

# 非小细胞肺癌患者手术前后血清中内皮抑素和 VEGF 水平变化及相关性研究

刘颖<sup>1</sup>, 周清华<sup>2</sup>, 陆艳蓉<sup>2</sup>, 张洁<sup>2</sup>, 刘伦旭<sup>2</sup>

1. 山东省立医院胸外科, 山东 济南 250021

2. 四川大学华西医院(心胸外科:周清华, 刘伦旭; 肿瘤研究所:陈艳蓉, 张洁), 四川 成都 610041

## Perioperative changes of serum levels of endostatin and VEGF in non-small cell lung cancer patients and the dependability between them

LIU Ying<sup>1</sup>, ZHOU Qing-hua<sup>2</sup>, LU Yan-rong<sup>3</sup>, ZHANG Jie<sup>3</sup>, LIU Lun-xu<sup>2</sup>

1. Department of Thoracic Surgery, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, P. R. China

2. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, P. R. China

**【摘要】** 目的:探讨非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者手术前后血清中内皮抑素(endostatin)和血管内皮生长因子(vasular endothelial growth factor, VEGF)水平的动态变化规律及两者水平变化的相关性。方法:用 ELISA 法检测 46 例 NSCLC 患者手术前后血清中 endostatin 和 VEGF 的水平。结果:1)NSCLC 患者术后 7 d 血清 endostatin 水平为(23.41±5.12) ng/mL,显著高于术前[(20.85±4.56) ng/mL]和术后 1 d [(18.89±4.67) ng/mL]血清 endostatin 水平, *P* 值分别为 0.011 和 0.000;术后 7 d 血清 VEGF 水平为(3.75±0.71) ng/mL,显著高于术前[(1.72±0.46) ng/mL]和术后 1 d [(2.22±0.58) ng/mL]血清 VEGF 水平, *P* 值均为 0.000。2)NSCLC 患者术前血清 endostatin 与 VEGF 水平呈非常显著负相关, *r* = -0.380, *P* = 0.009。3)NSCLC 患者术后 7 d 血清 endostatin 水平与 VEGF 水平呈非常显著正相关, *r* = 0.351, *P* = 0.017。结论: NSCLC 患者手术前、后血清 endostatin 和 VEGF 水平存在动态变化,且两者手术前后的水平变化有显著相关性,检测 NSCLC 患者手术前后血清中 endostatin 和 VEGF 水平可能是进一步预测肺癌恶性行为的有用指标。

肿瘤防治杂志, 2005, 12(19): 1441-1444

**【ABSTRACT】** **OBJECTIVE:** To study the perioperative dynamics of serum levels of endostatin and VEGF in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients and the dependability between them. **METHODS:** The perioperative serum levels of endostatin and VEGF were detected in 46 patients with NSCLC by ELISA method. **RESULTS:** 1) The serum levels of endostatin in NSCLC patients on the 7th postoperative day (23.41 ± 5.12) ng/mL were significantly higher than those before operation (20.85 ± 4.56) ng/mL (*P* = 0.011) and on the 1st postoperative day [(18.89 ± 4.67) ng/mL], *P* = 0.000; the serum levels of VEGF in NSCLC patients on the 7th postoperative day (3.75 ± 0.71) ng/mL were also significantly higher than those before operation (1.72 ± 0.46) ng/mL (*P* = 0.000) and on the 1st postoperative day (2.22 ± 0.58) ng/mL, *P* = 0.000. 2) The pre-operative serum levels of endostatin were highly negative correlated with serum VEGF levels in NSCLC patients, *r* = -0.380, *P* = 0.009. 3) The serum levels of endostatin on the 7th postoperative day were highly positive correlated with serum VEGF levels in NSCLC patients, *r* = 0.351, *P* = 0.017. **CONCLUSIONS:** The perioperatively dynamics of serum levels of endostatin and VEGF in NSCLC patients exists and the dependability between them is conspicuous. The perioperative serum levels of endostatin and VEGF in patients with NSCLC might be helpful to evaluating the biological behavior of lung cancer.

Chin J Cancer Prev Treat, 2005, 12(19): 1441-1444

**【基金项目】** 国家自然科学基金(30070333)

**【第一作者简介】** 刘颖,男,河北邯郸人,博士,主治医师,主要从事肺癌的基础与临床研究工作。

Tel: 86-531-85186387 E-mail: liumike\_2000@sohu.com

**【通讯作者简介】** 周清华,男,四川自贡人,硕士,博士生导师,教授,主任医师,主要从事肺癌的基础与临床研究工作。

Tel: 86-28-85422584 E-mail: zhouqh@mail.sc.cninfo.net

**【关键词】** 癌,非小细胞肺/代谢;癌,非小细胞肺/病理学;血管内皮生长因子 A/血清;内皮抑素类;酶联免疫吸附测定  
**[KEYWORDS]** carcinoma,non-small cell lung/metabolism; carcinoma,non-small cell lung/pathology; vascular endothelial growth factor A/serum; endostatin; enzyme-linked immunosorbent assay

**【中图分类号】** R734.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1009-4571(2005)19-1441-04

肿瘤的发生、发展、侵袭和转移不仅受到肿瘤血管生成促进因子的调控,同时受到肿瘤血管生成抑制因子的调控。为探讨非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者手术前后血清中内皮抑素(endostatin)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平的动态变化规律及两者水平变化的相关性,我们应用 ELISA 法检测了 46 例 NSCLC 患者手术前后血清中 endostatin 和 VEGF 水平。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2001 年 6 月 5 日~2002 年 2 月 23 日在四川大学华西医院心胸外科行手术治疗的部分 NSCLC 患者 46 例,男 34 例,女 12 例。年龄 37~74 岁,平均年龄 60.39 岁,中位年龄 56.5 岁。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(国际 UICC1997 分期标准): I+II 期 20 例,III+IV 期 26 例。

1.2 主要试剂和仪器

人 Endostatin Sandwich ELISA 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。酶标仪为美国 BIO-RAD Model 550。

1.3 血清标本的收集与保存

所有 NSCLC 患者均于手术前、术后 1 d 和 7 d 分别采用非抗凝管抽取外周静脉血 5 mL,室温放置 30~60 min,5 000 r/min 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。

1.4 检测方法

检测方法按试剂盒说明书进行,用酶标仪测定结果,VEGF 检测波长为 450 nm,endostatin 检测波长为 490 nm。

1.5 结果判断

1.5.1 VEGF 结果判断 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,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 OD<sub>450</sub>

值可在标准曲线上查出其浓度。

1.5.2 endostatin 结果判断 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 OD<sub>490</sub> 值可在标准曲线上查出其浓度。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件处理,采用的统计学方法为随机区组设计的 F 检验和双变量相关性分析。检验水准为 α=0.05。

2 结果

2.1 endostatin 和 VEGF 水平的动态变化

NSCLC 患者手术前、术后 1 d 和 7 d 血清 endostatin 的水平分别为(20.85±4.56)、(18.89±4.67)和(23.41±5.12) ng/mL。经 F 检验,三组间血清 endostatin 水平差异有统计学意义,F=29.652,P=0.000;两两比较:术后 7 d 血清 endostatin 水平显著高于术前(P=0.011)和术后 1 d 水平(P=0.000),术前血清 endostatin 的水平虽然比术后 1 d 稍高,但差异并无统计学意义,P=0.051(表 1,Tab.1;图 1, Fig.1)。NSCLC 患者手术前、术后 1 d 和 7 d 血清中 VEGF 的水平分别为(1.72±0.46)、(2.22±0.58)和(3.75±0.71) ng/mL。经 F 检验,三组间血清 VEGF 水平差异有统计学意义,F=52.270,P=0.000;两两比较:术后 7 d 血清 VEGF 水平显著高于术前(P=0.000)和术后 1 d 水平(P=0.000),术后 1 d 血清 VEGF 水平亦高于术前血清 VEGF 水平,但差异无统计学意义,P=0.062(见表 1,Tab.1;图 1, Fig.1)。

2.2 endostatin 和 VEGF 表达水平之间的相关性

NSCLC 患者手术前血清 endostatin 和 VEGF 水平呈非常显著负相关,r=-0.380,P=0.009;手术后 7 d 血清 endostatin 与 VEGF 水平呈非常显著正相关,r=0.351,P=0.017。

表 1 NSCLC 患者手术前后血清 endostatin 和 VEGF 水平的动态变化(̄x±s)

时间	n	endostatin (ng/mL)	P 值	VEGF (ng/mL)	P 值
术前	46	20.85±4.56	0.000*	1.72±0.46	0.000△
术后 1 d	46	18.89±4.67	0.051**	2.22±0.58	0.062△△
术后 7 d	46	23.41±5.12	0.011**	3.75±0.71	0.000△△△

\* endostatin 水平三组间比较,F=29.652.\*\* 与术前水平比较。△ VEGF 水平三组间比较,F=52.270。△△与术前水平比较。

Tab. 1 Pre-and postoperative sequential changes of serum endostatin, VEGF concentrations in patients with NSCLC ( $\bar{x} \pm s$ )

Time	n	Endostatin (ng/mL)	P value	VEGF (ng/mL)	P value
Before operation	46	20.85 ± 4.56	0.000*	1.72 ± 0.46	0.000 $\Delta$
1st postoperative day	46	18.89 ± 4.67	0.051**	2.22 ± 0.58	0.062 $\Delta\Delta$
7th postoperative day	46	23.41 ± 5.12	0.011**	3.75 ± 0.71	0.000 $\Delta\Delta$

\*  $F=29.652$ , endostatin level comparison within groups. \*\* Compared with level before operation respectively.  $\Delta F=52.270$ , VEGF level comparison within groups.  $\Delta\Delta$  Compared with level before operation respectively.

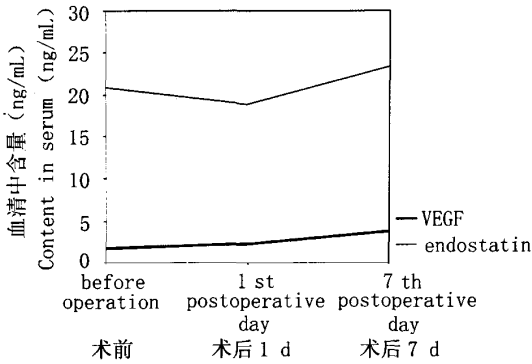


图 1 NSCLC 患者手术前后血清中 endostatin 和 VEGF 水平的动态变化

Fig. 1 Pre-and postoperative sequential changes of serum endostatin, VEGF concentrations in patients with NSCLC

### 3 讨论

肿瘤的形成和发展大致可分为 2 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促进肿瘤持续性生长阶段(血管期)<sup>[1]</sup>。实体瘤的生长和转移必须依赖于血管生成(angiogenesis),而抑制其血管生成能够控制其生长和转移<sup>[2]</sup>。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。研究发现,某些肿瘤(如 Lewis 肺癌)能够抑制其远处转移瘤的生长<sup>[3]</sup>,在原发肿瘤切除后,转移瘤开始迅速生长。并且提出一种假说,即原发性肿瘤分泌两种相拮抗的因子,分别抑制和刺激血管生成,这一假说已由许多试验所证实。现有的研究表明,VEGF 是作用最强的血管生成调控因子之一<sup>[4]</sup>,而 1997 年发现的 endostatin 则被认为是迄今为止最有效的内源性血管生长抑制剂之一<sup>[5]</sup>。文献报道 endostatin 的表达水平与多种恶性肿瘤的进展和预后有关<sup>[6,7]</sup>。VEGF 是一种糖蛋白,由 2 个相对分子质量为  $(17 \sim 22) \times 10^3$  的相同亚基经过二硫键形成二聚体,相对分子质量为  $(34 \sim 45) \times 10^3$ ,由于基因表达的剪切方式不同,形成 5 种不同的异构体,即 VEGF121、145、165、189 和 206,5 种异构体均能诱导体内血管生成<sup>[8]</sup>。endostatin 为胶原 XVIII (collagen XVIII) C-末端非胶原蛋白特征结构域 (NC1) 中的一内源性片段,由 184 个氨基酸组成,相对分子质量为  $20 \times 10^3$ <sup>[9]</sup>。

Kuroi 等<sup>[9]</sup>检测了多种癌症患者血浆中的 endostatin 和 VEGF 水平,发现明显高于健康对照组。我们的研究定量检测了 NSCLC 患者手术前后血清中 endostatin 和 VEGF 的含量,其结果与 Suzuki 等<sup>[10]</sup>用 ELISA 法研究 NSCLC 患者血清中 endostatin 含量的结果基本一致。上述研究结果表明,肺癌细胞确实能分泌大量的 VEGF,促进肿瘤血管生成,以提供肿瘤细胞生长所需的营养条件,并进一步为肿瘤的转移打下基础。同时,可能通过多种途径刺激机体产生大量的 endostatin,经过血循环到达肿瘤部位,抑制原发和继发肿瘤血管的生成,与血管生成促进因子的作用相对抗,达到一种平衡。

Feldman 等<sup>[11]</sup>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<sup>[12]</sup>还发现结肠癌伴肝转移患者血清中 endostatin 水平明显增高,并与 VEGF 水平及疾病的进展相关。我们的研究观察到 NSCLC 患者手术前后血清中 endostatin 和 VEGF 的水平有密切关系,  $P < 0.05$ 。NSCLC 患者术前血清 endostatin 和 VEGF 水平呈非常显著负相关 ( $r = -0.380, P = 0.009$ ),术后 7 d 血清 endostatin 水平与 VEGF 水平呈非常显著正相关,  $r = 0.351, P = 0.017$ 。此结果说明 NSCLC 患者手术前由于原发肿瘤的存在,分泌大量的 VEGF,进一步促进肿瘤的生长,而 endostatin 的水平则相对较低,这时主要表现为促进肿瘤的生长。而术后由于切除了原发肿瘤,消除了 VEGF 的主要来源,虽然可能通过其他途径 VEGF 仍然有所增高,但主要表现为 endostatin 的增高,这时主要表现为抑制肿瘤生长的作用。正是由于肺癌中血管生成促进因子 VEGF 的过度表达和血管生成抑制因子 endostatin 水平的过度降低,导致了肺癌无限制地生长、侵袭和远处转移。

Feldman 等<sup>[13]</sup>在研究肾细胞癌患者血清中 endostatin 和 VEGF 的水平时发现手术后两者的水平都出现了一定程度的增加。我们的研究观察到 NSCLC 患者术后 7 d 血清中 endostatin 水平和 VEGF 水平也较手术前和术后 1 d 出现了一定程度的增高 ( $P = 0.000$ ),NSCLC 患者血清中两者水平的变化趋势是 endostatin 水平在术后先有短暂的降低,随后开始升高;而 VEGF 水平在术后短期内即开始升高,并持续

增加。手术后两者的水平非但没有降低,反而出现了升高的趋势,提示可能存在其他的不依赖肿瘤存在而产生 endostatin 及 VEGF 的途径,或者是由于 VEGF 的升高,相应地刺激了残留的微小肿瘤病灶加速产生 endostatin 以达到平衡的结果,具体机制需要进一步研究。既然 NSCLC 患者术后血清中两者的水平没有降低,反而进一步增加,那么术后出现的部分患者远处转移灶加速生长的原因何在? 这可能是由于两者增高的不平衡所致,VEGF 增高水平超过了 endostatin 增高的水平,从而表现出促血管生成的作用,导致了肿瘤的快速生长。实际的作用机制有待进一步研究,并加以阐明。

我们的研究结果进一步证明了肺癌血管生成促进因子和抑制因子在肺癌发生、发展、侵袭和转移中均起着重要作用,而且两者的水平有明显的相关性。结果表明,人 NSCLC 患者血清中 endostatin 和 VEGF 水平可能是预测肺癌恶性行为的有用指标,对于指导肺癌术后多学科综合治疗有着重要意义。

### 【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] Wu Z, O'Reilly M S, Folkman J, et al. Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1997,236(3):651-654.
- [3] Dong Z, Kumar R, Yang X, et al. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma[J]. *Cell*,1997,88(6):801-810.
- [4] Brooks P C. Cell adhesion molecules angiogenesis[J]. *Cancer Metastasis Rev*,1996,15(242):187-194.
- [5] O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Cell*,1997,88(2):277-285.
- [6] Homer J J, Greenman J, Stafford N D, et al. Angiogenesis head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Clin Otolaryngol*,2000,25(3):169-180.
- [7] 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.
- [8] Gitay-Goren H, Soker S, Vlodavsky Y, et al. The binding of VEGF to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules[J]. *J Biol Chem*,1992,267(9):6093-6098.
- [9] Kuroi K, Tanaka C, Toi M, et al. Circulating levels of endostatin in cancer patients[J]. *Oncol Rep*,2001,8(2):405-409.
- [10] Suzuki M, Iizasa T, Ko E, et al. Serum endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*,2002,35(1):29-34.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Feldman A L, Alexander H R Jr, Yang J C, et al. Prospective analysis of circulating endostatin levels in patients with renal cell carcinoma[J]. *Cancer*,2002,95(8):1637-1643.

收稿日期:2005-06-03 修回日期:2005-07-09

(编辑:韩明勇)