

乳腺癌中 DLL4 的表达与临床病理参数及腋窝淋巴结转移的关系

蔡秀明 黄元夕

摘要 目的 探讨乳腺癌中血管生长因子 (DLL4) 的表达及其与临床病理参数和腋窝淋巴结转移的关系。方法 免疫组化法检测 132 例乳腺癌组织及 40 例癌旁组织中 DLL4 的表达情况,分析 DLL4 的表达与乳腺癌患者临床病理参数和腋窝淋巴结转移的相关性。结果 乳腺癌患者中 DLL4 的高表达率为 56.8%,显著高于癌旁组织组 (13.8%)。DLL4 的高表达率与乳腺癌患者腋窝淋巴结转移以及 TNM 分期呈正相关。DLL4 高表达是乳腺癌患者出现腋窝淋巴结转移的独立预测因子 ($OR = 3.726, 95\% CI: 1.751 \sim 7.929, P = 0.001$)。结论 乳腺癌组织中 DLL4 呈高表达的患者的恶性程度较高,更易出现腋窝淋巴结转移。

关键词 乳腺癌 血管生长调控因子 免疫组化 腋窝淋巴结转移

中图分类号 R737.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.015

Expression of DLL4 Protein is Related to Clinicopathological Variables and Axillary Lymph Node Metastasis in Breast Cancer. Cai Xiuming, Huang Yuanxi. Department of Breast Surgery, The Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150081, China

Abstract **Objective** To evaluate the relationship between DLL4 expression and clinicopathologic features as well as axillary lymph node metastasis in breast cancer. **Methods** A total of 132 patients with breast cancer who undergone primary mastectomies plus axillary lymph node dissection from November 2012 to September 2013 were eligible for this study. The expression of DLL4 in breast cancer tissues was examined immunohistochemically. **Results** The high expression of DLL4 was observed in 56.8% (75/132) in patients with breast cancer. DLL4 high expression correlated with the TNM stage ($P = 0.005$) and axillary lymph node metastasis ($P < 0.001$) of breast cancer. Moreover, the presence of lymph node metastasis was significantly associated with DLL4 expression ($OR = 3.726, 95\% CI: 1.751 \sim 7.929, P = 0.001$). **Conclusion** DLL4 overexpression correlated with the advanced extent and axillary lymph node metastasis in breast cancer. DLL4 may serve as a new molecular marker to predict the axillary lymph node metastasis of breast cancer in the clinic.

Key words Breast cancer; DLL4; Immunohistochemistry; Axillary lymph node metastasis

乳腺癌已成为全球女性发生率最高的恶性肿瘤,同时亦是女性癌症患者的首要死亡原因之一^[1]。在我国乳腺癌的发生率呈逐年上升的趋势,其侵袭和转移是造成患者死亡的主要原因,其中淋巴道转移是乳腺癌最为常见的转移方式,腋窝淋巴结是否转移是乳腺癌最重要的预后因素之一。

DLL4 作为 Notch 的一个配体,是 1993 年由 Palopulu 等在对 Notch 信号通路配体的研究中分离出来的,DLL4 基因定位于染色体 15q21.1,编码含有 685 个氨基酸残基的蛋白质,特异性表达在生理性及病理性的血管生成中^[2]。已有大量研究证实 DLL4 与 VEGF 在血管发育和稳态维持中发挥着同样重要

的作用,具有潜在的临床应用价值^[3]。研究发现在成人和胚胎组织中 DLL4 主要在脉管系统的内皮细胞中呈高表达,而 DLL4 在实体瘤方面的研究起步较晚^[4,5]。既往研究发现 DLL4 在胃癌、乳腺癌、胰腺癌、肺癌及恶性胶质瘤的癌组织及血管系统中的表达有所上调,DLL4 可调节肿瘤血管的生成,从而影响肿瘤的生长和进展,因此 DLL4 是很有前景的肿瘤治疗靶点,已成为肿瘤研究领域的热点^[6-10]。本研究旨在通过免疫组化方法检测 DLL4 在乳腺癌组织中的表达,探讨其与乳腺癌临床病理参数及腋窝淋巴结转移的相关性,从而为预测乳腺癌的恶性程度及腋窝淋巴结转移等提供帮助。

材料与方法

1. 一般资料:收集 2012 年 11 月 ~ 2013 年 9 月在哈尔滨医科大学附属肿瘤医院乳腺外科住院并行手术治疗的乳腺癌蜡块标本 132 例,所有患者术前均未进行辅助化疗、放疗或免

基金项目:黑龙江省教育厅基金资助项目(12531420)

作者单位:150081 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院乳腺外科二病房

房

通讯作者:黄元夕,电子邮箱:doctor_hyx@126.com

疫治疗,术式为乳腺癌改良根治术,且切除的腋窝淋巴结数目>10,并且具有完整的临床和随访资料。132例患者均为女性,患者年龄31~74岁,平均年龄 49.00 ± 8.71 岁。其中伴腋窝淋巴结转移61例,无腋窝淋巴结转移71例。浸润性导管癌104例,浸润性小叶癌16例,其他类型癌12例。肿物直径: ≤ 2 cm者52例,2~5cm者68例,>5cm者12例。组织学分级: G_1 17例, G_2 80例, G_3 35例。TNM分期:I期37例,II期58例,III期37例。

2. 免疫组化染色:每例乳腺癌组织的病理切片均由两位病理科专家确认诊断为乳腺癌,癌旁乳腺组织均取自上述29例标本距癌组织3cm以上的乳腺组织。DLL4兔抗人多克隆抗体购自英国Abcam公司(Ab7280),工作浓度为1:100。采用免疫组织化学SP法将标本连续切片,切片厚度为4 μ m,常规脱蜡、水化,经3% H_2O_2 消化内源性过氧化物酶后,微波抗原修复,一抗、生物素标记的二抗作用后,DAB显色剂染色,苏木素复染后,经过梯度乙醇脱水干燥,二甲苯透明,常规中性树胶封固后于显微镜下观察。以PBS代替一抗作为阴性对照,以已知的DLL4阳性表达的卵巢癌标本作为阳性对照。

3. 染色结果判断: DLL4蛋白阳性表达主要表现为细胞膜和细胞质内呈现棕黄色或棕褐色颗粒。采用半定量方法进行判断,以染色强度结合阳性细胞数百分比综合计分。染色强度以多数细胞呈现的染色特性计分:无着色为0分,淡黄色为

1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。阳性细胞百分比:0%为0分,1%~25%为1分,26%~50%为2分,>50%为3分。每张切片随机取5个400倍视野,每个视野均进行染色强度计分与阳性细胞百分比计分,染色强度与阳性细胞百分比的加和:0~3分为低表达,4~6分为高表达^[11,12]。

4. 统计学方法:所有数据均经SPSS 16.0软件进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验,DLL4表达水平与乳腺癌腋窝淋巴结转移的相关性采用Logistic回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. DLL4在乳腺癌组织中呈高表达: DLL4蛋白在乳腺癌癌旁组织中的高表达率为13.8%,而在乳腺癌组织中的高表达率明显升高为56.8%。二者阳性表达率差异有统计学意义($P = 0.000$),详见表1、图1。

表1 乳腺癌组织和癌旁组织中DLL4表达的差异

组别	样本量 ($n = 161$)	DLL4 的表达		
		高表达例数(n)	%	P
癌旁组	29	4	13.8	0.000
乳腺癌组	132	75	56.8	

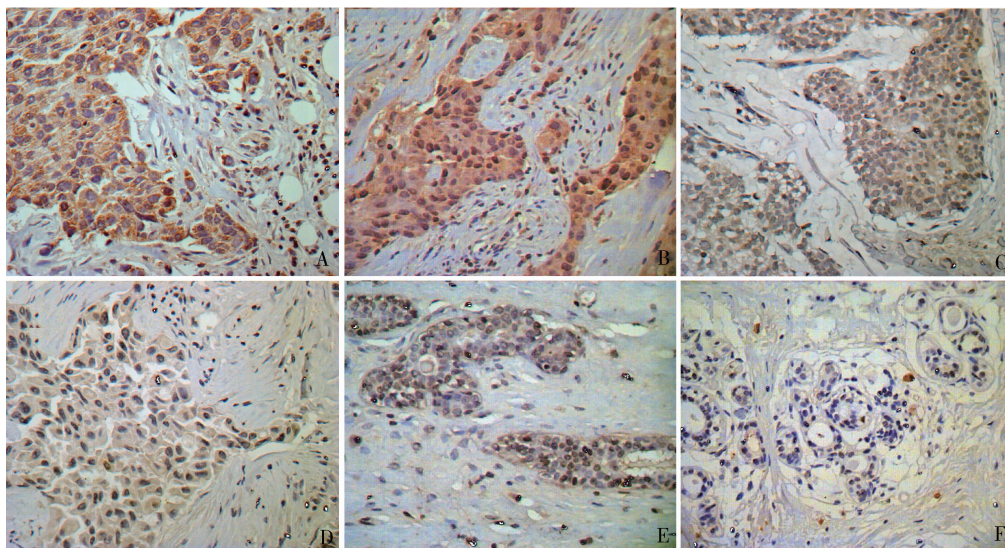


图1 乳腺癌组织及癌旁组织中DLL4的表达(SP, $\times 200$)

A、B. DLL4在乳腺癌组织中高表达;C、D. DLL4在乳腺癌组织中低表达;E. DLL4在癌旁组织中高表达;F. DLL4在癌旁组织中低表达

2. DLL4蛋白表达与临床病理特征的关系:腋窝淋巴结有转移组DLL4蛋白的高表达率为73.8%,明显高于腋窝淋巴结无转移组为42.3% ($P = 0.000$); I期患者DLL4的高表达率为35.1%,II期患者DLL4的高表达率为62.1%,III期患者DLL4的高表达率为70.3%,随着临床分期的提升,DLL4的高表达率明显升高($P = 0.005$)。浸润性导管癌患者中

DLL4的高表达率为52.9%,浸润性小叶癌患者中DLL4的高表达率为87.5%,而在其他组织学类型中的高表达率为50.0%,浸润性小叶癌中DLL4的高表达率明显升高($P = 0.030$)。DLL4蛋白在乳腺癌中的表达水平与患者年龄、是否绝经、肿瘤直径以及组织学分级无相关性($P > 0.05$,表2)。

表 2 DLL4 的表达和乳腺癌临床病理参数的相关性分析 [n(%)]

变量	样本量 (n = 132)	DLL4 的表达		P
		低表达 57	高表达 75	
年龄(岁)				
≤50	79	33(41.8)	46(58.2)	0.690
>50	53	24(45.3)	29(54.7)	
绝经状态				
绝经前	62	28(45.2)	34(54.8)	0.666
绝经后	70	29(41.4)	41(58.6)	
肿瘤直径(cm)				
<2	52	26(50.0)	26(50.0)	0.408
2~5	68	27(39.7)	41(60.3)	
>5	12	4(33.3)	8(66.7)	
组织学类型				
浸润性导管癌	104	49(47.1)	55(52.9)	0.030
浸润性小叶癌	16	2(12.5)	14(87.5)	
其他类型	12	6(50.0)	6(50.0)	
组织学分级				
高分化	17	8(47.1)	9(52.9)	0.878
中分化	80	35(43.8)	45(56.2)	
低分化	35	14(40.0)	21(60.0)	
TNM 分期				
I	37	24(64.9)	13(35.1)	0.005
II	58	22(37.9)	36(62.1)	
III	37	11(29.7)	26(70.3)	
淋巴结转移				
无	71	41(57.7)	30(42.3)	0.000
有	61	16(26.2)	45(73.8)	

其他类型:黏液癌、髓样癌、化生性癌

3. 乳腺癌患者中 DLL4 与腋窝淋巴结转移的相关性:在 132 例乳腺癌患者中,71 例患者无腋窝淋巴结转移,而 61 例患者伴有腋窝淋巴结转移。而在 61 例伴有腋窝淋巴结转移的患者中,45 例(73.8%)患者表现出 DLL4 高表达。因此采用 Logistic 回归分析来评估 DLL4 的高表达对出现腋窝淋巴结转移影响。单因素分析表明肿瘤直径以及 DLL4 高表达(OR = 3.844,95% CI:1.834 ~ 8.054,P = 0.000)是乳腺癌患者出现腋窝淋巴结转移的相关因素(表 3)。将以上两个变量带入多变量 Logistic 回归模型,同时带入患者年龄去除混杂因素,结果表明,DLL4 高表达是乳腺癌患者出现腋窝淋巴结转移的独立预测因子(OR = 3.726,95% CI:1.751 ~ 7.929,P = 0.001,表 3)。

讨 论

DLL4 基因在 2001 年首次被发现,在脑、肺、心脏、骨骼肌、睾丸、卵巢及子宫等正常组织存在较低水平的表达,同时亦有研究表明其在正常结肠、胃及食管的黏膜中存在表达^[13]。DLL4 在人体多种肿瘤组织中表达水平有所不同,在膀胱癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、结肠癌及肾透明细胞癌中呈高表达^[11,12,14,15]。同时膀胱癌及肾透明细胞癌的研究表明 DLL4 高表达提示患者出现淋巴结转移的风险升高^[14]。以上研究结果提示 DLL4 与多种肿瘤的发生、发展及侵袭转移关系密切,因此确定 DLL4 的调控机制及其在肿

表 3 乳腺癌淋巴结转移的高危因素 Logistic 回归分析

变量	单因素分析				多因素分析			
	B	SE	OR(95% CI)	P	B	SE	OR(95% CI)	P
年龄(岁)								
≤50			参考值				参考值	
>50	0.191	0.356	1.211(0.602 ~ 2.433)	0.591	0.221	0.389	1.248(0.582 ~ 2.674)	0.570
绝经状态								
绝经前			参考值					
绝经后	0.574	0.354	1.775(0.887 ~ 3.553)	0.105				
肿瘤大小(cm)								
<2	参考值			参考值				
2~5	0.795	0.379	2.003(0.953 ~ 4.213)	0.047	0.638	0.399	1.893(0.866 ~ 4.141)	0.110
>5	1.429	0.678	3.778(1.000 ~ 14.273)	0.030	1.177	0.716	3.243(0.797 ~ 13.204)	0.100
组织学类型								
浸润性导管癌	参考值							
浸润性小叶癌	0.444	0.541	1.559(0.540 ~ 4.503)	0.412				
其他类型	-0.144	0.618	0.866(0.258 ~ 2.908)	0.816				
组织学分级								
高分化	参考值							
中分化	-0.049	0.543	0.952(0.329 ~ 2.761)	0.928				
低分化	0.883	0.604	2.418(0.740 ~ 7.903)	0.144				
DLL4 的表达								
低表达	参考值			参考值				
高表达	1.346	0.377	3.844(1.834 ~ 8.054)	0.000	1.315	0.385	3.726(1.751 ~ 7.929)	0.001

瘤发生、发展中的作用对恶性肿瘤的诊断及治疗具有重要意义。

乳腺癌在全球女性恶性肿瘤中发生率及病死率居于首位,浸润转移是乳腺癌的恶性生物学行为,是导致患者死亡的主要原因,其中淋巴转移是最常见的转移途径,是肿瘤细胞、宿主细胞及细胞外基质之间一系列复杂、多步骤相互作用的结果^[16,17]。同侧淋巴结是乳腺癌最易转移的部位,腋窝淋巴结是否出现转移也是乳腺癌治疗方案的选择及预后判断的重要指标之一,因此腋窝淋巴结转移的早期诊断有助于合理治疗方案的制定,对改善乳腺癌患者预后有重要的临床意义^[18]。既往研究表明淋巴血管间隙浸润、肿瘤直径、病理类型以及组织学分级均与乳腺癌患者出现腋窝淋巴结转移密切相关^[19]。近年来研究者着眼于一些分子生物学标志物,如 VEGF - C、C - erbB - 2、E - cadherin 及 VERFR - 3 等,到目前为止可用于临床预测乳腺癌腋窝淋巴结转移的标志物尚未完全明确,因此,进一步研究 DLL4 是否可以联合其他因子以预测乳腺癌腋窝淋巴结转移对改善乳腺癌患者的预后具有重要意义。

本研究主要着眼于 DLL4 与乳腺癌腋窝淋巴结转移的关系。研究发现在 DLL4 在乳腺癌患者中表达水平明显升高,其中乳腺癌伴腋窝淋巴结转移组 DLL4 的高表达率最高达到 73.8% (45/61),同时 *Logistic* 回归分析结果表明 DLL4 是乳腺癌患者出现腋窝淋巴结转移的相关因素,且其高表达是乳腺癌患者出现腋窝淋巴结转移的独立预测因子 (OR = 3.726, 95% CI: 1.751 ~ 7.929, $P = 0.001$)。此结果与膀胱癌及肾透明细胞癌的研究结果相似^[14]。因此, DLL4 在乳腺癌腋窝淋巴结转移过程中起到重要的促进作用,其高表达的乳腺癌患者更易发生腋窝淋巴结转移,侵袭性更强,恶性程度更高,预后更差,此结果提示 DLL4 可能成为预测乳腺癌腋窝淋巴结转移风险的新分子标志物。除此之外,笔者研究还发现 DLL4 蛋白高表达与乳腺癌 TNM 分期之间呈正相关,即乳腺癌 TNM 分期越高, DLL4 蛋白阳性表达就越显著。上述结果提示 DLL4 作为癌基因,通过各种调控机制对乳腺癌的发生、发展过程起重要作用, DLL4 蛋白高表达可以作为临床监测乳腺癌进展的一个重要指标,提示 DLL4 可能成为诊断乳腺癌的新分子标志物。

综上所述, DLL4 蛋白的高表达在乳腺癌的发生、发展、浸润转移中起重要作用,提示 DLL4 基因可能成为乳腺癌的诊断以及预测乳腺癌恶性程度和腋窝淋巴结转移风险的新的分子生物学标志物。

参考文献

- DeSantis C, Siegel R, Bandi P, *et al.* Breast cancer statistics, 2011 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61:409 - 418
- Shutter JR, Scully S, Fan W, *et al.* DLL4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium [J]. *Genes Dev*, 2000, 14 (11):1313 - 1318
- Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries [J]. *Nature*, 2007, 445 (7129):781 - 784
- 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 [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (23):11244 - 11253
- Segarra M, Williams CK, Sierra Mde L, *et al.* DLL4 activation of Notch signaling reduces tumor vascularity and inhibits tumor growth [J]. *Blood*, 2008, 112 (5):1904 - 1911
- Ishigami S, Arigami T, Uenosono Y, *et al.* Clinical implications of DLL4 expression in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32:46
- Xiao M, Yang S, Ning X, *et al.* Aberrant expression of delta - like ligand 4 contributes significantly to axillary lymph node metastasis and predicts postoperative outcome in breast cancer [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45 (11):2302 - 2310
- Qiu XX, Chen L, Wang CH, *et al.* High delta - like ligand 4 (DLL4) is correlated with peritumoral brain edema and predicts poor prognosis in primary glioblastoma [J]. *Medicine: Baltimore*, 2014, 93 (8):e57
- Yu S, Sun J, Zhang J, *et al.* Aberrant expression and association of VEGF and DLL4/Notch pathway molecules under hypoxia in patients with lung cancer [J]. *Histol Histopathol*, 2013, 28 (2):277 - 284
- Kang M, Jiang B, Xu B, *et al.* Delta like ligand 4 induces impaired chemo - drug delivery and enhanced chemoresistance in pancreatic cancer [J]. *Cancer Lett*, 2013, 330 (1):11 - 21
- Donnem T, Andersen S, Al - Shibli K, *et al.* Prognostic impact of Notch ligands and receptors in nonsmall cell lung cancer: coexpression of Notch - 1 and vascular endothelial growth factor - a predicts poor survival [J]. *Cancer*, 2010, 116:5676 - 5685
- Chen HT, Cai QC, Zheng JM, *et al.* High expression of delta - like ligand 4 predicts poor prognosis after curative resection for pancreatic cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19 (Suppl 3):S464 - S474
- Malhotra K, Luehrsens KR, Costello LL, *et al.* Identification of differentially expressed mRNAs in human fetal liver across gestation [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27:839 - 847
- Patel NS, Dobbie MS, Rochester M, *et al.* Up - regulation of endothelial delta - like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 4836 - 4844
- 王天宝, 黄奕华, 兰平, 等. 结直肠癌血管生成与抑制的相关性研究 [J]. *中华普通外科杂志*, 2005, 20:513 - 515
- Coughlin SS, Ekwueme DU. Breast cancer as a global health concern [J]. *Cancer Epidemiol*, 2009, 33:315 - 318
- 陈意生, 史景泉. 肿瘤分子细胞生物学 [M]. 北京: 北京人民军医出版社, 2002:50 - 79
- Sørle T, Perou CM, Tibshirani R, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:10869 - 10874
- Silverstein MJ, Skinner KA, Lomis TJ. Predicting axillary nodal positivity in 2282 patients with breast carcinoma [J]. *World J Surg*, 2001, 25:767 - 772

(收稿日期:2015 - 05 - 12)

(修回日期:2015 - 05 - 15)