

[文章编号] 1007-385X(2003)03-0194-04

肿瘤患者外周血循环血管内皮细胞数量与血清 VEGF 水平的关系

李 慧, 张 澎, 任秀宝, 刘 虹, 郝希山 (天津医科大学附属肿瘤医院, 天津 300060)

[摘 要] **目的:** 分析实体瘤患者外周血中的循环血管内皮细胞(circulating endothelial cells, CECs)及血管内皮前体细胞(circulating endothelial precursors, CEPs), 并比较与正常人的差异。**方法:** 流式细胞法检测 57 肿瘤患者及 15 例正常人外周血中的 CECs 和 CEPs, ELISA 法检测血清中血管生成相关因子 VEGF 和 bFGF 的表达水平。**结果:** 肿瘤患者外周血 CECs 及 CEPs 分别为(0.378 ± 0.047)% 和(0.059 ± 0.013)%, 血清 VEGF, bFGF 分别为(295.58 ± 59.56) ng/L 和(28.73 ± 7.40) ng/L, 均高于正常对照组($P < 0.05$)。血管内皮及其前体细胞的数量与血清 VEGF, bFGF 水平相关。**结论:** 实体瘤患者外周血中循环血管内皮及其前体细胞、血管内皮生长因子均高于正常人; VEGF 和 bFGF 可能参与了血管内皮干/祖细胞的动员过程。

[关键词] 肿瘤; 循环血管内皮细胞; 循环血管内皮前体细胞; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

Relation of the Amount of Circulating Endothelial Cells in Peripheral Blood and the Serum Level of VEGF in Tumor Patients

LI Hui, ZHANG Peng, REN Xiu-bao, LIU Hong, HAO Xi-shan (Cancer Institute & Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the circulating endothelial cells (CECs) and circulating endothelial precursors (CEPs) in peripheral blood of tumor patients. **Methods:** CECs and CEPs were enumerated in 57 tumor patients and 15 healthy controls by 3-color flow cytometry. The serum level of angiogenesis related cytokines(VEGF, bFGF) was determined by ELISA method. **Results:** In tumor patients, mean value of CECs and CEPs was (0.378 ± 0.047)% and (0.059 ± 0.013)% respectively. The serum level of VEGF and bFGF were (295.58 ± 59.56) ng/L and (28.73 ± 7.40) ng/L. The amount of CECs/CEPs positively correlated with the serum level of VEGF and bFGF. **Conclusions:** The CECs/CEPs and serum level of VEGF and bFGF of tumor patients was higher than those of normal controls. VEGF and bFGF may participate into the course of endothelial progenitors mobilization.

[Key words] tumor; circulating endothelial cells (CECs); circulating endothelial precursors (CEPs); vascular endothelial growth factor (VEGF)

* 血管生成在肿瘤的生长、转移等过程中具有重要作用^[1-3]。肿瘤组织中具有较高的血管密度,且血管结构、功能、分子机制等方面均较正常状况有较大差异。近几年关于血管生成机制的研究有了新的进展,原有的观点认为血管生成是从已有血管原位上通过出芽方式完成;而最新的研究表明骨髓来源的血管内皮前体细胞可被动员、募集到新生血管部位,参与血管形成^[4-5]。当肿瘤不能从临近组织募集到血管内皮细胞时,骨髓来源的血管内皮前体细胞将作为主要来源参与到肿瘤血管床的形成。恶性肿瘤细胞产生多种细胞因子将骨髓中的内皮前体细胞动员入血,掺入肿瘤组织局部参与血管生长,并且与肿瘤的演化过程相关。

本研究探讨实体瘤患者外周血中 CECs/CEPs 的动员情况,以及与血清 VEGF, bFGF 表达水平的相关性,以了解血管内皮干/祖细胞动员机制及其与肿瘤的相关性。

1 材料与方法

1.1 病例选择

共检测 57 例实体瘤患者及 15 例正常人外周血, 57 例肿瘤患者包括肾癌 15 例、消化道肿瘤 16 例、肺癌

[基金项目] 天津市自然科学基金(98311351)

[作者简介] 李慧(1974-), 女, 天津人, 助理研究员, 主要从事肿瘤免疫及生物治疗方面的研究。

7 例、乳腺癌 6 例、肝癌 6 例、淋巴瘤 4 例、胰腺癌 3 例。

1.2 外周血 CECs/CEPs 的检测

1.2.1 细胞表面标志

血管内皮细胞:CD31⁺CD45⁻; 血管内皮干/祖细胞:CD31⁺AC133⁺CD45⁻; (CD31-FITC 及其同型对照购自 COULTER 公司;CD45-Cy5, AC133-RPE 及其同型对照均购自 DAKO 公司)。

1.2.2 检测方法

采用荧光抗体标记,流式细胞仪检测。抽取抗凝血 3 ml,血标本用 PBS 对倍稀释,Ficoll 分离,1 800 r/min 离心 20 min,PBS 洗 2 次。将细胞加入 96 孔板中,每孔 5×10^5 ,加入抗体 5 μ l,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 ~ 60 min,用 PBS 洗涤标本 2 次,100 μ l 的 1% 多聚甲醛固定,流式细胞仪检测。

1.3 血清 VEGF,bFGF 水平检测

采用 ELISA 方法

将标准品及待测血清加入相应反应孔,轻轻混匀 30 s,封闭板孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。洗板,每孔依次加入

Biotin 和 HRP 标记单抗(LIFEKEY 公司),混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。洗板,加入底物 A,B,室温孵育 3 ~ 5 min。加入终止液,30 min 内在酶标仪上读取 OD₄₅₀ 值。以 OD₄₅₀ 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,根据血清样品的 OD 值,计算其浓度。

1.4 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件。

2 结果

2.1 肿瘤患者外周血中的 CECs/CEPs

分析了 57 例肿瘤患者外周血中 CECs 和 CEPs 的含量(图 1)。

57 例肿瘤患者外周血中 CECs 和 CEPs 分别占外周血细胞总数的(0.378 ± 0.047)%, (0.059 ± 0.013)%(表 1);同时检测了 15 例正常人外周血,CECs 及 CEPs 分别为(0.067 ± 0.013)%, (0.003 ± 0.001)%,肿瘤患者外周血中的血管内皮及其前体细胞均高于正常对照组($P < 0.05$)。

图 1 流式细胞法检测外周血中的循环血管内皮细胞和血管内皮前体细胞

Fig.1 Detection of CECs and CEPs in peripheral blood by flowcytometry method

表 1 肿瘤患者外周血 CECs/CEPs 检测结果

Tab.1 CECs and CEPs in peripheral blood of tumor patients

Groups	n	EC(%)	EPC(%)
Gastrointestinal cancer	16	0.425 ± 0.103	0.121 ± 0.039
Renal cancer	15	0.277 ± 0.099	0.028 ± 0.005
Lung cancer	7	0.448 ± 0.076	0.035 ± 0.013
Hepatoma	6	0.530 ± 0.184	0.081 ± 0.037
Breast cancer	6	0.302 ± 0.106	0.029 ± 0.014
Lymphoma	4	0.390 ± 0.119	0.021 ± 0.007
Pancreas cancer	3	0.296 ± 0.178	0.005 ± 0.003
Total	57	0.378 ± 0.047	0.059 ± 0.013

2.2 肿瘤患者血清 VEGF, bFGF 检测

肿瘤患者血清 VEGF, bFGF 分别为(295. 58 ± 59. 56) ng/L 和(28. 73 ± 7. 40) ng/L, 15 例正常人血清

VEGF, bFGF 分别为(109. 11 ± 28. 22) ng/L 和(12. 99 ± 7. 40) ng/L(表 2), 肿瘤患者以上 2 种细胞因子水平高于正常人($P < 0. 05$)。

表 2 肿瘤患者血清 VEGF, bFGF 检测结果
Tab. 2 Serum level of VEGF, bFGF in tumor patients

Groups	n	VEGF(ng/L)	bFGF (ng/L)
Gastrointestinal cancer	16	552. 84 ± 170. 58	56. 02 ± 24. 52
Renal cancer	15	180. 40 ± 64. 90	16. 43 ± 4. 21
Lung cancer	7	143. 40 ± 47. 06	18. 49 ± 4. 76
Hepatoma	6	350. 16 ± 189. 67	37. 79 ± 14. 11
Breast cancer	6	80. 62 ± 18. 97	9. 44 ± 1. 10
Lymphoma	4	379. 04 ± 174. 03	13. 83 ± 3. 76
Pancreas cancer	3	64. 03 ± 30. 72	8. 84 ± 1. 35
Total	57	295. 58 ± 59. 58	28. 73 ± 7. 40

2.3 外周血 CECs/CEPs 与血清 VEGF, bFGF 水平的相关性

分析了肿瘤患者外周血 CECs/CEPs 与血清 VEGF 水平的相关性, 发现循环血管内皮及其前体细胞与血清 VEGF, bFGF 水平相关(CECs 与 VEGF: $r = 0. 608$, $P < 0. 05$; CEPs 与 VEGF: $r = 0. 635$, $P < 0. 05$; CECs 与 bFGF: $r = 0. 684$, $P < 0. 05$; CEPs 与 bFGF: $r = 0. 722$, $P < 0. 05$)。

3 讨论

血管生成在恶性肿瘤的演化及转移过程中具有重要作用^[3-5]。通常情况下, 没有新生血管生成的恶性肿瘤往往处于休眠状态, 局限于原发部位, 生长缓慢。一旦肿瘤释放大量的促血管生长因子而导致局部稳定血管床的信号失调, 大量新生血管开始生长, 肿瘤也进入快速增长期^[6]。

成熟个体大多数造血干细胞和血管内皮前体细胞存在于骨髓中, 在某些细胞因子刺激下可以被动员到外周血循环, 并在其他造血器官形成克隆^[7-9]。目前的研究证实在多种疾病状态下(如肿瘤、镰刀细胞贫血症、心肌梗塞等) 存在血管内皮前体细胞的动员。恶性肿瘤细胞产生多种细胞因子将骨髓中的内皮前体细胞动员入血, 确实能掺入活性血管生成部位及肿瘤组织局部血管生长。1997 年 Asahara 等^[10]从成人外周血中分离检测了骨髓来源的 CD34⁺ VEGFR2(+) 的内皮前体细胞, 证实该种细胞参与缺血组织新生血管的形成。2001 年 Mancusop 等^[11]报道了淋巴瘤及乳腺癌患者外

周血中血管内皮细胞含量高于正常人, 而治疗达到 CR (完全缓解) 后循环血管内皮细胞恢复正常。恶性肿瘤除动员血管内皮前体细胞入血外, 还有将这些细胞募集到肿瘤组织局部参与肿瘤组织血管生成的作用。

外周血中血管内皮及其前体细胞的鉴定, 同样借助于细胞表面的特异性标志, 包括 KDR, Tie1, Tie2^[8], CD31, CD34 等^[11]。虽然 CD31, CD34 在部分血细胞上也有表达, 但可选择 CD45⁻ 细胞群, 以去除血细胞的影响。而血管内皮干/祖细胞的鉴别则有赖于 AC133 的成功克隆, AC133 表达于干/祖细胞, 而随着细胞的分化成熟, AC133 的表达则会下降, 几乎所有成熟的造血细胞都不表达 AC133。本文选择 CD31⁺ CD45⁻ 和 CD31⁺ AC133⁺ CD45⁻ 分别作为 CEC 及 CEP 的表面标志。

肿瘤细胞分泌 VEGF 等血管生成相关的细胞因子, 对血管内皮及其前体细胞具有动员作用^[12-14]。Hattori 等^[15]发现 VEGF 能迅速动员造血干细胞及 VEGFR2(+) 内皮前体细胞进入外周循环, 而且内皮前体细胞动员入血在调节出生后的血管生成方面具有重要作用, 证实了 VEGF/VEGFR 和 Ang-1/Tie-2 信号系统的活化在造血干细胞和血管内皮前体细胞的动员与募集、以及血管生成等过程中起重要作用。Monestiroli 等^[16]报道了 CEC 与 VEGF 的水平相关, 除动员作用外 VEGF 还可能阻止 CEC 的凋亡, 荷瘤小鼠体内 CEC 活性高于对照组。

内皮细胞的生长也受到多种生长因子的影响, 如 VEGF, bFGF, EGF, TGF α 等; 其中又以 VEGF, bFGF 最

为重要。VEGF 是血管内皮细胞特异的有丝分裂原,特异地促进内皮细胞的分裂和增殖,其受体 VEGFR 存在于内皮细胞表面。基因剔除实验表明,在胚胎中若缺失 VEGFR 血管系统不能生成,VEGF/VEGFR 系统是血管生长中特异的作用系统。bFGF 是多功能生长因子,有促进内皮细胞增殖的作用。

血管内皮细胞的动员与肿瘤的演化过程有关。Monestiroli 等^[16]通过动物实验研究了循环血管内皮细胞与肿瘤的关系,发现 CEC 与肿瘤体积等相关,提示 CEC 的升高与肿瘤进展有关。CEP 的动员与募集是肿瘤生长与血管生成中必需的环节,动物实验证实以血管内皮干/祖细胞为靶细胞的基因治疗,可以阻断肿瘤生长,起到治疗的作用^[17]。

目前关于血管内皮前体细胞动员机制的研究多见于动物实验,关于肿瘤患者外周血 CECs/CEPs 的检测仅见于白血病、淋巴瘤和乳腺癌,为研究实体肿瘤患者血管内皮及其前体细胞的动员情况及其规律,应用流式细胞法检测了 57 例肿瘤患者及 15 例正常人外周血中的血管内皮及其前体细胞,证实了外周血中 CEC/CEP 的存在;同时肿瘤患者循环血管内皮细胞及血管内皮干/祖细胞高于正常对照组 ($P < 0.05$),提示肿瘤患者体内存在血管内皮及其前体细胞的动员;肿瘤患者血清中的血管生长因子 VEGF, bFGF 水平与周血中 CEC/CEP 相关,表明促进血管生成的细胞因子,在血管内皮细胞的动员中具有一定作用。对于循环血管内皮细胞动员机制、在肿瘤发生发展中的作用的研究中具有一定的意义,同时也为肿瘤进展及转移的研究提供了有参考价值的指标。

[参考文献]

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other diseases[J]. Nat Med, 1995, 1: 27-31.
- [2] Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth[J]. Semin Cancer Biol, 1992, 3: 65-71.
- [3] Pluda JM. Tumor-associated angiogenesis: Mechanisms, clinical implications and therapeutic strategies[J]. Semin Oncol, 1997, 24: 203-218.
- [4] Shi Q, Raffi S, Wu WH, *et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells[J]. Blood, 1998, 92(2): 362-367.
- [5] Eveline SJ, De Bont, Jeroen EJ, *et al.* Mobilization of human CD34⁺ hematopoietic stem cells enhance tumor growth in a non-bese diabetic/severe combined immuno-deficient mouse model of human non-hodgkin's lymphoma[J]. Cancer Res, 2001, 61: 7654-7659.
- [6] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature, 2000, 407: 249-257.
- [7] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, *et al.* Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells responsible for neovascularization[J]. Nat Med, 1999, 5(4): 434-438.
- [8] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, *et al.* Expression of VEGFR2 and AC133 by circulating CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors[J]. Blood, 2000, 95(3): 952-958.
- [9] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, *et al.* Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2001, 103(23): 2776-2779.
- [10] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.
- [11] Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, *et al.* Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients[J]. Blood, 2001, 97: 3658-3661.
- [12] Moore MA, Hattori K, Heissig B, *et al.* Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF and angiopoietin-1 [J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 938: 36-45.
- [13] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, *et al.* Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects[J]. Circ Res, 2000, 86(12): 1198-1202.
- [14] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, *et al.* VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. EMBO J, 1999, 18(14): 3964-3972.
- [15] Hattori K, Dias S, Heissig B, *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells[J]. J Exp Med, 2001, 193(9): 1005-1014.
- [16] Monestiroli S, Mancuso P, Burlini A, *et al.* Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma[J]. Cancer Res, 2001, 61(11): 4341-4344.
- [17] Lyden D, Hattori K, Dias S, *et al.* Impaired recruitment of bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth[J]. Nat Med, 2001, 7(11): 1194-1201.

[收稿日期] 2003-01-28

[修回日期] 2003-04-20