文章编号:1000-5404(2006)02-0129-04

论著

非霍奇金淋巴瘤患者血清 VEGF 及 Endostatin 水平检测的临床相关研究

谢家印[1],向德兵[1,2], 王 阁[1], 李增鹏[2],仲召阳[1,2], 王 东[1,2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心,[2]病理科,重庆 400042)

提 要: 目的 探讨非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)患者血清 VEGF 及 Endostatin(ES)水平变化与其临床特征、治疗、预后因素的关系。**方法** 采用 ELISA 法检测 162 例 NHL 患者和 50 例正常健康人血清 VEGF 及 ES 水平。**结果** ①162 例 NHL 患者血清中 VEGF、ES 水平(198.97±17.92)pg/ml 和(34.82±7.91)pg/ml,均分别显著高于正常健康人(31.58±6.68)pg/ml 和(16.80±3.87)pg/ml($P<0.01$),V/E 比值也非常显著高于正常人。②NHL 患者血清中 VEGF、ES 水平以及 V/E 比值与其恶性程度、临床分期和骨髓侵犯(VEGF 除外)等显著相关($P<0.05$),而与其年龄、性别、细胞类型之间无明显关系。③50 例 NHL 完全缓解(CR)患者血清中 VEGF、ES 水平及 V/E 比值均非常显著低于 122 例 NHL 初治患者(IP)($P<0.01$);但血清中 VEGF、ES 水平仍非常显著高于正常健康人($P<0.01$),而两者 V/E 比值差异并不明显($P>0.05$)。39 例复发/难治 NHL 患者(RRP)血清中 VEGF 水平显著高于 IP 组($P<0.05$),但其 ES 水平差异并不明显($P>0.05$),其 V/E 比值非常显著高于 IP 组($P<0.01$)。④NHL 患者血清 VEGF、ES 水平以及 V/E 比值与其预后指标 LDH、CRP、β_2-MG 均呈显著正相关;血清 VEGF、ES 两者之间亦呈显著正相关。**结论** NHL 患者血清中 VEGF、ES 水平升高,与淋巴瘤的恶性程度及肿瘤负荷大小密切相关,其两者的比值(V/E)对 NHL 患者的治疗、预后判断有重要意义。

关键词: 恶性淋巴瘤;VEGF;内皮抑素
中图法分类号: R392.11;R730.23;R733.4 **文献标识码**: A

Clinical study on non-Hodgkin's lymphoma by determination of serum VEGF and endostatin levels

XIE Jia-yin[1], XIANG De-bing[1,2], WANG Ge[1], LI Zeng-peng[2], ZHONG Zhao-yang[1,2], WANG Dong[1,2] ([1]Cancer Center, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship in non-Hodgkin's lymphoma between the serum VEGF and ES levels and the factors of clinical characteristics, treatment, and prognosis. **Methods** The serum levels of VEGF and ES were detected in 162 patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and 50 healthy persons by ELISA method. **Results** ①The serum levels of VEGF [(198.97±17.92) pg/ml] and ES [(34.82±7.91) pg/ml] in NHL patients were significantly higher than those in healthy persons, respectively ($P<0.01$), and so was the V/E ratios. ②The serum level of VEGF and ES and the V/E ratio in NHL patients were closely related to clinical stages, malignant grade, and bone marrow invasion (except for VEGF) ($P<0.05$), but not to the histological cell classification, age, sex of the patients. ③The serum levels of VEGF, ES and the V/E ratio in CR patients (CRPs) were significantly lower than those in initial patients(IPs) ($P<0.01$), but significantly higher than those in healthy persons($P<0.01$). The V/E ratio was not different. The serum level of VEGF and V/E ratio in 39 relapsed/refractory patients (RRPs) were significantly higher than those in IPs, but not different to ES($P>0.05$). ④The serum level of VEGF and ES and the V/E ratio in NHL patients were found to have significantly positive correlation with the prognostic parameters including LDH, CRP, β_2-MG, and so was between VEGF and ES. **Conclusion** The increased serum levels of VEGF and ES were associated with the malignant grade, tumor size, and poor prognosis in NHL patients. Determining serum VEGF and ES levels combining with the V/E ratio are useful for treatment and prognostic judgement of NHL patients.

Key words: lymphoma; vascular endothelial growth factor; endostatin

作者简介:谢家印(1964-),男,四川省安岳县人,博士研究生,主治医师,主要从事血液肿瘤免疫治疗方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)68757346,E-mail:xiejia505@sina.com
通讯作者:王 东,电话:(023)68757706,E-mail:dongwang64@hotmail.com
收稿日期:2005-07-21;**修回日期**:2005-11-04

肿瘤生长和转移除了肿瘤细胞自身的增殖、分化及凋亡特性外，肿瘤细胞与微环境（包括肿瘤血管、细胞因子、生化酶等）密切相关。随着对肿瘤血管生成和抑制调控的研究不断深入，现已明确内皮细胞生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）是血管新生最重要的刺激因子，它可以由正常细胞或肿瘤细胞产生，为肿瘤细胞的迁徙和转移提供了条件[1]。1997年发现的内皮抑素（endostatin，ES）是最为有效的内源性血管生长抑制因子之一，文献[2,3]报道ES的表达水平与多种恶性肿瘤的进展和预后密切相关。目前，有关恶性肿瘤患者血清中VEGF与ES两者之间的平衡关系对肿瘤的进展和预后影响的研究较少。本研究应用ELISA和EIA方法检测162例非霍奇金淋巴瘤（NHL）患者血清中VEGF与ES的水平，探讨两者的平衡关系以及与NHL患者的临床特征、治疗、预后相关性研究。

1 材料与方法

1.1 临床资料

对2001年2月至2004年10月来我院就诊的部分NHL患者中血清VEGF及ES水平进行检测，并分析其与患者病理特点、临床分期以及其他主要生化、细胞学指标如：乳酸脱氢酶（LDH）、C反应蛋白（CRP）、β_2微球蛋白（β_2-MG）以及外周血细胞计数等的关系。162例NHL中女性54例，男性108例；年龄20～78岁，平均52.85岁，中位年龄56岁。初发（IP）122例进入治疗观察组，分别用CHOP等方案正规化疗＋放疗，完全缓解（CR）50例、难治/复发（RRP）39例；非初治病例40例。正常对照组选择我院体检中心的健康体检者50例，年龄19～76岁，平均51.85岁，中位年龄54岁。NHL患者病理学类型、恶性分级参照WHO（1997年）标准和1985年成都会议标准。临床分期严格采用AnnArbor分期标准，低度恶性40例，中度恶性84例，高度恶性38例。临床分期Ⅰ期25例、Ⅱ期53例、Ⅲ期49例、Ⅳ期35例。T细胞性32例，B细胞性130例。

1.2 标本采集与检测

1.2.1 主要试剂和仪器 人endostatin Sandwich EIA试剂盒购自美国Chemicon公司，人VEGF ELISA试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司，酶标仪为系瑞典CliniBio-128C。

1.2.2 标本采集与保存 采用非抗凝管抽取NHL患者或健康对照的外周静脉血5 ml，室温放置30～60 min后，5 000×g离心10 min，分离血清，然后将血清分别放入2 ml，Eppendorf管中，－20 ℃低温冷冻备用。

1.2.3 检测方法 检测方法按试剂盒说明书进行，用CliniBio-128C酶标仪测定所有结果，VEGF检测波长为450 nm；Endostatin检测波长为490 nm。

1.2.4 结果判断 ①VEGF：在标准坐标纸上手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，光密度值（D）作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的D(450)值可在标准曲线上查出其浓度。②Endostatin：在半对数坐标纸上手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标（横轴为对数刻度），D值作纵坐标，以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的D(490)值可在标准曲线上查出其浓度。所有标本重复检测2次，取平均值。

1.3 统计学处理

数据均以$\bar{x}\pm s$表示，使用SPSS 10.0统计软件进行回归及相关分析和t检验。

2 结果

2.1 NHL患者血清VEGF及ES水平与正常对照之间的比较

162例NHL患者和健康人血清VEGF水平均值分别为(198.97±17.92) pg/ml和(31.58±6.68) pg/ml，两者差异非常显著（$P<0.01$），血清VEGF/ES（V/E）比值非常显著高于正常对照（$P<0.01$）。见表1。

表1 NHL患者与健康人血清VEGF，ES水平的比较（$\bar{x}\pm s$）

分组	例数	VEGF（pg/ml）	内皮抑素（pg/ml）	V/E比值（%）
NHL组	162	198.97±17.92[a]	34.82±7.91[a]	5.71±0.28[a]
正常对照组	50	31.58±6.68	16.80±3.87	1.88±0.15

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.2 NHL患者血清VEGF及ES水平与其临床特征的关系

通过对检测结果采用多因素相关分析显示：NHL患者血清VEGF及ES水平以及V/E比值在不同年龄、性别、细胞类型之间均无显著性差异（$P>0.05$）。在低、中、高度恶性淋巴瘤三者之间经F检验其血清VEGF、ES水平以及V/E比值均存在非常显著性差异（$P<0.01$），表明3项指标均与NHL患者恶性程度有关。V/E比值显示NHL患者血清VEGF、ES水平升高并不平衡，而以血清VEGF升高为主。在患者血清VEGF、ES水平与不同临床分期之间显示，各期之间血清VEGF、ES水平以及V/E比值均存在显著性差异（$P<0.05\sim0.01$），表明3项指标均与NHL患者肿瘤负荷有关。50例有骨髓侵犯的NHL患者血清VEGF水平与无骨髓侵犯的NHL患者比较无显著性差异（$P>0.05$），但两组的ES水平及V/E比值均存在显著性差异（$P<0.05\sim0.01$），见表2。

2.3 初发、复发/难治及缓解的NHL患者之间血清VEGF及ES水平的比较

162例NHL患者中有122例为初发者，经治疗后检测了完全缓解、复发/难治病例血清的VEGF及ES浓度。122例NHL初发组（IP）与50例完全缓解组（CR）比较，其血清VEGF及ES水平以及V/E比值均有非常显著性差异（$P<0.01$），表明NHL患者经过有效治疗后其血清VEGF及ES水平均显著下降，而CR组患者血清VEGF及ES水平仍然显著高于正常人组（$P<0.01$），但两者的V/E比值显著性差异却不明显（$P>0.05$），表明CR患者其血清VEGF及ES水平达到了相对平衡。NHL复发/难治患者组（RRP）血清VEGF水平显著高于IP组（$P<$

0.05)；而两组患者血清 ES 水平差异并不明显($P>0.05$)，V/E 比值之间比较，它们的差异均显著($P<0.01$)，见表 3。

表 2　162 例 NHL 患者血清 VEGF 及 ES 与临床因素的比较($\bar{x}\pm s$)

临床因素	例数	VEGF (pg/ml)	Endostatin (pg/ml)	V/E 比值 (%)
年龄(岁)				
≤60 岁	121	197.75±17.82	34.08±7.81	5.80±0.76
>60 岁	41	200.23±18.25	35.58±7.97	5.63±0.68
性别				
男性	108	197.68±17.98	33.68±6.87	5.87±0.77
女性	54	199.79±18.92	36.01±8.12	5.55±0.65
组织学分级				
低度恶性	40	136.96±16.88	27.95±6.12	4.90±0.58
中度恶性	84	199.24±18.86[a]	34.59±7.87[a]	5.76±0.74[a]
高度恶性	38	258.23±21.72[c]	41.13±8.89[b]	6.28±0.86[b]
临床分期				
Ⅰ	25	98.22±14.26	23.92±6.10	4.12±0.57
Ⅱ	53	132.07±16.50[d]	27.48±6.55[d]	4.81±0.59[e]
Ⅲ	49	250.78±21.23[f]	36.96±8.28[f]	6.79±0.88[f]
Ⅳ	35	312.78±25.24[g]	49.32±9.92[g]	6.34±0.85[h]
细胞类型				
T 细胞	32	201.21±18.97	35.87±7.98	5.61±0.66
B 细胞	130	196.62±17.59	33.83±6.89	5.81±0.65
骨髓侵犯				
有	50	200.02±18.29	37.03±8.37[i]	5.41±0.61[j]
无	112	197.28±17.23	32.86±6.75	6.00±0.79

a：$P<0.01$，与低度恶性比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与中度恶性比较；d：$P<0.05$，e：$P<0.01$，与Ⅰ期比较；f：$P<0.01$，与Ⅱ期比较；g：$P<0.01$，h：$P<0.05$，与Ⅲ期比较；i：$P<0.05$，j：$P<0.01$，与无骨髓侵犯比较

表 3　NHL 患者血清 VEGF、ES 水平与治疗结果的关系($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	VEGF(pg/ml)	内皮抑数(pg/ml)	V/E 比值(%)
初治组 (IP)	122	189.23±16.92	33.85±6.92	5.59±0.69
完全缓解组(CRP)	50	40.52±7.21[a]	19.71±4.58[a]	2.06±0.21[a]
难治复发组(RRP)	39	248.54±20.52[b]	42.32±9.69	5.86±0.75[a]

a：$P<0.01$，与初治组比较

2.4　NHL 患者血清 VEGF 及 ES 水平与预后相关指标以及外周血细胞计数关系的比较

通过对 NHL 患者血清 VEGF 及 ES 水平与其 LDH、CRP、β_2-MG 以及外周血细胞计数进行相关统计分析，发现患者血清 LDH 与 VEGF 水平及 V/E 比值呈非常显著正相关($r=0.32$，$P<0.01$)，而与 ES 水平呈显著正相关($r=0.25$，$P<0.05$)；患者血清 β_2-MG 与其 VEGF、ES 水平呈显著正相关($r=0.28$，$P<0.05$)，而与 V/E 比值呈非常显著正相关($r=0.38$，$P<0.01$)；患者血清 CRP 与其 VEGF、ES 水平以及 V/E 比值均呈显著正相关($r=0.29$，$P<0.05$)。患者外周血中血小板计数与血清 VEGF 呈显著正相关($r=0.24$，$P<0.05$)外；WBC、HB 与患者血清 VEGF、ES 水平以及 V/E 比值均无显著相关性($r=0.12\sim0.17$，$P>0.05$)；NHL 患者血清 VEGF 和 ES 两者之间呈显著正相关($r=0.26$，$P<0.05$)；而 V/E 比值与其 VEGF 水平呈非常显著正相关($r=0.41$，$P<0.01$)，与其 ES 水平呈显著正相关($r=0.27$，$P<0.05$)。

3　讨论

研究表明 ES 和 VEGF 分别是作用最强、特异性最高的血管生存促进因子和抑制因子。ES 是存在于血浆和细胞外基质的胶原蛋白ⅩⅧ-C 末端水解片段，它具有抑制内皮细胞的增殖和迁移，并诱导内皮细胞凋亡；研究结果表明 ES 可以影响内皮细胞中参与血管生成调控的多条信号通路，包括 VEGF 及 bFGF 诱导的信号传导通路[4]。VEGF 是一种糖蛋白，它能刺激血管内皮细胞的增殖，同时促进血管内物质的渗出，有利于内皮细胞的迁移和肿瘤细胞的转移；VEGF 可能来源于成纤维细胞，甚至血小板，肿瘤细胞也可以分泌 VEGF[5]。Kuroi 等[2]检测了多种癌症患者血浆中的 ES 和 VEGF 水平明显增高。本研究观察显示 NHL 患者血清中 NHL 患者血清 VEGF、ES 均较正常人明显增高($P<0.01$)，这与 Bertolini 等[6]用 ELISA 法观察 36 例 NHL 患者血清 VEGF、ES 含量的结果一致，而本研究增设了 V/E 比值指标有两方面意义：①观察血清 VEGF、ES 含量升高或降低的程度，而 NHL 患者的均值明显高正常人($P<0.01$)，表明 VEGF、ES 含量升高并不平衡，以 VEGF 含量升高更为明显，推测可能系肿瘤因素引起，同时也体现了机体通过产生 ES 抗血管生成及抑制肿瘤生长、转移等达到自我调节和平衡的作用。②动态观察 NHL 患者血清 V/E 比值，可以观察到血清 VEGF、ES 含量随病情或治疗情况的变化。

通过比较不同临床病理特征的 NHL 患者血清 VEGF、ES 含量，在 3 种病理学类型中血清 VEGF、ES 水平以及 V/E 比值均存在非常显著性差异($P<0.01$)，表明随着淋巴瘤的恶性程度增加，其血清 VEGF、ES 水平均同时升高，伴随 V/E 比值也逐渐增大，提示其血清 VEGF、ES 水平升高并不平衡，而以血清 VEGF 升高为主，其原因目前尚不清楚。Feldman 等[7]认为肿瘤细胞除分泌 VEGF 外，也产生 ES；VEGF 可能调节了内皮细胞分泌多种胶原酶，有利于肿瘤细胞转移。本实验也显示随 NHL 患者临床分期递增，其血清 VEGF、ES 水平均同时升高，其 V/E 比值也逐渐增大，但Ⅲ/Ⅳ期患者血清 VEGF、ES 水平升高的程度比Ⅰ/Ⅱ期患者更为显著，因此该 3 项指标可以间接反映 NHL 患者肿瘤负荷及侵袭程度。本研究还提示 NHL 伴骨髓侵犯者其 ES 水平升高以及 V/E 比值降低，与非骨髓侵犯者比较存在显著性差异($P<0.01$)，

而 VEGF 水平却无显著性差异($P>0.05$),出现这种变化的原因,推测可能由于 NHL 患者骨髓微环境基质丰富,胶原前体含量多,肿瘤细胞的分泌胶原酶分解胶原前体产生 ES,从而引起 NHL 伴骨髓侵犯者其 ES 水平升高,尽管也伴随 VEGF 升高,但可能以 ES 水平升高占优势;为此 V/E 比值降低并不一定提示 NHL 患者肿瘤负荷轻或侵袭程度低,因此 NHL 患者 V/E 比值高低在反映 NHL 患者的肿瘤负荷、侵袭程度以及恶性程度上,但需要除外 NHL 伴骨髓侵犯的情况。

Feldman 等[8]发现软组织肉瘤患者血清 ES 含量明显增高,而且与肿瘤的侵袭性及切除术后的复发率增高有关。有作者研究发现 NHL 患者经治疗达 CR 后血清 VEGF 水平明显低于进展期患者($P=0.016$)[6];本研究表明 122 例为初发者经治疗后有 50 例达完全缓解,其血清 VEGF 及 ES 水平均显著下降($P<0.01$),但仍然显著高于正常人组($P<0.01$),通过两者的 V/E 比值比较显著性差异却不明显($P>0.05$),表明 CR 患者其血清 VEGF 及 ES 水平达到了相对平衡,致使疾病处于相对稳定状态。NHL 复发/难治患者血清 VEGF 水平显著高于初发者($P<0.05$),但两组患者血清 ES 水平差异并不明显($P>0.05$),而 V/E 比值均明显升高($P<0.01$),提示患者血清 ES 水平与血清 VEGF 水平升高并不成比例,表明疾病有进展趋势,肿瘤负荷加重,提示可能预后差。

Feldman 等[9]还发现结肠癌伴肝转移患者血清中 ES 水平明显增高,并与 VEGF 水平及疾病的进展相关,与本研究观察 NHL 患者的血清 ES 和 VEGF 水平明显相关一致。迄今,有关联合检测 NHL 患者血清 ES 和 VEGF 水平动态变化的研究,国内外报道较少;由于 NHL 患者存在血清 ES 和 VEGF 水平升高的不平衡,如果 VEGF 增高的水平超过了 ES 增高的水平,从而表现促血管生成的作用,导致了肿瘤的快速生长;作者认为采用 V/E 比值指标可能更准确反映 NHL 患者血清 ES 和 VEGF 水平动态变化情况,有利于指导相关治疗及预后判断。

Suki 等[10]研究认为淋巴瘤患者血清 LDH、β_2-MG、CRP 是有意义的独立预后指标,与患者的无病生存率和生存时间明显相关;Dhar 等[11]发现肝癌患者血清 ES 水平升高与其生存期较长相关;Wrobe 等[12]研究结果发现 NHL 患者血清 VEGF 与其血清 LDH 呈显著正相关,将其作为预后指标,但他们没有同时研究 VEGF、ES 水平及 V/E 比值与 NHL 患者预后的关系;在本研究中患者血清 LDH、β_2-MG、CRP 分别与 VEGF、ES 水平及 V/E 比值呈显著正相关($P<0.05$),因此血清 VEGF、ES 对于 NHL 患者预后判断可能具有重要意义。

总之,本研究通过联合检测 NHL 患者血清 VEGF、ES 水平的变化情况,进一步证明了 NHL 患者血管生存促进因子和抑制因子在淋巴瘤发生、发展、侵袭性和转移中有重要作用,而且两者的水平有明显的相关性;通过两者的比值(V/E)可以反映它们之间促进肿瘤生长和抑制肿瘤生长的平衡关系;需要进一步观察 NHL 患者血清 VEGF、ES 与其疗效、生存率的关系,有利于淋巴瘤的抗肿瘤血管生成的治疗以及预后判断。

参考文献:

[1] LEUNG D W, CACHIANES G, KUANG W J, *et al*. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen[J]. Science, 1989, 246(4935): 1306-1309.

[2] KUROI K, TANAKA C, TOI M, *et al*. Circulating levels of endostatin in cancer patients[J]. Oncol Rep, 2001, 8(2): 405-409.

[3] STRIK H M, SCHLUESENER H J, SEID K, *et al*. Localization of endostatin in rat and human gliomas[J]. Cancer, 2001, 91(5): 1013-1019.

[4] ABDOLLAHI A, HAHNFELDT P, MAERCKER C, *et al*. Endostatin's antiangiogenic signaling network[J]. Mol Cell, 2004, 13(5): 649-663.

[5] VERHEUL H, JORNA A S, HOEKMAN K, *et al*. Vascular endothelial growth factor-stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets[J]. Blood, 2000, 96(13): 4216-4221.

[6] BERTOLINI F, PAOLUCCI M, PECCATORI F, *et al*. Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma[J]. Br J Haematol, 1999, 106(2): 504-509.

[7] FELDMAN A L, TAMARKIN L, PACIOTTI G F, *et al*. Serum endostatin levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with stage Ⅳ clear renal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(12): 4628-4634.

[8] FELDMAN A L, PAK H, YANG J C, *et al*. Serum endostatin levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma[J]. Cancer, 2001, 91(8): 1525-1529.

[9] FELDMAN A L, ALEXANDER H R Jr, BARTLETT D L, *et al*. A prospective analysis of plasma endostatin levels in colorectal cancer patients with liver metastases[J]. Ann Surg Oncol, 2001, 8(9): 741-745.

[10] SUKI S, SWAN F Jr, TUCKER S, *et al*. Risk classification for large cell lymphoma using lactate dehydrogenase, beta-2 microglobulin, and thymidine kinase[J]. Leuk Lymphoma, 1995, 18(1-2): 87-92.

[11] DHAR D K, ONO T, YAMANOI A, *et al*. Serum endostatin predicts tumor vascularity in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2002, 59(10): 2188-2195.

[12] WROBEL T, MAZUR G, USNARSKA ZUBKIEWICZ L, *et al*. Vascular endothelial growth factor(VEGF) serum concentration in non-Hodgkin's lymphoma patients[J]. Pol Arch Med Wewn, 2004, 112(2): 919-923.

(编辑 薛国文)