

非小细胞肺癌患者外周血循环内皮细胞表达的临床价值探讨

权琳,王毅,徐玲,陈文萍*

(南京市胸科医院呼吸内科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的发生发展和肿瘤血管新生密切相关,但是目前临床缺乏有效、准确地评估肿瘤血管新生的指标,循环内皮细胞(circulating endothelial cell, CEC)作为血管新生的新型标志物具有无创和重复性好的优势,本研究拟探讨 NSCLC 患者外周血 CEC 的临床价值。方法:收集 2010 年 6 月~2012 年 12 月南京市胸科医院收治初诊 NSCLC 患者不同时段的外周血标本,利用多色流式细胞技术检测 CEC 的数量,并且和临床分期、治疗反应和生存等指标进行比较。结果:正常对照样本、I~II 期以及 III~IV 期 NSCLC 患者 CEC 表达中位数分别为 26、86 和 163 个/ml,与对照样本比较差异具有显著性(P 值分别为 0.001 和 0.048)。基线 CEC $>$ 150 个/ml 的 NSCLC 患者中位无疾病进展生存期(progression-free survival, PFS)为 5.6 个月,而基线 CEC $<$ 150 个/ml 的 NSCLC 患者中位 PFS 为 8.8 个月,两者差异具有显著性($P = 0.026$);治疗后(复发)CEC $>$ 150 个/ml 的 NSCLC 患者中位 PFS 为 4.5 个月,而治疗后(复发)CEC $<$ 150 个/ml 的 NSCLC 患者中位 PFS 为 8.8 个月,两者差异具有显著性($P < 0.001$)。结论:NSCLC 患者外周血 CEC 计数与疾病分期和预后具有相关性,是预测预后和监测微小残留病灶的潜在新指标。

[关键词] 非小细胞肺癌;血管新生;循环内皮细胞;无疾病进展生存

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)09-1228-04

doi:10.7655/NYDXBNS20140915

血管新生是多种恶性肿瘤病理生理过程中重要的环节之一^[1],非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中肿瘤局部丰富的新生血管被认为在 NSCLC 的生长增殖、耐药和转移过程中发挥极为重要的作用^[2]。血管新生的程度和 NSCLC 疾病分期、治疗反应和预后密切关联。目前临床实体肿瘤血管新生的经典指标为肿瘤组织血管密度,但是由于此方法为有创性检测,且只能反映检测标本局部血管新生状况,因此较难标准化,难以在临床广泛开展。循环内皮细胞(circulating endothelial cells, CEC)是近年来发现存在于外周血,可以归集于机体发生局部缺血的器官、并分化增殖为血管参与机体局部血管新生和组织重建过程的新型内皮细胞存在形式,研究发现 CEC 在活动性肿瘤、缺血性疾病、自身免疫性疾病等病理过程中显著升高并且和病情相关^[3-5]。基于血管新生在 NSCLC 中的重要作用和目前临床缺乏准确、重复性较好的检测方法,本研究采用多色流式细胞技术,检测 62 例 NSCLC 患者初

诊时外周血 CEC 的数量,并且动态观察其变化,深入分析其临床价值。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究纳入 2010 年 6 月~2012 年 12 月南京市胸科医院收治的 NSCLC 患者 62 例,疾病确诊及病理类型均经过临床、影像学 and 病理标本证实。基线血液标本采集于手术、化疗和放疗之前,其后分别在治疗结束和疾病复发时进行血液标本采集。健康对照为年龄匹配的正常志愿者 10 例,抽取清晨空腹外周血标本。所有患者及健康志愿者均需要排除活动性自身免疫性疾病、感染、冠心病等疾病。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

对于早期患者采用手术联合化疗为主的治疗策略,而晚期 NSCLC 患者则采用联合化疗和放疗,联合化疗为以铂类为基础的两药联合方案,治疗方案包括铂类 + 吉西他滨、铂类 + (多烯)紫杉醇和铂类 + 培美曲塞。如患者疾病进展或耐药,根据美国国立综合癌症网络(NCCN)治疗指南和患者具体情况采取二线挽救治疗。治疗过程中对患者跟踪随访,常规

[基金项目] 南京市卫生局医学科技青年启动基金项目(QYK11144)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chenwenping2001@sina.com

每 2 个月评价疾病情况,同时观察患者的无疾病进展生存 (progression-free survival,PFS)、总生存 (overall survival,OS)以及药物相关不良反应。

1.2.2 疗效评价标准

NSCLC 患者治疗的主要近期疗效指标按照 WHO 关于实体肿瘤评价指标(RECIST):包括完全缓解(complete remission,CR)、部分缓解(partial remission,PR)、疾病稳定(stable disease,SD)和疾病进展(progression of disease,PD)。中远期疗效包括 PFS 和 OS,其中 PFS 定义为从患者纳入本临床试验开始到最早发现疾病进展或者死亡的时间。OS 定义为从患者纳入本临床研究直到任何原因导致死亡的时间,或生存到末次随访的时间。药物的安全性、耐受性和不良反应参照美国国立癌症研究院药物不良事件标准 4.0 版本 (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events,version 4.0)。

1.2.3 CEC 检测方法

抽取患者抗凝外周血标本 2~4 ml,取样后 24 h 内进行检测。分别使用 anti-CD31-FITC、anti-CD146-PE、anti-CD45-PerCP 和 anti-CD105-APC 四色流式检测抗体标记检测标本,室温避光孵育 15 min,样本离心洗涤溶血后上机进行检测,使用相应荧光标记的 isotype 作为阴性对照设立十字门,检测机器为美国 BD 公司的 FACS Calibur 流式细胞仪,分析软件为随机软件 CellQuest。检测标本中 CD31⁺CD146⁺CD45⁻CD105⁻的细胞定义为活化 CEC。

1.3 统计学方法

数据统计和作图软件采用 GraphPad Prism 6.0 和 MicroSoft Office 2010,其中疗效和临床特征分析采用 Fisher 精确检验和 Logistic 回归分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义;PFS 和 OS 采用 Kaplan-Meier 分析法,两组间的生存率比较采用 Log rank 分析。

2 结果

2.1 NSCLC 患者一般情况

本研究共纳入 62 例 NSCLC 患者和 10 例年龄匹配的正常对照。NSCLC 患者中男 34 例,女 28 例;患者中位年龄 59 岁,其中 ≥ 60 岁 32 例, < 60 岁 30 例;疾病分期中 I~II 期患者 4 例,III~IV 期患者 58 例;组织细胞来源中腺癌 44 例,鳞癌 15 例,其他组织类型 3 例(表 1)。

2.2 NSCLC 患者和健康对照外周血 CEC 计数比较

本研究利用多色流式细胞技术检测了 62 例 NSCLC 患者和 10 例正常对照基线和治疗后(复发)

表 1 62 例非小细胞肺癌的疾病基线特征

观察指标	病例数	百分比 (%)
性别		
男	34	54.8
女	28	45.2
年龄(岁)		
≤ 60	30	48.4
< 60	32	51.6
病理组织类型		
腺癌	44	71.0
鳞癌	15	24.2
其他类型	3	4.8
TNM 分期		
I~II 期	4	6.5
III B 期	25	40.3
IV 期	33	53.2
ECOG		
0~1	52	83.9
2~4	10	16.1
治疗最佳反应		
CR	5	8.1
PR	19	30.6
SD	21	33.9
PD	17	27.4

外周血 CEC 水平,研究发现 10 例正常对照 CEC 中位数为 26 个/ml (12~42 个/ml),没有超过 50 个/ml;NSCLC 患者中 I~II 期患者外周血 CEC 中位表达数是 86 个/ml(45~136 个/ml),显著高于正常对照 ($P = 0.001$);而 III~IV 患者外周血 CEC 中位表达数为 163 个/ml(42~580 个/ml),显著高于 I~II 期患者 ($P = 0.048$),提示初诊时外周血 CEC 计数和 NSCLC 疾病分期有关,具体分布见图 1。

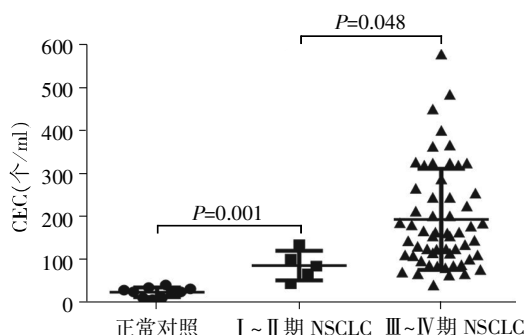


图 1 正常对照和不同临床分期 NSCLC 基线 CEC 计数

2.3 NSCLC 患者外周血 CEC 计数和生存关系

本研究共纳入 III~IV 期的晚期 NSCLC 患者 58 例,中位随访 16.5 个月,通过对比分析治疗前(基线)CEC 计数和治疗结束(复发)CEC 计数与 PFS 关系发现,基线 CEC > 150 个/ml 的 NSCLC 患者中位

PFS为5.6个月(2.0~15.8个月),而基线CEC<150个/ml的NSCLC患者中位PFS为8.8个月(2.5~22.6个月),两者差异具有显著性($P=0.026$),生存曲线见图2。治疗后(复发)CEC>150个/ml的NSCLC患者中位PFS为4.5个月(2.0~12.5个月),而治疗后(复发)CEC<150个/ml的NSCLC患者中位PFS为8.8个月(4.0~22.6个月),两者差异具有显著性($P<0.001$),提示基线和治疗后(复发)的CEC计数水平和采用以铂类为基础治疗方案的NSCLC患者的PFS密切相关,生存曲线见图3。

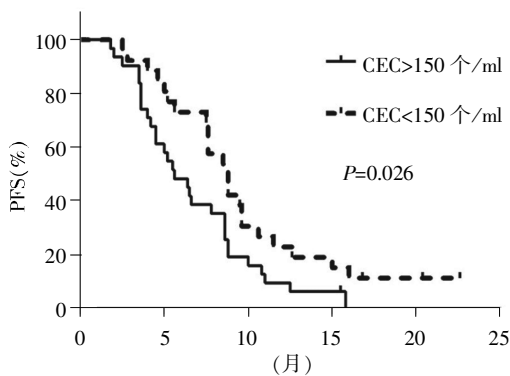


图2 基线不同CEC计数的PFS曲线

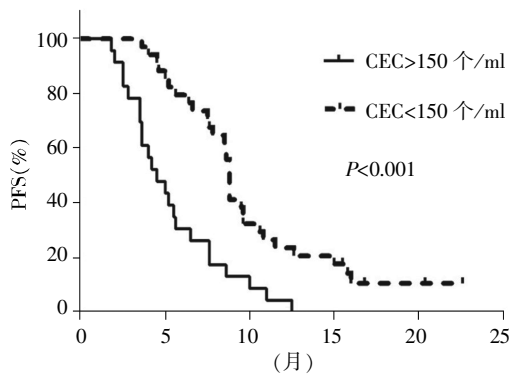


图3 治疗后不同CEC计数的PFS曲线

3 讨论

肺癌是目前人类发病率和病死率较高的恶性肿瘤,其中包括腺癌、鳞癌和大细胞癌在内的NSCLC发病率约占肺癌总数的80%以上^[6],除了NSCLC细胞本身的生物学特征外,肿瘤微环境被认为和肿瘤的发生、发展和转移密切相关。其中肿瘤的血管新生是最为重要的环节之一,多项研究表明NSCLC的肿瘤细胞可以通过分泌多种促血管新生因子,促进成熟内皮细胞和内皮祖细胞的迁移、归巢、分化和血管生成,而NSCLC患者体内肿瘤局部的微血管密度明显升高可以向肿瘤局部组织提供更多的氧供和营

养,从而支持肿瘤的持续生长;而同时内皮(祖)细胞可以通过分泌部分细胞因子反馈作用于肿瘤细胞表面相应的受体(VEGFR、FGFR和PDGFR等),通过旁分泌的形式进一步促进肿瘤细胞的生长和生存,并且内皮(祖)细胞分泌的细胞因子可以同时作用于肿瘤局部的基质细胞(血管周细胞、成纤维细胞等),促进局部的微环境更加有利于肿瘤的生长、浸润和耐药^[7]。目前临床检测NSCLC患者血管新生的临床指标较为有限,最为常用的是通过免疫组化方法,应用特异性的内皮细胞抗体CD34、CD31和(或)VEGF等检测病理组织局部内皮细胞密度以衡量肿瘤血管新生的情况,但是由于肿瘤内部生长的显著不均一性,局部穿刺活检的标本难以准确反映NSCLC患者整体血管新生,加之有创性操作,因此虽然曾在临床开展,但是由于指标本身重复性较差、和临床预后符合度较低未能成为临床常规检测指标;此外有研究报道检测NSCLC患者外周血血管新生指标VEGF等预测患者预后,但是由于样本量较小未有进一步探讨^[8]。

1973年由Hladovec和Rossam首先发现CEC的存在,并认为可能和机体血管生成有关。随后的研究通过免疫组化、流式细胞技术和显微技术证实人体内存在CEC,并成功分离培养,通过特定的培养环境可以诱导生成有功能的新生血管。外周血循环中的CEC在恶性疾病、自身免疫性疾病、缺血性疾病和感染等多种疾病中显著升高,并且和临床疾病的状态和预后具有一定相关性。NSCLC细胞可以通过分泌包括VEGF、FGF和VCAM-1等多种促血管新生因子,促进内皮祖细胞和成熟内皮细胞的迁移,归巢到肿瘤组织局部,分化成血管形成所必须的功能性内皮细胞,从而促进NSCLC的生长、转移和耐药等重要病理生理过程。Mancuso等^[9]首先发现多种实体肿瘤患者CEC水平明显升高,并且和生存相关;而Goon等^[10]发现乳腺癌患者外周血CEC和内皮祖细胞均较正常人显著升高,并且和诺丁汉预后指数(Nottingham prognostic index, NPI)相关,经过多参数分析只有CEC和肿瘤转移、大小以及NPI积分相关,因此认为CEC是检测肿瘤患者血管新生的新型指标;进一步深入研究发现,外周血循环的CEC含有内皮祖细胞、凋亡CEC以及活化CEC,其中活化CEC可能在临床肿瘤预后判定中具有更大价值。目前临床检测CEC的方法经过改进,主要采用多色流式细胞检测技术,由于大多采用商业化抗体,因此试验的重复性良好,标记CEC的策略为首先使用造

血细胞特异性抗体 CD45 排除粒细胞、单核细胞和淋巴细胞等造血细胞的影响,然后使用 1~2 个内皮细胞特异性标记 CD31、CD146、CD34 或 VEGFR2 等确认内皮细胞的性质,最后采用 CD105 确定内皮细胞的活化状态和 Annexin V 标记细胞的凋亡状态^[11-12],本研究所检测的活化内皮细胞代表具有功能活性的 CEC,较总 CEC 数更能准确反映体内血管新生状态。

本研究采用多色流式细胞技术,使用 CD45/CD31/CD146/CD105 的抗体检测组合,检测不同疾病状态 NSCLC 患者外周血活化 CEC 的数量,研究发现 NSCLC 患者活化 CEC 的含量显著高于正常对照组,CEC 的含量和疾病分期有关,晚期患者 CEC 水平升高更加明显($P = 0.048$),进一步的分析发现在患者获得缓解后的密切监测过程中,复发患者 CEC 水平再次升高,提示 CEC 有可能成为 NSCLC 检测微小残留的有效指标之一,最后通过 Kaplan-Meier 生存曲线分析发现治疗结束后的 CEC 在患者 PFS 分析中具有重要意义,治疗后 CEC 水平仍然较高的 NSCLC 患者的 PFS 显著短于 CEC 水平较低的患者($P < 0.001$),是 NSCLC 预后不良的因素,而初诊时 CEC 显著升高的 NSCLC 患者 PFS 也显著缩短($P = 0.026$)。

综上所述,在接受铂类为主的两药联合化疗 NSCLC 患者中,外周血 CEC 和疾病分期相关,不同疾病状态的 CEC 动态监测具有较为显著的临床意义,是预测患者预后和监测微小残留病灶的潜在新型指标,初诊和治疗后 CEC 计数和患者 PFS 显著相关,是疾病的不良预后因素,但是由于本研究纳入病例数相对较少,因此需要前瞻性的大型临床研究进一步验证。

[参考文献]

[1] Cuevas I, Boudreau N. Managing tumor angiogenesis: lessons from VEGF-resistant tumors and wounds[J]. *Adv Cancer Res*, 2009, 103(3):25-42

[2] 张静渊,尹荣,徐新宇. 非小细胞肺癌的脉管内侵犯与微转移、微血管密度关系的研究[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2013, 33(7):887-890

[3] Mancuso P, Calleri A, Bertolini F. Circulating endothelial cells and circulating endothelial progenitors[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2012, 195:163-170

[4] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(7):593-600

[5] Shantsila E, Blann AD, Lip GY. Circulating endothelial cells: from bench to clinical practice[J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6(5):865-868

[6] 权琳,陈文萍,束永前. 晚期非小细胞肺癌维持治疗的现状与展望[J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(6):637-641

[7] Santos ES, Gomez JE, Raez LE. Targeting angiogenesis from multiple pathways simultaneously: BIBF 1120, an investigational novel triple angiokinase inhibitor[J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(3):1261-1269

[8] 杨静,束永前. 非小细胞肺癌中 VEGF-C、PDGF-BB 与淋巴管生成和淋巴结转移的关系[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2008, 28(5):580-584

[9] Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, et al. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients[J]. *Blood*, 2001, 97(11):3658-3661

[10] Goon PK, Lip GY, Boos CJ, et al. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer[J]. *Neoplasia*, 2006, 8(2):79-88

[11] Samsel L, Dagur PK, Raghavachari N, et al. Imaging flow cytometry for morphologic and phenotypic characterization of rare circulating endothelial cells[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(6):379-389

[12] Lanuti P, Santilli F, Marchisio M, et al. A novel flow cytometric approach to distinguish circulating endothelial cells from endothelial microparticles: relevance for the evaluation of endothelial dysfunction[J]. *J Immunol Methods*, 2012, 380(1-2):16-22

[收稿日期] 2014-02-11