

肺癌组织中内皮抑素表达水平与血清内皮抑素水平的相关性研究

刘颖¹, 周清华^{2△}, 张尚福², 陆艳蓉², 张洁², 刘伦旭²

(1 山东省立医院, 山东济南 250021; 2 四川大学华西医院)

【摘要】 目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)组织中内皮抑素(endostatin)表达水平与血清中 endostatin 水平的相关性,以及两者水平与肺癌临床病理特征的关系。方法 用酶联免疫吸附(ELISA)法检测 46 例 NSCLC 患者血清中 endostatin 的水平;用免疫组织化学(LSAB)法检测其肺癌组织中 endostatin 表达水平。结果 ①肺癌患者血清中 endostatin 水平为 (20.85 ± 4.56) ng/ml;肺癌组织中为 $(84.91 \pm 7.65)\%$ 。②肺癌患者血清中 endostatin 水平及肺癌组织中 endostatin 的表达水平均与肺癌原发肿瘤大小、有无远处转移、细胞分化程度和 TNM 分期有关($P < 0.05$),与肺癌原发部位、淋巴结转移状态、组织学类型以及患者性别、年龄和吸烟与否等无关($P > 0.05$)。③肺癌组织中 endostatin 的表达水平与血清中 endostatin 水平呈显著正相关($r = 0.669, P < 0.01$)。结论 肺癌患者肺癌组织的 endostatin 的表达水平与血清 endostatin 水平有显著正相关关系,且均与肺癌的发生、发展、远处转移和细胞分化不良密切相关,NSCLC 患者血清 endostatin 水平和肺癌组织中 endostatin 的表达水平可能是预测肺癌恶性行为的有用指标。

【关键词】 肺肿瘤;内皮抑素;免疫组织化学;酶联免疫吸附测定

【中图分类号】 R734 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-266X(2005)27-0001-03

Abstract: Objective: To study on the correlation between the serum levels of endostatin and the expression of endostatin in lung cancer tissues, and to explore the relationship between both of them and clinical and pathophysiological characteristics in the non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Methods: The serum levels and expression in lung cancer tissues of endostatin were detected in 46 patients with NSCLC by ELISA method and immunohistochemical staining (LSAB method) respectively. Results: ①The serum concentration of endostatin in lung cancer patients was (20.85 ± 4.56) ng/ml and the expression of endostatin in lung cancer tissues was $(84.91 \pm 7.65)\%$. ②The serum level of endostatin and the expression of endostatin were closely related to P-TNM stages, distant metastasis, grade of cell differentiation and the size of the primary tumors ($P < 0.05$), but not to the histological classification, type of the tumor, lymph node status, age, sex of the patients and smoking or not ($P > 0.05$). ③The serum levels of endostatin in lung cancer patients were highly positive correlated to the expression of endostatin in lung cancer tissues ($r = 0.669, P < 0.01$). Conclusion: The serum levels of endostatin in lung cancer patients are highly positive correlated to the expression of endostatin in lung cancer tissues. The serum levels of endostatin and the expression of endostatin in patients with NSCLC may be helpful to evaluate the biological behavior of lung cancer.

Key words: lung neoplasms; endostatin; immunohistochemistry; enzyme linked immunosorbent assay

肿瘤的形成和发展大致可分为两个阶段,即肿瘤细胞的克隆性增殖阶段(血管前期)和继之而来的血管形成(血管期)促进肿瘤持续性生长阶段^[1]。肺癌和其他实体瘤一样,其生长和转移离不开新生血管生成。肿瘤血管生成是一个多基因、多因子参与的

过程。1997 年发现的内皮抑素(endostatin)被认为是迄今为止最有效的内源性血管生长抑制剂之一^[2],体外和动物实验已显示出 endostatin 及其类似物在体外能有效抑制内皮细胞的生长、移行,在体内显著退缩和停滞原发瘤和转移瘤的生长,且无明显耐药现象,无毒副作用^[2,3]。2001~2002 年,我们为探讨非小细胞肺癌(NSCLC)患者血清 endostatin 水平与肺癌

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30070333)

△通讯作者 万方数据

组织中 endostatin 表达水平的相关性以及两者与肺癌临床病理特征的关系,应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测了 46 例 NSCLC 患者血清 endostatin 水平,应用免疫组化酶—链亲和素生物素标记法(LSAB 法)检测了其肺癌组织中 endostatin 的表达水平。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 本组 46 例均行手术治疗,男 34 例,女 12 例;年龄 37~74 岁,平均 60.39 岁。其中腺癌 21 例,鳞癌 21 例,腺鳞癌 4 例;低分化癌 21 例,中分化癌 19 例,高分化癌 6 例;P-TNM 分期(UICC1997 分期标准): I + II 期 20 例, III + IV 期 26 例。

1.2 主要试剂与仪器 人 endostatin Sandwich EIA 试剂盒购自美国 Chemicon 公司;生物素化羊抗兔抗体(二抗)及过氧化物酶—链亲和素复合物购自北京中山生物有限公司;兔抗人 endostatin 的多克隆抗体(一抗)购自 NEOMARKERS 公司;美国 BIO-RAD Model 550 酶标仪 1 台。

1.3 标本的收集与保存 ①血清标本:所有肺癌患者均于术前及术后 1、7d 分别采用非抗凝管抽取外周静脉血 5ml,室温放置 30~60min 后,5000r/min 离心 10min,分离血清,将其放入 2ml Eppendorf 管中, -20℃ 低温冷冻备用。②肺癌组织标本:均经 10% 福尔马林液固定,常规石蜡包埋,5μm 厚连续切片。

1.4 检测方法 ①ELISA 法检测血清 endostatin 水平,按试剂盒说明书进行,用 BIO-RAD Model 550 酶标仪测定结果,血清 endostatin 检测波长为 490nm。②LSAB 法检测肺癌组织中 endostatin 表达:将 5μm 厚的石蜡切片常规脱蜡,逐渐水化,先经 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,然后滴加 3% 正常羊血清封闭非特异性抗原,再依次加入一抗(浓度为 1:50),生物素化二抗(1:200),生物素亲和素辣根过氧化物酶(SP)复合物(1:200)。滴加一抗后需经 37℃ 恒温箱孵育 1h, PBS 冲洗,其余各步间均经 37℃ 恒温箱孵育 30min, PBS 冲洗。最后二氨基联苯胺染色,苏木素复染,加拿大胶封片。用 PBS 代替一抗为空白对照,用正常人扁桃腺组织切片作阳性对照。

1.5 结果判读 ①血清 endostatin: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),OD 值作纵坐标,以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的 OD₄₉₀ 值可在标准曲线上查出其浓度。②肺癌组织中 endostatin 表达:以肿瘤细胞浆显示棕黄色为阳性。每张切片在 400 倍镜下观察 5~10 个视野,每个视野计数 100~200 个支气管黏膜上皮细胞或肿瘤细胞,共计 1000 个细胞,

计算出每张切片的阳性细胞百分数作为评价观察指标在该切片上表达水平的标准。

1.6 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件,应用 *t* 检验、*F* 检验、秩和检验和双变量相关性分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 血清 endostatin 水平及癌组织中 endostatin 的表达与肺癌病理特征的关系 肺癌患者血清 endostatin 水平及肺癌组织中 endostatin 的表达水平与肺癌原发肿瘤大小、有无远处转移、细胞分化程度和 TNM 分期等均有密切关系(*P* < 0.05),而与肺癌原发部位、淋巴结转移状态、组织学类型、患者性别、年龄和吸烟与否等均无明显关系(*P* > 0.05)。详见表 1。

表 1 血清与肺癌组织中 endostatin 的表达与临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	n	endostatin	
		血清(ng/ml)	癌组织(%)
性别			
男	34	20.72±4.09	84.12±8.00
女	12	21.22±2.67	87.17±6.35
年龄(岁)			
≥55	32	21.15±5.05	85.31±7.66
<55	14	20.16±3.24	84.00±7.84
吸烟史			
有	29	20.09±2.49	84.00±7.29
无	17	22.14±7.69	86.47±8.23
肿瘤位置			
中心型	20	19.79±3.09	82.70±8.64
周围型	26	21.66±5.35	86.62±6.46
淋巴结转移			
N ₀	25	21.68±5.39	85.68±8.24
N ₁ ~N ₃	21	19.85±3.17	84.00±6.98
组织学类型			
鳞癌	21	20.73±1.78	85.62±5.68
腺癌	21	21.06±4.10	84.57±9.90
腺鳞癌	4	20.32±4.56	83.00±1.15
临床分期			
T ₁ +T ₂	32	21.84±4.86*	86.44±7.65*
T ₃ +T ₄	14	18.59±2.77	81.43±6.68
远处转移			
M ₀	40	21.39±3.53*	86.20±6.94**
M ₁	6	17.22±3.01	76.33±7.09
细胞分化程度			
低分化	21	19.45±2.24	80.86±6.18
中、高分化	25	22.03±5.63**	90.26±4.38**
TNM 分期			
I + II	20	22.89±3.47**	88.70±5.78**
III + IV	26	19.28±2.97	82.00±7.73

注:组内比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01

2.2 肺癌组织中 endostatin 的表达水平与血清 endostatin 水平的相关性 血清 endostatin 水平为

(20.85 ± 4.56)ng/ml, 癌组织中 endostatin 的表达水平为 (84.91 ± 7.65)%。两者呈显著正相关 ($r = 0.669, P < 0.01$)。

3 讨论

O'Reilly 等^[2]研究发现某些肿瘤如 Lewis 肺癌, 能够抑制其远处转移癌的生长, 在原发肿瘤切除后, 转移瘤开始迅速生长。这一发现使 O'Reilly 等提出一种新的假说, 即原发性肿瘤分泌两种相拮抗的因子, 分别抑制和刺激肿瘤血管生成。endostatin 是目前发现的作用最强、特异性最高的血管生成抑制因子之一, 为胶原 XVIII C-末端非胶原蛋白特征结构域中的一内源性片段, 由 184 个氨基酸组成, 分子量约 20kD^[2]。

本研究定量检测了肺癌患者血清中 endostatin 的含量, 其结果与 Suzuki 等^[4]的结果基本一致。Feldman 等^[5]发现软组织肉瘤患者血清 endostatin 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。Feldman 等^[6]还发现结、直肠癌伴肝转移患者血清中 endostatin 水平明显增高, 并与疾病的进展相关。Strik HM 等^[7]采用免疫组化法发现人脑胶质瘤中恶性分型的肿瘤其 endostatin 的表达水平明显低于低度恶性肿瘤中的表达水平。本研究通过免疫组化法检测了肺癌组织中 endostatin 的表达, 发现肿瘤组织中均可以检测到 endostatin 的表达, 同时发现 NSCLC 患者血清中 endostatin 水平及肺癌组织中 endostatin 表达水平与肺癌原发肿瘤大小、有无远处转移、细胞分化程度和 TNM 分期等均有密切关系, 而与肺癌原发部位、淋巴结转移状态、组织学类型, 患者性别、年龄和吸烟与否等均无密切关系。即肺癌患者原发肿瘤越大, 细胞分化程度越低, TNM 分期越晚或伴有远处转移, 其血清中 endostatin 水平及肺癌组织中 endostatin 表达水平就越低。同时还发现肺癌组织中 endostatin 表达水平与血清 endostatin 水平呈显著正相关。结果提示肺癌的肿瘤细胞可产生高表达水平的 endostatin 蛋白, 或通过其他途径刺激机体产生大量的 endostatin, 抑制肿瘤血管生成, 来对抗肿瘤细胞产生的血管内皮生

长因子(VEGF)的促血管生成作用, 达到肿瘤血管生成和抑制因子间的平衡。本研究结果还提示分期较晚或分化程度较低的肺癌患者其肿瘤局部 endostatin 的表达越低, 使得血清中 endostatin 的含量亦降低, 而 Ohta 等^[8]利用 RT-PCR 法研究 90 例原发性肺癌时发现, VEGF 基因的表达水平与 P-TNM 分期、肿瘤细胞分化程度和淋巴结转移等密切相关, 分期越晚, 分化程度越低, 表达水平越高, 这样就使得肺癌血管生成促进因子和抑制因子间的平衡向着有利于肺癌新生血管生成的方向发展, 导致肺癌的进一步生长和侵袭转移, 这与临床实际发现的情况相吻合。

研究结果表明采用免疫组化 LSAB 法检测肺癌组织中 endostatin 的表达, ELISA 法检测肺癌患者血清 endostatin 的含量有助于预测肺癌的恶性行为, 有助于研究 endostatin 在肺癌发生、发展及侵袭转移中的作用, 指导肺癌术后多学科综合治疗。

【参考文献】

- [1] 周清华. 肺癌外科治疗进展[J]. 肺癌杂志, 1998, 1(1): 7-11.
- [2] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88(2): 277-285.
- [3] Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance[J]. Nature, 1997, 390(6658): 404-407.
- [4] Suzuki M, Iizasa T, Ko E, et al. Serum endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung cancer. Lung Cancer[J], 2002, 35(1): 29-34.
- [5] Feldman AL, Pak H, Yang JC, et al. Serum endostatin levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma[J]. Cancer, 2001, 91(8): 1525-1529.
- [6] Feldman AL, Alexander HR, Bartlett DL, 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.
- [7] Strik HM, Schluesener HJ, Seid K, et al. Localization of endostatin in rat and human gliomas[J]. Cancer, 2001, 91(5): 1013-1019.
- [8] Ohta Y, Endo Y, Tanaka M, et al. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 1996, 2(8): 1411-1416.

(收稿日期: 2005-06-06)

· 告读者 ·

《山东医药》杂志被俄罗斯《文摘杂志》列为来源期刊

经中国科学技术期刊编辑学会国际交流工作委员会、中国高等学校自然科学学报研究会对外联络委员会认定,《山东医药》杂志自 2004 年起被世界六大著名检索期刊之一的俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI)列为来源期刊。万方数据