

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.08.014

胃癌组织中 NRP-1 的表达与临床病理特征及预后的相关性*

徐卫国¹,杨少君¹,王宇鹏²,刘云³,张世伟⁴,徐洪⁵,贾纯亮⁶,孙红⁷,刘和亮⁵

(1. 河北联合大学附属医院肿瘤外科,河北唐山 063000;2. 天津市北辰医院肿瘤科 300400;3. 河北省廊坊市中医医院内科 065000;4. 浙江省富阳市人民医院肿瘤外科 311400;5. 河北联合大学医学研究实验中学,河北唐山 063000;6. 河北省唐山市人民医院胃肠外科 063000;7. 河北联合大学基础医学院病理学系,河北唐山 063000)

[摘要] 目的 检测胃癌组织中神经纤毛蛋白-1(NRP-1)的表达,分析其与胃癌临床病理特征之间的关系,探讨其对判断胃癌预后的价值。**方法** 回顾性分析 168 例胃癌患者的临床病理资料及预后情况,采用免疫组化法检测癌组织及相对正常组织 NRP-1 的表达,研究 NRP-1 的表达与临床病理及预后之间的关系。**结果** (1)NRP-1 在胃癌组织中表达高于相对正常组织(66.7% vs. 8.33%, $P<0.05$)。(2)NRP-1 的表达与肿瘤大小、细胞分化程度、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有关($P<0.05$)。(3)NRP-1 高表达的患者生存期短于低表达的患者(中位生存期 28 个月 vs. 64 个月, $P<0.05$)。(4)COX 比例风险模型进行多因素分析表明,NRP-1 的表达为影响胃癌预后的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** (1)NRP-1 在胃癌的发生、发展中起到重要作用,与胃癌的恶性生物学行为密切相关。(2)NRP-1 高表达提示预后不良。(3)NRP-1 有望作为判断胃癌生物学行为和预后的参考指标。

[关键词] 胃肿瘤;预后;神经纤毛蛋白-1**[中图分类号]** R735.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)08-1049-04**Expression of NRP-1 in gastric cancer tissue and its correlation with clinicopathological characteristics and prognosis***Xu Weiguo¹, Yang Shaojun¹, Wang Yupeng², Liu Yun³, Zhang Shiwei⁴, Xu Hong⁵, Jia Chunliang⁶, Sun Hong⁷, Liu Heliang⁵

(1. Department of Oncologic Surgery, Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China;

2. Department of oncology, Tianjin Beichen Hospital, Tianjin 300400, China;

3. Department of Internal Medicine, Langfang Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Langfang, Hebei 065000, China; 4. Department of Oncologic Surgery, Fuyang Municipal People's

Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310000, China; 5. Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China;

6. Department of Gastrointestinal Surgery, Tangshan Municipal People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China;

7. Department of Pathology, Basic Medical College, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of NRP-1 in gastric cancer tissue, to analyze its relationship with clinicopathological features, and to explore its value in judging the prognosis of gastric cancer. **Methods** The clinical pathologic data and prognosis situation in 168 cases of gastric cancer were retrospectively analyzed. The expression of NRP-1 in gastric cancer tissue and normal tissue was detected by the immunohistochemical method. The relationship between the expression of NRP-1 with the clinicopathological features and prognosis was investigated. Whether NRP-1 serving as a reference indicator for judging the prognosis of gastric cancer was evaluated. **Results** (1) In 168 cases, the NRP-1 expression in gastric cancer tissue was higher than that in normal tissue (66.7% vs. 8.33%, $P<0.05$). (2) The NRP-1 expression was related with the tumor size, differentiation degree, infiltrative depth, lymph node metastasis and TNM stage ($P<0.05$). (3) The median survival time in the patients with high NRP-1 expression was shorter than that in the patients with low NRP-1 expression ($P<0.05$). (4) The multiple factor analysis by COX proportional hazard model showed that the NRP-1 expression was an independent risk factor for the prognosis of gastric cancer ($P<0.05$). **Conclusion** (1) NRP-1 plays an important role in the incidence and development process of gastric cancer and its expression is closely related with the malignant biological behavior of gastric cancer. (2) The high NRP-1 expression prompts poor prognosis. (3) NRP-1 may be expected to be regarded as one of the indexes for judging the biologic behaviors and prognosis of gastric cancer.

[Key words] gastric neoplasms; prognosis; neuropilin-1

胃癌是最常见的消化道肿瘤之一,在全世界居恶性肿瘤死亡率第 2 位^[1]。我国胃癌的患病率及死亡率均明显高于世界平均水平^[2]。由于早期胃癌缺乏典型的临床症状,临床确诊的

胃癌病例多为进展期胃癌^[3]。导致患者死亡的原因多为肿瘤的复发及转移,而血液转移及淋巴管转移是恶性肿瘤转移的重要途径。神经纤毛蛋白-1(neuropilin-1, NRP-1)于 1995 年首

* 基金项目:河北省科学技术研究与发展计划(10276115D)。 作者简介:徐卫国(1966—),博士,主任医师,主要从事肿瘤临床与基础方面的研究。

次被 Fujisawa 等^[4]发现并命名。后被证明 NRP-1 可与神经轴突导向因子 Semaphorin3A(Sema3)结合,在神经发育过程起作用^[5]。近来研究表明,NRP-1 还可作为血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的受体,表达于肿瘤细胞,参与肿瘤细胞的增殖和转移^[6]。本文通过观察胃癌组织中 NRP-1 的表达与临床病理及预后的关系,进一步判断 NRP-1 在胃癌预后中的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集河北联合大学附属医院 2005 年 1 月至 2010 年 12 月行胃癌手术的 168 例患者(所有患者术前均未接受肿瘤相关治疗,术后均未行放疗、二次手术及生物免疫治疗)的临床病理资料,包括患者性别、年龄、发病部位、肿瘤大小、细胞分化程度、浸润深度、区域淋巴结转移情况及是否行围术期化疗,并对上述患者行电话、书信随访。观察终点为总生存期(overall survival, OS),定义为确诊胃癌时间至最后因癌肿引起死亡的时间。到随访截止时间 2014 年 12 月 30 日,168 例患者中,6 例失去联系方式,12 例死于其他疾病。168 例胃癌病例中,男 101 例,女 67 例。年龄 28~82 岁,中位年龄 54 岁,60 岁以下者 98 例,60 岁及以上者 70 例。肿瘤原发部位:上部 58 例,中部 72 例,下部 38 例。原发肿瘤最大直径大于 5 cm 者 116 例,小于或等于 5 cm 者 52 例。肿瘤细胞分化程度:高分化 32 例,中分化 42 例,低分化 94 例。肿瘤浸润深度:侵及黏膜及黏膜下者 19 例,侵及肌层者 57 例,侵及浆膜及浆膜外者 92 例。无区域淋巴结转移者 26 例,淋巴结转移 1~7 个者 95 例,大于 7 个者 47 例。行围术期化疗者 104 例,未行者 64 例。采用美国癌症联合会标准(第 7 版)对病理行 TNM 分期:Ⅰ期 27 例,Ⅱ期 34 例,Ⅲ期 107 例。

1.2 切片来源及处理 收集上述 168 例患者的术后癌组织及相对正常组织(距离瘤体 5 cm 以上^[7])。各取组织标本经脱水,甲醛固定,二甲苯透明,蜡块包埋,5 μm 每层连续切片,用

于免疫组化检测 NRP-1 在胃癌组织中的表达。病理标本及临床资料的收集均由医学伦理委员会讨论通过。

1.3 仪器与试剂 免疫组化试剂盒及二抗购于北京中杉金桥公司,兔抗人 NPR-1 单克隆抗体购于巴傲德生物公司。主要仪器有光学显微镜等。

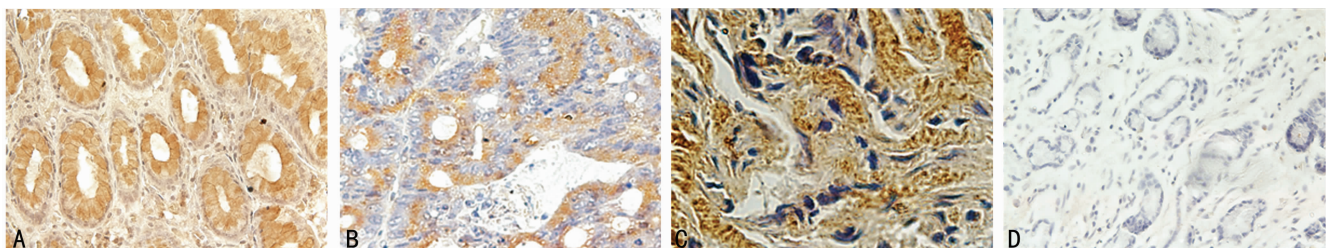
1.4 实验方法 采用免疫组化染色法检测 168 例胃癌组织中 NRP-1 的表达。实验均严格按照说明操作,采用 PBS 液为一抗行阴性对照实验。

1.5 免疫组化结果判定 参照文献[8]中的方法,对 NRP-1 的表达以阳性细胞百分率和染色强度得分总和进行判定。随机选取 5 个高倍镜视野($\times 400$):(1)阳性细胞数目低于 5% 为 0 分,5%~25% 为 1 分,25%~50% 为 2 分,>50% 为 3 分。(2)无染色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。将两项相加,0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为中等阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。两项相加大于或等于 3 分为高表达,<3 分为低表达。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理。两组间及多组间非等级资料差异采用 χ^2 检验;多组间等级资料的比较,采用 Mann-Whitney U 法;生存分析采用 Kaplan-Meier 法,组间差异采用 log-rank 法检验;采用 COX 比例风险回归模型评估影响预后因子的独立性。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 NRP-1 蛋白水平的表达 NRP-1 表达于胃癌细胞的胞质,染色为淡黄色至棕褐色为阳性表达,无特异染色者为阴性(图 1)。168 例胃癌组织中,112 例免疫组化结果评定为高表达,比率为 66.7%;相对正常组织中,14 例高表达,比率为 8.33%,胃癌组织中 NRP-1 的阳性表达高于相对正常组织($\chi^2=121.956, P=0.000$)。



A:正常组织中 NRP-1 的阳性表达;B:高分化腺癌中 NRP-1 的阳性表达;C:低分化腺癌组织中 NRP-1 的阳性表达;D:PBS 代替一抗的阴性对照。

图 1 胃癌组织及相对正常组织中 NRP-1 免疫组化染色结果

2.2 胃癌组织中 NRP-1 的蛋白表达水平与临床病理特征之间的关系 将 168 例患者临床病理资料与 NRP-1 表达情况进行统计学分析,发现 NRP-1 的蛋白表达水平与肿瘤大小、细胞分化程度、肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有关($P<0.05$),而与患者性别、年龄及发病部位无关($P>0.05$),见表 1。

2.3 胃癌组织 NRP-1 的表达与预后的关系

2.3.1 Kaplan-Meier 法评定 NRP-1 的表达与胃癌患者预后的关系 168 例胃癌患者的中位生存期为 37 个月,NRP-1 低表达的患者中位生存期 64 个月,NRP-1 高表达的患者中位生存期为 28 个月,log-rank 检验表明组间差异具有统计学意义

($\chi^2=29.150, P=0.000$),见图 2。

2.3.2 COX 多因素分析 本实验组建立 COX 比例风险模型,纳入的临床病理因素包括性别、年龄、发病部位、肿瘤大小、细胞分化程度、浸润深度、淋巴结转移、NRP-1 的表达、TNM 分期、是否行围术期化疗。进行多因素分析表明,TNM 分期(95%CI 4.238~16.704, $P=0.000$)、淋巴结转移(95%CI 2.046~4.767, $P=0.000$)、肿瘤浸润深度(95%CI 1.001~2.027, $P=0.049$)、NRP-1 的表达水平(95%CI 1.006~1.989, $P=0.046$)、围术期化疗(95%CI 0.390~0.939, $P=0.025$)是影响本组胃癌患者预后的独立危险因素。性别、年龄、发病部位、肿瘤大小、细胞分化程度均不是影响本组胃癌患

者预后的独立危险因素($P>0.05$),见表 2。

表 1 胃癌组织中 NRP-1 的表达与临床病理特征之间的关系

临床病理特征	n	NRP-1 表达[n(%)]		χ^2/Z	P
		高表达	低表达		
性别					
男	101	67(66.3)	34(33.7)	0.911	0.524
女	67	45(67.2)	22(32.8)		
年龄(岁)					
<60	98	60(61.2)	38(38.8)	3.135	0.097
≥60	70	52(41.3)	18(58.7)		
肿瘤大小(cm)					
≤5	52	26(40.4)	26(59.6)	9.414	0.003
>5	116	86(74.1)	30(25.9)		
发病部位*					
上	58	35(60.3)	23(39.7)		
中	72	51(70.8)	21(29.2)	2.000	0.572
下	38	26(68.4)	12(31.6)		
细胞分化					
高	32	15(46.9)	17(53.1)		
中	42	22(52.4)	20(47.6)	-4.031	0.000
低	94	75(79.8)	19(20.2)		
浸润深度					
黏膜及黏膜下	19	5(26.3)	14(73.7)		
肌层	57	34(59.6)	23(40.4)	21.842	0.000
浆膜及浆膜外	92	73(79.3)	19(20.7)		
淋巴结转移(个)					
0	26	8(30.8)	18(69.2)		
1~7	95	67(70.5)	18(29.5)	-3.488	0.000
≥7	47	37(78.7)	10(21.3)		
TNM 分期					
I	27	10(37.3)	17(62.4)		
II	34	18(52.9)	16(47.1)	-4.480	0.000
III	107	84(78.5)	23(21.5)		

发病部位*:将胃的大、小弯等分 3 份,连接其对应点,上 1/3 为上部,中 1/3 为中部,下 1/3 为下部。

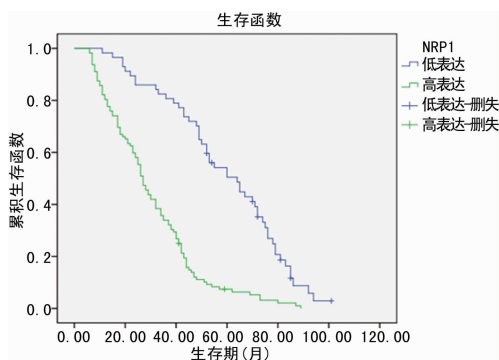


图 2 NRP-1 的表达与胃癌患者生存的关系

表 2 168 例胃癌患者 COX 比例风险模型多因素分析结果

相关因素	P	相对危险值	95%CI	
			下限	上限
性别	0.610	0.906	0.619	1.325
年龄	0.228	0.991	0.975	1.006
发病部位	0.543	0.918	0.697	1.209
肿瘤大小	0.486	1.139	0.790	1.642
分化程度	0.272	0.882	0.706	1.103
浸润深度	0.049	1.425	1.001	2.027
淋巴结转移	0.000	3.123	2.046	4.767
围术期化疗	0.025	0.605	0.390	0.939
NRP-1 的表达	0.046	1.414	1.006	1.989
TNM 分期	0.000	8.414	4.238	16.704

3 讨论

多项研究已经证明 NRP-1 表达于多种恶性肿瘤细胞以及肿瘤血管内皮细胞^[9],如前列腺癌^[10]、乳腺癌^[11]、结直肠癌^[12-13]、肝癌^[14]等。NRP-1 的表达在癌组织较为显著,在癌旁及正常组织表达水平下降或不表达^[15]。NRP-1 作为 VEGF 的受体之一与 VEGF-165 结合,促进肿瘤血管的生成及肿瘤的增殖,从而参与肿瘤的生长、侵袭及转移^[16]。

本研究通过免疫组化方法检测胃癌组织中 NRP-1 蛋白表达水平,同时分析相关的临床病理数据,发现 NRP-1 的表达与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移、细胞分化程度相关,与既往的报道基本一致^[17-18],表明 NRP-1 与胃癌的发生及发展过程相关。随着肿瘤的直径增大,胃周区域淋巴结转移的增多,NRP-1 的表达水平增高($P<0.05$),表明 NRP-1 可能参与了胃癌细胞的增殖、侵袭及转移;随着临床 TNM 分期的进展,NRP-1 的表达发生变化($P<0.05$),说明 NRP-1 的表达与胃癌的恶性行为相关。

既往研究中曾证明,NRP-1 和恶性肿瘤的预后有关,主要通过影响肿瘤的侵袭转移能力及细胞敏感性影响预后生存^[19-20],可能成为肿瘤治疗的新型靶点。Cheng 等^[21]应用实时荧光定量聚合酶链反应及免疫组化法检测膀胱癌中的 NRP-1 的基因水平及蛋白水平的表达,经多因素分析得出 NRP-1 的表达是影响膀胱癌预后的独立因素。Osada 等^[22]也提出 NRP-1 的高表达提示神经胶质瘤的预后不良,且 NRP-1 的表达比 VEGF 的表达更能促进神经胶质瘤的生长及转移。本研究发现胃癌细胞中 NRP-1 蛋白水平高表达的患者中位生存期 28 个月,而低表达的患者中位生存期 64 个月,提示 NRP-1 的高表达者预后不良。本研究中建立的 COX 比例风险模型多因素分析显示 TNM 分期、淋巴结转移、肿瘤浸润深度、围术期化疗为影响胃癌预后的独立危险因素($P<0.05$),与既往研究基本一致^[23-24]。本研究观察到本组胃癌患者中 NRP-1 的表达是影响胃癌预后的独立危险因素($P<0.05$),提示 NRP-1 的高表达水平与胃癌的临床转归呈负相关。

综上所述,笔者认为 NRP-1 的表达与胃癌的部分临床及病理特点相关,有望成为判断预后的观察指标之一,且可能成为胃癌药物治疗的新型靶点。但本研究仅应用免疫组化方法对 NRP-1 的蛋白水平进行分析,其基因学及分子影响机制尚不完全明确,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [2] Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. The incidences and mortalities of major cancers in China, 2010 [J]. *Chin J Cancer*, 2014, 33(8):402-405.
- [3] Yoon H, Lee DH. New approaches to gastric cancer staging: beyond endoscopic ultrasound, computed tomography and positron emission tomography [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(38):13783-13790.
- [4] Fujisawa H, Takagi S, Hirata T. Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in xenopus optic nerve fibers [J]. *Dev Neurosci*, 1995, 17(5/6):343-349.
- [5] Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, et al. Neuropilin is a semaphorin III receptor [J]. *Cell*, 1997, 90(4):753-762.
- [6] Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2002, 51(5):33-48.
- [7] Rogatsch H, Hittmair A, Reissigl A, et al. Microvessel density in core biopsies of prostatic adenocarcinoma: A stage predictor? [J]. *J Pathol*, 1997, 182(2):205-210.
- [8] 黎明, 彭勃, 谈顺, 等. 直肠癌 NRP-1、VEGF-C 的表达与直肠系膜淋巴结转移的关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(24):3659-3662.
- [9] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 226(1):50-60.
- [10] Pallaoro A, Braun GB, Moskovits M. Quantitative ratio-metric discrimination between noncancerous and cancerous prostate cells based on neuropilin-1 overexpression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(40):16559-16564.
- [11] Vintonenko N, Pelaez-Garavito P, Buteau-Lozanoh B, et al. Overexpression of VEGF189 in breast cancer cells induces apoptosis via NRP1 under stress conditions [J]. *Cell Adh Migr*, 2011, 5(4):332-343.
- [12] Staton CA, Koay I, Wu JM, et al. Neuropilin-1 and neuropilin-2 expression in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal cancer [J]. *Histopathology*, 2013, 62(6):908-915.
- [13] 徐卫国, 杨小青, 郝世柱, 等. 大肠癌组织中 Neuropilin-1 的表达及其与肿瘤血管生成的相关性研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14(1):29-33.
- [14] Xu J, Xia J. NRP-1 silencing suppresses hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(1):150-154.
- [15] Jubb AM, Strickland LA, Liu SD, et al. Neuropilin-1 expression in cancer and development [J]. *J Pathology*, 2012, 226(1):50-60.
- [16] Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, et al. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(5):584-593.
- [17] 胡希宏, 王云忠, 金桂龙, 等. Neuropilin-1 与胃癌发生、发展及血管生成的关系 [J]. *浙江医学*, 2013, 35(5):347-350.
- [18] Akagi M, Kawaguchi M, Liu W, et al. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(5):796-802.
- [19] Miao HQ, Lee P, Lin H, et al. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression [J]. *FASEB J*, 2000, 14(15):2532-2539.
- [20] 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.
- [21] Cheng W, Fu D, Wei ZF, et al. NRP-1 expression in bladder cancer and its implications for tumor progression [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(6):6089-6094.
- [22] Osada H, Tokunaga T, Nishi M, et al. Overexpression of the neuropilin 1 (NRP1) gene correlated with poor prognosis in human glioma [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(2B):547-552.
- [23] Huang CM, Lin JX, Zheng CH, et al. Prognostic impact of metastatic lymph node ratio on gastric cancer after curative distal gastrectomy [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(16):2055-2060.
- [24] Bang YJ, Kim YW, Yang HK, et al. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2012, 379(9813):315-321.

(收稿日期:2015-09-17 修回日期:2016-01-12)

(上接第 1048 页)

梗死模型大鼠经血管内皮生长因子 121 基因治疗后的血管新生 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(7):1241-1244.

- [19] 刘科, 唐文渊. VEGF-165 基因对创伤性脑损伤脑血流动力学影响的实验研究 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2012, 11(2):109-112.

- [20] 吴爱清, 郭雅娜. 急性脑梗死患者治疗前、后血清 TGF-

$\beta 1$ 、VEGF、HCY 水平的变化及临床意义 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2012, 19(6):372-373.

- [21] 刘惠良. 急性冠脉综合征患者血浆 HCY 水平变化与血管内皮功能及 VEGF 关系研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2005.

(收稿日期:2015-09-16 修回日期:2015-11-15)