

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.03.047

# 神经纤毛蛋白-1 与肿瘤的关系\*

董 萍 综述, 蔡华伟, 李 林<sup>△</sup> 审校

(四川大学华西医院核医学科, 成都 610041)

**关键词:** 神经系统; 纤毛; 神经纤毛蛋白-1; 肿瘤; C 末端元件多肽; 综述**中图分类号:** R817.1**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2015)03-0412-03

神经纤毛蛋白-1(neuropilin-1, NRP-1)为一种多功能信号传导跨膜蛋白,其参与转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、血管内皮生长因子(VEGF)等信号通路的信号传导<sup>[1-3]</sup>,在生长发育、免疫、肿瘤方面起着重要的作用。近年来关于 NRP-1 的研究已从最初的神经系统发育扩展到血管形成、肿瘤发生与发展、造血系统疾病、免疫系统功能等多个领域<sup>[4]</sup>,而关于 NRP-1 在肿瘤发生、发展机制中的作用也逐渐成为研究热点。研究表明, NRP-1 表达于内皮细胞及肿瘤细胞,可作为血管内皮生长因子 165(VEGF165)及与血管新生相关的其他几种 VEGF 家族成员的受体,在肿瘤血管新生方面发挥重要作用, NRP-1 在某些肿瘤中过度表达,是其不良预后的独立危险因素<sup>[5]</sup>。Teessalu 等<sup>[6]</sup>研究发现,具有 C 末端 R/KXXR/K(X 为任意氨基酸)特征的肿瘤导向肽能与 NRP-1 高效、特异性结合,该类 C 末端元件依靠肿瘤识别序列与肿瘤细胞特异性结合,在细胞表面经肽酶剪切后暴露出 C 末端的 R/KXXR/K 序列,能被细胞表面的跨膜转运蛋白 NRP-1 所识别结合,并携带进入细胞内部。

## 1 NRP-1 的结构及生物学特性

1995 年 Fujisawa 等首次报道位于形成中的神经纤维轴突上的跨膜糖蛋白 NRP-1,其相对分子质量约  $130 \times 10^3$ ,并进一步证实其为轴突导向分子(Semaphorin, Sema)家族受体,在神经细胞导向、轴突生长方面发挥调节作用。之后发现的 NRPs 家族中的另一成员 NRP-2,与 NRP-1 有 44% 的同源性,尽管二者在胚胎神经系统及成人部分组织中的表达有重叠,但在配体结合、下游调控功能上均不同。人 NRP-1 与 NRP-2 分别定位于染色体 10p12 和 2q34,基因长度各为 112 kb 和 110 kb,均由 17 个外显子和 16 个内含子组成。NRP 家族由胞外区、跨膜区及胞内区 3 部分组成。其中胞外区又有 3 个不同的结构域,分别称为 a1/a2, b1/b2 和 c。其中 a1/a2 结构域与 b1/b2 结构域是 NRP-1 与配体(Sema3A)结合的位点, b1/b2 区负责与 VEGF165 结合并与 NRP-1 介导细胞的黏附作用有关, a1/a2 区和 c 区负责形成 NRP 二聚体。近膜的 c 结构域与 NRP-1 传导其配体的信号密切相关<sup>[7]</sup>。

大量的体外和体内实验研究证实, NRP-1 和 NRP-2 在多种细胞表面均有一定表达,包括内皮细胞、神经元细胞、胰岛细胞、肝细胞、黑色素细胞和成骨细胞等。最新研究表明, NRP 表达于多个器官的内皮细胞,如皮肤、乳腺、前列腺、肺、肾脏及膀胱<sup>[8]</sup>。动脉的内皮细胞主要表达 NRP-1,而静脉及淋巴管的内皮细胞则主要表达 NRP-2。在免疫系统中, NRP-1 主要表达于胸腺细胞、类浆细胞、树突细胞、调节性 T 细胞。在老鼠体内, NRP-1 主要表达于静息或活化的调节性 T 细胞,但在

人体内, NRP-1 主要表达在活化的调节性 T 细胞表面<sup>[6]</sup>。

## 2 NRP-1 在肿瘤中的作用机制

2011 年 Jubb 等<sup>[9]</sup>通过抗体染色免疫组织化学分析和原位杂交技术证实了 NRP-1, NRP-2 在正常组织和肿瘤组织中表达不一致,绝大部分肿瘤细胞、肿瘤新生血管内皮细胞及肿瘤新生淋巴管内皮细胞均会高表达 NRP-1 和 NRP-2。但 NRPs 在不同肿瘤细胞中的表达明显不同。对肺癌和乳腺癌患者及大鼠模型的肿瘤细胞的研究发现, NRP-1 在原发性乳腺癌和转移性乳腺癌组织中的表达阳性率分别为 6% 和 14%,而在原发性非小细胞肺癌中为 36%,在转移性非小细胞肺癌中可达 50%<sup>[9]</sup>。Jubb 等<sup>[9]</sup>发现 85% 的恶性黑色素瘤患者肿瘤组织中 NRP-2 表达呈阳性,如果对病理样本中 NRP-1 与 NRP-2 进行复染, NRPs 的阳性率可能会更高<sup>[10]</sup>。由于 NRPs 可与多种癌症相关分子相互作用,所以其在肿瘤发生、发展中的作用机制非常复杂,目前尚无明确的单一结论。NRP-1 主要表达在喉癌、食管癌、胃癌、胰腺癌等肿瘤细胞表面,这可能与两方面因素有关。首先是 NRP-1 的分布特点, Barr 等<sup>[11]</sup>用 5-(6)-羧基氢化荧光素(FAM)标记的抗 NRP-1 抗体与乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和正常脐静脉内皮细胞 HUVEC 分别孵育 18 h,在共聚焦显微镜下观察发现, NRP-1 既分布于肿瘤血管内皮细胞上,也直接分布于肿瘤细胞表面上,因此 NRP-1 可在肿瘤的这两个部位上分别发挥作用。另有研究表明, NRP-1 还表达于各种间质细胞,如纤维母细胞、免疫细胞等,这些细胞可与肿瘤细胞相互作用;且 NRP-1 与纤连蛋白结合后可激活  $\alpha 5 \beta 1$  整合素,该整合素调节纤维母细胞和可溶性纤连蛋白的相互作用,从而促进依赖  $\alpha 5 \beta 1$  整合素的纤连蛋白在肿瘤细胞的聚集,进而促进肿瘤生长<sup>[12]</sup>。其次, NRP-1 作用结果可能根据其结合配体的不同而不同。研究证实, NRP-1 为跨膜的非酪氨酸蛋白激酶受体,且为 Sema 家族及 VEGF 家族的共受体,但其与 2 种配体结合时发挥的作用不同<sup>[13]</sup>。Sema 家族与 VEGF 家族的成员能竞争性 NRP-1 结合,相互间可视为拮抗剂。具体来说,如果 NRP-1 与配体 VEGF 家族成员结合,则可促进肿瘤血管的新生及肿瘤细胞的增殖;反之,如果 NRP-1 与配体 Sema 家族成员结合,则可抑制肿瘤血管的新生及肿瘤细胞的增殖。而 NRP-2 是肿瘤淋巴管生成过程中一个重要影响因素, Caunt 等<sup>[14]</sup>利用 NRP-2 的抗体来竞争性抑制 NRP-2 与 VEGF-C 的结合,能抑制 VEGF-C 所诱导的肿瘤细胞向淋巴管内皮细胞的侵袭,抑制肿瘤性淋巴管生成,防止肿瘤向局部及远端淋巴结转移。最近的研究表明,在小鼠模型中,抗 VEGF、抗 NRP-1 治疗和单克隆抗体治疗具有协同抗癌

\* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81371585;81301250)。

作者简介:董萍(1989-),硕士,主要从事放射性核素标记多肽用于肿瘤靶向治疗方向研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel:18980601584; E-mail:lilinhuaxi@sina.com。

作用<sup>[15]</sup>。

### 3 NRP-1 与肿瘤治疗预后的关系

NRPs 在部分人类肿瘤细胞中的过度表达对肿瘤预后有重要影响,包括胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌,黑色素瘤,胶质母细胞瘤,白血病和淋巴瘤等。在恶性肿瘤中,NRP-1 的高表达通常预示不良预后,这可能与 NRP-1 的表达与肿瘤新生血管相关<sup>[9,16-17]</sup>。NRP-1 可通过依赖于 VEGF 的方式或独立作用于 VEGF 的方式参与肿瘤新生血管的调节;NRP-1 能增强 VEGF 受体对 VEGF 的效应,从而增强 VEGF 信号在细胞间的传导;或在某些没有表达 VEGF 受体而表达了 NRP-1 的肿瘤细胞中,NRP-1 也可与 VEGF 结合从而诱导肿瘤细胞增殖。研究发现,NRP-1 或 NRP-2 表达与乳腺癌的不良预后关系密切,目前已被评价为乳腺癌患者术后的一个独立预后因素<sup>[10]</sup>,此外,NRPs 在肿瘤细胞上表达量的高低,同样与临床肿瘤的侵袭性相关,在活检中发现恶性程度高的乳腺癌比恶性程度低的表达更多的 NRP-1<sup>[9]</sup>。Hong 等<sup>[16]</sup>发现 NRP-1 表达是非小细胞肺癌不良预后的一个独立因素,抑制 NRP-1 在肺癌细胞中的表达,能够降低肺癌的侵袭性并抑制肺癌的远处转移。此外,抑制小鼠正常上皮内 NRP-1 表达,可降低皮肤癌的发生率。NRP-1 与多种生长因子相互作用,如 VEGF、TGF- $\beta$ 、肝细胞生长因子(HGF)等都可以促进癌症的发生,这些信号通路相互影响,NRP-1 在这些应答中起着非常重要的作用,尤其是与 TGF- $\beta$  的相互作用。研究表明,与  $\alpha v\beta 3$  整合素结合后的 TGF- $\beta$  容易被 NRP-1 或 NRP-2 激活,当生长因子(GF)低表达时,活化的 TGF- $\beta$  抑制肿瘤细胞生长;而当其高表达时,活化的 TGF- $\beta$  促进肿瘤远处转移<sup>[2]</sup>。综上所述,由于 NRPs 的多功能性,它很可能参与肿瘤发生、发展、转移整个过程。

### 4 NRP-1 的结构及与 C 末端元件多肽的特异性结合

每种组织的脉管系统在蛋白质表达方面都是具有特异性的,这种分子差异性被称为“血管邮政编码”,这些选择性表达的蛋白质为特异性诊断和治疗的化合物提供靶点。目前,各种各样的肿瘤导向肽存在于临床前期和临床期的发展中。可是,细胞外基质中血管畸形、纤维变性、收缩有助于增加肿瘤组织液压力,从而阻碍药物进入血管外肿瘤组织。晶体学研究表明,VEGF 的 C 末端元件能与 NRP-1 的 b1 位点结合<sup>[17]</sup>。这预示可以通过制备能进入 b1 位点的小药盒来抑制 NRP-1 与 VEGF 结合,这些药物可能还同时抑制其他结合于 b1 位点的配体。Jarvis 等<sup>[18]</sup>最近通过分子设计发现了一种类似的小药盒(EG00229),它能阻止 VEGF-A 与 NRP-1 结合,降低肺癌细胞 A549 的生存能力。值得注意的是,它还能增加细胞毒药物(如 5-氟尿嘧啶)对肿瘤细胞的杀伤效力。Alberici 等<sup>[19]</sup>和 Sugahara 等<sup>[20]</sup>报道了一类新的环状组织穿透型肿瘤导向肽 iRGD 多肽(CRGDK/RGPDC)。它包含两段序列:一段是 RGD 肿瘤特异性识别序列,可特异地结合在肿瘤血管内皮和肿瘤细胞的整合素  $\alpha v\beta 3/5$  上;另一段是隐藏的 R/KXXR/K-OH 序列,X 为任意氨基酸,首尾为 R 或 K。iRGD 多肽首先依靠肿瘤识别 RGD 序列与肿瘤细胞特异性结合,在细胞表面经肽酶剪切后暴露出 C 末端的 R/KXXR/K 序列,该序列能被细胞表面的跨膜转运蛋白 NRP-1 所识别结合,并进入细胞内部<sup>[17,19]</sup>。这段 C 末端序列(R/KXXR/K)能增加多肽对肿瘤组织的穿透性,并能携带小分子化学药物、生物毒性药物,放射性治疗核素或纳米粒子药物深入肿瘤组织中。基于当前导向序列和 C 末端序列内在化受体这一知识体系,发展出的一类新

的多肽被称为 C 末端元件多肽(C-end Rule motif peptides, CRMP)。最新人工设计出的一种 C 末端元件多肽 iNGR(CRNGRGPDC),包含了识别血管内皮细胞 CD13 的 NGR 序列,C 末端元件序列(RNGR),以及 iRGD 中被证实的肽酶酶切位点(GPDC)3 个部分。iNGR 多肽首先通过 NGR 序列结合到 CD13 阳性的肿瘤细胞表面,经肽酶酶切后暴露出 C 末端元件 RNGR,进一步识别和结合 NRP-1,从而携带药物进入肿瘤细胞内。裸鼠原位肿瘤模型证实,这种新多肽能有效地结合 CD13 阳性肿瘤细胞,并能比标准的 NGR 多肽更加深入肿瘤组织内部,连接有 iNGR 的阿霉素明显比单纯的阿霉素有更好的肿瘤抑制效果<sup>[5]</sup>。这些结果表明肿瘤特异性组织导向肽能够根据现有的序列进行设计加工,而这一原理也有望应用于其他疾病的治疗。

### 5 展望

综上所述,NRP-1 在绝大多数肿瘤细胞表面均高表达,在肿瘤的发生、发展、转移过程中发挥重要作用,是肿瘤细胞的表面标志物之一。如果 NRP-1 与配体 VEGF 家族成员结合,则可促进肿瘤血管的新生及肿瘤细胞的增殖。反之,如 NRP-1 与配体 Sema 家族成员结合,则可抑制肿瘤血管的新生及肿瘤细胞的增殖。由于 NRPs 与很多癌症相关分子相互作用,所以其在肿瘤中的作用机制难以明确。在恶性肿瘤中,NRP-1 的高表达通常预示不良预后,这可能与 NRP-1 促肿瘤血管新生有关。具有 C 末端 R/KXXR/K 特征的多肽序列能被细胞表面的跨膜转运蛋白 NRP-1 所识别结合,并携带药物分子进入细胞内部,将偶联药物分子的 CRMP 序列与其他肿瘤识别序列偶联,可进一步增强多肽药物对肿瘤细胞的筛选结合能力并提高药物抗肿瘤的效果。

近年来,以 NRP-1 作为肿瘤治疗靶点成为了抗肿瘤研究的热点之一。例如,用抗体、肽类物质等抑制 NRP-1 的抗肿瘤疗法<sup>[5]</sup>,药物既能通过作用于 VEGF 来调节 NRP-1,研究发现 NRP-1 结合肽还能抑制癌细胞生长并增加癌细胞对化疗药的敏感性(如 5-氟尿嘧啶、紫杉醇、顺铂)<sup>[17]</sup>。此外,随着 NRP-1 与肿瘤形成、侵袭机制的逐渐明确,以 C 末端元件为代表的 NRP-1 靶向小分子多肽,也有可能被开发为新型放射性同位素药物载体,用于改善传统的放射性粒子包埋技术,达到靶向性抗肿瘤治疗的目的,有望成为抗肿瘤药物发展的新方向。

### 参考文献:

- [1] Sulpice E, Plouët J, Bergé M, et al. Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity[J]. *Blood*, 2008, 111(4): 2036-2045.
- [2] Glinka Y, Stoilova S, Mohammed N, et al. Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(4): 613-621.
- [3] Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, et al. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27(26): 3746-3753.
- [4] Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, et al. Neuropilins: structure, function and role in disease[J]. *Biochem J*, 2008, 411(2): 211-226.
- [5] Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, et al. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into

- tumors[J]. *Cancer Cell*, 2009, 16(6): 510-520.
- [6] Teesalu T, Sugahara KN, Kotamraju VR, et al. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(38): 16157-16162.
- [7] Roskoski R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 62(3): 179-213.
- [8] Tran DQ, Shevach EM. Therapeutic potential of FOXP3 (+) regulatory T cells and their interactions with dendritic cells[J]. *Hum Immunol*, 2009, 70(5): 294-299.
- [9] Jubb AM, Strickland LA, Liu SD, et al. Neuropilin-1 expression in cancer and development[J]. *J Pathol*, 2012, 226(1): 50-60.
- [10] Prud'homme GJ, Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity[J]. *Oncotarget*, 2012, 3(9): 921-939.
- [11] Barr MP, Byrne AM, Duffy AM, et al. A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(2): 328-333.
- [12] Yaqoob U, Cao S, Shergill U, et al. Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 4047-4059.
- [13] Neufeld G, Kessler O, Herzog Y. The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors
- for VEGF[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2005(515): 81-90.
- [14] Caunt M, Mak J, Liang WC, et al. Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(4): 331-342.
- [15] Pan Q, Chanthery Y, Liang WC, et al. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(1): 53-67.
- [16] Hong TM, Chen YL, Wu YY, et al. Targeting neuropilin-1 as an antitumor strategy in lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(16): 4759-4768.
- [17] Jia H, Cheng L, Tickner M, et al. Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(3): 541-552.
- [18] Jarvis A, Allerston CK, Jia H, et al. Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction[J]. *J Med Chem*, 2010, 53(5): 2215-2226.
- [19] Alberici L, Roth L, Sugahara KN, et al. De novo design of a tumor-penetrating peptide[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(2): 804-812.
- [20] Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, et al. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs[J]. *Science*, 2010, 328(5981): 1031-1035.

(收稿日期: 2014-08-21 修回日期: 2014-11-14)

• 综述 • doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2015.03.048

## 人工关节假体周围感染的实验室检查

李程旭 综述, 黄伟<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学附属第一医院骨科 400016)

**关键词:** 人工关节; 假体和植入物; 实验室技术和方法; 假体周围感染进展

**中图分类号:** R446.9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2015)03-0414-04

随着医学技术的发展,人工关节置换已成为重建关节功能的主要手段,这使不少关节疼痛及关节功能障碍的患者明显提高了生活质量,与此同时人工关节翻修手术也越来越多。人工关节翻修的原因主要有:无菌性松动、人工关节脱位、假体磨损、假体周围骨折、假体周围感染(prosthetic joint infection, PJI)等。无菌性松动及假体周围感染是人工关节翻修排在第2位的原因,其中PJI是人工关节置换术后最严重的并发症之一。据统计人工髋关节的感染率为0.3%~1.7%<sup>[1]</sup>,人工膝关节的感染率为0.8%~1.9%<sup>[1]</sup>,人工肩关节的感染率为0.7%,人工肘关节的感染率为3.0%<sup>[2-3]</sup>。虽然PJI发病率较低,但一旦发生将严重影响关节功能,降低患者的生活质量,常需再次手术及长时间的抗菌药物治疗,严重者需行关节融合甚至截肢而导致终生残疾,给患者带来极大的身心及经济压力。近年来对PJI的研究越来越多,在实验室检测方面产生新的认识,出现新的检测方法。下面就PJI定义、致病菌及实验室检

查进行综述。

### 1 PJI的定义及诊断

PJI的诊断一直是一种挑战,目前无任何一种检查可以做到绝对的准确,诊断无“金标准”可言<sup>[4]</sup>。PJI的诊断主要依靠临床表现、实验室检查及影像学检查等综合考虑。骨科界试图通过多种指标的组合定义PJI,由此提出了许多不同的定义<sup>[4]</sup>。2011年11月美国骨科感染学会提出了一个新的PJI定义,(1)存在与假体相通的窦道;(2)或受累人工关节的两处假体周围组织或关节液标本中分离出同一病原体;(3)或满足以下6条中的4条:①红细胞沉降率或C-反应蛋白(CRP)水平升高;②滑膜白细胞(WBC)数升高;③滑膜中性粒细胞百分比升高;④受累关节出现化脓表现;⑤假体周围组织或关节液标本中一次培养分离出微生物;⑥400倍放大率下,假体周围组织的病理学分析在5个高倍镜视野下发现大于5个中性粒细胞<sup>[5]</sup>。若满足第3种标准不少于4条,PJI可能存在。但是对