论著

文章编号:1000-5404(2012)20-2056-04

晚期非小细胞肺癌患者血清细胞因子IL-1β、IL-2R、IL-6及TNF-α水平与厄洛替尼疗效的相关性研究

刘 璐,王永生,何雅億,任胜祥,李爱武,李雪飞,陈晓霞,戚 川,周彩存 (200433 上海,同济大学附属上海市肺科医院肿瘤科,同济大学医学院肿瘤研究所)

[摘要] **目的** 探讨晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者血清细胞因子水平与厄洛替尼疗效的相关性。**方法** 收集2007年1月至2011年5月同济大学附属上海市肺科医院二线/三线接受厄洛替尼治疗的晚期NSCLC患者162例。收集厄洛替尼治疗前的血样,采用ELISA测定血清中IL-1β、IL-2R、IL-6及TNF-α的表达水平。以细胞因子的中位值为临界值,将细胞因子水平分为高水平组及低水平组。采用Kaplan-Meier生存分析法对入组病例进行生存时间分析,Cox回归多因素分析法对细胞因子水平、病例临床特征与疾病进展时间(time to progression, TTP)及总生存时间(overall survival, OS)进行相关性分析。**结果** 入组病例中位年龄为58岁。其中男性109例,女性53例;吸烟者74例,不吸烟者88例;病理类型为腺癌122例,鳞癌27例,其他类型13例;ECOG PS评分0~1分的病例139例,2~3分23例。在多因素分析结果中,IL-1β、IL-2R和IL-6的表达水平与年龄、性别、ECOG PS评分、吸烟状态、病例类型及肿瘤分期无明显相关性,而TNF-α的表达水平与吸烟状态相关($P=0.045$)。生存分析结果显示,IL-6低表达的患者比IL-6高表达的患者有更长的生存期($P<0.01$),TNF-α低表达的患者较TNF-α高表达的患者有更长的生存期($P<0.05$)。Cox回归多因素分析结果显示,IL-6与TNF-α均为独立的生存相关因子($P<0.01$)。**结论** 在二线/三线接受厄洛替尼治疗的晚期NSCLC患者中,IL-6、TNF-α低表达的患者生存期较高表达者长,提示IL-6和TNF-α可能成为厄洛替尼在治疗晚期NSCLC中疗效的预测因子。

[关键词] 非小细胞肺癌;细胞因子;厄洛替尼

[中图法分类号] R181.32;R734.2;R979.1 [文献标志码] A

Correlation of serum cytokine levels with erlotinib treatment outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer

Liu Lu, Wang Yongsheng, He Yayi, Ren Shengxiang, Li Aiwu, Li Xuefei, Chen Xiaoxia, Qi Chuan, Zhou Caicun (Department of Oncology, Oncology Institute of Tongji University Medical School, Shanghai Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai, 200433, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the correlation of serum levels of cytokines with clinical outcomes of erlotinib in the second- or third-line therapies to treat the patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** One hundred and sixty-two patients with advanced NSCLC who received erlotinib as either second- or third-line treatment in our department from January 2007 to May 2011 were enrolled in this study. Their median age was 58 years. In this group, 109 were male, and 53 were female. Seventy-four were former or current smokers, and 88 were non-smokers. One hundred and twenty-two patients presented with adenocarcinoma, 27 had squamous cell carcinoma, and 13 had tumors with other types of histology. Blood samples were collected before the initiation of erlotinib, and the serum levels of IL-1β, IL-2R, IL-6 and TNF-α were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cutoff points were defined as the median levels to divided the patients into low and high level groups (IL-1β, 26.5 pg/ml; IL-2R, 115 pmol/L; IL-6, 49.5 pg/ml; TNF-α, 48.5 pg/ml). Kaplan-Meier analysis was performed to estimate the survival time, and Cox regression analyses were employed to correlate cytokines and baseline clinical characteristics with clinical outcomes, including time to progression (TTP) and overall survival (OS). **Results** One hundred and thirty-nine patients had an eastern cooperative oncology group (ECOG) performance status of 0 to 1, while the left 23 scored at 2 to 3. Serum levels of IL-1β, IL-2R and IL-6 were not significantly associated with age, gender, ECOG performance

[通信作者] 周彩存,电话:(021)65115006,E-mail: caicunzhou@yahoo.com.cn

status, smoking status, histology, or stage of tumor. But that of TNF-α was associated with smoking status ($P=0.045$). Survival analysis showed that patients with low levels of IL-6 had a statistically longer TTP and OS than patients with high expression ($P<0.01$), whereas the subgroup of patients with low levels of TNF-α also demonstrated statistically better TTP and OS than the high level group ($P<0.01$). Cox regression multivariate analysis indicated that these 2 cytokines were both independent factors related to survival ($P<0.01$). **Conclusion** For advanced NSCLC patients with erlotinib as second- or third-line treatments, those have low levels of IL-6 or TNF-α show a longer TTP and OS than those with high levels, indicating that these 2 cytokines might be served as predictive biomarkers for the efficacy of erlotinib.

[**Key words**] non-small cell lung cancer; cytokine; erlotinib

Corresponding author: Zhou Caicun, Tel: 86-21-65115006, E-mail: caicunzhou@yahoo.com.cn

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是最常见的恶性肿瘤,并且是肿瘤相关死亡的重要原因之一[1]。对于早期NSCLC患者,手术治疗是最佳选择。然而,70%的NSCLC患者首次诊断时已经出现局部或远处转移[2],失去了手术治疗的机会。晚期NSCLC患者标准一线化疗方案为含铂双药方案[3-4]。对于一线治疗后出现疾病进展的患者,二线及二线以后的治疗选择有以下几种药物:培美曲塞、多西他赛及表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, EGFR-TKIs)——吉非替尼或者厄洛替尼[5]。

NCIC BR.21研究中显示,厄洛替尼较安慰剂显著延长了NSCLC患者的总生存期(6.7个月 *vs* 4.7个月)[6],此结果在多个国家的相关研究中均得到证实,提示厄洛替尼可作为晚期NSCLC患者二线/三线治疗的选择。亚组分析结果显示,女性、腺癌、不吸烟及亚洲患者从厄洛替尼治疗中获益更大。近期研究表明,EGFR基因酪氨酸激酶区域的体细胞突变与EGFR-TKIs的疗效具有相关性[7-8]。因此,EGFR基因突变检测成为预测吉非替尼或厄洛替尼疗效的一种有效手段[9]。然而,EGFR基因突变检测需要足够的肿瘤组织(活检或者手术获得),对一线或二线治疗后出现疾病进展的晚期NSCLC患者而言,活检或手术等有创操作可能会造成严重的并发症。因此,相对创伤较小的外周血预测指标检测更方便、易行且对患者更有利[10]。

细胞因子水平与EGFR-TKIs的疗效具有相关性。已有研究证实,血清肝细胞生长因子水平与EGFR-TKIs的临床疗效相关[11]。近期有研究证实,基线时血浆中转化生长因子-α(TGF-α)高表达提示晚期NSCLC患者接受厄洛替尼治疗的疗效差[12]。有学者指出,细胞因子能够影响细胞株或者肿瘤组织中EGFR信号转导通路的活性。文献[13]报道证实,EGFR基因突变能够通过上调人肺癌中IL-6的表达水平,从而激活gp130/JAK/STAT3信号转导通路。在PC-9细胞株中,TNF-α能够诱导EGFR的自体磷酸化,导致EGFR-TKIs无效[14]。

基于上述结果,我们提出假设,血清中某些细胞因子的表达水平也许能够预测晚期NSCLC患者接受EGFR-TKIs治疗的疗效。为了验证这一假说,我们对162例晚期NSCLC患者进行研究,对其接受EGFR-TKIs治疗之前血清中的IL-1β、IL-2R、IL-6和TNF-α水平进行测定,分析入组病例细胞因子表达水平与生存时间之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 病例入组

收集2007年1月至2011年5月同济大学附属上海市肺科医院肿瘤科就诊的肺癌患者162例。所有患者为组织或者细胞学明确病理类型为NSCLC,二线/三线接受厄洛替尼治疗,入组年龄均>18岁。患者病理组织学分类参照WHO分类标准,分期采用2009年的TNM分期法。所有入组病例未能从标准的一线治疗方案中获益。排除标准为脑转移、脊髓压迫、怀孕及对厄洛替尼过敏。所有入组病例既往接受一线铂类双药方案化疗,且既往未接受放疗。患者入组前签署知情同意书。本研究已取得上海市肺科医院伦理委员会批准。

1.2 样本收集

收集入组患者接受治疗厄洛替尼前24 h外周静脉血样。血样标本保存于EDTA真空采血管中,凝固30 min后,以1 000×*g*离心15 min后,提取血清,保存于-80 ℃的冰箱中。

1.3 血清细胞因子测定

采用ELISA试剂盒(上海生工生物工程有限公司)测定血清中细胞因子的表达水平。应用酶标仪(Labsystems dragon,型号Wellscan MK3)对孔内的光密度进行分析。

1.4 研究设计及数据分析

本研究为回顾性研究,主要研究终点为血清细胞因子水平与生存期的相关性,生存期指的是二线/三线接受厄洛替尼治疗的晚期NSCLC患者的疾病进展时间(time to progression, TTP)及总生存时间(overall survival, OS)。OS定义为患者从二线/三线治疗开始至死亡之间的时间。TTP定义为患者从二线/三线治疗开始至病情出现进展(有影像学等书面依据)之间的时间。

按细胞因子的中位值水平将其进行分组,并与OS及TTP进行相关性分析。使用Cox相对危险回归法分析单个血清细胞因子对生存的影响,多因素回归分析法对分类变量进行分析。在多因素回归分析中,我们将本研究中所有可能影响生存的因素,包括年龄、性别、吸烟状态等,均与生存期进行分析。以P值<0.05(双向)为有统计学差异。生存期分析采用Kaplan-Meier生存分析法。所有的分析过程在SPSS 13.0统计软件上进行。

2 结果

2.1 病例临床特征

入组病例的年龄范围为32~78岁(中位年龄为58岁);所有入组病例一线至少接受1个周期的含铂双药方案治疗,中位治疗周期数为4。患者的基线临床特征见表1。

表1 NSCLC患者基线特征[例数(%)]

特征	所占比例
性别	
女性	53(32.7)
男性	109(67.3)
分期	
Ⅲb期	18(11.1)
Ⅳ期	144(88.9)
吸烟状态	
吸烟者	74(45.7)
不吸烟者	88(544.3)
组织学类型	
腺癌	122(75.3)
鳞癌	27(16.7)
其他类型	13(8.0)
ECOG PS评分	
0~1	139(85.8)
2~3	23(14.2)

ECOG PS评分:美国东部肿瘤协作组体能状态评分

2.2 细胞因子表达水平检测

对IL-1β、IL-2R、IL-6和TNF-α进行检测。以细胞因子的中位值为临界值,将细胞因子水平分为高水平组及低水平组:IL-1<26.5 pg/ml为低值,26.5 pg/ml≥为高值;IL-2R<115 pmol/L为低值,≥115 pmol/L为高值;IL-6<49.5 pg/ml为低值,≥49.5 pg/ml为高值;TNF-α<48.5 pg/ml为低值,≥48.5 pg/ml为高值。多因素分析结果显示,TNF-α与肺癌患者的吸烟状态相关(P=0.045),IL-1β、IL-2R和IL-6表达水平与肺癌患者的临床特征无明显相关性(P>0.05)。

2.3 细胞因子水平与TTP相关性分析

所有病例的中位生存期及中位TTP时间分别为9.8个月及5.0个月。

IL-1β和IL-2R水平的高低对患者TTP的影响无显著差异:IL-1β高水平组中位TTP为5.6个月,相比低水平组(中位TTP为6.0个月)差异不显著(P=0.572);IL-2R高水平组中位TTP为4.9个月,相比低水平组(TTP为7.2个月)差异不显著(P=0.220)。

IL-6、TNF-α不同水平组生存期差异显著:IL-6高水平组中位TTP为4.9个月,相比低水平组(TTP为10个月)差异显著(P=0.001);TNF-α高水平组中位TTP为4.9个月,相比低水平组(TTP为8.7个月)差异显著(P<0.01)。

对TTP及可能影响因素进行了Cox多因素回归分析,结果发现,年龄(P=0.029)、组织学类型(P=0.025)、IL-6(P=0.042)及TNF-α(P=0.040)为影响患者TTP的因素。

2.4 细胞因子水平与OS相关性分析

不同水平的IL-1β和IL-2R组间患者的OS差异不显著:IL-1β高水平组中位OS为11个月,相比低水平组(中位OS为10个月)差异不显著(P=0.986);IL-2R高水平组中位OS为9.7个月,相比低水平组(中位OS为11.5个月)差异不显著(P=0.220)。

不同水平的IL-6、TNF-α组间OS有显著差异:IL-6高水平组患者中位OS为13个月,相比低水平组(中位OS为17.4个月)差异显著(P=0.001);TNF-α高水平组中位OS为9.3个月,相比低水平组(中位OS为13.6个月)差异显著(P=0.002)。

经过Cox多因素回归分析提示年龄(P=0.012)、组织学类型(P=0.015)、IL-6(P=0.025)及TNF-α(P=0.045)与OS具有相关性。

3 讨论

分子靶向治疗的发展为肿瘤研究及治疗开拓了1条新的道路[15-16]。EGFR-TKIs厄洛替尼在晚期NSCLC二线/三线治疗中的有效性已经得到证实。厄洛替尼在女性、腺癌、不吸烟及亚洲人群中表现出良好的疗效[6]。近期越来越多的临床研究证实,EGFR基因突变状态对EGFR-TKIs的疗效具有预测作用。但是,对于晚期NSCLC患者特别是出现进展的晚期患者而言,EGFR基因检测所需求的肿瘤样本通过活检、手术等手段不易得到,因此寻找其他可从外周血检测的EGFR-TKIs疗效预测因子很有必要。

既往研究证实,细胞因子对NSCLC患者化疗疗效具有预测作用[9]。本研究发现,TNF-α是厄洛替尼疗效的1个预测因子[8]。此外,一些细胞因子如IL-1β、IL-2R和IL-6与肿瘤靶向治疗疗效具有相关性。因此认为,患者治疗基线时细胞因子水平可能与厄洛替尼的疗效相关。本研究证实,接受厄洛替尼治疗的晚期NSCLC患者的生存与IL-6、TNF-α的表达水平有一定的相关性。

IL-6是炎症细胞因子中的一种,它能够与可溶性的IL-6R结合,进而激活PI3K和STAT信号转导通路[17]。在癌症患者中,IL-6常为高表达状态。已有研究证实,血清IL-6水平与NSCLC的进展相关[18]。本研究未发现血清IL-6水平与患者临床特征具有相关性,但血清IL-6水平与二线/三线接受厄洛替尼治疗患者的生存期具有显著相关性。因此,IL-6可能成为厄洛替尼疗效的1个预测因子。

TNF-α 为 1 个具有多种抗肿瘤作用的细胞因子，它能够影响肿瘤细胞的溶解[19]。与本研究一致的是，其他学者亦发现，TNF-α 在 NSCLC 患者中表达水平较正常对照组高[20-21]。同时，本研究表明，TNF-α 与吸烟状态密切相关，TNF-α 与二线/三线接受厄洛替尼治疗患者的生存期具有显著相关性，说明 TNF-α 同样也可能是厄洛替尼疗效的 1 个预测因子。这些结果与文献[8]结果一致。

在多项实验中，IL-1β 已被证实能够影响肿瘤的生长和转移[22-23]，它可以诱导细胞黏附分子的表达，不管是在恶性还是正常的血管内皮细胞中，增加了肿瘤细胞潜在的侵袭性和转移性[24]。文献[9]也报道过，IL-1β 在 NSCLC 中的表达水平较健康对照组高。然而本研究中 IL-1β 不同水平组间患者的生存并无差异。此外，在激活宿主抗肿瘤免疫反应中发挥重要作用的细胞因子 IL-2R[25]，其表达水平与接受厄洛替尼治疗患者的生存也无相关性。

综上所述，我们通过对二线/三线接受厄洛替尼治疗的晚期 NSCLC 患者基线血清中 IL-1β、IL-2R、IL-6 和 TNF-α 水平进行检测，发现 IL-6 和 TNF-α 水平与厄洛替尼的疗效具有相关性，提示 IL-6 和 TNF-α 可作为厄洛替尼疗效的 1 个血清预测因子。

参考文献：

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al*. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010; 60(5): 277-300.

[2] Gately K, O'Flaherty J, Cappuzzo F, *et al*. The role of the molecular footprint of EGFR in tailoring treatment decisions in NSCLC[J]. J Clin Pathol, 2012, 65(1): 1-7.

[3] Socinski M A, Crowell R, Hensing T E, *et al*. Treatment of non-small cell lung cancer, stage Ⅳ: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)[J]. Chest, 2007, 132(3 Suppl): 277S-289S.

[4] Pfister D G, Johnson D H, Azzoli C G, *et al*. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(2): 330-353.

[5] Gridelli C, Ardizzoni A, Ciardiello F, *et al*. Second-line treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2008, 3(4): 430-440.

[6] Shepherd F A, Rodrigues-Pereira J, Ciuleanu T, *et al*. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2005, 353(2): 123-132.

[7] Lynch T J, Bell D W, Sordella R, *et al*. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. N Engl J Med, 2004, 350(21): 2129-2139.

[8] Paez J G, Janne P A, Lee J C, *et al*. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676): 1497-1500.

[9] Cataldo V D, Gibbons D L, Perez-Soler R, *et al*. Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib[J]. N Engl J Med, 2011, 364(10): 947-955.

[10] Zhou S, Ren S, Yan L, *et al*. Clinical efficacy of erlotinib in patients previously treated for advanced non-small cell lung cancer[J]. Respirology, 2009, 14(5): 709-715.

[11] Kasahara K, Arao T, Sakai K, *et al*. Impact of serum hepatocyte growth factor on treatment response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(18): 4616-4624.

[12] Addison C L, Ding K, Zhao H, *et al*. Plasma transforming growth factor alpha and amphiregulin protein levels in NCIC Clinical Trials Group BR.21[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(36): 5247-5256.

[13] Gao S P, Mark K G, Leslie K, *et al*. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation *via* IL-6 production in human lung adenocarcinomas[J]. J Clin Invest, 2007, 117(12): 3846-3856.

[14] Ando K, Ohmori T, Inoue F, *et al*. Enhancement of sensitivity to tumor necrosis factor alpha in non-small cell lung cancer cells with acquired resistance to gefitinib[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(24 Pt 1): 8872-8879.

[15] Azim H A Jr, Ganti A K. Targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): where do we stand?[J]. Cancer Treat Rev, 2006, 32(8): 630-636.

[16] Silvestri G A, Rivera M P. Targeted therapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a review of the epidermal growth factor receptor antagonists[J]. Chest, 2005, 128(6): 3975-3984.

[17] Heinrich P C, Behrmann I, Haan S, *et al*. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation[J]. Biochem J, 2003, 374(Pt 1): 1-20.

[18] De-Vita F, Orditura M, Auriemma A, *et al*. Serum levels of interleukin-6 as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 1998, 5(3): 649-652.

[19] Tas F, Duranyildiz D, Argon A, *et al*. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in advanced-stage non-small cell lung cancer[J]. Med Oncol, 2005, 22(4): 353-358.

[20] Farlow E C, Vercillo M S, Coon J S, *et al*. A multi-analyte serum test for the detection of non-small cell lung cancer[J]. Br J Cancer, 2010, 103(8): 1221-1228.

[21] Kaminska J, Kowalska M, Kotowicz B, *et al*. Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, and correlations with clinicopathological features and prognosis. M-CSF--an independent prognostic factor[J]. Oncology, 2006, 70(2): 115-125.

[22] Saijo Y, Tanaka M, Miki M, *et al*. Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: *in vivo* analysis of tumor-stromal interaction[J]. J Immunol, 2002, 169(1): 469-475.

[23] Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, *et al*. Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(12): 1554-1561.

[24] Chirivi R G, Chiodoni C, Musiani P, *et al*. IL-1alpha gene-transfected human melanoma cells increase tumor-cell adhesion to endothelial cells and their retention in the lung of nude mice[J]. Int J Cancer, 1996, 67(6): 856-863.

[25] Kanazawa S, Yamaguchi K, Kinoshita Y, *et al*. Elevation of soluble interleukin-2 receptor in patients with non-small cell lung cancer treated with gefitinib[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2006, 132(11): 719-725.

（收稿：2012-05-19；修回：2012-08-06）

（编辑 王 红）