

引用本文:胡杰,韩正祥,杜秀平.神经纤毛蛋白1和血管内皮生长因子受体2在肝细胞癌组织中的表达和临床意义[J].安徽医药,2021,25(3):512-515.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.020.

◇临床医学◇



神经纤毛蛋白1和血管内皮生长因子受体2 在肝细胞癌组织中的表达和临床意义

胡杰¹,韩正祥²,杜秀平²

作者单位:¹徐州医科大学研究生院,江苏 徐州 221000;

²徐州医科大学附属医院肿瘤科,江苏 徐州 221002

通信作者:杜秀平,男,主任医师,硕士生导师,研究方向为肿瘤的个体化治疗,Email:xzmcch@163.com

基金项目:江苏省“六大人才高峰”B类项目(2014-WSW-040);江苏省科教强卫创新团队(CXTDA2017034)

摘要: **目的** 检测神经纤毛蛋白1(NRP-1)和血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)在肝细胞癌组织及其癌旁正常肝组织中的表达情况,同时探讨NRP-1和VEGFR2的表达与肝细胞癌病人预后的关系。**方法** 收集2014年11月至2018年11月在徐州医科大学附属医院肝胆外科行手术切除并经病理学确诊为肝细胞癌病人的肿瘤石蜡标本40例及其癌旁正常肝组织标本20例,应用免疫组织化学法检测肝细胞癌组织及正常肝组织中NRP-1和VEGFR2的表达情况。对病人进行至少为期1年的随访,末次随访时间为2019年11月。**结果** NRP-1、VEGFR2在肝细胞癌组织中的表达 $[(0.398\pm 0.051), (0.454\pm 0.058)]$ 明显高于正常肝组织 $[(0.244\pm 0.095), (0.337\pm 0.064)]$ (均 $P<0.05$)。NRP-1、VEGFR2表达与肝细胞癌病人的肿瘤最大径、有无血管侵犯、分化程度、TNM分期明显相关(均 $P<0.05$),而与病人的性别、年龄、有无慢性肝炎病毒感染、甲胎蛋白水平、肿瘤数目、有无肝硬化、Child-Pugh分级无关(均 $P>0.05$)。NRP-1和VEGFR2的表达呈正相关($r=0.789, P<0.001$)。此外,NRP-1、VEGFR2表达高的肝细胞癌病人的术后1年内复发率高 $[63.64\% (14/22), 55.00\% (11/20)]$,而NRP-1、VEGFR2表达低的肝细胞癌病人的术后1年复发率较低 $[5.56\% (1/18), 20.00\% (4/20)]$ (均 $P<0.05$)。**结论** NRP-1、VEGFR2在肝细胞癌组织中均有高表达,在肝细胞癌的发生和发展中起重要作用,而NRP-1、VEGFR2的高表达提示病人预后不良。

关键词: 癌,肝细胞; 血管内皮生长因子受体2; 神经纤毛蛋白1; 预后

Expressions and clinical significance of NRP-1 and VEGFR2 in hepatocellular carcinoma

HU Jie¹, HAN Zhengxiang², DU Xiuping²

Author Affiliations: ¹School of Postgraduate, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China;

²Department of Oncology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China

Abstract: **Objective** To detect the expression of neuropilin 1 (NRP-1) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and normal liver tissues adjacent to the cancer, and explore the relationship between the expressions of NRP-1 and VEGFR2 with the prognosis of HCC patients. **Methods** The data of 40 HCC patients who underwent complete resection and pathological diagnosis from November 2014 to November 2018 in The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University were collected. The expression of NRP-1 and VEGFR2 in 40 HCC tissues and 20 paracancerous liver tissues was detected by immunohistochemistry. All patients were followed up after operation, the last followed-up time was November 2019. **Results** The expression rate of NRP-1 and VEGFR2 in HCC tissues $[(0.398\pm 0.051), (0.454\pm 0.058)]$ was significantly higher than that in paracancerous normal liver tissues $[(0.244\pm 0.095), (0.337\pm 0.064)]$ (all $P<0.05$). The expression of NRP-1 and VEGFR2 was significantly correlated with the maximum diameter, vascular invasion, differentiation and TNM stage of HCC patients (all $P<0.05$). There was no significant relationship between sex, age, chronic hepatitis virus infection, alpha fetoprotein level, tumor number, liver cirrhosis and Child-Pugh grade (all $P>0.05$). There was a positive correlation between the expression of NRP-1 and VEGFR2 ($r=0.789, P<0.001$). In addition, the recurrence rate within 1 year after operation was higher in HCC patients with high expression of NRP-1 and VEGFR2 $[63.64\% (14/22), 55.00\% (11/20)]$, while the recurrence rate was lower in patients with low expression of NRP-1 and VEGFR2 in HCC patients $[5.56\% (1/18), 20.00\% (4/20)]$ (all $P<0.05$). **Conclusion** NRP-1 and VEGFR2 are highly expressed in HCC tissues, and may play an important role in the occurrence and development of HCC, while the high expression of NRP-1 and VEGFR2 indicates poor prognosis.

Key words: Carcinoma, hepatocellular; Vascular endothelial growth factor receptor 2; Neuropilin-1; Prognosis

肝癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,它是全球导致癌症死亡的第二大原因。全球每年新增肝癌

病例 782 500 例,死亡 745 500 例,仅中国就占总病例和死亡人数的 50% 左右^[1]。其中肝细胞癌占原发性肝癌的 85%~90%^[2]。目前,手术切除和肝移植是唯一可能治愈的策略^[3],但在根治性切除后,尤其是在残余肝中,复发率仍然很高^[4],约 80% 病人在诊断时已为肿瘤晚期,中位生存期约为 8 个月,其预后普遍令人沮丧。近年来,人们对其侵袭和转移的分子机制进行了大量的研究,但有关肝细胞癌恶性和转移的详细机制尚不明确,因此,识别肝细胞癌可靠的肿瘤分子生物标记物对于个性化治疗和评估预后至关重要。神经纤毛蛋白 1(neuropilin-1, NRP-1)最初被描述为对神经元发育具有重要作用的信号受体^[5],同时很多研究发现,NRP-1 在许多癌症的血管生成和恶性进展中起重要作用,如:乳腺癌、非小细胞肺癌、前列腺癌、黑色素瘤和胰腺癌等^[6]。但它在肝细胞癌方面的相关研究鲜见报道,因此,本研究通过应用免疫组织化学法检测肝细胞癌组织及癌周正常肝组织的 NRP-1、血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)表达情况,探讨 NRP-1、VEGFR2 在肝细胞癌的表达与临床病理特征、预后的关系,为肝细胞癌的诊治、预后评估提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 11 月至 2018 年 11 月徐州医科大学附属医院肝胆外科行手术切除并经病理学确诊为肝细胞癌的石蜡包埋标本共 40 例,并获得 20 例癌旁正常肝组织标本,均有完整的临床资料。所有病人术前未接受任何抗肿瘤治疗,且经影像学检查排除远处转移。男性 25 例,女性 15 例;中位年龄 60 岁;有慢性肝炎病毒感染 26 例,无慢性肝炎病毒感染 14 例;合并肝硬化 26 例,未合并肝硬化 14 例;Child-Pugh 分级 A 级 29 例、B 级 11 例。病理分级高分化 8 例,中分化 21 例,低分化 11 例;TNM 分期 I 期 22 例,II 期 6 例,III 期 12 例。对所有病人进行至少为期 1 年的随访,记录病人术后 1 年复发情况,末次随访时间为 2019 年 11 月。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 方法 主要试剂包括购自美国的 affinity 公司的兔抗人 NRP-1 单克隆抗体,购自美国的 proteintech 公司的兔抗人 VEGFR2 单克隆抗体,购自福州迈新生物科技有限公司的兔 SP 免疫组化检测试剂盒和 DAB 显色剂。将 40 例肝细胞癌组织及 20 例正常肝组织标本蜡块制备成 4 μ m 厚连续切片,60 $^{\circ}$ C 烤片 2 h,行 NRP-1 和 VEGFR2 免疫组化染色。

1.3 判定标准 显微镜下观察组织细胞中 NRP-1 和 VEGFR2 蛋白的表达情况,选取 3 个高表达区域拍照保存(所有图片均 400 $\times$ 拍摄),使用 Image-Pro

Plus 图像分析软件对免疫组化图片进行处理,计算平均光密度(average optical density, AOD)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS Statistics 22.0 软件对数据进行统计学分析,使用 Shapiro-Wilk(W 检验)判断数据是否服从正态分布。NRP-1 和 VEGFR2 在肝细胞癌和癌旁正常肝组织的表达及与各临床病理参数之间的关系采用两独立样本 *t* 检验。NRP-1 和 VEGFR2 的表达的相关性采用 Pearson 相关分析。NRP-1 和 VEGFR2 的表达高低与病人术后复发关系采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肝细胞癌组织及正常肝组织的 NRP-1、VEGFR2 的表达情况 免疫组化结果显示,NRP-1 和 VEGFR2 主要表达在肿瘤细胞和血管内皮细胞的细胞质和细胞膜上(图 1)。NRP-1、VEGFR2 在肝细胞癌组织中 AOD 分别为 (0.398 ± 0.051) 、 (0.454 ± 0.058) ,在正常肝组织中的 AOD 分别为 (0.244 ± 0.095) 、 (0.337 ± 0.064) ,经 *t* 检验分析 NRP-1、VEGFR2 在肝细胞癌组织和正常肝组织中的表达差异有统计学意义($t=6.815, P<0.001$; $t=7.155, P<0.001$)。

2.2 NRP-1、VEGFR2 的表达与肝细胞癌临床病理特征的关系 肝细胞癌组织的 NRP-1、VEGFR2 的表达水平与病人性别、年龄、有无慢性肝炎病毒感染、甲胎蛋白水平、肿瘤数目、有无肝硬化、Child-Pugh 分级无明显相关性(均 $P>0.05$);而与病人肿瘤的最大径、有无血管侵犯、分化程度、TNM 分期有关(均 $P<0.05$)。见表 1。

2.3 肝细胞癌组织中 NRP-1 与 VEGFR2 的相关性分析 Pearson 相关分析显示,NRP-1 和 VEGFR2 在肝细胞癌组织中的表达存在正相关($r=0.789, P<0.001$)。

2.4 肝细胞癌组织中 NRP-1、VEGFR2 的表达与病人术后复发关系分析 根据 NRP-1、VEGFR2 各自的算术平均数分为高、低表达组,肝细胞癌组织中 NRP-1、VEGFR2 低表达组术后 1 年复发率[5.56% (1/18)、20.00% (4/20)]明显低于 NRP-1、VEGFR2 高表达组[63.64% (14/22)、55.00% (11/20)]($\chi^2=14.249, P<0.001$; $\chi^2=5.227, P=0.022$)。

3 讨论

肝细胞癌是一种富血供肿瘤,它的发生、进展与新生肿瘤血管的生成有密切关系。血管生成是肿瘤进展的重要组成部分。新血管的生成为细胞增殖提供氧气和营养,同时去除二氧化碳和代谢废物。不仅支持了恶性肿瘤的快速生长,而且通过提供一条逃逸到身体中远部位的路径,增加肿瘤的转移潜力。血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)是其中一个关键的促血管

表1 NRP-1、VEGFR2的表达与40例肝细胞癌病人临床病理参数的关系/ $\bar{x} \pm s$

参数	例数	NRP-1	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	VEGFR2	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
性别			1.457	0.153		1.163	0.252
男	25	0.407±0.052			0.462±0.064		
女	15	0.383±0.047			0.440±0.045		
年龄			1.363	0.181		0.384	0.703
≥ 60岁	19	0.387±0.055			0.450±0.059		
< 60岁	21	0.409±0.046			0.457±0.058		
慢性肝炎病毒感染			1.633	0.111		1.905	0.064
有	26	0.408±0.055			0.464±0.066		
无	14	0.381±0.037			0.434±0.033		
甲胎蛋白			1.880	0.068		0.360	0.721
≥ 400 μg/L	17	0.415±0.041			0.458±0.050		
< 400 μg/L	23	0.386±0.054			0.451±0.065		
肿瘤最大径			2.653	0.012		2.108	0.042
>5 cm	21	0.417±0.049			0.471±0.058		
≤5 cm	19	0.377±0.046			0.434±0.053		
肿瘤数量			1.025	0.312		1.224	0.229
单发	28	0.393±0.055			0.446±0.059		
多发	12	0.411±0.039			0.471±0.054		
肝硬化			0.358	0.723		0.324	0.748
有	26	0.400±0.052			0.452±0.059		
无	14	0.394±0.050			0.458±0.059		
血管侵犯			3.864	<0.001		2.546	0.015
有	9	0.448±0.036			0.494±0.062		
无	31	0.384±0.045			0.442±0.052		
Child-Pugh 分级			2.000	0.055		1.028	0.310
A	29	0.390±0.054			0.448±0.061		
B	11	0.419±0.034			0.469±0.051		
分化程度			4.208	<0.001		3.614	0.001
高-中分化	29	0.383±0.049			0.436±0.046		
低分化	11	0.438±0.031			0.501±0.062		
TNM分期			4.603	<0.001		3.824	<0.001
I + II	28	0.379±0.044			0.434±0.048		
III	12	0.444±0.035			0.500±0.055		

注: NRP-1为神经纤毛蛋白1, VEGFR2为血管内皮生长因子受体2。

生成信号分子,它主要通过 VEGFR2 的相互作用来促进细胞增殖、迁移、骨架重组、分化和新脉管系统的形成及动员内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)从骨髓进入外周循环^[7]。VEGF 的过度表达与多种肿瘤的进展和预后不良有关,包括乳腺癌、肺癌、胃癌、大肠癌、胰腺癌、前列腺癌和黑色素瘤^[8]。本研究检测了肝细胞癌组织中 VEGFR2 的表达情况,结果显示与正常肝组织细胞相比,肝细胞癌组织中 VEGFR2 的表达明显升高,这与在其他恶性肿瘤的表达相符。同时我们进一步分析了 VEGFR2 的表达与肝细胞癌病人的临床病理特征及复发情况的关系,发现它与肿瘤组织的最大径、有无血管侵犯、分化程度、TNM 分期明显相关,VEGFR2 高表达的肝细胞癌病人术后 1 年复发率明显高于 VEGFR2 低表达的肝细胞癌病人组,这表明 VEG-

FR2 的表达与肿瘤的增殖、侵袭性有关,并可作为临床判断肝细胞癌预后的指标之一。

NRP-1 是 I 型跨膜糖蛋白,可以促进肿瘤发生的各个方面,如血管生成、细胞存活、迁移、侵袭和化疗耐药。NRP-1 参与肿瘤进展的机制,主要与肿瘤血管生成有关,这与其通过表达在肿瘤内皮细胞中的 VEGFR2 增强 VEGF 介导的信号传导的相关^[9]。NRP-1 还被证明介导了依赖血小板衍生生长因子 B (platelet derived growth factor B, PDGF-B) 的间充质干细胞-周细胞的转变和募集^[10]。这两个事件在肿瘤血管重构和转移扩散中起着重要作用。此外, NRP-1 能结合几种促血管生成细胞因子,并能放大肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)诱导的促血管生成的刺激信号^[11],而且已经在胶质瘤、胰腺癌和前列腺癌等中得到证实。本研究结果

显示 NRP-1 在肝细胞癌组织中高表达,在正常肝组织中低表达或不表达,这与其他研究^[12]相一致,这些结果提示 NRP-1 表达与正常组织的恶性转化有关。更重要的是,我们还发现它与肿瘤组织的最大径、分化程度、TNM 分期明显相关。与 NRP-1 低表达的病人相比,NRP-1 高表达的病人的显示不良的预后,这表明 NRP-1 可以作为肝细胞癌病人的一种新的预后生物标志物。本研究结果与前期王金爽^[13]、杨丽^[14]报告的其在 NSCLC 的作用相类似。

我们还检测了肝细胞癌中 NRP-1 与 VEGFR2 的相关性,两者成正相关($r=0.789$, $P<0.001$),而 VEGFR2 对肿瘤血管生成、促进内皮细胞增殖和增加血管通透性至关重要,因此,NRP-1 可能通过促进肝细胞癌中的 VEGFR2 表达来促进血管生成。有研究发现 NRP-1 是一种共受体来介导 VEGFR2 的活性,可增强 VEGF 与 VEGFR2 的结合,从而促进内皮细胞中的 VEGF 介导的下游信号通路^[15]。也有研究表明 NRP-1 不仅促进 VEGFR2 信号转导、内吞作用、信号输出,还可促进 VEGFR2 非依赖性的 VEGF-A 信号转导、整合素介导的纤维连接蛋白组装和基质黏附^[16]。本研究进一步地支持了他们的观点。

目前,阻断血管生成已成为一种突出的策略,以补充化疗方法来治疗癌症。虽然两项大型国际多中心 III 期临床试验^[17-18]均充分证明了索拉非尼对晚期肝细胞癌有一定的生成获益,但仍不能令人满意。最近,一种人 IgG 单克隆抗体被开发出来,阻断位于 VEGF 结合位点的 NRP-1 B1B2 结构域,值得注意的是,该抗体阻断了血管生成和血管重塑^[19]。因此,NRP-1 可以作为潜在的血管生成靶点。

总之,本研究结果提示 NRP-1、VEGFR2 的高表达与肝细胞癌的发生、发展有关,可以作为判断肝细胞癌病人预后的分子标志。同时针对 NRP-1 的靶向药物正在研制中,NRP-1 有望成为一个新的治疗靶点。由于本研究的样本量较少,随访时间较短,无法得出 NRP-1、VEGFR2 的表达与总生存期的关系,因此需要继续随访病例,并进一步扩大样本量进行验证。

(本文图 1 见插图 3-3)

参考文献

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
- [2] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2017 年版)[J]. 中华肝病杂志, 2017, 25(12):886-895.
- [3] MENAHEM B, LUBRANO J, DUVOUX C, et al. Liver transplantation versus liver resection for hepatocellular carcinoma in intention to treat: An attempt to perform an ideal meta-analysis[J]. Liv-

er Transpl, 2017, 23(6):836-844.

- [4] KISHI Y, HASEGAWA K, SUGAWARA Y, et al. Hepatocellular carcinoma: current management and future development-improved outcomes with surgical resection[J]. Int J Hepatol, 2011, 2011: 728103. DOI:10.4061/2011/728103.
- [5] HE Z, TESSIER-LAVIGNE M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III [J]. Cell, 1997, 90(4): 739-751.
- [6] CHAUDHARY B, KHALED YS, AMMORI BJ, et al. Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer[J]. Cancer Immunol. Immunother, 2014, 63(2):81-99.
- [7] KIM H, KO Y, PARK H, et al. MicroRNA-148a/b-3p regulates angiogenesis by targeting neuropilin-1 in endothelial cells[J]. Exp Mol Med, 2019, 51(11):1-11.
- [8] HICKLIN DJ, ELLIS LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(5):1011-1027.
- [9] ZHU HQ, JIANG X, ZHOU X, et al. Neuropilin-1 regulated by miR-320 contributes to the growth and metastasis of cholangiocarcinoma cells[J]. Liver Int, 2018, 38(1):125-135.
- [10] DHAR K, DHAR G, MAJUMDER M, et al. Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1[J]. Mol. Cancer, 2010, 9:209.
- [11] 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.
- [12] BERGÉ M, ALLANIC D, BONNIN P, et al. Neuropilin-1 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumour growth and vascular remodelling [J]. J Hepatol, 2011, 55(4): 866-875.
- [13] 王金爽, 黄建国, 张建华, 等. 人非小细胞肺癌中神经纤蛋白 1 表达及其与临床病理特征和预后的关系[J]. 肿瘤, 2018, 38(5):452-459.
- [14] 杨丽. 神经纤蛋白 1 和 C-MET 在不同临床病理特征的非小细胞肺癌中的表达特点及其对肿瘤血管生长的关系[J]. 安徽医药, 2016, 20(9):1731-1734.
- [15] SOKER S, TAKASHIMA S, MIAO HQ, et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor [J]. Cell, 1998, 92(6):735-745.
- [16] PATNAIK A, LORUSSO PM, MESSERSMITH WA, et al. A Phase Ib study evaluating MNRP1685A, a fully human anti-NRP1 monoclonal antibody, in combination with bevacizumab and paclitaxel in patients with advanced solid tumors[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2014, 73(5):951-960.
- [17] LLOVET JM, RICCI S, MAZZAFERRO V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. N Engl J Med, 2008, 359(4): 378-390.
- [18] JOHNSON P, BILLINGHAM L. Sorafenib for liver cancer the horizon broadens[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(1): 4-5.
- [19] MCGONIGLE S, MAJUMDER U, KOLBER-SIMONDS D, et al. Neuropilin-1 drives tumor-specific uptake of chlorotoxin [J]. BioMed Central, 2019, 17(1):67.

(收稿日期:2019-11-27, 修回日期:2019-12-25)