

Notch1 在皮肤黑色素瘤血管生成中的作用研究

刘振阳,陈旻静[△],白 滨

(郑州大学第一附属医院整形外科,郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨 Notch1 在皮肤黑色素瘤血管生成中的作用。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 78 例皮肤黑色素瘤组织和 40 例皮内痣组织中 Notch1、血管内皮生长因子(VEGF)的表达,以及 CD34 标记的微血管密度(CD34-MVD)。**结果** 皮肤黑色素瘤组织中 Notch1 阳性表达率、VEGF 阳性表达率及 CD34-MVD 均高于皮内痣组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。皮肤黑色素瘤组织中 Notch1 表达与 VEGF 表达和 CD34-MVD 均呈正相关($P < 0.05$);皮肤黑色素瘤组织中 Notch1 阳性表达率、VEGF 阳性表达率、CD34-MVD 与 Clark 分级、淋巴结转移有关($P < 0.05$)。**结论** Notch1 和 VEGF 可能在皮肤黑色素瘤血管生成中具有一定的协同作用,并在肿瘤转移浸润过程中共同发挥作用。

[关键词] 黑色素瘤;Notch1;血管内皮生长因子类;微血管密度;血管新生

[中图分类号] R739.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)11-1799-05

Role of Notch1 in angiogenesis of cutaneous melanoma

LIU Zhenyang, CHEN Minjing[△], BAI Bin

(Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou

University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of Notch1 in angiogenesis of cutaneous melanoma. **Methods** Immunohistochemical SP method was performed to detect the expressions of Notch 1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in 78 cases of cutaneous melanoma and 40 cases of intradermal nevus, as well as the CD34 marked microvessel density (CD34-MVD). **Results** The positive expression rates of Notch1, VEGF and CD34-MVD were higher in cutaneous melanoma tissues than in intradermal nevus tissues, with statistically significant differences ($P < 0.05$). The expression of Notch1 was positively correlated with the expression of VEGF and CD34-MVD in cutaneous melanoma tissues ($P < 0.05$). The expression of Notch1, VEGF and CD34-MVD in cutaneous melanoma tissues was related to Clark classification and lymphatic metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** Notch1 and VEGF may play a synergistic role in melanoma angiogenesis, and also play a role in tumor metastasis and invasion.

[Key words] melanoma; Notch1; vascular endothelial growth factors; microvessel density; angiogenesis

皮肤黑色素瘤是源于神经嵴黑色素细胞的一种恶性程度最高、预后最差的皮肤肿瘤。可浸润皮肤表皮、皮下组织甚至黏膜,也可沿血道、淋巴结转移到相邻器官或组织,引起广泛转移或扩散^[1]。其患病率和病死率呈逐年上升趋势,据 2011 年统计,我国黑色素瘤的年增长率为 3%~5%,每年约新增 2 万例^[2]。肿瘤的生长、浸润和转移及预后都依赖于血管的生成。血管内皮生长因子(VEGF)与血管内皮细胞上的受体 VEGFR 结合后,在一系列复杂的血管生成过程中发挥重要的促进作用,是其最具有代表性的信号通路^[3]。微血管密度(MVD)是直观评估肿瘤血管生成

程度的定量指标,间接判断血管生成能力,CD34 单克隆抗体标记能准确预测微血管数量^[4]。Notch 信号通路是一个进化上相对保守的信号转导系统,Notch 受体通过与配体的相互作用传递细胞信号,调控相邻细胞之间通讯及细胞分化、增殖和凋亡等^[5-7]。研究证实,Notch 信号中关键分子基因突变的异常表达与多种疾病和肿瘤(包括黑色素瘤)的发生和发展相关,但关于 Notch1 与 VEGF 在黑色素瘤血管生成中的表达的相关性的类似报道相对较少。本研究旨在比较皮肤黑色素瘤组织和皮内痣组织中 Notch1、VEGF 的表达和 CD34 标记的微血管密度(CD34-MVD),探讨

Notch1 在皮肤黑色素瘤血管生成中可能发挥的作用和临床治疗意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取郑州大学第一附属医院病理科 2013—2018 年存档的 78 例皮肤黑色素瘤石蜡标本及 40 例皮内痣石蜡标本。78 例皮肤黑色素瘤患者中,男 32 例,女 46 例;年龄 25~91 岁,中位年龄 58.89 岁;四肢肢端 60 例,非肢端 18 例(胸背部 11 例、外阴 4 例、面颊部 3 例);原位 27 例,转移性 51 例;Clark 分级 I~II 级 14 例,III~V 级 64 例。40 例皮内痣患者中男 26 例,女 14 例;年龄 3~66 岁,中位年龄 28.93 岁。所有病例均排除肝肾功不全、感染性疾病、风湿免疫疾病等合并症,入院前未接受任何治疗。所有患者入院后均接受常规检查和标准化治疗。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

鼠抗人 Notch1 单克隆抗体、鼠抗 CD34 单克隆抗体购于武汉山鹰生物技术有限公司;鼠抗人 VEGF 单克隆抗体购于美国 Abcam 公司;免疫组织化学 SP 染色试剂盒、EDTA 抗原修复液和 DAB 显色试剂由实验室提供。

1.2.2 实验方法

病理蜡块均经常规连续切片,切片厚 3 μm ,按照试剂盒说明书分别进行 Notch1、VEGF、CD34 免疫组织化学染色。

1.2.3 结果判读

Notch1 和 VEGF 的结果判读:染色切片由两位资深病理医师采用双盲法诊断及判读结果。每张切片随机选取 5 个高倍视野($\times 200$),每个视野分别记录 50 个肿瘤细胞的染色强度与染色密度,采用半定量计数法判定染色结果。与阳性对照片相比较,将染色强度分为 4 级计分^[8]:不着色为“-”(0 分);着色稍浅,呈淡黄色的为“+”(1 分);染色呈棕黄色的为“++”(2 分);着色加深,呈棕褐色的为“+++”(3 分)。染色密度根据所着色细胞的比例来计算评分: $\leq 5\%$ 为 0 分, $> 5\% \sim 25\%$ 为 1 分, $> 25\% \sim 50\%$ 为 2 分, $> 50\%$ 为 3 分。求二者评分之积, ≤ 2 分为阴性表达, > 2 分为阳性表达。

CD34-MVD 测定:按照 Weidner 标准^[9],先在低倍镜下($\times 100$)选择 CD34 染色阳性的高微血管密度区域,然后调整到高倍视野($\times 400$)下计数微血管分布最集中的 5 个区域,1 个微血管计数即为胞质或胞膜内棕黄色边界单一清楚的內皮细胞或內皮细胞群。经计算,平均值为 CD34-MVD。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验;采用 Spearman 相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Notch1、VEGF 和 CD34-MVD 在皮肤黑色素瘤中的表达

Notch1 主要表达于黑色素瘤细胞质和少量细胞核中,以棕黄色颗粒样物质为表达阳性;VEGF 表达于黑色素瘤细胞膜和细胞质,也可见于部分基质血管內皮细胞,均匀棕黄色颗粒为阳性细胞的主要特征;CD34 主要表达在黑色素瘤组织和瘤组织周围浸润部位,不仅在血管內皮细胞的细胞质中着色,也表达在皮肤黑色素瘤和皮内痣组织的微血管中,见图 1。

Notch1 在皮肤黑色素瘤和皮内痣组织中的阳性表达率分别为 84.6%、27.5%,差异有统计学意义($P < 0.05$);VEGF 在皮肤黑色素瘤和皮内痣组织中表达的阳性率分别为 69.2%、40.0%,差异有统计学意义($P < 0.05$);CD34-MVD 在皮肤黑色素瘤和皮内痣组织中的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 Notch1、VEGF 和 CD34-MVD 在皮肤黑色素瘤、皮内痣组织中的表达情况

组别	<i>n</i>	Notch1 阳性 表达 [<i>n</i> (%)]	VEGF 阳性 表达 [<i>n</i> (%)]	CD34-MVD ($\bar{x} \pm s$)
皮肤黑色素瘤组织	78	66(84.6)	54(69.2)	32.10 \pm 8.97
皮内痣组织	40	11(27.5)	16(40.0)	13.05 \pm 6.66

2.2 皮肤黑色素瘤组织中 Notch1、VEGF、CD34-MVD 的相关性分析

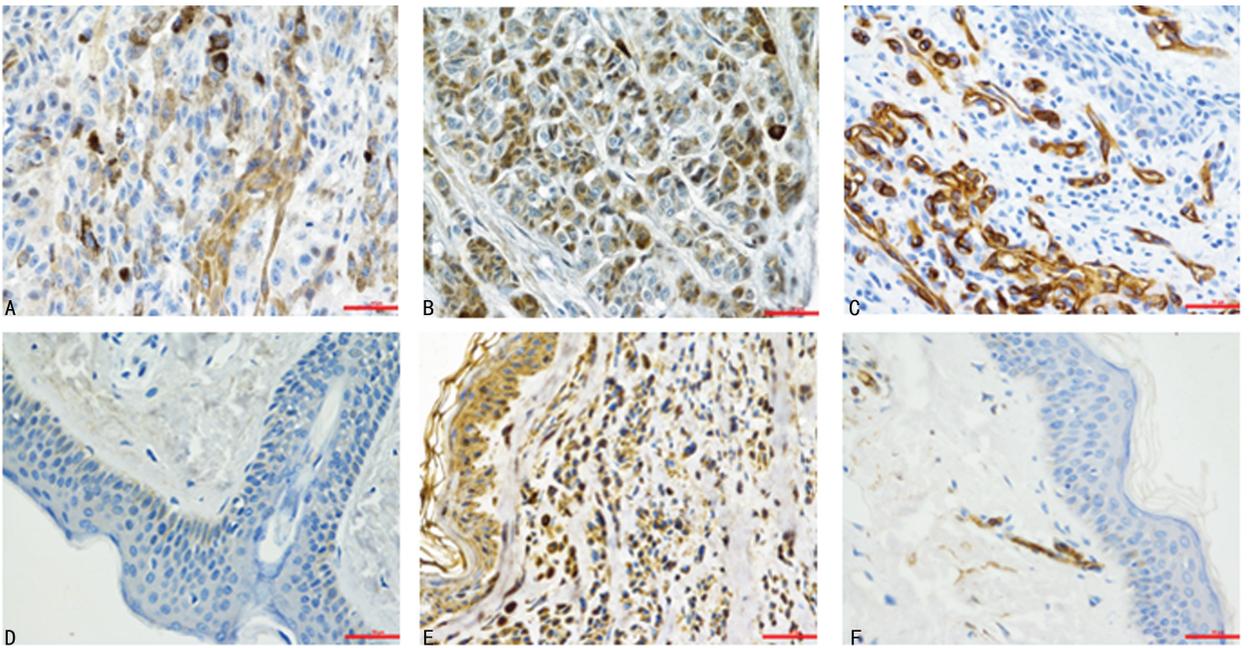
Notch1 表达和 VEGF 表达呈正相关($r = 0.283$, $P < 0.05$),见表 2;Notch1 表达阳性的皮肤黑色素瘤组织中 CD34-MVD 明显升高,差异有统计学意义($r = 0.495$, $P < 0.05$),见表 3。

表 2 皮肤黑色素瘤组织中 Notch1 和 VEGF 的相关性(*n*)

VEGF	<i>n</i>	Notch1	
		+	-
+	62	50	12
-	16	8	8

表 3 皮肤黑色素瘤组织中 Notch1 和 CD34-MVD 的相关性($\bar{x} \pm s$)

Notch1	<i>n</i>	CD34-MVD
+	66	33.83 \pm 8.35
-	12	21.92 \pm 4.06



A:Notch1 在皮肤黑色素瘤组织中的表达;B:VEGF 在皮肤黑色素瘤组织中的表达;C:CD34 在皮肤黑色素瘤组织中的表达;D:Notch1 在皮内痣组织中的表达;E:VEGF 在皮内痣组织中的表达;F:CD34 在皮内痣组织中的表达。

图 1 Notch1、VEGF 和 CD34 在皮肤黑色素瘤、皮内痣组织中的表达 (SP×400)

表 4 Notch1、VEGF 和 CD34-MVD 与皮肤黑色素瘤临床病理特征的关系

病理特征	n	Notch1(n)		χ^2	P	VEGF(n)		χ^2	P	CD34-MVD ($\bar{x}\pm s$)	t	P
		+	-			+	-					
性别												
男	32	25	7	1.756	0.215	22	10	0.006	1.000	30.31±9.14	0.180	0.116
女	46	41	5			32	14			33.17±8.71		
年龄(岁)												
≤60	45	36	9	1.740	0.221	34	11	1.997	0.215	31.38±8.22	0.058	0.616
>60	33	30	3			20	13			32.85±9.91		
肿瘤部位												
肢端	60	52	8	0.840	0.457	39	21	2.185	0.160	31.27±9.29	0.167	0.144
非肢端	18	14	4			15	3			34.44±7.39		
肿瘤直径												
<5 cm	52	42	10	1.773	0.318	34	18	0.115	0.803	31.46±8.79	0.070	0.542
≥5 cm	26	24	2			18	8			32.69±9.73		
Clark 分级												
I+II	14	9	5	5.417	0.034	5	9	7.995	0.009	26.93±7.98	0.266	0.019
III+V	64	57	7			49	15			32.95±8.99		
淋巴结转移												
原位	27	19	8	6.437	0.019	14	13	5.855	0.021	28.07±7.04	0.300	0.008
转移	51	47	4			40	11			33.88±9.43		

2.3 Notch1、VEGF 和 CD34-MVD 与皮肤黑色素瘤临床病理特征的关系

皮肤黑色素瘤患者的 VEGF 阳性表达率、Notch1 阳性表达率、CD34-MVD 在 Clark 分级、淋巴

结转移中差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

3 讨论

皮肤黑色素瘤的发生、发展和转移过程有多种分子和信号传导通路参与,环境因素也发挥着作用。一

些研究表明,在人黑色素细胞中活化形式的 Notch1 过表达时,能明显促进体外黑色素瘤细胞生长发育,提高生长限制条件下的黑色素瘤细胞的存活率^[10], Notch 信号通路已被证实调控机体细胞的分化、增殖和凋亡等生理过程, Notch1 是 Notch 信号通路中最重要的、作用最大的受体。本研究发现, Notch1 在皮肤黑色素瘤组织中的阳性表达率明显高于皮内痣组织,这与之前的研究结果一致^[11]。证实了 Notch 信号通路和受体 Notch1 在黑色素瘤的发生、发展过程中有着癌基因的作用。研究还发现,高 Clark 分级、淋巴结转移的皮肤黑色素瘤组织中 Notch1 表达的阳性率更高,说明 Notch1 的表达与皮肤黑色素瘤的 Clark 分级、淋巴结转移等临床病理特征有关, Notch1 可能参与肿瘤细胞的侵袭和转移过程。一般来说,黑色素瘤患者有高的 Clark 分级或伴有淋巴结转移症状,则患者的预后越差,因此 Notch1 的表达量也可认为间接和黑色素瘤的预后有关,其可作为预测皮肤黑色素瘤浸润或转移,监测预后和复发的指标。

癌细胞产生释放过量的生长因子,导致恶性肿瘤和附近的外癌细胞无节制增殖,缘于癌细胞的血管生成,肿瘤得以转移与扩散。同时,由于新生血管结构和功能的不完整,更是肿瘤细胞发生侵袭、转移和复发等生物学行为的基础^[12]。而肿瘤血管生成是由相关血管生成因子所诱导,其中 VEGF 发挥了最强的刺激血管生成的作用, VEGF 表达与血管生成和增殖反应明显相关, VEGF 和 MVD 是评价血管生成的重要指标。 Notch 信号通路中多个受体及配体均参与肿瘤血管新生过程,例如受体 Notch1 和 Dll4 被认为是调节血管生成的重要因子,通过抑制内皮细胞活化,特异性调控和参与肿瘤血管的生长发育^[13]。本研究显示,皮肤黑色素瘤组织中 Notch1 表达和 VEGF 表达、CD34-MVD 呈正相关,提示 Notch1 和 VEGF 可能存在单向或环状信号调控通路,协调发挥调节血管生成的作用。二者之间相互协调作用的可能机制:受体 VEGFR1、VEGFR2 激活后,作用于下游的 PI3K/Akt 信号通路,然后上调 Notch1 和 Dll4 的表达;而 Dll4/Notch 能通过内皮细胞膜上的 VEGFR2 受体数量多少,负反馈作用于 VEGF 信号通路,这些过程是 HSER1(HEY1)等下游靶基因实现的^[14]。另外,LEE 等^[15]报道缺氧状态会激活表达 Notch1, Notch/HIF-1 α 信号途径又促进 VEGF 的表达,进而促进血管形成,但二者具体机制仍不清楚。

2004 年,贝伐单抗被美国 FDA 批准作为第一个抗肿瘤血管生成的人源化单克隆抗体上市,其可与 VEGF 结合,阻止血管生成^[16]。随着有关肿瘤血管新

生相关因子的分子生物学研究的深入,抑制肿瘤血管生成的靶向药物治疗得到越来越多的关注,少部分被应用于基础研究和临床肿瘤的治疗^[17]。与此用时,分子靶向抑制剂也得到发展和应用,并有望成为治疗黑色素瘤的主导。有学者综述了近年来 Notch 信号通路参与黑色素瘤发病的机制和临床应用 Notch 抑制剂的效果评价^[18],证实了 Notch 信号通路的直接或间接抑制可导致肿瘤的生长停滞,提示 Notch 信号通路也可以成为黑色素瘤治疗的新靶点。也有报道指出 Notch 抑制剂联合应用化疗或放疗有协同作用,可以改善化疗反应。有研究指出 VEGF 途径作为血管新生实验常用的靶点,往往没有作用,这提示在肿瘤血管新生过程中,其他因子、信号通路也在发挥作用^[19],或者是耐药、效应不持久、诱发肿瘤转移的原因。抑制血管生成药物和免疫检查点阻滞剂的联合应用,已成为一种有希望的策略^[20]。

Notch 信号通路在黑色素瘤中的作用机制研究,以及在黑色素瘤血管生成中的作用,将为肿瘤的临床监测、基因靶向治疗、预后评估、药物疗效及新药研发等提供科学的理论依据。本研究为临床上进一步以 Notch 信号通路作为血管新生靶分子的皮肤黑色素瘤防治研究提供了一定的试验证据和策略选择。

参考文献

- [1] LADE-KELLER J, RIBER-HANSEN R, GULDBERG P, et al. Immunohistochemical analysis of molecular drivers in melanoma identifies p16 as an independent prognostic biomarker[J]. *J Clin Pathol*, 2014, 67(6): 520-528.
- [2] GUO J, QIN S, LIANG J, et al. Chinese guidelines on the diagnosis and treatment of melanoma (2015 Edition)[J]. *Chin Clin Oncol*, 2015, 5(4): 57.
- [3] 向本旭, 刘婷婷, 孙芳玲, 等. VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(12): 81-86.
- [4] SHARMA S, SHARMA M C, SARKAR C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprostic perspective and significance of neoangiogenesis[J]. *Histopathology*, 2005, 46(5): 481-489.
- [5] 伍迪, 朱责梅, 杨丝丝, 等. Notch 信号: 一个新型代谢调节因子[J]. *生理科学进展*, 2016, 47(6): 459-463.

- [6] 王晓清,袁国强,潘亚文. 肿瘤 Notch 信号通路的研究进展[J]. 基础医学与临床,2018,38(7):1025-1028.
- [7] NOWELL C S,RADTKE F. Notch as a tumour suppressor[J]. Nat Rev Cancer,2017,17(3):145-159.
- [8] 邢传平,刘斌,董亮. 免疫组织化学标记结果的判断方法[J]. 中华病理学杂志,2001,30(4):318.
- [9] WEIDNER N,CARROLL P R,FLAX J,et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma [J]. Am J Pathol,1993,143(2):401-409.
- [10] MURTAS D,PIRAS F,MINERBA L,et al. Activated Notch1 expression is associated with angiogenesis in cutaneous melanoma[J]. Clin Exp Med,2015,15(3):351-360.
- [11] 刘白,俞婉婷,程伟,等. Notch 信号相关受体/配体在皮肤恶性黑素瘤中的表达[J]. 中华皮肤科杂志,2017,50(4):252-256.
- [12] 杨霞. 靶向诱导内皮细胞凋亡抑制肿瘤血管新生的研究进展[J]. 中山大学学报(医学科学版),2017,38(2):204-214.
- [13] ANA-RITA P,ALEXANDRE T,ANA-CARINA F,et al. Endothelial Jagged1 antagonizes Dll4 regulation of endothelial branching and promotes vascular maturation downstream of Dll4/Notch1[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2015,35(5):1134-1146.
- [14] MATTHEW T H,CHRISTOPHER C W H. Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis[J]. Circ Res,2008,102(6):637-652.
- [15] LEE S H,KIM M H,HAN H J. Arachidonic acid potentiates hypoxia-induced VEGF expression in mouse embryonic stem cells: involvement of Notch, Wnt, and HIF-1alpha[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2009,297(1):C207.
- [16] HURWITZ H,FEHRENBACHER L,NOVOTNY W,et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med,2004,350(23):2335-2342.
- [17] 鲁美钰,仲维兰,司春枫,等. 肿瘤血管生成机制及抗肿瘤血管新生的靶向药物研究进展[J]. 安徽医药,2018,22(5):798-802.
- [18] YUAN X,WU H,XU H,et al. Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment[J]. Cancer Lett,2015,369(1):20-27.
- [19] GAVIN T,IRENE N T,YANCOPOULOS G D. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth [J]. Nat Rev Cancer,2007,7(5):327-331.
- [20] RAMJIWAN R R,GRIFFIOEN A W,DAN G D. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy[J]. Angiogenesis,2017,20(2):185-204.

(收稿日期:2019-12-26 修回日期:2020-02-26)

(上接第 1798 页)

- with a routine blood test[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2017,12:615-625.
- [12] LEE H,UM S J,KIM Y S,et al. Association of the neutrophil-to-lymphocyte ratio with lung function and exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. PLoS One,2016,11(6):e0156511.
- [13] 倪高顺,牛永亮,陈洋. PLR、NLP 水平和 C 反应蛋白在预测慢阻肺急性加重的价值分析[J]. 临床肺科杂志,2016,21(11):2032-2035.
- [14] AKSOY E,KARAKURT Z,GUNGOR S,et al. Neutrophil to lymphocyte ratio is a better indicator of COPD exacerbation severity in neutrophilic endotypes than eosinophilic endotypes[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2018,13:2721-2730.

(收稿日期:2020-01-18 修回日期:2020-03-11)