

· 临床研究 ·

## Netrin-1 及 VEGF 在食管鳞癌组织中的表达水平及其相关性研究

何章彪<sup>1,2</sup>, 曹翠萍<sup>2</sup>, 刘卫华<sup>2</sup>, 赵琳<sup>2</sup>, 魏抗抗<sup>2</sup>, 王翠侠<sup>3</sup>, 陈奎生<sup>1△</sup>

(1. 郑州大学第一附属医院病理科, 郑州 450052; 2. 商丘医学高等专科学校,

河南商丘 476100; 3. 河南省商丘市第一人民医院 476100)

**摘要:**目的 检测食管鳞癌组织中神经轴突导向因子-1(Netrin-1)及血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达水平,探讨 Netrin-1 和 VEGF 的相关性。方法 应用免疫组织化学 SP 法和原位杂交方法检测 50 例食管鳞癌组织及其相应的 19 例癌旁不典型增生组织和 20 例正常食管黏膜组织中 VEGF、Netrin-1 蛋白及 mRNA 的表达水平。结果 (1)食管鳞癌组织中 Netrin-1、VEGF 蛋白及 mRNA 阳性表达率均高于癌旁不典型增生组织和正常食管黏膜组织( $P < 0.05$ );(2)有淋巴结转移组食管鳞癌组织中 Netrin-1、VEGF 蛋白及 mRNA 阳性表达率均高于无淋巴结转移者( $P < 0.05$ );(3)食管鳞癌组织中 VEGF 和 Netrin-1 阳性表达率间呈正相关( $r = 0.9413, P < 0.01$ ),VEGF mRNA 和 Netrin-1 mRNA 阳性表达率间呈正相关( $r = 0.5847, P < 0.01$ )。结论 人食管鳞癌组织中 VEGF、Netrin-1 蛋白及 mRNA 均呈高表达;Netrin-1、VEGF 的表达在食管癌的淋巴结转移过程中起一定的作用;且二者存在正相关,可能共同参与食管癌的发生、发展。

**关键词:**癌,鳞状细胞;食管;神经轴突导向因子;血管内皮细胞生长因子类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.17.014

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)17-1965-03

### Expression of Netrin-1 protein and VEGF protein in esophageal squamous cell carcinoma tissue and its correlation research

He Zhangbiao<sup>1,2</sup>, Cao Cuiping<sup>2</sup>, Liu Weihua<sup>2</sup>, Zhao Lin<sup>2</sup>, Wei Kangkang<sup>2</sup>, Wang Cuixia<sup>3</sup>, Chen Kuisheng<sup>1△</sup>

(1. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China;

2. Shangqiu Medical College, Shangqiu, Henan 476100; 3. Shangqiu First People's Hospital, Shangqiu, Henan 476100, China)

**Abstract:** Objective To detect the expression of Netrin-1 protein and VEGF protein in squamous cell carcinoma(ESCC) tissue and its correlation research. **Methods** The expressions of Netrin-1 protein and mRNA, VEGF and mRNA in 50 cases of ESCC, 19 cases of adjacent atypical hyperplasia tissue and 20 cases of normal tissue were detected using immunohistochemistry and in situ hybridization. **Results** The expressions of Netrin-1 protein and mRNA, VEGF and mRNA were positive in ESCC tissue. The positive rate of Netrin-1 protein and mRNA, VEGF and mRNA in ESCC tissue was significantly higher than those of atypical hyperplasia tissue( $P < 0.05$ ); in metastatic group, the positive rates of Netrin-1 protein and mRNA, VEGF in ESCC tissue and atypical hyperplasia tissue was higher than those in non-metastatic group( $P < 0.05$ ); VEGF and Netrin-1 both between positively correlated( $r = 0.9413, P < 0.01$ ), VEGF mRNA and Netrin-1 mRNA both between positively correlated( $r = 0.5847, P < 0.01$ ), and Netrin-1 both between positively correlated( $r = 0.9413, P < 0.01$ ). **Conclusion** The expression of Netrin-1 protein and mRNA, VEGF in human ESCC tissue is increased. VEGF and Netrin-1 expression in esophageal cancer lymph node metastasis plays a role. Netrin-1 and VEGF is related to development, invasion and metastasis of ESCC.

**Key words:** carcinoma, squamous cell; esophagus; Netrin-1; vascular endothelial growth factors

神经轴突导向因子-1(Netrin-1)是层黏连蛋白相关的分泌蛋白,在调节神经轴突生长、缺氧促进肿瘤血管生成、调节白细胞迁移等方面发挥重要作用。而血管内皮生长因子(VEGF)是目前所知的作用最强的促血管形成因子之一,在肿瘤血管形成中起重要作用<sup>[1]</sup>。有关食管鳞癌组织中 Netrin-1、VEGF 蛋白及 mRNA 表达及其意义尚未见文献报道。作者采用免疫组织化学与原位杂交方法观察食管鳞癌组织中 Netrin-1、VEGF 的蛋白及 mRNA 表达,从而探讨其与食管癌发生、发展及浸润转移的关系以及 VEGF 和 Netrin-1 的相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 实验标本** 组织标本系河南省商丘市第一人民医院 2011 年 3 月至 2012 年 3 月食管癌新鲜手术切除标本,共 50 例,病理检查证实均为鳞癌,并取相应的癌旁不典型增生标本 19 例及正常食管黏膜标本 20 例。食管鳞癌患者中,男 33 例,女 17 例,年龄 40~74 岁。50 例食管标本按有无淋巴结转移分为:转移组 14 例和无转移组 36 例。术前均未接受放疗。

**1.2 实验试剂** Netrin-1、VEGF 免疫组织化学 SP 试剂盒及 Netrin-1、VEGF 原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;VEGF 鼠抗人单克隆抗体、Netrin-1 兔抗人抗体购买于北京中杉试剂公司;胃蛋白酶、预杂交液及核固红均购自武汉博士德生物工程有限公司;SP-AP(streptavidin A1-kaline phosphatase)及 BCIP/NBT 购自美国 Promega 公司,Netrin-1 探针(5'-GGA AGT TCA CGG TGA ACA T-3'),VEGF 探针(5'-GTC ATG GAA TCC ATC TGT TGA GT-3')由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本处理** 食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织经 40 g/L 的多聚甲醛固定,石蜡包埋,用于免疫组织化学及原位杂交检测。

**1.3.2 免疫组织化学** 免疫组织化学 SP 法染色步骤按照试剂盒及一抗(浓度为 1:100)说明书要求进行,同时用购自武汉博士德公司(Netrin-1)及北京中杉试剂公司(VEGF)的阳性

对照片进行阳性对照及用 PBS 代替一抗作阴性对照。

**1.3.3 原位杂交** 参照原位杂交试剂盒说明书操作,以不含探针的预杂交液进行杂交及杂交前用 RNase 处理样本作阴性对照。

**1.3.4 免疫组织化学及原位杂交结果判定** 在显微镜下观察并计数,每张切片观察 10 个视野( $\times 200$ ),并取均数。按阳性细胞数所占的百分比分为:阴性:阳性细胞数小于 5%;弱阳性:阳性细胞数占 5%~25%;阳性:阳性细胞数占 25%~50%;强阳性:阳性细胞数大于 50%。为便于统计,将弱阳性和阴性归为阴性,阳性和强阳性归为阳性<sup>[2]</sup>。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS13.0 软件数据进行统计分析,行  $\chi^2$  检验及列联表的关联性分析,检验标准  $\alpha=0.05$ 。

**2 结 果**

**2.1 免疫组织化学与原位杂交结果** Netrin-1 蛋白阳性信号位于正常食管鳞状上皮细胞、食管癌细胞或癌旁不典型增生细

胞胞膜,在细胞与细胞的接触面的表达更为清晰,呈棕黄色颗粒(图 1A)。Netrin-1 mRNA 阳性信号位于正常食管鳞状上皮细胞、食管癌细胞或癌旁不典型增生细胞胞质中,呈蓝紫色颗粒(图 1B);VEGF 蛋白阳性表达主要定位于细胞胞质(图 1C)。VEGF mRNA 阳性信号位于正常食管鳞状上皮细胞、食管癌细胞或癌旁不典型增生细胞胞质中,呈蓝紫色颗粒(图 1D)。

**2.2 食管鳞癌组织中 Netrin-1、VEGF 的蛋白及 mRNA 表达** 见表 1。食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织与正常食管黏膜组织 Netrin-1、VEGF 蛋白及 mRNA 表达,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3 Netrin-1 及 VEGF 蛋白表达与食管癌转移的关系** 见表 2~3。有淋巴结转移的食管鳞癌组织中 Netrin-1 蛋白及 mRNA、VEGF 蛋白及 mRNA 表达均高于无淋巴结转移的相应组织( $P<0.05$ )。

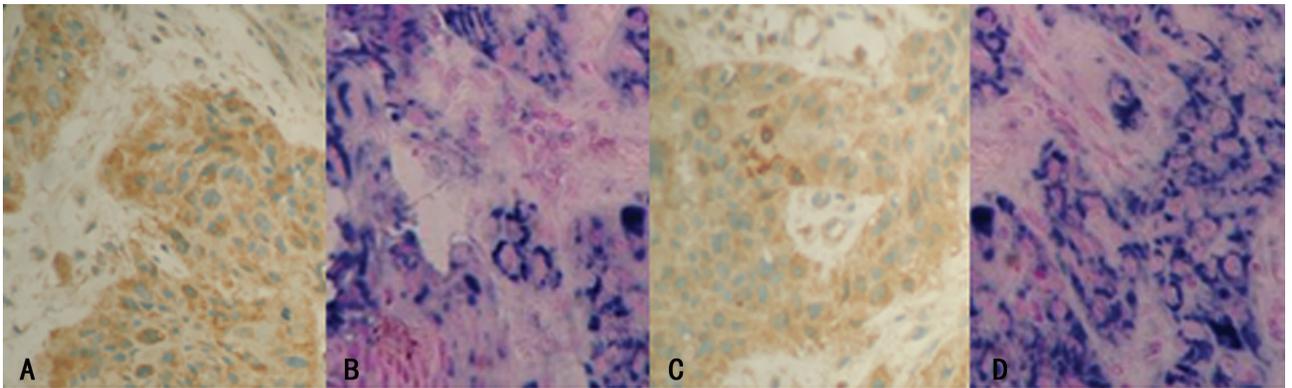


图 1 食管鳞癌组织中 VEGF、Netrin-1 蛋白及 mRNA 的影像学表现(SP,  $\times 400$ )

表 1 食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及其正常组织中 Netrin-1、VEGF 蛋白及 mRNA 表达比较[n(%)]

组别	n	Netrin-1 蛋白		Netrin-1mRNA		VEGF 蛋白		VEGFmRNA	
		阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)
食管鳞癌组织	50	31	62.0	25	50.0	34	68.0	28	56.0
癌旁不典型增生组织	19	5	26.3	3	15.8	4	21.1	4	21.1
正常组织	20	2	10.0	1	5.0	2	10.0	1	5.0
$\chi^2$		18.437 7		16.271 0		24.993 9		9.468 2	
P		0.000 1		0.000 3		0.000 0		0.008 8	

表 2 VEGF 及 mRNA 蛋白的表达与淋巴结转移的关系

因素	n	VEGF 表达		VEGF mRNA 表达	
		阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)
有淋巴结转移	14	12	85.71	13	92.59
无淋巴结转移	36	15	41.70	19	52.80
$\chi^2$		7.873 2		7.027 8	
P		0.005 0		0.008 0	

表 3 Netrin-1 及 mRNA 蛋白的表达与淋巴结转移的关系

因素	n	Netrin-1 表达		Netrin-1mRNA 表达	
		阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)
有淋巴结转移	14	13	92.59	12	85.71
无淋巴结转移	36	19	52.80	15	41.70
$\chi^2$		7.027 8		7.873 2	
P		0.008 0		0.005 0	

**2.4 VEGF 和 Netrin-1 的相关性** 在 VEGF 蛋白表达阳性病例中,Netrin-1 蛋白表达阳性率为 91.18%(31/34),VEGF 蛋白表达阴性病例中 Netrin-1 蛋白表达阳性 12.50%(2/16),经统计学分析,结果显示列联系数(contingency coefficient) $r=0.941 3, P<0.01$ ,提示两种蛋白在食管癌组织中的表达成正相关性。在 VEGF mRNA 表达阳性病例中,Netrin-1 mRNA 表达阳性率为 89.29%(25/28),VEGF mRNA 表达阴性病例中 Netrin-1 mRNA 表达阳性率为 9.09%(2/22),经统计学分析,结果显示列联系数  $r=0.584 7, P<0.01$ ,提示两种 mRNA 在食管癌组织中的表达成正相关性。

**3 讨 论**

Netrin 家族是一类与层黏连蛋白相关的可分泌蛋白,也是重要的神经突起导向因子,在结构上高度保守<sup>[3]</sup>。Netrin-1 是 Netrin 基因家族中研究较多的重要成员之一。近年研究结果显示,Netrin-1 可通过调节肿瘤血管生成调节肿瘤的形态发生和发展、转移<sup>[4]</sup>。2004 年, Park 等<sup>[5]</sup>在 PNAS 上率先报道 Netrin-1 是一血管生成因子,既能促进内皮细胞增生、迁移和黏

附,增生效应类似于经典的内皮细胞促进因子——血管内皮生长因子;又能促平滑肌细胞增生,效应等同于经典的平滑肌细胞促进因子——血小板源性生长因子。几乎与此同时,Fitamant 等<sup>[6]</sup>报道,去除 Netrin-1 基因表达,会导致内皮细胞伪足迷乱、过度分支和方向异常,提示 Netrin-1 具有调控血管方向和形态发生功能。

Netrin-1 与恶性肿瘤侵袭性的关系也受到重视。Otrock 等<sup>[7]</sup>基于 Netrin-1 转基因小鼠的研究证实,Netrin-1 在转基因小鼠的结肠中高表达,而其受体 DCC 和 UNC5H 在所有肠上皮细胞中均有表达,与之相应的表型是结肠增生和腺瘤发生频率增高,提示 Netrin-1 可能作为原癌基因在结肠癌的早期发挥重要作用。Mehlen 等<sup>[8]</sup>发现 Netrin-1 与乳腺癌细胞的存活及转移关系密切,认为 Netrin-1 有利于转移的乳腺癌细胞存活,但不足以导致形成癌细胞转移灶;Netrin-1 的表达量有利于判断乳腺癌的转移性,如乳腺癌组织中 Netrin-1 高表达,则转移性强。近来有研究表明,在 92 例非小细胞肺癌中,Netrin-1 高表达的有 43 例(占 47%);且通过增强或减弱 Netrin-1 表达对肿瘤的影响研究可能存在的联系,结果提示 Netrin-1 有可能成为治疗肺癌的新靶点<sup>[9]</sup>。本研究显示 Netrin-1 表达在淋巴转移的患者中阳性表达明显升高,表明 Netrin-1 在食管癌中的表达上调可能在食管癌细胞侵袭转移过程中发挥重要作用。实验结果显示 Netrin-1 在食管癌侵袭转移过程中扮演重要角色,可能被作为肿瘤基因治疗的新靶点进行的研究。

VEGF 是目前已知作用最强的促血管形成因子之一,也是肿瘤细胞分泌的血管形成因子中最重要的一种,新血管形成是保证肿瘤生长和转移的组织学基础,受多种促血管因子和抗血管生成因子的双重调节。据报道,食管鳞癌阳性率为 23.9%~93.3%,本研究为 68.0%。VEGF 主要表达于癌细胞,具有明显的异质性,强阳性表达的细胞多位于浸润前缘,在血管内皮不表达或极少量表达,与 Mbius 等<sup>[10]</sup>的报道相似。推测 VEGF 主要以旁分泌途径作用于血管内皮细胞。VEGF 是高度特异的血管内皮细胞有丝分裂原<sup>[11]</sup>,是肿瘤新生血管生成的重要调控因子<sup>[12]</sup>,不仅参与肿瘤血管生成、增殖,还直接与肿瘤浸润转移有关,且其表达水平与肿瘤的恶性程度有关<sup>[13]</sup>。VEGF 与食管鳞状细胞癌的浸润程度、淋巴结转移呈正相关。因此,可以作为判定食管癌生物学行为的检测及预后指标<sup>[14]</sup>。本研究显示,VEGF 在食管癌中的表达与癌旁非典型增生组织及正常食管黏膜组织比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示 VEGF 可诱导食管癌肿瘤血管形成,提高其通透性,促使肿瘤细胞浸润转移、恶性程度增加。

VEGF 是目前已知作用最强的促血管形成因子之一,而 Netrin-1 可通过调节肿瘤血管生成调节肿瘤的形态发生和发展、转移<sup>[15]</sup>。因此,Netrin-1 和 VEGF 基因蛋白之间可能有协同作用。实验结果显示 Netrin-1 和 VEGF 基因蛋白在正常食管黏膜组织中基本不表达,而在食管癌组织中有不同程度的阳性表达,食管癌中 VEGF 及 Netrin-1 的表达存在正相关性。它们以不同的机制促进了食管癌的发生、发展、侵袭和转移。对食管癌患者进行 Netrin-1 和 VEGF 的联合检测,有可能作为食管癌的诊断和评估其预后的重要分子生物学指标。判断食管癌的侵袭和转移能力,为术后高危患者制订合理的治疗方案及防止肿瘤的复发和转移提供可靠的依据。但是,在体内食管癌侵袭、转移过程中,Netrin-1 基因的作用及其分子机制,还有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Michael PS, Margarete S. To die or not to die, that's the

question and the answer may depend on netrin-1[J]. *J Natl Cancer*, 2009, 101(4): 217-219.

- [2] 庞霞, 郑湘予, 李晨磊, 等. 食管鳞状细胞癌组织中血管内皮生长因子-C 与血小板生成因子-4 蛋白的表达[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2008, 43(7): 865-867.
- [3] Ngoe PL, Katsumi K, Jain PF, et al. Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo[J]. *Pmc Nail Acad Sci*, 2005, 102(31): 4729-4734.
- [4] Lu XH, Noble F, Jiang Q, et al. The netrin-1 receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system[J]. *Nature*, 2004, 43(2): 179-186.
- [5] Park M, Fume C. Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(22): 2599-2616.
- [6] Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux MM, et al. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer[J]. *Proc Nail Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 4850-4855.
- [7] Otrock ZK, Malafouz RA, Makarem JA, et al. Understanding the biology of angiogenesis; Review of the most important molecular mechanisms[J]. *Blood Cell Mol Dis*, 2007, 39(2): 212-220.
- [8] Mehlen P, Liambi F. Role of netrin-1 and netrin-1 dependencereceptors in colorectal cancers[J]. *Br J cancer*, 2005, 93(1): 1-6.
- [9] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(15): 2557-2576.
- [10] Mbius C, Freire J, Becker I, et al. VEGF-C expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus[J]. *World J Surg*, 2007, 31(9): 1768-1770.
- [11] Gonzalez-Quevedo R, Shoffer M, Horng L, et al. Receptor tyrosine phosphatase-dependent cytoskeletal remodeling by the hedgehog-responsive gene MIM/BEC4[J]. *Cell Biol*, 2005, 168(3): 453-463.
- [12] Herskovic A, Russell W, Liptay M, et al. Esophageal carcinoma advances in treatment results for locally advanced disease; review[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(5): 1095-1103.
- [13] Qian H, Lu N, Xue L, et al. Reduced MTA1 expression by RNAi inhibits invitro invasion and migration of esophageal squamous cell carcinoma cell line[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22(8): 653-662.
- [14] Bompard G, Sharps J, Freiss G, et al. Involvement of Rac in actin cytoskeleton rearrangements induced by mim B[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(14): 5393-5403.
- [15] Callahan CA, Oostad T, Horng JK, et al. MIM/BEG4, a sonic hedgehog respinsire gene that potentiates Gli dependent transcription[J]. *Gense Der*, 2004, 18(13): 2724-2729.

(收稿日期: 2012-12-28 修回日期: 2013-02-12)