

DLL4 和 Ki-67 在青年型乳腺癌组织中的表达及临床意义

The Expression of DLL4 and Ki-67 in Young Patients with Breast Cancer and Its Significance // WANG Qun, YU Ming-hua, WANG Geng, et al.

王 群¹, 余明华², 王 耕¹, 王明华¹

(1. 湖北医药学院附属太和医院, 湖北 十堰 442000;

2. 湖北医药学院基础医学研究所, 湖北 十堰 442000)

摘 要: [目的] 探讨 DLL4 和 Ki-67 在青年型乳腺癌组织中的表达与临床意义。[方法] 采用免疫组织化学 SP 法检测临床和病理学资料完整的青年型(≤ 35 岁)乳腺癌组织中 DLL4 和 Ki-67 的表达情况。对照组选取同期中老年型(>35 岁)乳腺癌组织, 结合入组病例 TNM 分期、腋淋巴结转移情况进行比较分析。[结果] 青年型与中老年型乳腺癌 TNM 分期、腋窝淋巴结转移数目有显著性差异, 病理类型均以浸润性导管癌为主。DLL4 和 Ki-67 在青年型乳腺癌组织的阳性表达率分别为 63.77% 和 76.81%, 均明显高于中老年型乳腺癌组织中的 40.40% 和 56.25% ($P<0.05$)。青年型乳腺癌组织中 DLL4 和 Ki-67 表达与 TNM 分期($r=0.387, P=0.001; r=0.392, P=0.001$), 腋淋巴结转移($r=0.411, P=0.002; r=0.312, P=0.004$)均呈正相关。[结论] 青年型乳腺癌中 DLL4 和 Ki-67 高表达, 临床检测两者表达情况可评估乳腺癌的潜在转移风险。

关键词: 乳腺癌; 青年; DLL4; Ki-67

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)01-0059-04

在我国, 女性乳腺癌已成为上升幅度较快的恶性肿瘤之一, 并趋向年轻化^[1]。女性青年型乳腺癌相比较中老年型乳腺癌, 一般具有高侵袭力、S 期细胞比例高、恶性程度高、易出现淋巴结转移和预后差等生物学特性^[2-5]。目前有研究发现^[6], Delta 样配体 4 (Delta-like ligand 4, DLL4) 在 73% 的乳腺癌组织中呈高表达, 高表达病例的总体生存期及无复发生存期明显降低。Ki-67 与乳腺癌的组织学分型和淋巴结转移情况密切相关, 作为乳腺癌预后的一个重要指标目前在临床上已广泛应用。本文研究 DLL4 和 Ki-67 在青年型乳腺癌组织中的表达特点, 进一步探讨青年型乳腺癌的临床病理学特征, 以期指导临床治疗及预后分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2008 年 12 月至 2011 年 12 月在太和医院

接受手术治疗经病理组织学证实的女性原发性乳腺癌患者 517 例, 其中青年型(≤ 35 岁)69 例, 中位年龄 33 岁(21~35 岁); 对照组为同期 35 岁以上中老年型乳腺癌 448 例, 中位年龄 47 岁(36~85 岁)。术前均未接受化、放疗及内分泌治疗等治疗。病理诊断及临床分期均参考 2012 年中国版乳腺癌 NCCN 指南。

1.2 免疫组织化学法检测 DLL4 和 Ki-67 的表达

常规 HE 染色, 在相同条件下按 SP 试剂盒推荐实验步骤进行免疫组化染色操作。即用型兔抗人 DLL4 多克隆抗体、即用型鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体及相应二抗试剂盒均购自武汉博士德公司。

1.3 结果判定

DLL4 蛋白阳性反应为细胞膜或细胞质中出现颗粒状或弥漫性棕黄色染色; Ki-67 定位于细胞核, 阳性染色为胞核内出现棕黄色颗粒状染色。高倍镜($\times 400$)下取 10 个不同的视野观察, 每视野平均计数 100 个细胞, 计数阳性细胞百分比并求出平均值^[7]: 无阳性细胞数计为 0 分, 阳性细胞数 $\leq 25\%$ 计为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 计为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 计为 3 分, $>75\%$

收稿日期: 2012-07-27; 修回日期: 2012-09-24

通讯作者: 王明华, E-mail: wangmh1970@sina.com

计为4分;着色强度以多数阳性细胞呈现的染色计分:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。最后将阳性细胞百分比计分和着色强度计分相加, ≤ 2 分计为阴性(-), ≥ 3 分计为阳性(+).

1.4 统计学分析

采用SPSS15.0软件进行数据分析,组间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用Spearman相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青年型与中老年型乳腺癌患者临床病理特征

本研究中青年型乳腺癌患者Ⅰ期12例,Ⅱ期42例,Ⅲ~Ⅳ期共15例;中老年型乳腺癌患者Ⅰ期

36例,Ⅱ期295例,Ⅲ~Ⅳ期共117例,两组比较有显著性差异($P=0.043$)。青年型乳腺癌中浸润性导管癌49例,浸润性小叶癌8例,其他类型12例;中老年型乳腺癌中浸润性导管癌336例,浸润性小叶癌42例,其他类型70例;两组均以浸润性导管癌为主,差异无统计学意义($P=0.76$)。青年型乳腺癌与中老年型乳腺癌腋窝淋巴结转移数目有显著性差异($P=0.034$)。青年型乳腺癌TNM分期Ⅰ期比例高于中老年型乳腺癌($\chi^2=6.214, P=0.013$);青年型乳腺癌腋窝淋巴结转移数目 ≥ 4 枚比例高于中老年型乳腺癌($\chi^2=6.364, P=0.012$)(Table 1)。

2.2 乳腺癌组织中DLL4和Ki-67表达

DLL4和Ki-67在青年型乳腺癌组织中的阳性表达率分别为63.77%(44/69)和76.81%(53/69)(Figure 1、2),中老年型乳腺癌组织中的表达率分别为40.40%(181/448)和56.25%(252/448),青年型组与中老年型组DLL4、Ki-67阳性表达率差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 乳腺癌组织中DLL4和Ki-67的表达与TNM分期、腋窝淋巴结转移状态之间的关系

青年型、中老年型乳腺癌TNM分期与DLL4表达均相关($r=0.387, P=0.001; r=0.254, P=0.001$),与Ki-67的表达也均相关($r=0.392, P=0.001; r=0.173, P=0.021$);且随着TNM分期增

Table 1 Comparison of clinicopathological features between young patients and older patients with breast cancer

Clinicopathological features	Young(%)	Older(%)	χ^2	P
TNM stage			6.313	0.043
I	12(17.39)	36(8.04)		
II	42(60.87)	295(65.85)		
III~IV	15(21.74)	117(26.12)		
Axillary lymph node metastasis			6.779	0.034
None	20(28.98)	148(33.03)		
<4	17(24.64)	161(35.94)		
≥ 4	32(46.38)	139(31.03)		
Pathological subtype			0.550	0.760
invasive ductal carcinoma	49(71.01)	336(75.00)		
invasive lobular carcinoma	8(11.59)	42(9.75)		
others	12(17.39)	70(15.63)		

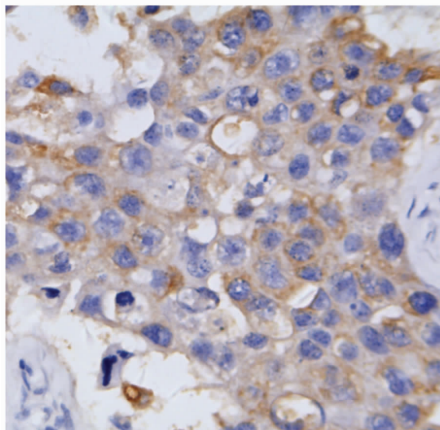


Figure 1 Expression of DLL4 in young breast cancer (SP×400)

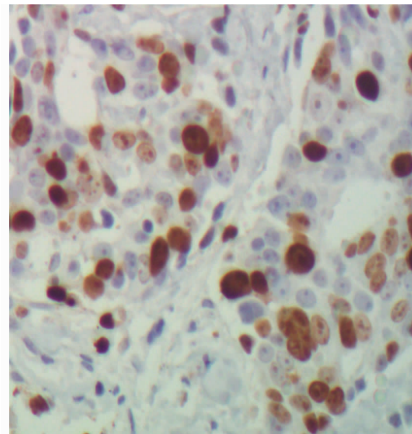


Figure 2 Expression of Ki-67 in young breast cancer (SP×400)

加,两组中 DLL4 和 Ki-67 的表达率随之上升,差异均有统计学意义($P<0.05$)。青年型、中老年型乳腺癌腋窝淋巴结转移数目与 DLL4 表达均相关($r=0.411$, $P=0.002$; $r=0.312$, $P=0.001$),与 Ki-67 表达也呈正相关($r=0.312$, $P=0.004$; $r=0.497$, $P=0.001$);且随着腋窝淋巴结转移数目的增多,两组中 DLL4 和 Ki-67 表达率随之上升,差异均有统计学意义($P<0.05$)(Table 2)。

3 讨 论

乳腺癌是目前女性最常见的恶性肿瘤,近 30 年乳腺癌每年以 3% 的速度增长,年龄趋向年轻化。目前国际上将青年型乳腺癌年龄界定在 ≤ 35 岁^[8],其具有侵袭性和恶性程度较高,预后较差等特性,严重威胁青年女性的生命健康,已成为临床治疗关注重点。乳腺癌的临床病理特征与临床治疗、预后相关,青年型乳腺癌的 TNM 分期、腋窝淋巴结转移状态是影响乳腺癌预后公认的良好指标^[9]。在本研究中,我们发现病理类型在青年型乳腺癌与中老年型乳腺癌间无统计学差异,与相关文献报道一致,两者均以浸润性导管癌为主^[10,11]。青年型乳腺癌与中老年型乳腺癌 II 期、III~IV 期比例差异无统计学意义,表明青年型乳腺癌患者确诊时肿瘤 TNM 分期与中老年型

乳腺癌相仿。青年型腋窝淋巴结转移数目 ≥ 4 枚比例高于中老年型乳腺癌,与相关文献报道的青年型乳腺癌较中老年型乳腺癌侵袭性较强、病情发展快、腋窝淋巴结转移多等^[12,13]相符。

Delta 样配体 4 (Delta-like ligand 4, DLL4) 是 Notch 信号通路中的配体,目前研究已证实^[14] DLL4 是 VEGF 的下游基因,发挥负性调控作用,抑制肿瘤血管的出芽及生长,抑制 DLL4 能促进无功能新生血管的生成^[15]。DLL4 可能是诱导血管内皮细胞增殖后向血管成熟化发展的关键因素^[16]。但 DLL4 的功能不仅是调控血管生成,在肿瘤微环境中 DLL4 通过间接影响 NF- κ B 能抑制肿瘤细胞凋亡^[17],阻断 DLL4 后还能够减少肿瘤干细胞的频数^[18]。本研究中,青年型乳腺癌 DLL4 阳性率明显高于中老年型,且随着 TNM 分期、腋窝淋巴结转移数目的增加,青年型乳腺癌组 DLL4 的表达率随之升高,高表达 DLL4 的青年型乳腺癌比中老年型侵袭力更强、进展更快。因此,检测 DLL4 的表达并针对性靶向治疗可为青年型乳腺癌的判断预后和治疗提供新思路。

Ki-67 目前已应用于乳腺癌的临床检测,被认为是能可靠、全面反映细胞群体增殖活性的客观指标。Ki-67 高表达是细胞增殖活跃的重要标记,可反映肿瘤细胞的增殖活性^[19]。在本实验中,青年型和中老年

Table 2 Relationship of DLL4, Ki-67 expression and TNM stage and lymph node status in breast cancer of young and older patients

Clinicopathological features	DLL4 expression						Ki-67 expression					
	+	−	χ^2	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	+	−	χ^2	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
TNM stage												
Young Patients												
I	2	10	11.857	0.003	0.387	0.001	6	6	1.027	0.004	0.3921	0.001
II	29	13					33	9				
III~IV	13	2					14	1				
Older Patients												
I	8	28	26.382	0.001	0.254	0.001	24	12	0.173	0.021	18.203	0.001
II	102	193					147	148				
III~IV	71	46					81	36				
Axillary lymph node metastasis												
Young Patients												
None	8	12	7.964	0.007	0.411	0.002	11	9	7.623	0.017	0.312	0.004
<4	10	7					14	3				
≥4	26	6					28	4				
Older Patients												
None	32	116	33.745	0.001	0.312	0.001	43	105	87.207	0.001	0.497	0.001
<4	65	96					97	64				
≥4	84	55					112	27				

型乳腺癌组织中 Ki-67 的表达率随着 TNM 分期、淋巴结转移数目的增加而增加,表明肿瘤细胞的增殖与青年型和中老年型乳腺癌的肿瘤分化和淋巴侵袭相关。本研究中青年型乳腺癌 Ki-67 阳性率明显高于中老年型,表明 Ki-67 的高表达可能是导致青年型乳腺癌生物学特性不同于中老年型生物学特性的原因之一。有文献报道^[20],Ki-67 可以作为乳腺癌化疗敏感性指标,其指数变化比肿瘤组织缩小更能反映肿瘤对化疗敏感性。

青年型女性乳腺癌相比较中老年型乳腺癌,临床及病理特征明显,可能与 DLL4 和 Ki-67 两种蛋白的表达有关。因此,检测 DLL4 和 Ki-67 表达,将对指导青年型女性乳腺癌患者合理治疗和评估预后起到积极作用。

参考文献:

- [1] Zheng YQ, Li XR, Li R. The research development of breast conservation therapy[J/O]. Chinese Journal of Breast Disease, 2008, 2(2):190-201.[郑一琼,李席如,李荣.乳腺癌保乳综合治疗的进展[J/OL].中华乳腺病杂志,2008,2(2):190-201.]
- [2] Bharat A, Aft RL, Gao F, et al. Patient and tumor characteristics associated with increased mortality in young women(≤ 40 years) with breast cancer [J]. J Surg Oncol, 2009, 100(3):248-251.
- [3] Gnerlich JL, Deshpande AD, Jeffe DB, et al. Elevated breast cancer mortality in women younger than age 40 years compared with older women is attributed to poorer survival in early-stage disease[J]. J Am Coll Surg, 2009, 208(3):341-347.
- [4] Dutra MC, Rezende MA, Andrade VP, et al. Immunophenotype and evolution of breast carcinomas: a comparison between very young and postmenopausal women [J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2009, 31(2):54-60.
- [5] Han W, Kang SY, The Korean Breast Cancer Society. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 119(1):193-200.
- [6] Jubb AM, Turley H, Moeller HC, et al. Expression of delta-like ligand 4(DLL4) and markers of hypoxia in colon cancer[J]. Br J Cancer, 2009, 101(10): 1749-1757.
- [7] Xu LZ, Yang WT. The judgemental criterion of the immunohistochemical result [J]. China Oncology, 1996, 6(4): 229-231.[许良中,杨文涛.免疫组织化学反应结果的判断标准[J].中国癌症杂志,1996,6(4):229-231.]
- [8] Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, et al. Very young women (≤ 35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation[J]. Ann Oncol, 2002, 13 (2):273-279.
- [9] Kwon JH, Kim YJ, Lee KW, et al. Triple negativity and young age as prognostic factors in lymph node-negative invasive ductal carcinoma of 1 cm or less[J]. BMC Cancer, 2010, 10:557.
- [10] Tian ZN, Hu Y. Pathological characteristics in breast cancer of young patients[J]. Journal of Practical Oncology, 2007, 21 (4):338-340.[田振国,胡杨.青年乳腺癌病理特点附60例病例分析[J].实用肿瘤学杂志,2007,21(4):338-340.]
- [11] Zhang WJ, Song B, Gu C. Clinical and pathological characteristics in breast cancer of young patients [J]. Journal of Southern Medical University, 2010, 32(6):1250-1252.[张文靖,宋冰,谷川.青年期女性乳腺癌的临床及病理特点[J].南方医科大学学报,2010,32(6):1250-1252.]
- [12] Curigliano G, Rigo R, Colleoni M, et al. Adjuvant therapy for very young women with breast cancer: response according to biologic and endocrine features[J]. Clin Breast Cancer, 2004, 5(2): 125-130.
- [13] Shannon C, Smith IE. Breast cancer in adolescents and young women [J]. Eur J Cancer, 2003, 39(18): 2632-2642.
- [14] 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.
- [15] Dufraigne J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms [J]. Oncogene, 2008, 27(38): 5132-5137.
- [16] Harrington LS, Sainson RC, Williams CK, et al. Regulation of multiple angiogenic pathways by DLL4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells[J]. Microvasc Res, 2008, 75(2): 144-154.
- [17] Indraccolo S, Minuzzo S, Masiero M, et al. Cross-talk between tumor and endothelial cells involving the Notch3-DLL4 interaction marks escape from tumor dormancy [J]. Cancer Res, 2009, 69(4):1314-1323.
- [18] Hoey T, Yen WC, Axelrod F, et al. DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency [J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(2):168-177.
- [19] Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(28):7212-7220.
- [20] Vincent-Salomon A, Rousseau A, Jouve M, et al. Proliferation markers predictive of the pathological response and disease outcome of patients with breast carcinomas treated by anthracycline-based preoperative chemotherapy[J]. Eur J Cancer, 2004, 40(10):1502-1508.