

## 论著·基础研究

## DLL4-Notch1 信号通路与肺癌组织新生血管形成的相关性研究\*

张丽<sup>1</sup>,匡黎<sup>1</sup>,王宇<sup>2</sup>,王玉洁<sup>3</sup>,向伟<sup>1</sup>,权瑞泉<sup>1△</sup>,杨靖<sup>4</sup>

(湖北医药学院附属东风医院:1.肿瘤科;2.儿科;3.急诊科,湖北十堰 442001;4.湖北医药学院基础医学院微生物免疫教研室,湖北十堰 442000)

**摘要:**目的 探讨 Delta 样配体 4(DLL4)-Notch1 信号通路与非小细胞肺癌(NSCLC)组织新生血管形成的相关性。方法 选择 2009 年 8 月至 2017 年 2 月保存于湖北医药学院附属东风医院病理科的 NSCLC 组织标本(肺癌组,  $n=56$ )与癌旁组织标本(癌旁组,  $n=56$ ),采用免疫组织化学法检测 DLL4、Notch1 表达情况,记录病理组织的新生血管形成情况,调查患者的一般资料并进行相关性分析。结果 肺癌组的 DLL4 与 Notch1 阳性表达率分别为 57.1% 和 14.3%,癌旁组分别为 7.1% 和 32.1%,DLL4、Notch1 在 2 组间差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。在 56 例患者中,病理表现为新生血管形成 30 例,其 DLL4 与 Notch1 阳性表达率分别为 96.7% 和 1.3%,与非新生血管形成(1.3% 和 26.9%)比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。在肺癌组中, Spearman 相关分析显示,新生血管形成与 DLL4 表达呈正相关( $r=0.734, P=0.000$ ),与 Notch1 表达呈负相关( $r=-0.795, P=0.000$ )。多因素非条件 Logistic 回归分析显示,DLL4 表达、Notch1 表达、临床分期、淋巴结转移、组织学分化均是影响新生血管形成的因素( $P<0.05$ )。结论 DLL4-Notch1 信号通路促进新生血管形成是 NSCLC 组织发生侵袭、转移的关键事件,可作为评估 NSCLC 患者临床特征与转移的重要指标。

**关键词:**DLL4-Notch1 信号通路; 肺癌组织; 新生血管形成; 相关性**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.22.001**中图法分类号:**R734.2**文章编号:**1673-4130(2019)22-2689-04**文献标识码:**A**Correlation research between DLL4-Notch1 signaling pathway and neovascularization in lung cancer tissues\***ZHANG Li<sup>1</sup>, KUANG Li<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, WANG Yujie<sup>3</sup>, XIANG Wei<sup>1</sup>, QUAN Ruiquan<sup>1△</sup>, YANG Jing<sup>4</sup>

(1. Department of Oncology; 2. Department of Paediatrics; 3. Department of Emergency, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442001, China; 4. Department of Microbial Immunology, Basic Medical College, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between DLL4-Notch1 signaling pathway and neovascularization in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** From August 2009 to February 2017, 56 NSCLC tissue specimens (lung cancer group,  $n=56$ ) and paracancerous tissue specimens (adjacent group,  $n=56$ ) preserved in the Department of Pathology, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine were selected. The expression of DLL4 and Notch1 was detected by immunohistochemistry. The angiogenesis of pathological tissues was recorded. The general data of patients were investigated and the correlation was analyzed. **Results** The positive expression rates of DLL4 and Notch1 in lung cancer group were 57.1% and 14.3%, respectively, and those in the adjacent group were 7.1% and 32.1%, respectively, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). Among 56 patients, 30 had neovascularization, and the positive rates of DLL4 and Notch1 were 96.7% and 1.3%, respectively, and the differences were statistically significant compared with non-neovascularization (1.3% and 26.9%,  $P<0.05$ ). In the lung cancer group, Spearman correlation analysis showed the neovascularization was positive correlation with DLL4 expression ( $r=0.734, P=0.000$ ), and was negative correlation with Notch1 expression ( $r=-0.795, P=0.000$ ). Multivariate unconditional Logistic regression analysis showed that DLL4 expression, Notch1 expression, clinical stage, lymph node metastasis, and histological differentiation were all factors affected neovascularization ( $P<0.05$ ). **Conclusion** DLL4-Notch1 signaling pathway promotes neovascularization, which is a key event for invasion and metas-

\* 基金项目:2018 年度湖北省教育厅科研计划项目(B2018117)。

作者简介:张丽,女,主管护师,主要从事肿瘤临床护理研究。 △ 通信作者, E-mail:quanrq39@163.com。

本文引用格式:张丽,匡黎,王宇,等. DLL4-Notch1 信号通路与肺癌组织新生血管形成的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(22):2689-2692.

tasis of NSCLC tissues. It can be used as an important index to evaluate the clinical characteristics and metastasis of NSCLC patients.

**Key words:** DLL4-Notch1 signaling pathway; lung cancer tissue; neovascularization; correlation

肺癌是目前全球发病率最高的癌症,每年全球有 100 多万人死于肺癌,其中 80% 以上为非小细胞肺癌 (NSCLC)<sup>[1]</sup>。NSCLC 的恶性程度比较高,多数患者就诊时既已发生远处转移,伴随有血管生成,失去手术治疗机会,5 年生存率低<sup>[2-3]</sup>。抗血管生成药物给 NSCLC 治疗带来的生存获益已被临床证实<sup>[4]</sup>,但是目前研究对 NSCLC 相关的新生血管形成信号通路的报道较少。Delta 样配体 4(DLL4)-Notch1 信号通路可促进或抑制细胞增殖、分化和凋亡,还有助于调节机体血管生成<sup>[5-6]</sup>。并且该通路在进化过程中属于高度保守的信号通路,其中 Notch1 受体家族有 4 个成员,Notch1 是最常见的 Notch1 受体,在结直肠癌、胃癌中起着促癌的作用<sup>[7-8]</sup>。已有研究显示,Notch1 的过量表达可使 NSCLC 细胞周期阻滞在 G0 期,抑制细胞生长<sup>[9-10]</sup>。基础研究也显示,Notch1 在正常早期小鼠肺内均有表达,其在小鼠肺中的表达量随年龄增长而增加,在肺发育中发挥重要作用<sup>[11]</sup>,但是与新生血管形成的研究还鲜有报道。本文具体探讨 DLL4-Notch1 信号通路与 NSCLC 组织新生血管形成的相关性,希望为 NSCLC 的诊断、评价、治疗提供思路与参考。现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2009 年 8 月至 2017 年 2 月保存于湖北医药学院附属东风医院病理科的肺癌组织标本 56 例(肺癌组)与癌旁组织标本(离肺癌肿块 > 5.0 cm 的肺组织)56 例(癌旁组)。纳入标准:临床病理资料完整,每例患者都保存有肺癌组织标本与癌旁组织标本;病理确诊为 NSCLC,患者术前均未行放、化疗及其他抗肿瘤治疗;年龄 20~80 岁。排除标准:临床与病理资料缺乏者;合并严重性心脏瓣膜病、先天性心脏病患者。56 例患者中男 30 例,女 26 例;年龄 22~78 岁,平均(63.22 ± 2.19)岁;病理类型:鳞状细胞癌 50 例,腺癌 6 例;分化类型:高分化 6 例,中分化 35 例,低分化 15 例;淋巴结转移 31 例;临床分期:I 期 21 例,II 期 19 例,III 期 10 例,IV 期 6 例;平均病程(4.10 ± 0.22)年;平均体质量指数(22.47 ± 1.48)kg/m<sup>2</sup>。

**1.2 免疫组织化学分析** 兔/鼠抗人多克隆抗体(抗 DLL4 抗体、抗 Notch1 抗体)、PBS 缓冲液购自北京中杉金桥生物技术有限公司,羊抗鼠/兔 IgG 聚合物(二抗)、DAB 显色剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。所有组织标本均经 4% 中性福尔马林固定,石蜡包埋组织以 4 μm 厚连续切片。60 ℃ 烘烤,二甲苯、乙醇脱蜡水化,高压热修复,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活。免疫

组织化学染色步骤按试剂盒说明书进行,抗 DLL4 抗体、抗 Notch1 抗体工作浓度为 1:500,37 ℃ 孵育 1 h,二抗于室温下作用 10 min(工作浓度 1:2000),DAB 显色 3~5 min,苏木素对比染色,封片后在镜下观察分析结果。免疫组织化学染色步骤按试剂盒说明书进行,以 PBS 液代替一抗作空白对照,用已知阳性片作对照。

**1.3 判断标准** 所有免疫组织化学结果最后由 2 位病理医师采用独立双盲法阅片判定。DLL4、Notch1 均以细胞膜和细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。着色强度:0 分,无色;1 分,淡黄色;2 分,棕黄色;3 分,棕褐色。着色范围:0 分,阳性细胞所占百分比 <10%;1 分,11%~50%;2 分,51%~75%;3 分,>75%。将着色强度得分和着色范围得分的乘积作为判断结果,总得分 ≤ 2 为阴性,总得分 > 2 为阳性。

**1.4 调查内容** 本研究调查了患者的一般资料与新生血管形成状况,包括年龄、性别、临床分期、病程、分化类型、病理类型、淋巴结转移、体质量指数、新生血管形成等。

**1.5 统计学处理** 选择 SPSS22.00 软件对本研究数据进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,计数数据以率(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,两者相关性采用 Spearman 相关分析,将具有统计学意义的单因素变量进行多因素 Logistic 回归分析,检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

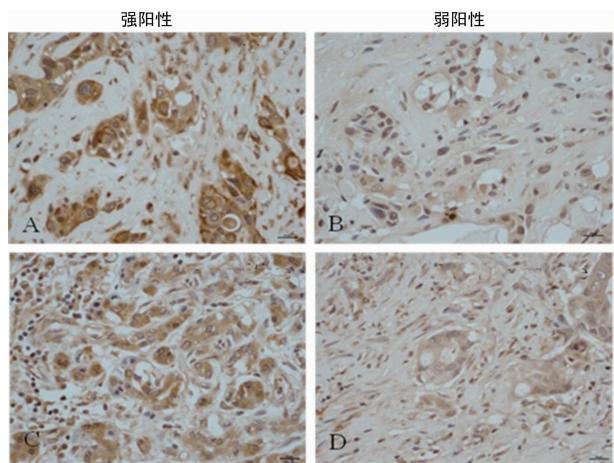
## 2 结 果

**2.1 DLL4-Notch1 表达情况对比** 肺癌组的 DLL4 与 Notch1 阳性表达率分别为 57.1% 和 14.3%,癌旁组分别为 7.1% 和 32.1%,DLL4、Notch1 在 2 组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1 与图 1。

表 1 2 组 DLL4-Notch1 表达情况对比[n(%)]

组别	n	DLL4	Notch1
肺癌组	56	32(57.1)	8(14.3)
癌旁组	56	4(7.1)	18(32.1)
$\chi^2$		32.094	5.009
P		0.000	0.025

**2.2 新生血管形成情况** 在 56 例患者中,病理表现为新生血管形成 30 例,其 DLL4 与 Notch1 阳性表达率分别为 96.7% 和 1.3%,与非新生血管形成(1.3% 和 26.9%)比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。



注:A、B 表示 DLL4;C、D 表示 Notch1

图 1 肺癌组 DLL4-Notch1 的免疫组织化学表达

表 2 肺癌组中新生血管形成的 DLL4、Notch1 阳性表达率比较[n(%)]

病理类型	n	DLL4(n=32)	Notch1(n=8)
新生血管形成	30	29(96.7)	1(1.3)
非新生血管形成	26	3(11.5)	7(26.9)
$\chi^2$		29.575	4.846
P		0.000	0.028

**2.3 相关性分析** 在肺癌组中, Spearman 相关分析显示, 新生血管形成与 DLL4 表达呈正相关 ( $r = 0.734, P = 0.000$ ), 与 Notch1 表达呈负相关 ( $r = -0.795, P = 0.000$ )。

**2.4 影响因素分析** 在肺癌组中, 以新生血管形成作为因变量, 将调查资料、免疫组织化学结果等因素作为自变量, 多因素非条件 Logistic 回归分析显示, DLL4 表达、Notch1 表达、临床分期、淋巴结转移、组织学分化均为影响新生血管形成的因素 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 影响肺癌患者新生血管形成的多因素分析结果(n=56)

指标	B	SE	Wald $\chi^2$	P	OR	95%CI
DLL4 表达	2.014	0.488	17.309	0.000	7.494	2.874~19.482
Notch1 表达	1.094	0.533	5.069	0.041	0.573	0.305~0.981
临床分期	0.861	0.428	4.071	0.044	2.366	1.025~5.465
淋巴结转移	1.540	0.619	6.186	0.013	0.231	0.064~0.722
组织学分化	0.680	0.337	4.079	0.043	1.976	1.029~3.822

### 3 讨 论

肺癌是目前全球发病率最高的癌症, NSCLC 约占肺癌总数的 80%。NSCLC 患者的 5 年生存率很低, 术后转移、复发是主要原因<sup>[12-13]</sup>。本研究显示, 肺癌组的 DLL4 与 Notch1 阳性表达率分别为 57.1% 和 14.3%, 癌旁组分别为 7.1% 和 32.1%, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Notch1 的过量表达可以引起

NSCLC 细胞形态发生改变, 抑制细胞的生长。Notch1 在肿瘤组织中的表达与具有促癌作用的 DLL4 因子均呈负相关, 提示 Notch1 可能存在抑制 NSCLC 生长的趋势<sup>[14-15]</sup>。

肿瘤的生长与肿瘤的血管生成密切相关, 新生血管形成可以与机体血液循环相通, 使得肿瘤组织能得到更好的血液供应, 促进肿瘤的转移与侵袭<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, 在 56 例患者中, 病理表现为新生血管形成 30 例, 其 DLL4 与 Notch1 阳性表达率分别为 96.7% 和 1.3%, 与非新生血管形成 (1.3% 和 26.9%) 比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明有新生血管形成的 NSCLC 具有更高的侵袭性和转移能力, 临幊上表现为患者预后很差。新生血管形成的特点为管道内没有血管内皮细胞衬覆, 肿瘤细胞模仿机体血管生成而形成瘤细胞条索并围成管道<sup>[17]</sup>。病幊学显示分化程度越低, 新生血管形成的阳性率越高, 肿瘤的恶性度越高<sup>[18]</sup>。而 DLL4 与 Notch1 的表达都可调节肿瘤干细胞的分化, 特别是 DLL4 高表达可导致肿瘤干细胞比例减低, 抑制肿瘤细胞克隆形成, 促进细胞分化和凋亡<sup>[19]</sup>。当前也有研究显示, Notch1 具有很强的致瘤、血管侵袭能力; 在增殖过程中, Notch1 可能会分泌某种化学因子, 使得肿瘤细胞具有新生血管的微环境, 从而调节内皮细胞的增殖, 并促进血管的发育和成熟<sup>[20]</sup>。

肿瘤的生长与肿瘤的血管生成密切相关, 抗血管生成已经是当前肿瘤治疗研究的新方向。DLL4-Notch1 信号通路是影响肿瘤血管生成的重要信号通路, DLL4 是唯一特异性存在于血管内皮细胞的 Notch1 配体, 可调控血管萌发和分支的形态<sup>[21]</sup>。DLL4 只存在于内皮细胞的表面, 在肿瘤组织中呈高表达状态, 可促进肿瘤生长; 阻断 DLL4 信号, 起到协同抑制肿瘤生长的作用<sup>[22]</sup>。Notch1 受体是目前 Notch 信号通路中研究最多的受体, 其通过邻近细胞间的相互作用来调控细胞的生物学行为; Notch1 的异常活化可能使细胞过度增殖和侵袭<sup>[23]</sup>。本研究 Spearman 相关分析显示, 肺癌组织的新生血管形成与 DLL4 表达呈正相关 ( $r = 0.734, P = 0.000$ ), 与 Notch1 表达呈负相关 ( $r = -0.795, P = 0.000$ ); 多因素非条件 Logistic 回归分析显示, DLL4 表达、Notch1 表达、临床分期、淋巴结转移、组织学分化均为影响新生血管形成的因素 ( $P < 0.05$ ), 表明 DLL4-Notch1 信号通路异常可能参与 NSCLC 的病幊学分化等, 该通路的异常表达可促进新生血管形成和肿瘤的侵袭、转移<sup>[24]</sup>。但是抗新生血管形成治疗并不是对所有 NSCLC 都有效, 有的 NSCLC 虽然在治疗初期有效, 但在治疗过程中可以发展为耐药, 因此, 有必要研究更多的影响新生血管形成的信号通路, 寻找新的血管治疗靶点, 从而改善患者的预后<sup>[25]</sup>。

## 4 结 论

DLL4-Notch1 信号通路在 NSCLC 的形成中起重要作用。DLL4-Notch1 信号通路促进新生血管形成是 NSCLC 组织发生侵袭、转移的关键事件,可作为评估 NSCLC 患者临床特征与转移的重要指标。

## 参考文献

- [1] 徐秋萍,肖仁栋,熊为旻,等. Notch 信号通路相关基因多态性与肺癌易感性的关联研究[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(3): 243-252.
- [2] MCKEAGE M J, KOTASEK D, MARKMAN B, et al. Phase IB trial of the anti-cancer stem cell DLL4-Binding agent demcizumab with pemetrexed and carboplatin as first-line treatment of metastatic non-squamous NSCLC [J]. Target Oncol, 2018, 13(1): 89-98.
- [3] TRINDADE A, DJOKOVIC D, GIGANTE J, et al. Endothelial DLL4 overexpression reduces vascular response and inhibits tumor growth and metastasization in vivo [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 189.
- [4] 周怡然,辛宇,陈骏. 小细胞肺癌中 Notch1 信号通路, ASCL1 与 EMT 关系研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2018, 40(3): 270-273.
- [5] ZHANG J F, CHEN Y, QIU X X, et al. The vascular delta-like ligand-4 (DLL4)-Notch4 signaling correlates with angiogenesis in primary glioblastoma: an immunohistochemical study[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 3797-3805.
- [6] YANG M H, ZANG Y S, HUANG H, et al. Arsenic trioxide exerts anti-lung cancer activity by inhibiting angiogenesis[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2014, 14(6): 557-566.
- [7] 王凤玲. 利用小干扰 RNA 沉默长非编码 RNA ZFAS1 能够促进安罗替尼对非小细胞肺癌的抗肿瘤活性[J]. 生物技术通讯, 2018, 29(4): 506-510.
- [8] 刘恒锐,赵国丽,王福文,等. Notch 信号通路在肺癌和肺癌干细胞中的作用及其抑制剂[J]. 国际肿瘤学杂志, 2018, 45(4): 250-252.
- [9] LIU Z W, WANG Y, ZHU H T, et al. Matrine blocks AGEs-induced HCSMCs phenotypic conversion via suppressing Dll4-Notch pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 835(1): 126-131.
- [10] 蔡华荣,江跃全. Notch1 和 Bmi-1 蛋白在肺癌组织中的表达及意义[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(5): 683-687.
- [11] BILLIARD F, KARALIOTA S, WANG B, et al. Delta-like ligand-4-Notch signaling inhibition regulates pancreatic islet function and insulin secretion[J]. Cell Rep, 2018, 22(4): 895-904.
- [12] 刘青锋,杨军峰,杨光煜,等. 微小 RNA-125a 通过 Notch 通路抑制肺癌细胞侵袭,迁移和增殖[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(6): 1001-1004.
- [13] PAGIE S, GERARD N, CHARREAU B. Notch signaling triggered via the ligand DLL4 impedes M2 macrophage differentiation and promotes their apoptosis [J]. Cell Commun Signal, 2018, 16(1): 4.
- [14] PITULESCU M E, SCHMIDT I, GIAIMO B D, et al. Dll4 and notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation[J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(8): 915.
- [15] 李纪远,张灿斌,马新,等. 长链非编码 H19 靶向调节 miR-107 通过 Notch 通路对肺癌的侵袭迁移的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(9): 1392-1397.
- [16] CARRA S, SANGIORGIO L, PELUCCHI P A, et al. Zebrafish Tmem230a cooperates with the Delta/Notch signaling pathway to modulate endothelial cell number in angiogenic vessels[J]. J Cell Physiol, 2018, 233 (2): 1455-1467.
- [17] 李维,刘旭,张国倩,等. 动物水平的绿原酸通过 Notch1 信号通路调控非小细胞肺癌凋亡及机制研究[J]. 中国肿瘤杂志, 2017, 20(8): 555-561.
- [18] ANTFOLK D, SJOQVIST M, CHENG F, et al. Selective regulation of Notch ligands during angiogenesis is mediated by vimentin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114 (23): E4574-E4581.
- [19] YOU C, ZHAO K, DAMMANN P, et al. EphB4 forward signalling mediates angiogenesis caused by CCM3/PD-CD10-ablation[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21 (9): 1848-1858.
- [20] 盛晶,万里新,屈中玉. miR-23a 靶向 NID2 通过 Notch 通路调控肺癌细胞的侵袭和迁移[J]. 肿瘤防治研究, 2017, 44(6): 381-386.
- [21] 邹斌,周学亮. Notch 信号通路相关分子在肺癌中的表达,临床意义及生物学作用[J]. 重庆医学, 2017, 46(10): 1416-1419.
- [22] BADENES M, TRINDADE A, PISSARRA H A, et al. Delta-like 4/Notch signaling promotes ApcMin/+ tumor initiation through angiogenic and non-angiogenic related mechanisms[J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 50.
- [23] 金子,马锐,于若曦,等. c-Met 及 Notch-1 对非小细胞肺癌患者预后的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26 (11): 1692-1696.
- [24] SACILOTTO N, CHOULIARAS K M, NIKITENKO L L, et al. MEF2 transcription factors are key regulators of sprouting angiogenesis [J]. Genes Dev, 2016, 30 (20): 2297-2309.
- [25] 罗彬,秦蓁,王旭东. Notch1 受体在肺癌组织的表达及意义[J]. 诊断病理学杂志, 2016, 23(2): 144-145.