

本文引用:贾如江,侯丽艳,尹清臣,等. 轴突诱导因子4D和血管内皮生长因子在胰腺癌组织中的表达[J]. 新乡医学院学报,2016,33(11):950-953. DOI:10.7683/xyxyxb.2016.11.004.

【基础研究】

轴突诱导因子4D和血管内皮生长因子在胰腺癌组织中的表达

贾如江,侯丽艳,尹清臣,任利兵,杨庚武
(邯郸市中心医院普外一科,河北 邯郸 056102)

摘要: **目的** 探讨轴突诱导因子4D(Sema 4D)和血管内皮生长因子(VEGF)在胰腺癌组织中的表达及其临床意义。**方法** 采用免疫组织化学法检测43例胰腺癌组织和10例癌旁组织中Sema 4D和VEGF的表达,分析Sema 4D和VEGF在胰腺癌组织中表达的相关性,以及胰腺癌组织中Sema 4D和VEGF的表达与临床病理特征、患者预后的关系。**结果** Sema 4D和VEGF在胰腺癌组织中的阳性表达率分别为51.2%(22/43)和46.5%(20/43),在癌旁组织中的阳性表达率分别为10.0%(1/10)和20.0%(2/10),Sema 4D和VEGF在胰腺癌组织中的阳性表达率均显著高于癌旁组织($P < 0.01$)。胰腺癌组织中Sema 4D和VEGF的表达呈正相关($r = 0.445, P < 0.05$)。Sema 4D和VEGF的阳性表达均与肿瘤分期、淋巴结转移、脉管内瘤栓有关($P < 0.05$),与患者的性别、年龄、分化程度、肿瘤直径无关($P > 0.05$)。VEGF表达阳性者中位生存时间低于VEGF表达阴性者($P < 0.05$)。Sema 4D表达阳性者中位生存时间与Sema 4D表达阴性者差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Sema 4D和VEGF在胰腺癌组织中异常表达可能与胰腺癌的发生发展有一定关系,且二者可能对诱导血管新生具有协同效应;VEGF的表达与胰腺癌预后有关。

关键词: 胰腺癌;轴突诱导因子4D;免疫组织化学;血管内皮生长因子

中图分类号: R735.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2016)11-0950-04

Clinical significance of the expression of semaphorin 4D and vascular endothelial growth factor in pancreatic carcinoma

JIA Ru-jiang, HOU Li-yan, YIN Qing-chen, REN Li-bing, YANG Geng-wu

(Department of General Surgery, Handan Central Hospital, Handan 056102, Hebei Province, China)

Abstract: **Objective** To study the clinical significance of the expression of semaphorin 4D(Sema 4D) and vascular endothelial growth factor(VEGF) in pancreatic carcinoma. **Methods** The expressions of Sema 4D and VEGF in 43 cases of pancreatic cancer and 10 cases of adjacent tissues were detected by immunohistochemistry. The correlation between Sema 4D and VEGF expression in pancreatic cancer was analyzed. The relationship between Sema 4D or VEGF expression and clinical pathological characteristics or prognosis of patients was analyzed. **Results** The positive rates of Sema 4D and VEGF in pancreatic cancer tissues were 51.2%(22/43) and 46.5%(20/43), and them in adjacent tissues were 10.0%(1/10) and 20.0%(2/10); the positive rates of Sema 4D and VEGF in pancreatic cancer tissues were significantly higher than those in adjacent tissues($P < 0.01$). The expression of Sema 4D was positively correlated with the expression of VEGF in pancreatic cancer tissues($r = 0.445, P < 0.05$). The abnormal expression of Sema 4D and VEGF was related to tumor staging, lymph node metastasis and vascular tumor thrombus($P < 0.05$), but it was not related to the sex, age, degree of differentiation and tumor size($P > 0.05$). The live time in patients with positive expression of VEGF was significantly lower than that in patients with negative expression of VEGF($P < 0.05$). There was no significant difference in the live time between the patients with positive expression of Sema 4D and the patients with negative expression of Sema 4D($P > 0.05$). **Conclusions** The abnormal expression of Sema 4D and VEGF is related to the occurrence and development of pancreatic cancer, and Sema 4D and VEGF may have a synergistic effect on the induction of angiogenesis. The expression of VEGF may be related to the prognosis of pancreatic cancer.

Key words: pancreatic carcinoma; semaphorin 4D; immunohistochemistry; vascular endothelial growth factor

DOI:10.7683/xyxyxb.2016.11.004

收稿日期:2016-06-27

基金项目:河北省卫生和计划生育委员会计划项目(编号:20150457)。

作者简介:贾如江(1974-),男,河北邯郸人,博士研究生在读,副主任医师,研究方向:胰腺肿瘤的基础与临床。

通信作者:尹清臣(1968-),男,河北邯郸人,硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:普通外科基础与临床;E-mail:jiaruijiang@163.com。

轴突诱导因子 4D (semaphorin 4D, Sema 4D) 是具有 sema 区域为共同特征的蛋白 Semaphorin 超家族成员受体亚群之一,可以诱导轴突生长锥的定向生长。有研究证明, Sema 4D 在许多肿瘤中高表达^[1],并且还能通过其受体神经丛素-B1 诱导血管生成^[2]。而实体瘤的生长和转移依赖新生血管形成,因此,抑制新血管生成是近年来治疗肿瘤的新策略^[3]。同时,血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及其受体在肿瘤血管生成中具有重要作用,已成为抗肿瘤生物治疗的一个重要靶点。肿瘤介导血管生成的信号传导涉及多个信号通路,针对这些通路而进行的一些靶向治疗也取得了振奋人心的效果。本研究以免疫组织化学方法检测胰腺癌中 Sema 4D 和 VEGF 的表达,分析其临床意义及二者表达的相关性,旨在为临床治疗胰腺癌提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 1 月至 2015 年 12 月邯郸市中心医院收治的 43 例胰腺癌患者的手术切除组织标本,全部病例均经手术和病理检查证实,术前未经化学治疗和放射治疗,具有完整的病历资料;其中男 29 例,女 14 例;年龄 40 ~ 71 岁,平均 (55.1 ± 4.9) 岁;组织学分化程度:高分化腺癌 3 例,中分化腺癌 18 例,中低分化及低分化腺癌 22 例;肿瘤直径:≤ 2 cm 者 1 例,2 ~ 4 cm 者 22 例, > 4 cm 者 20 例;肿瘤分期:Ⅰ期 5 例,Ⅱ期 16 例,Ⅲ期 22 例;淋巴结转移阳性者 18 例;脉管内瘤栓 20 例。随机抽取其中 10 例手术时切除的癌旁胰腺组织标本作为对照,其中男 7 例,女 3 例,年龄 46 ~ 67 岁,平均 (53.1 ± 2.2) 岁。二者性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 主要试剂和仪器 Sema 4D 鼠抗人单克隆抗体购自美国 BD Biosciences 公司, VEGF 鼠抗人单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,免疫组织化学二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体 (二抗)、生物素化过氧化物酶、苏木精染液购自武汉艾美捷生物技术有限公司,化学发光超敏显色试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;冰冻切片机、倒置相差显微镜及图像分析仪购自德国 LEICA 公司。

1.3 免疫组织化学法检测胰腺癌组织及胰腺癌癌

旁组织中 Sema 4D 和 VEGF 蛋白的表达 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法 (streptavidin-peroxidase, SP) 进行免疫组织化学染色,对胰腺癌组织及胰腺癌癌旁组织中 Sema 4D 和 VEGF 蛋白的表达进行检测。严格依据试剂盒说明步骤进行操作。常规石蜡包埋,4 μm 切片,脱蜡并予乙醇水化,体积分数 3% H₂O₂ 室温避光孵育 20 min 以阻断内源性过氧化物酶活性;100 mL · L⁻¹ 正常非免疫动物血清室温封闭 30 min;弃去血清,枸橼酸盐缓冲液修复抗原,加入 50 mg · L⁻¹ 山羊血清孵育 30 min 后再分别加入一抗 (Sema 4D 工作液浓度均为 1 : 100, VEGF 工作液浓度为 1 : 50) 4 ℃ 过夜,再分别加二抗和生物素化过氧化物酶孵育 30 min,滴加新鲜配制的 3,3'-二氨基联苯胺显色液,镜下控制显色,苏木精轻度复染,二甲苯透明,中性树脂封片,倒置显微镜观察拍照。阳性对照采用已知阳性片为标准,阴性对照采用磷酸盐缓冲液代替一抗为标准,其余步骤相同。

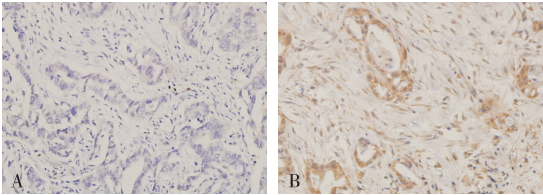
1.4 免疫组织化学染色结果的判定 Sema 4D 蛋白表达主要定位于肿瘤细胞的细胞质,少量着色于细胞膜,呈棕黄色颗粒状。VEGF 蛋白主要着色细胞质,呈棕黄色颗粒。级别判断:染色结果根据染色细胞所占细胞总数比例来判断,染色细胞积分采用细胞阳性染色百分数,分为 3 级: < 25% 细胞染色为阴性 (-), 25% ~ 50% 细胞染色为弱阳性 (+), > 50% 细胞染色为强阳性 (++) ;阳性 = 弱阳性 + 强阳性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用非独立样本 *t* 检验,多组计量资料采用方差分析, Sema 4D 和 VEGF 的表达相关性采用 Spearman 双变量相关分析,生存率分析采用 Kaplan-meier 法,生存率比较采用 Log-rank 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sema 4D 和 VEGF 在胰腺癌组织中的表达 43 例原发性胰腺癌组织中有 22 例 (51.2%) Sema 4D 蛋白表达阳性, 10 例癌旁组织中仅 1 例 (10.0%) Sema 4D 呈弱阳性表达,胰腺癌组织 Sema 4D 蛋白表达阳性率显著高于癌旁组织 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义 (图 1)。43 例原发性胰腺癌组织中有 20 例 (46.5%) VEGF 蛋白表达阳性, 10 例癌旁组织中仅 2 例 (20.0%) VEGF 呈弱阳性表达,胰腺癌组织 VEGF 蛋白表达阳性率显著高于癌旁组

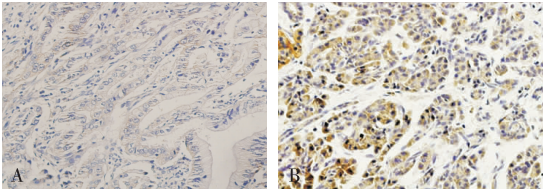
织($P < 0.01$),差异有统计学意义(图2)。



A:胰腺癌癌旁组织;B:胰腺癌组织。

图1 Sema 4D 在胰腺癌癌旁组织和胰腺癌组织中的表达

Fig.1 Sema 4D expression in pancreatic cancer tissues and adjacent tissues



A:胰腺癌癌旁组织;B:胰腺癌组织。

图2 VEGF 在胰腺癌癌旁组织和胰腺癌组织中的表达

Fig.2 VEGF expression in pancreatic cancer tissues and adjacent tissues

2.2 Sema 4D 和 VEGF 在胰腺癌组织中表达的相关性 结果见表1。相关分析显示,Sema 4D 和 VEGF

表2 胰腺癌组织中 Sema 4D 和 VEGF 表达与临床病理指标的关系

Tab.2 Relationship between Sema 4D or VEGF expression in pancreatic carcinoma tissues and the clinical pathological characteristics

临床病理特征	n	Sema 4D		χ^2	P	VEGF		χ^2	P
		阳性/例	阴性/例			阳性/例	阴性/例		
性别									
男	29	15	14	0.011	0.916	12	17	0.943	0.331
女	14	7	7			8	6		
年龄									
>60 岁	32	16	16	0.795	0.068	15	17	0.007	0.935
≤60 岁	11	6	5			5	6		
分化程度									
高/中分化	21	10	11	0.206	0.650	9	12	0.220	0.639
中低/低分化	22	12	10			11	11		
肿瘤直径									
≤4 cm	23	14	9	1.865	0.172	12	11	0.637	0.425
>4 cm	20	8	12			8	12		
肿瘤分期									
I / II	21	5	16	12.291	0.000	6	15	5.310	0.021
III	22	17	5			14	8		
淋巴结转移									
有	18	15	3	12.824	0.000	14	4	12.165	0.000
无	25	7	18			6	19		
脉管内瘤栓									
有	20	14	6	5.310	0.021	14	6	8.292	0.004
无	23	8	15			6	17		

3 讨论

胰腺癌起病隐匿,发展较快,易发生转移,手术切除率低,预后极差,已成为危害人类健康的“癌中

在胰腺癌组织中的表达呈正相关($r = 0.445, P < 0.05$)。

表1 Sema 4D 和 VEGF 胰腺癌表达的相关性分析

Tab.1 Correlation analysis of the expression of Sema 4D and VEGF in pancreatic carcinoma

Sema-4D	VEGF		合计	r	P
	阳性/例	阴性/例			
阳性/例	15	7	22	0.445	0.003
阴性/例	5	16	21		
合计	20	23	43		

2.3 胰腺癌组织 Sema 4D 和 VEGF 的表达与临床病理特征及患者预后的关系 结果见表2。Sema 4D 和 VEGF 的阳性表达均与胰腺癌分期、淋巴结转移、脉管内瘤栓有关($P < 0.05$),与患者的性别、年龄、分化程度、肿瘤直径无关($P > 0.05$)。VEGF 表达阳性者中位生存时间为 12.23 个月,VEGF 表达阴性者中位生存时间 15.70 个月,VEGF 表达阳性者中位生存时间低于 VEGF 表达阴性者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Sema 4D 表达阳性者中位生存时间(13.54 个月)与 Sema 4D 表达阴性者中位生存时间(14.63 个月)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

之王”。胰腺癌的发生、发展是一个极其复杂的过程,当前针对胰腺癌的治疗不断发展和进步,但总体疗效仍较差,需要进一步深入了解其发生、发展的机制,从而施行靶向治疗。

近来,有研究认为,Sema 4D 和其受体与肿瘤发生、发展关系密切,多种肿瘤细胞如头颈鳞状细胞癌、乳腺癌、前列腺癌和结肠癌等均可表达 Sema 4D^[4]。本研究表明,在胰腺癌中 Sema 4D 也有一定程度的阳性表达,而癌旁组织则没有类似的强阳性表达。最近有文献报道,Sema 4D 与神经丛素-B1 结合后,激活小分子三磷酸鸟苷 (guanosinetriphosphate,GTP) 酶结合蛋白癌基因(Rat sarcoma,Ras) 的同源基因家族 A-Ras,导致有丝分裂原活化蛋白激酶和丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(protein-serine-threonine kinas,Akt) 的磷酸化,从而增强胰腺癌细胞的侵袭力^[5]。但是,目前少有关于胰腺癌组织中 Sema 4D 表达的报道,其与胰腺癌的关系和机制需要进一步探讨和研究。也有研究报道,Sema 4D 的表达与肿瘤内皮细胞迁移和肿瘤血管形成有关^[6-7],而血管生成在肿瘤发展、侵袭及转移过程中的作用举足轻重^[8]。肿瘤生长所需的氧气和营养都需要靠血管生成来维持相应的血液循环和物质交换。目前,已有文献证实,VEGF 在胰腺癌中高表达,而在癌旁组织中则并非如此^[9],这与本研究结果基本一致,而表达强度和比例的差异则可能与种族、地区差异或抽样误差有关,需要进一步大样本证实。VEGF 在肿瘤新生血管生成中起重要作用^[10],它能刺激血管内皮细胞生长迁徙至肿瘤组织形成新的血管。多项研究已证实,VEGF 已成为抗肿瘤治疗的一个重要靶点^[9-11]。

本组研究结果显示,胰腺癌组织中 Sema 4D 和 VEGF 阳性表达的比例明显高于癌旁组织。并且,Sema 4D 和 VEGF 的阳性表达均与胰腺癌分期、淋巴结转移、脉管内瘤栓相关,这与既往研究的结果基本一致^[9-15]。另外,本研究发现 Sema 4D 和 VEGF 在胰腺癌中的表达具有明显相关性,VEGF 表达阳性者中位生存时间低于 VEGF 表达阴性者,因此推测在胰腺癌中,Sema 4D 和 VEGF 在诱导血管新生应答方面可能具有协同作用,Sema 4D 可能通过 VEGF 影响肿瘤血管生成。

综上所述,Sema 4D 和 VEGF 在胰腺癌组织中异常阳性表达,且与胰腺癌的发生、发展有一定关系,二者的表达具有相关性,提示在胰腺癌进展机制中,Sema 4D 和 VEGF 可能对诱导血管新生具有协同效应,进而影响肿瘤进展,但具体机制需要进一步研究。另外,本研究例数较少,且为单中心研究结果,因此,需要进一步扩大样本量以及后续行多中心联合分析来证实研究结果。

参考文献:

[1] YOUNIS R H,HAN K L,WEBB T J. Semaphorin 4D produced by human head and neck squamous cell carcinoma induces myeloid derived suppressor cells expansion from peripheral blood monocytes [J]. *J Immunol Ther Canc*,2015,3(Suppl 2):280-281.

[2] DING X,QIU L,ZHANG L,*et al.* The role of semaphorin 4D as a potential biomarker for antiangiogenic therapy in colorectal cancer [J]. *Onco Targets Ther*,2016,9:1189-1204.

[3] BELLOU S,PENTHEROUKAKIS G,MURPHY C,*et al.* Anti-angiogenesis in cancer therapy:hercules and hydra[J]. *Cancer Lett*,2013,338(2):219-228.

[4] YOUNIS R H,HAN K L,WEBB T J. Human head and neck squamous cell carcinoma-associated Semaphorin 4D induces expansion of myeloid-derived suppressor cells [J]. *J Immunol*,2016,196(3):1419-1429.

[5] KATO S,KUBOTA K,SHIMAMURA T,*et al.* Semaphorin 4D: a lymphocyte semaphorin,enhances tumor cell motility through binding its receptor, plexinB1, in pancreatic cancer [J]. *Cancer Sci*,2011,102(11):2029-2037.

[6] SUN Q,ZHOU H,BINMADI N O,*et al.* Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphorin 4D affects tumor growth and vascularity[J]. *J Biol Chem*,2009,284(46):32066-32074.

[7] ZHOU H,YANG Y H,BASILE J R. The Semaphorin 4D-Plexin-B1-RhoA signaling axis recruits pericytes and regulates vascular permeability through endothelial production of PDGF-B and ANGPTL4[J]. *Angiogenesis*,2014,17(1):261-274.

[8] 闫小晨,张连栋. 血清恶性肿瘤特异性生长因子及肝细胞生长因子水平对膀胱癌新生血管相关因子的影响[J]. *川北医学院学报*,2016,31(3):291-293.

[9] 张涓娟,蒲宇,李勇,等. PI3K/AKT 和 MAPK/ERK1/2 信号通路对胰腺癌 PANC-1 细胞 VEGF 表达的影响[J]. *川北医学院学报*,2014,29(1):44-48.

[10] 熊义富,李丽,徐浩,等. HIF-1 α /VEGF 在肝细胞癌的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. *川北医学院学报*,2013,28(6):530-533.

[11] WU K,YANG L,HUANG Z,*et al.* A double suicide gene system driven by vascular endothelial growth factor promoter selectively kills human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*,2016,11(5):3152-3160.

[12] 彭勇,胡韬,田云鸿,等. 精准胰腺外科在胰腺肿瘤切除中的应用[J]. *川北医学院学报*,2014,29(2):125-128.

[13] 陈建峰. HIF-1 α /VEGF 在胰腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *肝胆胰外科杂志*,2008,20(5):43-46.

[14] PATNAIK A,WEISS G J,LEONARD J E,*et al.* Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a humanized anti-Semaphorin 4D antibody, in a first-in-human study of patients with advanced solid tumors[J]. *Clin Cancer Res*,2016,22(4):827-836.

[15] KATO S,KUBOTA K,SHIMAMURA T,*et al.* Semaphorin 4D, a lymphocyte semaphorin, enhances tumor cell motility through binding its receptor, plexinB1, in pancreatic cancer [J]. *Cancer Sci*,2011,102(11):2029-2037.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)