

• 论 著 •

肺癌患者血清中内皮抑素水平表达与临床病理生理特征的关系

纪 勇, 黄 斌, 陈国强, 吴 松, 沈 凯, 虞桂平, 王晓臣
(东南大学附属江阴市人民医院胸心外科, 江苏江阴 214000)

摘 要:目的 检测原发性肺癌患者术前血清内皮抑素含量, 分析其与肿瘤临床病理特征和预后的关系。方法 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 57 例原发性肺癌及 27 例肺良性病变患者术前血清内皮抑素含量。结果 肺癌患者血清内皮抑素含量均值为 $(132.73 \pm 31.69) \mu\text{g/L}$, 高于肺良性病变者 $(84.56 \pm 15.47) \mu\text{g/L}$, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。淋巴结及远处转移组内皮抑素含量高于未转移组($P < 0.05$); 肺腺癌患者血清内皮抑素水平高于鳞癌、小细胞癌患者; III~IV 期患者血清内皮抑素水平高于 I~II 期($P < 0.01$)。结论 肺癌患者血清内皮抑素含量显著增高, 且与肿瘤组织学类型、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移相关, 是预测肿瘤恶性行为和评估预后的有效指标。

关键词: 肺肿瘤; 内皮抑素; 血清; 酶联免疫吸附测定

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.013

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0560-02

Clinical significance of Serum levels of Endostatin expression in Patients with Primary Lung Cancer

Ji Yong, Huang Bin, Chen Guoqiang, Wu Song, Shen Kai, Yu Guiping, Wong Xiaochen

(Department of Cardiothoracic Surgery, Jiangyin People's Hospital, Dongnan University, Jiangyin Jiangsu 214400, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the expression of endostatin in serum levels of patients with lung cancer and to analyze the relationship between the levels of it and clinical prognosis as well as pathophysiological characteristics. **Methods** The samples of serum were obtained from 57 patients with untreated primary lung cancer and 27 patients with benign pulmonary diseases. The levels of endostatin were analyzed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The expression of endostatin in serum of patients with lung cancer was significantly higher than that in patients with benign pulmonary diseases ($P < 0.01$). The levels of endostatin in serum in late stage (stage III or IV) lung cancer patients were significantly higher than that in early stage (stage I or II, $P < 0.01$). And in adenocarcinoma patients was significantly higher than that in patients with squamous cell carcinoma and SCLC in serum. Endostatin concentrations in serum were significantly greater in patients with lymph node and distant metastasis than those patients without. **Conclusion** The expression of endostatin in serum is higher in lung cancer than benign pulmonary diseases and associated with TNM stage, lymph node metastasis and clinicopathological variables, which can evaluate the behavior of lung cancer and estimation of prognosis.

Key words: lung neoplasms; endostatin; serum; enzyme-linked immunosorbent assay

肺癌的生长、浸润和转移需要大量新生血管提供营养, 因而肿瘤血管形成是肺癌进展的关键。血管形成促进因子和抑制因子相互作用、共同调节肿瘤血管形成过程^[1]。研究表明: 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是作用最强、特异性最高的血管生成促进因子^[2]; 内皮抑素则是目前作用最强、最专一的血管生成抑制因子^[3], 在肿瘤的发生、发展、侵袭和转移中起着重要作用, 其表达水平与多种恶性肿瘤的进展和预后有关^[3-6]。本研究应用 ELISA 法检测肺癌患者术前血清中内皮抑素的含量, 并分析其可能的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 10 月至 2009 年 7 月期间住院的肺癌患者 57 例, 男 45 例, 女 12 例。年龄 49~72 岁, 平均 (65 ± 12) 岁。所有病例均经病理学证实, 其中鳞癌 31 例, 腺癌 15 例, 小细胞癌 11 例; 淋巴结转移者 43 例; 远处转移(肝、肺内、脑、骨)者 11 例; 根据 2002 年国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)的 TNM 分期标准: I 期 8 例, II 期 12 例, III 期 26 例, IV 期 11 例。术前均未行任何放、化疗。对照组为同期住院的肺良性病变患者 27 例, 男 21 例, 女 6 例, 年龄 28~84 岁, 平均 (57 ± 6) 岁。其中支气管扩张症 7 例, 支气管异物 3 例, 肺间质纤维化 3 例, 肺炎性假瘤 6 例, 肺结核 8 例。

1.2 血清内皮抑素水平检测 所有患者均于治疗前 1 d 清晨留取空腹静脉血 5 mL, 离心半径 8 cm, 3 000 r/min 离心 10

min, 收集上清液 2 份, -80°C 冰箱保存, 待测。采用奥地利 SLT III 型酶标仪 ELISA 法集中检测内皮抑素。内皮抑素试剂盒购自美国 R&D Systems 公司。具体操作严格按说明书进行。

1.3 统计学处理 测定结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计学软件进行分析, 组内及组间比较采用 t 检验, 多组比较行单因素方差分析, 方差不齐或非正态分布采用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺癌与肺良性病变患者血清内皮抑素表达的比较 采用 ELISA 法检测 57 例肺癌患者和 27 例肺良性病变者外周静脉血清中内皮抑素表达, 含量分别为 $(132.73 \pm 31.69) \mu\text{g/L}$ 和 $(84.56 \pm 15.47) \mu\text{g/L}$, 高于肺良性病变者, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 肺癌患者外周血清中内皮抑素水平及其与临床病理特征的关系 肺癌患者血清内皮抑素表达与患者性别、年龄均无明显相关性, 而吸烟指数大于或等于 300 者血清内皮抑素表达高于小于 300 者, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。有淋巴结及远处转移者血清内皮抑素表达高于无转移者($P < 0.05$); 临床 III~IV 期肺癌血清内皮抑素表达高于 I~II 期患者($P < 0.01$); 血清内皮抑素含量在中、低分化肺癌患者高于高分化者($P < 0.05$); 经两两比较, 腺癌血清内皮抑素表达均高于小细胞肺癌

和鳞癌(*P* 值分别为 0.044 和 0.038),而小细胞肺癌与鳞癌比较差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

表 1 外周血清中内皮抑素水平与肺癌患者临床病理特征的关系($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

临床病理特征	<i>n</i>	内皮抑素(ng/mL)	<i>P</i> 值
性别			
男	45	134.73±42.18	0.299
女	12	129.88±55.03	
年龄			
<60 岁	26	123.35±50.49	0.312
≥60 岁	31	138.45±50.14	
吸烟指数*			
<300	35	126.28±43.04	0.037
≥300	22	179.86±52.97	
组织学分型			
鳞癌	31	128.13±51.08	
腺癌	15	157.65±52.26	0.044
小细胞	11	124.53±40.45	
TNM 分期			
I+II	20	114.59±46.74	
III+IV	37	149.38±43.61	0.043
组织分化程度			
高	22	128.32±56.18	0.037
中、低	35	256.31±61.38	
远处转移			
无	46	122.36±45.21	0.020
有	11	162.29±56.15	
淋巴结转移			
无	14	106.77±32.04	0.034
有	43	149.24±53.08	

*: 吸烟指数=每天吸烟支数×吸烟年数。

3 讨 论

血管形成与实体性肿瘤的生长、浸润和转移有密切关系。恶性肿瘤组织能产生血管形成促进因子[如 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(base fibroblast growth fator,bFGF)等]和血管形成抑制因子(如内皮抑素、血管抑素等),肿瘤血管形成过程是两类因子相互作用、沟通调节的结果^[7-8]。而内皮抑素是目前已知作用最强、最专一的内源性血管生成抑制因子。内皮抑素蛋白及基因治疗已证明可产生明确的肿瘤抑制作用^[9-10]。

内皮抑素是 O'Reilly 等^[2]1997 年从小鼠血管内皮瘤细胞(murine hemangioendothelioma cell line,EOMA)的培养上清中分离的一种新的血管内皮生长抑制因子,是血管周围基底膜部位的胶原ⅩⅧ经蛋白酶降解的 C 端部分片段,相对分子质量 20×10³,由 184 个氨基酸组成,大多分布在血管的基底膜上。内皮抑素可通过阻断 VEGF 的受体 KDR/FLK-1 的连接和一些蛋白激酶的激活(有丝分裂原激活蛋白激酶、细胞外信号调节蛋白激酶),阻断 VEGF 介导的信号传导途径;下调肿瘤细胞 VEGF mRNA 及蛋白质表达,减少 VEGF 诱导的 NO

的生成,抑制肿瘤生长和转移。可激活酪氨酸激酶,诱导内皮细胞上多种蛋白信号复合体形成,从而诱导内皮细胞发生 Shb 磷酸化介导的凋亡,抑制新生血管形成。体外实验表明,内皮抑素还可阻断基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2,MMP-2)的激活和 MMP-2 的胶原酶活性,抑制内皮细胞和肿瘤细胞迁移,进而发挥抗肿瘤作用。

文献报道^[11]肺癌患者血清内皮抑素水平明显升高,并与肿瘤的侵袭性及预后有关。本研究结果显示,与 Boehle 等^[12]研究相一致,肺癌患者血清中内皮抑素水平显著高于肺良性疾病者,差异有统计学意义(*P*<0.01)。在年龄、性别方面,血清内皮抑素水平差异无统计不意义(*P*>0.05)。临床分期方面,Ⅲ期和Ⅳ期患者内皮抑素含量则高于Ⅰ期和Ⅱ期患者(*P*<0.01),Ⅰ期和Ⅱ期之间、Ⅲ期和Ⅳ期之间差异则无统计学意义(*P*>0.05)。在淋巴结转移方面,淋巴结转移组血清中内皮抑素水平明显高于未转移组,差异有统计学意义(*P*<0.05),单纯淋巴结转移组及远处转移组患者间差异则无统计学意义(*P*>0.05)。

本研究结果表明,血清内皮抑素的表达与肺癌患者的性别、年龄无关,但与肿瘤临床分期、组织学类型、组织分化及淋巴结转移密切相关,且其表达水平随肿瘤浸润程度加深和淋巴结转移而呈升高趋势,提示内皮抑素含量变化在一定程度上可反映肺癌的恶性程度及肿瘤负荷,在肺癌的诊断、病理类型的推断、病情进展的判断等方面具有重要意义。

综上所述,血清中内皮抑素表达水平在一定程度上可以反映肺癌恶性程度和评估预后。有望能作为肺癌的新的生物学指标来指导治疗和预防。

参考文献

[1] Stefanou D,Goussia AC,Arkoumani E,et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the adhesion molecule E-cadherin in non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res,2003,23(6): 4715-4720.

[2] O'Reilly MS,Boehm T,Shing Y,et al. Endostatin,an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell,1999,88(2): 277-285.

[3] 刘丽华,张安成,宋卫东,等. 应用钾离子作为支气管肺泡灌洗液标准化参照物的多项指标检测肺癌诊断价值的探讨[J]. 中华结核和呼吸杂志,1991,14(4):246-247.

[4] Dhanabal M,Ramchandran R,Waterman MJ,et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis[J]. J Biol Chem,1999,274(17): 11721-11726.

[5] Dhanabal M,Volk R,Ramchandran R,et al. Cloning,expression, and in vitro activity of human endostatin[J]. Biochem Biophys Res Commun,1999,258(2):345-352.

[6] Lee SJ,Jang JW,Kim YM,et al. Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2[J]. FEBS Letters,2004,519(1-3):147-152.

[7] 李新丰,庄伟,王高雄. 肝细胞癌中内皮抑素和血管内皮生长因子的表达意义[J]. 中华消化外科杂志,2010,9(1):44-47.

[8] 董晓鹏,肖天辉,孟令佰,等. 内皮抑素对小鼠体内 Lewis 肺癌生长及淋巴管生成的影响[J]. 中华医学杂志,2010,90(43):3091-3093.

[9] 张彦彦,戈伟,赵娟,等. 内皮抑素对人肺腺癌 A549 细胞周期及 HIF-1 表达的影响[J]. 肿瘤防治研究,2010,37(1):36-39.

[10] 黄文. 血管内皮抑素抗肿瘤研究进展综述[J]. 中国实用医药,2010,5(4):253-255.

释到一定倍数后灵敏度降低的较快,本试剂对于 HIV-O 病毒株的检测上具有更高的灵敏度。

3 讨 论

据 WHO 最新统计,全球 HIV 感染人数高达 3 300 余万,其中亚洲感染人数约 490 万,2007 年造成的死亡人数达 21 余万,并仍有 250 余万新发病例^[6-7]。中国 HIV 感染人数达 84 万,处于流行的高速增长期^[7]。HIV 感染已成为各国严重的社会问题及医学难题,其危害难以估量^[8-9]。HIV-1 的 M 组病毒呈全球性流行,我国也基本上是该组病毒株,而 HIV-1 的 O 组,N 组和 HIV-2 型只在非洲某些局部地区流行^[10]。目前,国外绝大多数及国内全部的 HIV 检测试剂都只能检测 HIV-1 亚型 M 组和 HIV-2 亚型,而对于 O 组 HIV-1 病毒株无检测能力,直接导致了 HIV-1 型 O 组病毒株的漏检^[3-4]。随着世界经济日益紧密,各国往来日益频繁,原本只存在于非洲局部地区的 HIV O 亚型在北美、欧洲和澳大利亚均有报道^[11],各国科学家也纷纷加强针对 O 组病毒检测试剂研究。目前,已有包括罗氏 (Ortho Clinical Diagnostics Inc)、生物梅里埃 (BioMerieux Inc) 和西门子 (Siemens) 在内的知名企业研发出试剂盒^[12-15]。

ELISA 技术是世界公认的,较成熟的生物分析技术,由于该技术产品具有使用方便、灵敏度高和较经济等优点,WHO 曾向各国推荐使用。目前以该技术已开发出了第三代 HIV 双抗原夹心法检测抗体诊断试剂,所以双抗原夹心法是目前主流的 HIV 检测方法。对于同时检测 HIV-1 O、M 亚型和 HIV-2 型病毒抗体的技术,国外已有此类产品的销售,技术上完全可行。

本项目产品采用柔性链将 3 段表位基因嵌合在一起,一方面作为一个嵌合抗原能够顺利表达;另外一方面,表达后各自的抗原活性并没有丧失。我们也尝试过不加柔性链直接嵌合表达,但是嵌合在中间位置的 HIV-2 gp36 的抗原活性很低。我们分析,HIV-1 M gp41 C 端和 HIV-2 gp36 N 端刚性连接,而 HIV-2 gp36 C 端和 HIV-1 O gp41 N 端也是刚性连接,但重组抗原表达出来后,经过自然构像,两端的 gp41 把 gp36 的结构破坏,阻碍了 gp36 表位的暴露,造成 HIV-2 阳性标本的漏检。而柔性链,我们知道是几个可以自由旋转的氨基酸分子,3 段表位基因经过柔性连接后,在表达过程中都尽可能的保持了天然构造,较好的保持了各自的抗原活性,本研究对比试验也很好的说明了这点。

病毒传播是没有国界的,因此做好预防是阻止病毒扩散的有效途径。虽然我国没有 HIV-1 O 组感染者,但并不代表以后不会有,因此在 HIV 的检测中加入对 O 组病毒株的检测非常有意义。

参考文献

[1] Heyndickx L, Janssens W, Alary M, et al. Genetic variability of HIV type 1 in Benin[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1996, 12

(15):1495-1497

[2] Vanden Haesevelde M, Decourt JL, De Leys RJ, et al. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate[J]. J Virol, 1994, 68 (3):1586-1596.

[3] Ondo P, Willems B, Fransen K, et al. Evaluation of different V3 peptides in an enzyme immunoassay for specific HIV type 1 group O antibody detection[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998, 14 (11):963-972.

[4] Zouhair S, Roussin-Bretagne S, Moreau A, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection That Escaped Detection in Two Immunoassays[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(2):662-665.

[5] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高速的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. 上海免疫学杂志, 1983, 3(15):972-1000.

[6] UNAIDS/WHO. AIDS Epidemic Update[EB/OL]. [2008-06-30] <http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007-epiupdate-en.pdf>

[7] Wang L. Overview of the HIV/AIDS Epidemic, scientific research and Government responses in China[J]. AIDS, 2007, 21(Suppl18):3-7.

[8] Sun X, Wang N, Li D. The development of HIV/AIDS surveillance in China[J]. AIDS, 2007, 21(Suppl18):33-38.

[9] Hladik W, Musinguzi J, Kirungi W, et al. The estimated burden of HIV/AIDS in Uganda 2005~2010[J]. AIDS, 2008, 22(4):503-510.

[10] Hunt JC, Golden AM, Lund JK, et al. Envelope sequence variability and serologic characterization of HIV type 1 group O isolates from equatorial guinea[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1997, 13 (12):995-1005.

[11] Koolen Marcus Josephus Marle, Schielen Wilhelmus Joseph Gera [J]. Antigenes Specifiques Du VIH-1, Groupe O. Word Patent WO9627012.

[12] Pau CP, Hu DJ, Spruill C, et al. Surveillance for human immunodeficiency virus type 1 group O infections in the United States[J]. Transfusion, 1996, 36(5):398-400.

[13] De Leys R, Zheng J. Peptides for the detection of HIV-1 group O [J]. Japan Patent JP2000157268.

[14] Montagnier Luc, Quillent Caroline, Borman Andrew, Clavel Francois, Cohen Jacques H M, Guetard Denise, Charnequ Pierre, Donjon De Saint-Martin Jacquiel [J]. Nucleotide sequences of HIV-1 type (or subtype) O retrovirus antigens, United States Patent US2003049604.

[15] Duncan Richard Julian Stuart. Dosage Du Groupe O Du VIH-1 A L' Aide D' Au Moins Un Peptide GP41 [J]. Word Patent WO9532293.

(收稿日期:2010-09-10)

(上接第 561 页)

[11] Suzuki M, Iizasa T, Ko E, et al. Serum endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2006, 35(1):29-34.

[12] Boehle AS, Kurdow R, Schulze M, et al. Human endostatin inhib-

its growth of human non-small-cell lung cancer in a murine xenotransplan model[J]. Int J Cancer, 2001, 94(3):420-428.

(收稿日期:2010-08-04)