

Notch1, Jagged1 和 VEGF 蛋白在非小细胞肺癌的表达及其意义

姜 昕, 周建华, 邓征浩, 屈晓辉, 蒋海鹰, 刘 英

(中南大学湘雅医学院病理学系, 长沙 410078)

[摘要] 目的:检测 Notch1, Jagged1 和血管内皮生长因子(VEGF)蛋白在非小细胞肺癌(NSCLC)组织的表达及其临床病理学意义。方法:应用免疫组织化学 SP 法检测 65 例 NSCLC 组织、15 例正常支气管上皮组织中 Notch1, Jagged1 和 VEGF 蛋白的表达并分析它们与临床病理参数间的关系。结果:Notch1, Jagged1 和 VEGF 蛋白在非小细胞肺癌中表达的阳性强度分别为 81.5% (53/65), 83.1% (54/65) 和 93.8% (61/65), 均明显高于正常支气管上皮组织的阳性强度 ($P < 0.05$); NSCLC 中 Notch1 和 VEGF 蛋白表达与患者临床分期和淋巴结转移密切相关 ($P < 0.05$); Jagged1 蛋白表达与患者病理类型和淋巴结转移有关。Notch1, Jagged1 和 VEGF 蛋白的表达三者两两间均呈显著正相关。结论:Notch1, Jagged1 和 VEGF 蛋白可能在肺癌发生发展中起重要作用;其高表达有可能作为预测 NSCLC 侵袭、转移的重要指标。

[关键词] Notch1; Jagged1; 血管内皮生长因子; 免疫组织化学; 非小细胞肺癌

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)06-1031-06

Expression and significance of Notch1, Jagged1 and VEGF in human non-small cell lung cancer

JIANG Xin, ZHOU Jian-hua, DENG Zheng-hao, QU Xiao-hui, JIANG Hai-ying, LIU Ying

(Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To determine the expressions of Notch1, Jagged1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human non-small cell lung cancer (NSCLC) and to explore its clinical pathological significance. **Methods** Immunohistochemical SP method was used to detect the expressions of Notch1, Jagged1 and VEGF in 65 patients with NSCLC and 15 normal epithelial tissues of the lung, and the relationship between them and clinic-pathological parameters were analyzed. **Results** The positive rates of Notch1, Jagged1 and VEGF in NSCLC were 81.5%, 83.1% and 93.8%, respectively, higher than those in normal epithelial tissues of the lung ($P < 0.05$). The positive expression levels of Notch1 and VEGF were closely associated with the tumor stage and the lymph node metastasis ($P < 0.05$). The positive expression levels of Jagged1 was positively correlated with the pathological type and lymph node metastasis. There was a positive correlation between Notch1, Jagged1 and VEGF. **Conclusion** Notch1, Jagged1 and VEGF protein may play an impor-

①收稿日期(Date of reception) 2007-04-28

作者简介(Biography) 姜昕(1975-),女,湖南永州人,硕士,讲师,现在永州职业技术学院医学院工作,主要从事肺癌的基础研究。

通讯作者(Corresponding author) 周建华, E-mail: jianhzhou@hotmail.com

基金项目(Foundation items) 湖南省自然科学基金(06JJ2098);湖南省卫生厅科研基金(B2006-216) This work was supported by Hunan Province Nature Science Foundation (06JJ2098) and Scientific Research Foundation of Hunan Province Health Bureau of P. R. China (B2006-216)

tant role in the pathway of carcinogenesis and progression of NSCLC. The up-regulation of Notch1, Jagged1 and VEGF protein expression probably predict NSCLC carrying relatively strong permeation and metastasis.

Key words: Notch1; Jagged1; VEGF; immunohistochemistry; non-small cell lung cancer

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007, 32(6):1031-06]

肺癌是常见的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的治疗及预后至今尚无突破性进展。Notch 蛋白可促进或抑制细胞的增殖、分化和凋亡^[1-2],调节机体血管的生成^[3]。Jagged1 是哺乳动物中第 1 个被证实的 Notch 受体的配体,在造血、肌肉形成、神经和血管发生等过程中起重要作用。有关 NSCLC 中 Notch1, Jagged1 蛋白的表达与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的相关性研究,尚未见文献报道。本研究采用链霉菌抗生素蛋白过氧化物(SP)法检测 56 例 NSCLC 组织 Notch1, Jagged1 和 VEGF 的表达,探讨它们与非小细胞肺癌的发生发展和临床病理学特征的关系,拟为肿瘤的诊治与预后的评估提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源及处理 标本选自中南大学湘雅医院 2004~2005 年手术切除后经病理证实的 NSCLC 标本 65 例和正常支气管上皮组织 15 例(非肺癌尸体解剖组织)。65 例患者中,男性 47 例,女性 18 例;年龄 28~75(平均 56.9)岁;肿块直径 >3 cm 患者 44 例,≤3 cm 患者 21 例;中央型肺癌 41 例,周围型肺癌 24 例。所有标本经 10% 的甲醛固定,常规石蜡包埋连续切片,厚 4 μm,分别作 HE 染色和免疫组织化学染色。

病理组织学诊断及分级按照 1999 年 WHO 肺癌组织学分类、分级标准^[4],65 例 NSCLC 中鳞癌 38 例,腺癌 27 例;高分化癌(Grade 1, G₁)15 例、中分化癌(Grade 2, G₂)24 例、低分化癌(Grade 3, G₃)26 例。

根据 1997 年国际抗癌联盟制订的肺癌临床分期标准^[5],I 期 29 例,II 期 13 例,III 期 23 例;有淋巴结转移 34 例,无淋巴结转移 31 例。所有患者术前未进行抗肿瘤化疗或放疗。

1.2 主要试剂与方法 羊抗人 Notch1、兔抗人 Jagged1、鼠抗人 VEGF 为美国 SantaCruz 公司产品;各种 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒为北京中杉公司产品。采用免疫组织化学 SP 法检测,步骤按试剂

盒说明书操作。用已知的阳性切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判断 以细胞膜或/和胞浆出现黄色或棕黄色颗粒为阳性反应。参照 Fromowitz 等^[6]提出的方法,稍加改进作半定量分析:随机观察 5 个高倍视野,每个视野计数 100 个肿瘤细胞,各视野中阳性细胞数的平均百分数作为该切片的阳性细胞百分比进行计分。0%~5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分。染色强度以多数阳性细胞呈现的染色特征为标准计分。细胞未着色为 0 分,染色呈淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。最后以阳性细胞的百分比和染色强度计分之之和所得的总分进行结果判定。0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为中度阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS13.0 统计软件进行秩和检验及 Spearman 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Notch1, Jagged1 和 VEGF 的蛋白表达及其与各临床病理参数的比较用等级资料的秩和检验;3 个变量阳性表达之间的关系采用 Spearman 等级相关性分析。

2 结 果

2.1 Notch1, Jagged1 和 VEGF 蛋白在 NSCLC 组织和正常支气管黏膜上皮中的表达 Notch1 蛋白阳性产物主要表达在癌细胞膜和细胞浆(图 1, 2);Jagged1 蛋白则主要在癌细胞浆表达,部分病例可有癌细胞核表达(图 3, 4);VEGF 蛋白主要表达于癌细胞浆,间质中纤维母细胞、血管内皮细胞也可表达(图 5)。Notch1, Jagged1 和 VEGF 蛋白在 NSCLC 中的阳性表达强度分别为 81.5% (53/65), 83.1% (54/65) 和 93.8% (61/65), 明显高于正常支气管黏膜上皮的 40% (6/15), 46.7% (7/15) 和 33.3% (5/15) (均 $P < 0.01$) (图 6, 表 1)。

2.2 NSCLC 组织 Notch1, Jagged1 和 VEGF 蛋白的表达与临床病理特征的关系 结果显示伴淋巴

结转移的 NSCLC 组织 Notch1 蛋白, Jagged1 蛋白和 VEGF 蛋白表达阳性强度分别为 88.2% (30/34), 均高于无淋巴结转移的 NSCLC 组织 ($P < 0.05$); III 期(晚期)肺癌病例 Notch1 蛋白和 VEGF 蛋白的表达强度均高于 I + II 期患者 ($P < 0.05$), 但 Jagged1 蛋白的表达则与肺癌临床分期无关 ($P > 0.05$); Jagged1 蛋白在腺癌中表达强度显著

高于鳞癌 ($P < 0.05$), Notch1 蛋白及 VEGF 蛋白在鳞癌组织与腺癌组织的阳性表达未见差异 ($P > 0.05$); NSCLC 组织 Notch1 蛋白, Jagged1 蛋白和 VEGF 蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小和组织分化等其他临床病理参数无明显相关 ($P > 0.05$) (表 2)。

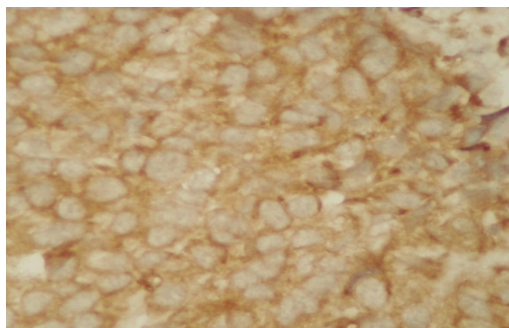


图 1 Notch1 在肺鳞癌中的表达(SP, ×400)

Fig. 1 Expression of Notch1 in lung squamous cell carcinoma (SP, ×400)

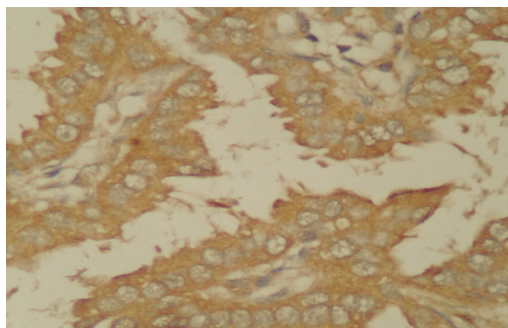


图 2 Notch1 在肺腺癌中的表达(SP, ×400)

Fig. 2 Expression of Notch1 in lung adenocarcinoma (SP, ×400)

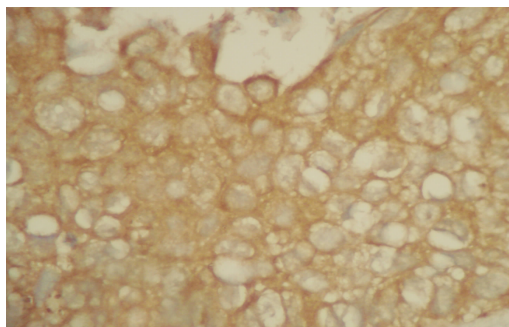


图 3 Jagged1 在肺鳞癌中的表达(SP, ×400)

Fig. 3 Expression of Jagged1 in lung squamous cell carcinoma (SP, ×400)

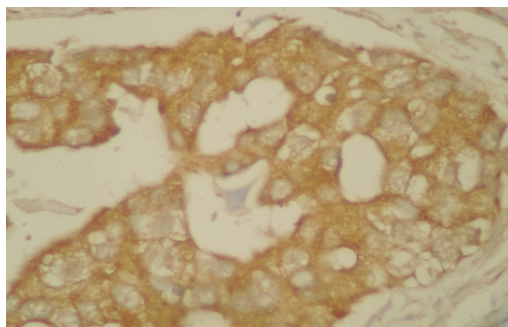


图 4 Jagged1 在肺腺癌中的表达(SP, ×400)

Fig. 4 Expression of Jagged1 in lung adenocarcinoma (SP, ×400)

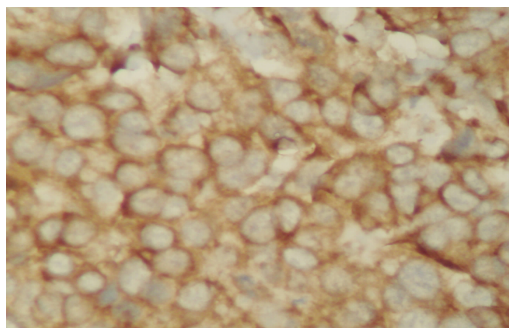


图 5 VEGF 在肺鳞癌中的表达(SP, ×400)

Fig. 5 Expression of VEGF in lung squamous cell carcinoma (SP, ×400)

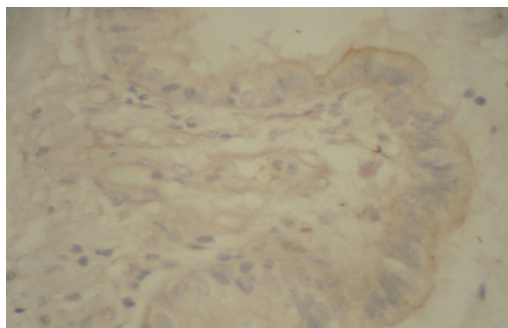


图 6 正常支气管黏膜上皮中 Notch1 蛋白表达弱阳性(SP, ×400)

Fig. 6 Expression of Notch1 in normal epithelial tissues of the lung (SP, ×400)

表1 NSCLC与正常支气管黏膜组织中Notch1, Jagged1和VEGF蛋白的表达

Table 1 Expressions of Notch1, Jagged1 and VEGF proteins in NSCLC and normal bronchi mucosa

项目	n	Notch1				Z	P	Jagged1				Z	P	VEGF				Z	P
		-	+	++	+++			-	+	++	+++			-	+	++	+++		
NSCLC	65	12	23	21	9	3.482	<0.001**	11	23	24	7	-3.703	<0.001**	4	24	28	9	-5.027	<0.001**
正常支气管黏膜	15	9	5	1	0			8	7	0	0			10	5	0	0		

与正常支气管黏膜上皮组织比较, ** $P < 0.01$

表2 Notch1, Jagged1和VEGF蛋白表达与各临床参数之间的关系

Table 2 Expressions of Notch1, Jagged1 and VEGF proteins and their clinic-pathological relationship in NSCLC

项目	n	Notch1				Z	P	Jagged1				Z	P	VEGF				Z	P
		-	+	++	+++			-	+	++	+++			-	+	++	+++		
性别																			
男	47	10	15	15	7	-0.199	0.842	10	14	20	3	-1.182	0.237	4	19	17	7	-1.929	0.054
女	18	2	8	6	2			1	9	4	4			0	5	11	2		
年龄(岁)																			
<55	24	4	9	5	6	-0.654	0.513	7	6	8	3	-0.774	0.439	3	8	9	4	-0.759	0.448
≥55	41	8	14	16	3			4	17	16	4			1	16	19	5		
肿瘤部位																			
中央型	41	7	14	15	5	-0.334	0.738	9	14	15	3	-1.340	0.180	4	16	18	3	-1.912	0.056
周围型	24	5	9	6	4			2	9	9	4			0	8	10	6		
肿瘤大小																			
≤3 cm	21	2	10	6	3	-0.279	0.780	2	9	8	2	-0.325	0.745	0	8	10	3	-0.708	0.479
>3 cm	44	10	13	15	6			9	14	16	5			4	16	18	6		
病理类型																			
鳞癌	38	9	14	11	4	-1.525	0.127	9	14	13	2	-2.098	0.036*	3	16	15	4	-1.444	0.149
腺癌	27	3	9	10	5			2	9	11	5			1	8	13	5		
组织分化																			
高	15	0	7	2	6	4.917	0.086	1	5	5	4	-3.347	0.188	0	4	8	3	3.242	0.198
中	24	5	7	11	1			3	10	10	1			1	9	11	3		
低	26	7	9	8	2			7	8	9	2			3	11	9	3		
临床分期																			
I + II	42	8	19	12	3	-2.053	0.040*	8	16	16	2	-1.475	0.140	3	19	16	4	-2.077	0.038*
III	23	4	4	9	6			3	7	8	5			1	5	12	5		
淋巴结转移																			
无	31	8	13	9	1	-2.529	0.011 [△]	7	12	12	0	-2.036	0.042 [△]	2	16	12	1	-2.581	0.010 [△]
有	34	4	10	12	8			4	11	12	7			2	8	16	8		

与临床分期I+II组比较, * $P < 0.05$; 与无淋巴结转移组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 NSCLC组织中Notch1, Jagged1和VEGF蛋白表达的相关性 经Spearman等级相关分析发现Notch1与Jagged1, VEGF蛋白的表达及Jagged1与VEGF蛋白的表达均呈显著正相关, P 均为0.000; r 分别为0.498, 0.428和0.564。

3 讨论

Notch基因发现于1919年,其突变可造成果蝇的残翅,20世纪80年代中期Artavanis Tsakonas研究组首次克隆了该基因。在哺乳动物中共发现4

类 *Notch* 基因,分别定位于染色体 9q34, 1p13-p11, 19p13.2-p13.1 和 6p21.3, 编码 4 种 Notch 受体,分别为 Notch1 ~ 4。Notch 受体是一种跨膜受体,细胞外的结构域包含 29 ~ 36 个串联的表皮生长因子样重复序列(epidermal growth factor, EGF)及 3 个富含半胱氨酸的 Lin/Notch 重复序列(Lin/Notch repeats, LNR)。研究显示 Notch 信号通路与肿瘤密切相关,在不同状况下,分别充当癌基因或抑癌基因^[7-8]。王敏等^[9]实验显示 Notch1 蛋白在不同类型鼻咽癌中有不同程度表达下调或不表达。有研究显示在不同组织、肿瘤发展的不同阶段,Notch 的作用也不同。Zagouras 等^[10]实验显示 Notch1 在宫颈癌发生早期阶段为促癌作用,而晚期表现为抗癌作用。Collins 等^[11]研究发现,NSCLC 组织 Notch1 和 Notch2 呈高表达,Notch 信号激活对 NSCLC 是促进肿瘤细胞生长。国内尚未见 Notch 蛋白在 NSCLC 中表达的类似文章报道。本实验结果显示 Notch1 蛋白在 NSCLC 中表达上调,提示 Notch1 蛋白信号可能促进 NSCLC 的发生发展,与 Collins 等的研究结果基本一致。本研究进一步显示 Notch1 蛋白的表达与患者临床分期和淋巴结转移呈正相关,提示检测肺癌组织 Notch1 蛋白可作为判断 NSCLC 恶性程度、转移的指标。

Notch 的配体包括 Jagged1, Jagged2, Delta1, Delta3 和 Delta4。Jagged1 是存在于哺乳动物细胞膜上 Notch 受体的主要配体之一,为单次跨膜糖蛋白,参与调控许多组织的生长发育,在维持正常造血前体细胞及其增殖过程中起着重要作用。Jagged1 通过与邻近细胞表面 Notch 的细胞外结构域结合而触发 Notch 信号通路,通过 HES-1, Del-tex, Nur77 和 NF- κ B 等转录因子调节靶基因的转录。Reedijk 等^[12]发现乳腺癌组织 Notch1 和 Jagged1 表达增强与恶性肿瘤侵袭性增强、预后不良有显著关系。国内外尚未见联合检测 NSCLC 组织中 Notch1 和 Jagged1 蛋白表达的文献报道。本实验结果显示 NSCLC 组织中 Jagged1 蛋白表达显著增强,伴淋巴结转移的 NSCLC 组织 Jagged1 蛋白表达阳性强度高于无淋巴结转移的 NSCLC 组织,提示 Jagged1 可促进 NSCLC 发生发展,其高表达可作为预测 NSCLC 侵袭、转移的重要指标。本研究显示 Notch1, Jagged1 和 VEGF 蛋白在 NSCLC 肺鳞癌和腺癌组织呈高表达, Jagged1 蛋白在腺癌中表达显著高于鳞癌,这种差异也许能说明临床肺腺癌往往较鳞癌预后差,且腺癌易早期转移的特性。

VEGF 是促进血管生长的最重要生长因子,检测其表达有助于判断肿瘤患者的生物学行为及其预后^[13]。VEGF 在肺癌中呈高表达^[14],其表达增加与肺癌恶性程度、易发生淋巴结转移及预后不良有关^[15-16]。本研究表明 VEGF 蛋白在 NSCLC 中的表达明显增强,提示其在肺癌癌变发生、发展中起十分重要作用,其高表达可能作为预测 NSCLC 侵袭、转移的重要指标。

Zeng 等^[17]研究发现血管生成因子能够刺激丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径,并诱导头颈鳞状上皮癌细胞中的 Notch 配体 Jagged1 表达。Jagged1 引发附近血管细胞中 Notch 的活化并促进新血管的形成。该研究阐明肿瘤细胞可通过 MAPK 和 Notch 信号途径刺激新血管的形成,癌细胞中的 Jagged1 与内皮细胞中 Notch 受体之间的接触促成肿瘤相关的血管形成。本研究对 Notch1, Jagged1 和 VEGF 的表达水平进行相关性分析,发现 Notch1, Jagged1 和 VEGF 蛋白三者两两间表达呈显著正相关。研究结果表明,Notch1 和 Jagged1 与 NSCLC 的发生、发展相关,Notch1 和 Jagged1 表达增强可能促进癌细胞的 VEGF 表达增加, Jagged1 可通过与激活的 Notch1 结合,增强其活性,刺激肿瘤新生血管形成从而促进肿瘤生长、侵袭及转移。

参考文献:

- [1] Artavanis Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. *Science*, 1999, 284(5415): 770-776.
- [2] Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(3): 393-409.
- [3] Rossant J, Hirashima M. Vascular development and patterning: making the right choices [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13(4): 408-412.
- [4] Travis W D, Colby T V, Corrin B, et al. WHO histological typing of lung and pleural tumors [M]. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
- [5] Mountain C F. Revisions in the international system for staging lung cancer [J]. *Chest*, 1997, 111(6): 1710-1717.
- [6] Fromowitz F B, Voila M V, Chao S, et al. ras p21 expression in the progression of brain cancer [J]. *Hum Pathol*, 1987, 18(12): 1268-1275.
- [7] Tonon G, Modi S, Wu L, et al. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway [J]. *Nat*

- Genet, 2003, 33(2): 208-213.
- [8] Nicolas M, Wolfer A, Raj K, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin [J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 416-421.
- [9] 王敏, 李锦添, 曾益新, 等. Notch1、P21^{WAF1} 和 Involucrin 在鼻咽癌组织中的表达及意义 [J]. 癌症, 2005, 24(10): 1230-1234.
- WANG Min, LI Jin-tian, ZENG Yi-xin, et al. Expression and significance of Notch1, P21^{WAF1} and involucrin in nasopharyngeal carcinoma [J]. Chinese Journal of Cancer, 2005, 24(10): 1230-1234.
- [10] Zagouras P, Stifani S, Blaumueller C M, et al. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(14): 6414-6418.
- [11] Collins B J, Kleeberger W, Ball D W. Notch1 in lung development and lung cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14(5): 357-364.
- [12] Reedijk M, Odorcic S, Chang L, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival [J]. Cancer Res, 2005, 65(18): 8530-8537.
- [13] 李宏江, 敬静, 陈琳, 等. 血管内皮生长因子与微血管密度对乳腺癌患者预后的评价: 1~10 年随访观察 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(8): 1574-1575.
- LI Hong-jiang, JING Jing, CHEN Lin, et al. Evaluation of vascular endothelial growth factor and tumor microvessel density in prognoses of patients with breast cancer: a follow-up of 1-10 years [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2004, 8(8): 1574-1575.
- [14] 李斌, 曹学文, 张建华, 等. 血管内皮生长因子在非小细胞肺癌中的表达及临床意义 [J]. 中国肺癌杂志, 2004, 7(2): 142-145.
- LI Bin, CAO Xue-wen, ZHANG Jian-hua, et al. Expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor in human non-small cell lung cancer [J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2004, 7(2): 142-145.
- [15] Makoto T, Masahiro T, Toshifumi T, et al. Frequent expression of the vascular endothelial growth factor mRNA in non-small-cell lung carcinoma [J]. Br J Cancer, 1999, 79(2): 363-369.
- [16] Ren Y, Li X, Zhang J. Correlation between the expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of lung carcinoma [J]. Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi, 1999, 22(9): 538-540.
- [17] Zeng Q, Li S, Chepeha D B, et al. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling [J]. Cancer Cell, 2005, 8(1): 13-23.

(本文编辑 郭 征)