

· 临床研究 ·

DLL4、VEGF在肺腺癌中的表达 及其与肿瘤血管生成的关系

李晓平 张清富 陆斌 邱雪杉 罗阳 张卫东 许顺

【摘要】背景与目的 血管发生（angiogenesis）依赖于多种促进血管发生因子和抑制血管发生因子的综合交互作用调控。血管内皮生长因子（VEGF）和Notch信号传递途径（Notch signaling pathway）参与了此过程。本研究旨在探讨肺腺癌组织中Notch配体DLL4、VEGF的表达及其与肺腺癌血管生成的关系及临床意义。方法 应用免疫组织化学方法检测80例肺腺癌（包括细支气管肺泡癌和普通肺腺癌）石蜡切片组织中DLL4、VEGF和CD34的表达。结果 DLL4、VEGF的表达与肺腺癌患者的肿瘤直径、临床分期、组织学分级、淋巴结转移密切相关，DLL4阳性表达病例中VEGF表达率明显比DLL4阴性表达病例高，DLL4、VEGF共表达时与微血管密度的相关性比DLL4单独表达更明显。DLL4的表达在普通肺腺癌中明显高于细支气管肺泡癌。结论 肺腺癌的预后与血管生成明显相关，DLL4的高表达与肺腺癌转移预后密切相关。

【关键词】DLL4；VEGF；CD34；肺肿瘤；免疫组织化学

【中图分类号】R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2009.02.04

Expression of DLL4 and VEGF in Lung Adenocarcinoma and their Relationship with Angiogenesis in Tumor

Xiaoping LI^{*#}, Qingfu ZHANG[△], Bin LU^{*}, Xueshan QIU[△], Yang LUO[◇], Weidong ZHANG[#], Shun XU^{*}

^{*}Department of Thoracic Surgery, China Medical University First Hospital, Shenyang 110001, China; [#]Department of Thoracic Surgery, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; [△]Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China; [◇]Department of Genetics, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: Shun XU, E-mail: xushun2005@sina.com

【Abstract】Background and objective Angiogenesis depends on the interaction of a variety of promoting factors and inhibiting factors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Notch signaling pathway take part in this process. This experiment investigates the expression of Notch ligand DLL4 and VEGF in lung adenocarcinoma and their relationship with angiogenesis in tumor. Methods Immunohistochemical method was used to detect DLL4, VEGF and CD34 protein expression in 80 cases of lung adenocarcinoma (including bronchioloalveolar carcinoma and common lung adenocarcinoma) paraffin section tissues. Results The expression of DLL4 and VEGF was closely related to tumor diameter, clinical stage, histological grade and lymph node metastasis, the VEGF expression rate in DLL4 positive expression cases was significantly more than the DLL4 negative cases, the correlation between microvascular density and DLL4, VEGF co-expression was more significant, the expression of DLL4 in common lung adenocarcinoma was significantly higher than that in bronchioloalveolar carcinoma. Conclusion The prognosis of lung adenocarcinoma is significant correlated with the angiogenesis, high expression of DLL4 is closely related to the metastasis and the prognosis.

【Key words】Human DLL4 protein; Vascular Endothelial Growth Factor A; CD34 Antigen; Lung neoplasms; Immunohistochemistry

作者单位：110001 沈阳，中国医科大学第一临床学院胸外科（李晓平，陆斌，许顺）；300192 天津，天津市第一中心医院胸外科（李晓平，张卫东）；110001 沈阳，中国医科大学基础医学院病理学教研室（张清富，邱雪杉）；中国医科大学基础医学院遗传学教研室（罗阳）（通讯作者：许顺，E-mail: xushun2005@sina.com）

肺癌的生长和转移有赖于血管的生成，以获得足够的血液供应。随着对肿瘤血管生成靶向治疗的深入研究，肺癌中特别是细支气管肺泡癌及普通肺腺癌中血管生成的作用及其机制已愈来愈受重视^[1]。Notch信号通路近来被证实是在血管发生中起重要作用，且内皮细胞的迁移、增殖和分化需要成纤维细胞生长因子（FGF）和血管

内皮细胞生长因子(VEGF)基因家族成员的调节^[2]。在哺乳动物细胞中Notch信号通路包含了5种跨膜Notch配体(Jagged1、Jagged2、DLL1、DLL3和DLL4)和4种Notch受体(Notch1-4)^[3]。DLL4是表达在血管发生、增殖部位内皮上的一种特殊配体。既往的研究^[4]表明, DLL4的表达在乳腺癌、肾癌及膀胱癌的血管系统中有所上调, 在人类内皮细胞中, DLL4在调节内皮细胞增殖、迁移、存活和网状系统形成中起重要作用。本实验通过检测细支气管肺泡癌和普通肺腺癌中DLL4、VEGF的表达, 及其与微血管密度的关系, 并分析细支气管肺泡癌及普通肺腺癌中相关因子表达的差异, 以探讨DLL4在判断肺癌预后中的价值即针对该因子靶向治疗的可行性。

1 材料和方法

1.1 标本来源及临床病理资料 收集中国医科大学第一临床学院胸外科及天津市第一中心医院2000年9月-2003年12月间手术切除的35例病理确诊的细支气管肺泡癌(bronchioloalveolar carcinoma, BAC)和45例普通肺腺癌(adenocarcinoma, AC)组织。组织均经中性甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μm 连续切片。全部病例术前均未行放、化疗, 术后均有明确病理诊断。80例肺腺癌组织按国际抗癌联盟(UICC)1997年修订的肺癌pTNM分期标准分为I/II期52例, III/IV期28例; 高分化46例, 中分化26例, 低分化8例; 有淋巴结转移37例, 无淋巴结转移43例; 男性32例, 女性48例; 年龄18岁-75岁(平均53岁 $\pm$ 19岁)。

1.2 免疫组织化学染色 兔抗人DLL4多克隆抗体, 购自Abcam公司, 链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-biotin-peroxidase, SP)超敏试剂盒(KIT29709)、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)酶底物显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。染色方法按SP法试剂盒说明书步骤进行: 切片常规脱蜡, 0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)中高温高压抗原修复90 s, 一抗(1:100)孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; DAB显色, 苏木素复染, 中性树脂封片。用PBS替代一抗作空白对照。

1.3 结果判定 所有的样本均经过两位病理医师进行评估。DLL4、VEGF以细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性染色。光镜下每张切片选取5个400倍视野, 每个视野计数100个肿瘤细胞, 共计500个细胞中的阳性细胞数, DLL4的评估为阳性细胞数<10%为阴性表达, $\leq 50\%$ 为低表达, $> 50\%$ 为高表达; VEGF的评估为阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性表达, $< 10\%$ 为阴性表达。血管判定标准为: 内皮细胞形成条状、裂隙状等孤立或簇状结构棕黄染色或有管腔者按一条血

管或淋巴管计数。低倍光镜下确定3个微血管高密度区域(热点), 然后在高倍镜下分别计数每个热点中3个区域的CD34阳性管腔数均值。MVD=CD34阳性管腔数均值^[5]。当两名医师计数相差10%以上时则重新计数。

1.4 统计学分析 采用卡方检验分析各组计数资料, 组间资料比较采用 t 检验, 采用Spearman等级相关分析DLL4与VEGF表达的相关性, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织染色结果 如图1所示, 在BAC及普通AC中DLL4、VEGF蛋白染色为棕黄色颗粒, 主要集中在细胞质内, 胞膜也有少量表达。

2.2 DLL4、VEGF的表达与临床病理特征的关系 分别对DLL4、VEGF的表达情况及其与肺腺癌临床病理特征的相互关系进行统计学分析, 结果如表1所示: DLL4、VEGF的表达与肺腺癌患者的病理类型($\chi^2=4.90$, $0.025<P<0.05$)、肿瘤直径($\chi^2=44.13$, $0.025<P<0.05$)、临床分期($\chi^2=43.98$, $0.025<P<0.05$)、组织学分级($\chi^2=44.30$, $0.025<P<0.05$)、淋巴结转移($\chi^2=4.84$, $0.025<P<0.05$)明显相关, 与患者性别($\chi^2=0.04$, $0.90>P>0.75$)、年龄($\chi^2=0.36$, $0.75>P>0.50$)无关。

2.3 BAC和普通AC中DLL4、VEGF的表达差异 在35张BAC切片和45张普通AC切片中, 每张随机取10个视野, 各类切片视野总数分别为350和450。在这些视野中分别计数DLL4阳性血管的出现个数和不出现个数。一个视野中出现单个DLL4阳性血管就足以被认为是DLL4阳性(阳性视野最大数: 10个视野中出现10个, 最小数: 10个视野中出现0个)。与BAC组织DLL4表达相比(随机阳性视野 4.0 ± 0.7), DLL4阳性血管大量出现在普通AC组织中(随机阳性视野 7.2 ± 0.6 , 两组资料的 t 检验显示: $t=10.996$, $P<0.001$)。VEGF的表达亦出现了相似的情况(BAC组织VEGF随机阳性视野 5.1 ± 0.5 , 其它AC组织为 7.9 ± 0.4 , $t=13.685$, $P<0.001$)。

2.4 BAC和普通AC中DLL4阳性血管集中区域的微血管密度差异 对于每个肿瘤组织切片中, DLL4阳性血管集中度最高的一个区域作标记, 并且统计CD34染色(见图1)血管个数, 在BAC组织切片, 35个DLL4集中区域共统计出对1233条血管(每个区域血管数= 35.2 ± 5.3), 而在普通AC组织切片45个区域统计血管总数为2 502条(每个区域血管数= 55.6 ± 9.5), 在BAC及普通AC组织切片DLL4阳性血管集中区域的微血管密度(MVD)存在明显差异, 普通AC中MVD要明显高于BAC($t=11.384$, $P<0.001$)。

表 1 DLL4、VEGF在肺腺癌中的表达与临床病理特征的关系

Tab 1 Relationship between expression of DLL4 and VEGF with clinicopathologic characteristics in adenocarcinoma of the lung

Characteristic	n	DLL4				VEGF			
		(+)	%	χ^2	P	(+)	%	χ^2	P
Sex				0.04	0.90>P>0.75			0.05	0.90>P>0.75
Male	32	22	68.75			24	75.00		
Female	48	34	70.83			37	77.08		
Age(year)				0.36	0.75>P>0.50			0.33	0.75>P>0.50
≥60	46	31	67.39			34	73.91		
<60	34	25	73.53			27	79.41		
Histology				4.90	0.025<P<0.05			6.16	0.010<P<0.025
Adenocarcinoma	45	36	80.00			39	86.67		
Bronchioloalveolar carcinoma	35	20	57.14			22	62.86		
diameter of tumor				4.13	0.025<P<0.05			7.59	0.005<P<0.01
≥3 cm	47	37	78.72			41	87.23		
<3 cm	33	19	57.58			20	60.61		
Clinical stage				3.98	0.025<P<0.05			5.23	0.010<P<0.025
I+II	52	32	61.54			35	67.31		
III+IV	28	24	85.71			26	92.86		
Differentiation				4.30	0.025<P<0.05			5.91	0.010<P<0.025
Poor and moderate	34	28	82.35			31	91.18		
High	46	28	60.87			30	65.22		
Lymph node metastasis				4.84	0.025<P<0.05			7.76	0.005<P<0.01
N0	43	24	55.81			27	62.79		
N1-3	37	32	86.49			34	91.89		

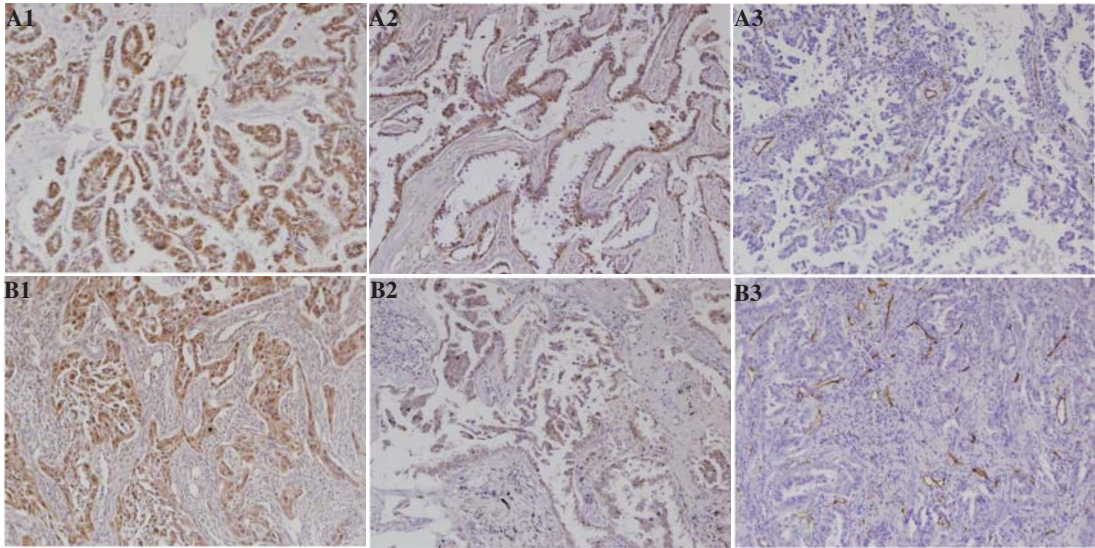


图 1 DLL4、VEGF和CD34在肺腺癌组织中的表达

A: 细支气管肺泡癌 (BAC); B: 普通肺腺癌 (AC); 1: DLL4 (+); 2: VEGF (+); 3: CD34 (+)

Fig 1 The expression of DLL4, VEGF and CD34 in adenocarcinoma of the lung

A: Bronchioloalveolar carcinoma (BAC); B: Adenocarcinoma (AC); 1: DLL4 (+); 2: VEGF (+); 3: CD34(+)

2.5 肺腺癌中DLL4与VEGF表达的相关性 对DLL4和VEGF阳性和阴性的数据进行比较,结果如表2所示: DLL4和VEGF的表达具有明显的一致性,在DLL4阳性表达病例中,VEGF表达阳性率明显增高($r=0.2658$, $P<0.05$)。

表2 肺腺癌中DLL4与VEGF表达的关系

Tab 2 Correlation of expression between DLL4 and VEGF in adenocarcinoma of the lung

	VEGF(+)	VEGF(-)	Total
DLL4(+)	47	9	56
DLL4(-)	14	10	24
Total	61	19	80

3 讨论

肺腺癌中过度的血管生成及VEGF的表达均提示了一种不良后果。为了更深刻地理解这种机制,本研究评价了DLL4-肺腺癌血管发生中Notch信号通路的一种特殊配体,作为一种在BAC和普通AC中潜在的预后评价指标。DLL4、VEGF主要表达在癌细胞质和(或)细胞膜中,在癌旁正常组织中则呈阴性表达,普通AC中DLL4、VEGF均要高于BAC中的表达,且DLL4与微血管密度亦呈正相关关系。

以往的研究^[5]显示,VEGF mRNA的表达在肺癌中是上调的。本实验研究发现,在BAC和普通AC中DLL4的表达与CD34和VEGF的表达均具有明显相关性。这些结果与以往在膀胱癌及肾透明细胞癌中的研究结果一致,即DLL4与VEGF的表达具有明显正相关性^[6]。本实验的结果同时也支持了体外实验关于内皮细胞中VEGF调节DLL4表达的结论^[7-9]。

研究^[10]显示,在正常血管和肿瘤血管中DLL4的表达与CD34的表达均具有明显相关性。DLL4阴性的血管中CD34的表达明显低于DLL4阳性的血管中CD34的表达。这说明了DLL4通过与外膜细胞Notch受体相互作用来调节血管的密度^[6]。已有报道^[6]在膀胱癌中DLL4的表达与血管成熟度及微血管密度密切相关,而其机制还需进一步的验证。有研究^[11-13]报道DLL4在Notch1、Notch4与内皮细胞之间传导信号,但是内皮细胞DLL4对外膜的作用至今仍未见报道。但是已有许多证据证实Notch信号通路在血管成熟中发挥作用,有学者报道,对DLL4的阻断可造成肿瘤组织中未成熟无功能血管的增多^[14,15], DLL4缺乏的小鼠血管一般都没有光滑的肌肉或外膜覆盖^[16]。这种表现类型与血小板生长因子B或血小板生长因子B受体缺乏的小鼠相似^[17,18]。

拥有成熟血管比例高的肿瘤可能对抗VEGF之类的抗

血管治疗反应较差,因为血管外膜可能对于生长因子的缺乏具有保护作用。最近研究^[19]发现人类内皮细胞中DLL4的过度表达可以下调VEGF受体2和NRP1的表达从而抑制细胞增殖,这也为该治疗的耐药提供了额外的证据。DLL4的表达和 α -SMA表达的联系说明了在VEGF之外,对DLL4的靶向治疗可针对成熟及不成熟的血管,因而也就可以获得最大的治疗益处^[20]。

DLL4的表达在内皮细胞完成最终分化的中间阶段,起到了促进细胞成熟和功能分化的作用,因此,它可能成为抗VEGF治疗肿瘤的重要靶点。

DLL4的表达与临床随访数据的结合,可以初步评估DLL4作为肿瘤预后标志的价值。以往的研究^[21]证实细支气管肺泡癌整体预后状况要优于普通肺腺癌,因此, DLL4的高水平可能提示了肿瘤复发率或肿瘤病死率的提高。在本项研究中,我们亦首次观察到了腺癌传统分类中高危度肿瘤具有DLL4的高水平表达。

在本实验中,我们发现DLL4在肺腺癌血管系统中优先表达,与微血管密度有关,在肺腺癌中有提示预后的价值,且与VEGF呈正相关,普通肺腺癌与细支气管肺泡癌中DLL4表达水平的差异可能决定了其生长、增殖、转移及预后的差异。DLL4的适宜水平是内皮细胞实现功能所必需的^[9,20],针对DLL4进行抑制或过表达的靶向治疗在治疗肺腺癌,特别是对抗VEGF治疗不敏感的恶性肿瘤中的意义,值得我们进一步更深层次探索。

参考文献

- 1 Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*, 2005, 40(2): 90-97.
- 2 Krebs LT, Xue Y, Norton CR, *et al*. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev*, 2000, 14(11): 1343-1352.
- 3 Radtke F, Schweisguth F, Pear W. The Notch "gospel". *EMBO Rep*, 2005, 6(12): 1120-1125.
- 4 Gridley T. Vascular biology: vessel guidance. *Nature*, 2007, 445(7129): 722-723.
- 5 Patel NS, Dobbie MS, Rochester M, *et al*. Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(16): 4836-4844.
- 6 Thurston G, Kitajewski J. VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *Br J Cancer*, 2008, 99(8): 1204-1209.
- 7 Patel NS, Li JL, Generali D, *et al*. Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8690-8697.
- 8 Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, *et al*. Regulation of Notch1 and Dll4 by

- vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(1): 14–25.
- 9 Li JL, Sainson RC, Shi W, *et al*. Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth *in vivo*. *Cancer Res*, 2007, 67(23): 11244–11253.
- 10 Ridgway J, Zhang G, Wu Y, *et al*. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*, 2006, 444(7122): 1083–1087.
- 11 Shawber CJ, Das I, Francisco E, *et al*. Notch signaling in primary endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 995: 162–170.
- 12 Rao PK, Dorsch M, Chickering T, *et al*. Isolation and characterization of the notch ligand delta4. *Exp Cell Res*, 2000, 260(2): 379–386.
- 13 Shutter JR, Scully S, Fan W, *et al*. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev*, 2000, 14(11): 1313–1318.
- 14 Thurston G, Noguera-Troise I, Yancopoulos GD. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(5): 327–331.
- 15 Sainson RC, Harris AL. Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis? *Trends Mol Med*, 2007, 13(9): 389–395.
- 16 Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, *et al*. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(45): 15949–15954.
- 17 Hellström M, Kalén M, Lindahl P, *et al*. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 1999, 126(14): 3047–3055.
- 18 Lindahl P, Johansson BR, Levén P, *et al*. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 1997, 277(5323): 242–245.
- 19 Williams CK, Li JL, Murga M, *et al*. Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood*, 2006, 107(3): 931–939.
- 20 Yan M, Plowman GD. Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(24): 7243–7246.
- 21 Yue DS, Zhang ZF, Wang CL. Clinical analysis in patients with stage I bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2007, 14(12): 939–941. [岳东升, 张真发, 王长利. I期细支气管肺泡癌与肺腺癌临床分析比较. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(12): 939–941.]

(收稿: 2009-01-08 修回: 2009-01-18)

(本文编辑 南娟)

· 启事 ·

《中国肺癌杂志》被DOAJ收录

2008年6月5日, 本刊编辑部收到瑞典隆德大学图书馆Wahlgren博士邮件, 《中国肺癌杂志》已被DOAJ收录, 标志本刊成为达到国际标准的开放存取期刊(Open Access Journal)。

DOAJ简介

DOAJ (Directory of Open Access Journal, <http://www.doaj.org/>) 是由瑞典隆德大学图书馆于2003年建立的全球OA期刊门户网站, 目前收录的OA全文期刊超过3000种。收录主题包括: 农业及食品科学, 美学及建筑学, 生物及生命科学, 经济学, 化学, 地球及环境科学, 一般主题, 健康科学, 历史及考古学, 语言及文学, 法律及政治学, 数学及统计学, 哲学及宗教学, 物理及天文学, 一般科学, 社会科学, 工程学等主题。DOAJ的目标: 让开放途径的科技期刊能够更广泛和更方便的被读者看到, 使它们的作用能得到更大发挥。

《中国肺癌杂志》编辑部

2008年10月