

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000082

细胞跨膜 Notch 配体 4 和血管内皮生长因子蛋白在子宫内膜异位症组织中的表达及意义

叶 青, 马 楠

(郑州大学第二附属医院妇产科, 郑州 450014)

【摘要】目的:探讨细胞跨膜 Notch 配体 4(delta-like ligand 4, DLL4)蛋白和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)组织中的表达及意义。**方法:**采用免疫组织化学 SP 法检测 48 例 EMs 的异位内膜(A 组)、37 例在位内膜(B 组)及 30 例正常子宫内膜组织(C 组)中 DLL4 和 VEGF 蛋白的表达。**结果:**(1)A、B、C 3 组中, DLL4 蛋白的平均积分光密度(integral optical density, IOD)值分别为(145.01 ± 10.47)、(115.56 ± 10.87)、(90.08 ± 8.56), VEGF 的 IOD 值分别为(148.48 ± 8.36)、(122.79 ± 5.68)、(108.75 ± 7.39), 组间差异均有统计学意义($F=279.113$ 和 $r=296.049$, P 均 <0.05)。(2)A、B 两组中 DLL4 和 VEGF 蛋白的表达存在正相关($r=0.828$ 和 $r=0.773$, P 均 <0.05), C 组中二者的表达无相关性。(3)A、B 两组中 I、II 期 DLL4 和 VEGF 蛋白的表达均显著低于 III、IV 期($P<0.05$)。**结论:**DLL4、VEGF 蛋白可能在 EMs 的发生发展中发挥着重要作用。

【关键词】子宫内膜异位症;细胞跨膜 Notch 配体 4;血管内皮生长因子

【中图分类号】R711.71

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-30

Expression and significance of delta-like ligand 4 and vascular endothelial growth factor in endometriosis

Ye Qing, Ma Nan

(Department of Gynecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and significance of delta-like ligand 4 (DLL4) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis (EMs). **Methods:** Expressions of DLL4 and VEGF in 48 cases of ectopic endometrium (group A), 37 cases of eutopic endometrium (group B) and 30 cases of normal endometrium (group C) was detected by the immunohistochemical SP method. **Results:** (1) In groups A, B, C, expression of DLL4 was (145.01 ± 10.47), (115.56 ± 10.87) and (90.08 ± 8.56) while expression of VEGF was (148.48 ± 8.36), (122.79 ± 5.68) and (108.75 ± 7.39), with significantly differences among 3 groups ($F=279.113$ and $F=296.049$, $P<0.05$). (2) In group A and B, expressions of DLL4 and VEGF showed a positive correlation ($r=0.828$ and $r=0.773$, $P<0.05$), but in group C, their expression showed no correlation. (3) In group A and B, expression of DLL4 and VEGF at stage I and II were significantly lower than that at stage III and IV ($P<0.05$). **Conclusions:** DLL4 and VEGF may play an important role in the pathogenesis of EMs.

【Key words】endometriosis; delta-like ligand 4; vascular endothelial growth factor

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)属于妇科良性疾病,但其病变广泛,常侵犯卵巢及盆腔等部位,引起盆腔黏连、痛经、性交痛及不孕等,且有转移、浸润、复发等恶性行为,严重影响患者的生活质量。目前该病的发病机制尚未阐明,随着对 EMs 的深入研究,血管发生的作用及其机制已成为当前关注的焦点。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是促进血管生成的最主要的生

物因子,Notch 信号通路尤其是其配体细胞跨膜 Notch 配体 4(delta-like ligand 4, DLL4)蛋白被认为是调控血管形成的另一重要机制。本实验采用免疫组织化学 SP 法联合检测 DLL4 蛋白和 VEGF 蛋白在 48 例 EMs 患者异位内膜、37 例在位内膜及 30 例正常内膜组织中的表达,并分析二者的相关性,以探讨二者在 EMs 发生、发展中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例组 随机选取 2011 年 10 月至 2012 年 8 月在郑

作者介绍:叶 青, Email: yeqing1987@163.com,

研究方向:普通妇科疾病。

通信作者:马 楠, Email: mnwdf@yahoo.com.cn。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000082.html>

州大学第二附属医院妇科因卵巢囊肿行腹腔镜手术治疗且术后病理诊断为子 EMs 的患者 48 例,取其卵巢异位内膜(A 组)及宫腔在位内膜组织(B 组)37 例(其中 11 例因未婚无性生活未取)。按 1987 年美国生育协会修正标准分期:A 组:I、II 期 21 例,III、IV 期 27 例;B 组 I、II 期 16 例,III、IV 期 21 例。

1.1.2 对照组(C 组) 随机选取同期因不孕症行宫腔镜检查的患者 30 例,取其宫腔正常内膜组织。

1.1.3 纳入标准 病例组及对照组患者均处于月经周期子宫内膜增生期,3 组之间年龄差异无统计学意义($P>0.05$),均有较好的可比性,所有研究对象均通过研究知情同意,无其他内外科合并症,月经周期规律 28~35 d,排除子宫腺肌症,无其他妇科疾病及内分泌疾病、无生殖道炎症且半年内均未行激素治疗。

1.2 主要试剂

兔抗人 DLL4、VEGF 多克隆抗体分别由北京博奥森生物工程有限公司、美国 SANTA CRUZ 生物公司生产(工作浓度均为 1:100),DAB 显色试剂盒、SP9000 试剂盒均由北京中杉生物工程公司生产。

1.3 实验方法

采用 SP 法检测组织中 DLL4 和 VEGF 蛋白。所有标本均用 0.9%氯化钠注射液冲洗去除血液等杂质,10%甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋,4 μm 厚度连续切片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烤片 2 h,脱蜡、水化、抗原修复、阻断内源性过氧化酶、显色、梯度酒精脱水、二甲苯透明及中性树脂胶封片。SP 实验步骤严格按试剂盒说明进行,PBS 缓冲液替代一抗试剂作阴性对照,已知阳性切片做阳性对照。

1.4 结果判定

显微镜(Olympus)下观察切片,DLL4 和 VEGF 均以细胞质出现黄色至棕黄色颗粒为阳性表达,应用电子计算机图像分析系统(上海山富科学仪器有限公司,Biosens Digital Imaging System v1.6),随机选取 5 个非重叠的阳性高倍视野(400 $\times$),测定平均积分光密度值(integral optical density, IOD)。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 对实验数据进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。经检验数据服从正态分布、具有方差齐性。采用单因素方差分析比较 2 种蛋白在 A、B、C 组的表达,组内两两比较采用 LSD- t 检验;采用 Pearson 相关对数据进行相关性分析;A、B 组内不同分期比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

DLL4、VEGF 蛋白均主要表达于子宫内膜腺体上皮细胞的胞质,间质细胞的胞质极少量表达,不计入 IOD 分析。见图 1~6。

2.1 DLL4、VEGF 蛋白的表达

DLL4、VEGF 蛋白在 3 组中的表达:A 组>B 组>C 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

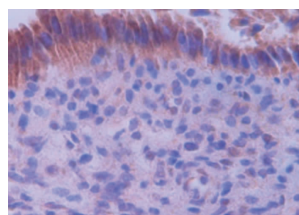


图 1 DLL4 蛋白异位内膜的表达(400 $\times$)

Fig.1 Expression of DLL4 proteins in ectopic endometrium (400 $\times$)

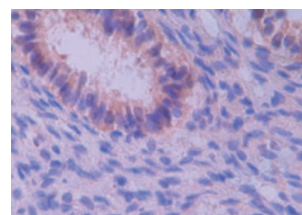


图 2 DLL4 蛋白在位内膜的表达(400 $\times$)

Fig.2 Expression of DLL4 proteins in eutopic endometrium (400 $\times$)

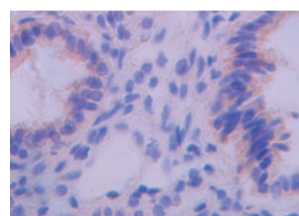


图 3 DLL4 蛋白正常内膜的表达(400 $\times$)

Fig.3 Expression of DLL4 proteins in normal endometrium (400 $\times$)

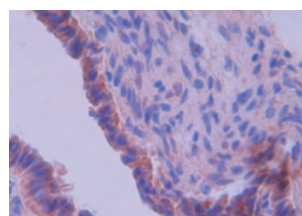


图 4 VEGF 蛋白异位内膜的表达(400 $\times$)

Fig.4 Expression of VEGF proteins in ectopic endometrium (400 $\times$)

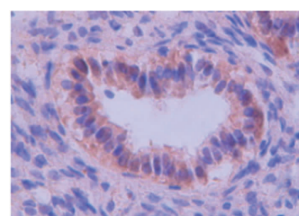


图 5 VEGF 蛋白在位内膜的表达(400 $\times$)

Fig.5 Expression of VEGF proteins in eutopic endometrium(400 $\times$)

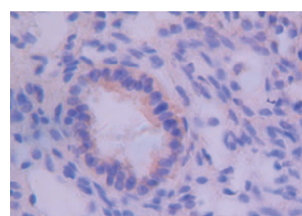


图 6 VEGF 蛋白正常内膜的表达(400 $\times$)

Fig.6 Expression of VEGF proteins in normal endometrium (400 $\times$)

表 1 DLL4、VEGF 蛋白在 A、B、C 3 组中的表达

Tab.1 Expression of DLL4 and VEGF proteins in groups A,B,C

组别	例数(n)	年龄(岁)	DLL4	VEGF
A组	48	29.46 $\pm$ 6.08	145.01 $\pm$ 10.47 ^a	148.48 $\pm$ 8.36 ^a
B组	37	29.84 $\pm$ 6.42	115.56 $\pm$ 10.87 ^a	122.79 $\pm$ 5.68 ^b
C组	30	30.17 $\pm$ 5.61	90.08 $\pm$ 8.56	108.75 $\pm$ 7.39
F 值		0.127	279.113	296.049
P 值		0.881	0.000	0.000

注:a 与 B、C 2 组相比, $P<0.05$;b,与 A、C 2 组相比, $P<0.05$

2.2 DLL4、VEGF 蛋白的相关性

A、B 组中 DLL4 和 VEGF 蛋白的表达均有明显的一致性($P<0.05$),C 组中二者无相关性。见表 2。

2.3 不同分期 A、B 中 DLL4、VEGF 蛋白的表达

A 组中 DLL4、VEGF 蛋白在 I、II 期的表达均明显低于 III、IV 期($t_{\text{DLL4}}=-7.375, P=0.000$ 和 $t_{\text{VEGF}}=-4.774, P=0.000$),B 组中 DLL4、VEGF 蛋白在 I~II 期的表达均明显低于 III~IV 期($t_{\text{DLL4}}=-5.578, P=0.000$ 和 $t_{\text{VEGF}}=-4.274, P=0.000$),见表 3。

表 2 DLL4、VEGF 蛋白的相关性

Tab.2 Correlation between DLL4 and VEGF proteins

组别	例数 (n)	DLL4	VEGF	r 值	P 值
A组	48	145.01 ± 10.47	148.48 ± 8.36	0.828	0.000
B组	37	115.56 ± 10.87	122.79 ± 5.68	0.773	0.000
C组	30	90.08 ± 8.56	108.75 ± 7.39	0.171	0.367

表 3 不同分期 A、B 组中 DLL4、VEGF 蛋白的表达

Tab.3 Expression of DLL4 and VEGF proteins in different stages of groups A and B

EMs分期	例数 (n)	DLL4	VEGF
A组 I、II期	21	136.37 ± 5.84 ^a	143.08 ± 5.08 ^a
III、IV期	27	151.73 ± 8.03	152.68 ± 8.04
B组 I、II期	16	107.13 ± 7.47 ^a	119.04 ± 4.12 ^a
III、IV期	21	121.98 ± 8.41	125.65 ± 5.04

注:a,与同组 III、IV期相比, $P < 0.05$

3 讨 论

新生血管提供血液支持是异位内膜细胞宫外持续生长的主要原因,近年来,EMs 中血管发生的作用及其机制备受关注。DLL4 蛋白是近期发现的一种新的哺乳动物 Notch 信号途径的重要配体^[1]。研究发现,DLL4 蛋白可抑制血管内皮顶端细胞的形成,通过调节细胞密度、位置及行为方式,有效促进血管内皮细胞的正常分化和血管网的形成^[2]。Patel 等^[3]通过体外 RNA 干扰技术下调 DLL4 蛋白表达,发现血管内皮细胞的增殖、迁移和血管网络形成明显受到抑制。这些研究结果提示 DLL4 蛋白可能是诱导增殖的血管内皮细胞向成熟分化发展的关键因素。DLL4 蛋白以往被认为特异表达于血管内皮细胞^[4],研究^[5-6]发现在肺癌、胰腺癌等多种恶性肿瘤组织中 DLL4 蛋白表达均上调,且与肿瘤的临床分期、淋巴结转移等密切相关。但关于其在 EMs 组织中的表达国内外尚无报道。本研究发现,DLL4 蛋白在异位内膜及在位内膜组织的腺上皮细胞的胞质中呈阳性表达,表达量明显高于对照组;其在异位内膜中的表达量高于在位内膜,在异位内膜及在位内膜中随着临床分期的升高表达显著增加,提示 DLL4 蛋白与 EMs 的发生发展关系密切。

VEGF 蛋白是功能最强的促血管形成因子。本实验表明:其在异位内膜的表达高于在位内膜,在位内膜中表达高于对照组,组间差异均有统计学意义,与以往报道一致^[7],说明 VEGF 蛋白组织中的高表达与 EMs 促血管发生关系密切。同时,其表达强度随 EMs 临床分期的上升而增强,说明 VEGF 蛋白在 EMs 的发生发展中可能发挥着重要作用。

本实验还发现 DLL4、VEGF 蛋白存在明显的正

相关,说明二者共同参与了 EMs 的发生发展。研究表明 VEGF 可上调 DLL4 蛋白的表达^[8],而 DLL4 蛋白作为 VEGF 下游通路的关键性负性调控因子,反馈性抑制血管出芽和分支形成,降低血管密度,增强血液灌注^[9]。推测 EMs 发生过程中,二者可能通过相互反馈,在病灶达到新的动态平衡,共同促进新生血管的形成及正常分化,保证病灶中血流正常灌注,为疾病发展提供了必要条件。

Dufraigne 等^[10]研究发现:抑制 DLL4 蛋白可促进无功能新血管生成;Ridgway 等^[11]使用 DLL4 蛋白的特异性抗体处理肿瘤,发现阻断肿瘤中 DLL4-Notch 信号通路则生成大量无功能新血管,肿瘤生长受到抑制,且这种抑制仅限于肿瘤新的血管形成阶段,对已有的正常血管没有影响。由此推测,DLL4-Notch 有可能成为 EMs 临床治疗的新靶点,也提示 DLL4 蛋白抑制剂在 EMs 异位内膜靶向治疗中的应用前景,有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Jakobsson L, Bentley K, Gerhardt H, et al. VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning[J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(Pt6): 1233-1236.
- [3] 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[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8690-8697.
- [4] Kerbel R S. Tumor angiogenesis[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(19): 2039-2049.
- [5] 曹慧秋, 文继舫, 胡玉林, 等. 肺鳞状细胞癌中 Notch1~4 和 DLL4 的表达及与微血管密度的相关性[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(8): 842-847.
- [6] 徐桂芳, 张伟杰, 孙 琦, 等. DLL4 在胰腺癌组织中的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. *中华胰腺病杂志*, 2012, 12(3): 164-166.
- [7] 赵 洁, 薛素萍, 曲银娥, 等. HIF-1 α 和 VEGF 在子宫内膜异位症增生期内膜中的表达及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(3): 429-431.
- [8] Caolo V, van den Akker NM, Verbruggen S, et al. Feed-forward signaling by membrane-bound ligand reporter circuit: the case of NOTCH DELTA-like 4 ligand in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(52): 40681-40689.
- [9] Suchting S, Freitas C, le Noble F, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(9): 3225-3230.
- [10] Dufraigne J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms[J]. *Oncogene*, 2008, 27(38): 5132-5137.
- [11] Ridgway J, Zhang G, Wu Y, et al. Inhibition of DLL4 signalling inhibits tumor growth by deregulating angiogenesis[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1083-1087.

(责任编辑: 关蕴良)