

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.015

· 临床研究 ·

喉鳞癌患者外周血 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ 内皮祖细胞的检测及其临床意义

董龙宝¹, 厉倩², 徐林根³, 田振华¹, 谭龙益²(1. 中国人民解放军第455医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海200052; 2. 上海市第一人民医院宝山分院检验科, 上海200940; 3. 复旦大学附属金山医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海200540)

[摘要] 目的: 研究喉鳞癌患者外周血中循环 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ 内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的水平及其与喉鳞癌发生、发展的相关性。方法: 收集2010年2月至2011年2月20例喉鳞癌患者外周血标本, 10例健康志愿者外周血作为对照。流式细胞术检测 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 占外周血 CD34⁺ 造血干细胞或外周血淋巴细胞的比例, 实时定量PCR检测PBMC中KDR mRNA和CD133 mRNA的表达水平, ELISA与Griess法分别检测血清中VEGF和NO的水平。结果: 临床Ⅱ期~Ⅳ期的喉鳞癌患者外周血 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 占 CD34⁺ 造血干细胞的比例和占淋巴细胞的比例均较健康对照组明显升高[(55.4 ± 11.4)% vs (21.0 ± 5.8)% , $P < 0.05$; (1.27 ± 0.25)% vs (0.25 ± 0.09)% , $P < 0.05$]。临床Ⅱ期~Ⅳ期喉鳞癌患者PBMC中KDR mRNA和CD133 mRNA的表达水平及血清中VEGF水平均明显高于健康对照组($P < 0.05$), NO水平没有明显差异; 而临床Ⅰ期的喉鳞癌患者 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 比例、KDR mRNA和CD133 mRNA表达以及VEGF水平与健康对照组相比无差异。结论: 晚期喉鳞癌患者外周血循环 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPC 和血清中VEGF水平均明显升高, 可能与肿瘤的发生有关。

[关键词] 喉癌; 鳞癌; 内皮祖细胞; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R739.65; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0315-05

Detection of CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ endothelial progenitor cells in laryngeal squamous carcinoma patients and their clinical significance

DONG Long-bao¹, LI Qian², XU Lin-gen³, TIAN Zhen-hua¹, TAN Long-yi²(1. Department of Otolaryngology, No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Baoshan Branch of Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200940, China; 3. Department of Otolaryngology, Jinshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200540, China)

[Abstract] **Objective:** To study the ratio of circulating CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ endothelial progenitor cells (EPCs) in peripheral blood of laryngeal squamous carcinoma patients, and to investigate its relationship with the development and progress of laryngeal squamous carcinoma. **Methods:** Blood samples from 20 laryngeal squamous carcinoma patients, who were diagnosed from Feb. 2010 to Feb. 2011, and 10 healthy volunteers were included in the present study. The ratio of CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs in peripheral CD34⁺ haemopoietic stem cells or peripheral lymphocytes was detected by flow cytometry, the expressions of KDR and CD133 mRNA in PBMC were examined by real-time RT-PCR, and the levels of VEGF and NO in plasma were assayed by ELISA and Griess assay, respectively. **Results:** The ratios of CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs in both peripheral CD34⁺ haemopoietic stem cells and peripheral lymphocytes of laryngeal squamous carcinoma patients in stage II-stage IV were significantly higher than those in healthy volunteers ([55.4 ± 11.4]% vs [21.0 ± 5.8]% , $P < 0.05$; [1.27 ± 0.25] vs [0.25 ± 0.09] , $P < 0.05$). The expressions of KDR and CD133 mRNA and the level of plasma VEGF in laryngeal squamous carcinoma patients of stage II-stage IV were significantly higher than those in healthy volunteers ($P < 0.05$), but there was no significant difference in NO level. The ratio of CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺

[基金项目] 上海卫生局青年科技基金项目(No.2007Y43)。Project supported by the Science Foundation for Young Scholars from Health Bureau of Shanghai (No. 2007Y43)。

[作者简介] 董龙宝(1965 -),女,江苏省盐城市人,本科,主要从事喉癌的临床与基础研究, E-mail: cco1965@163.com

[通信作者] 董龙宝(DONG Long-bao, corresponding author), E-mail: cco1965@163.com

EPCs, the expression of KDR mRNA and CD133 mRNA, and the level of plasma VEGF in laryngeal squamous carcinoma patients of stage I were similar to those in healthy volunteers. **Conclusion:** The ratio of circulating CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs in peripheral blood and serum VEGF in advanced laryngeal squamous carcinoma patients are increased, which may be related to the development of tumors.

[**Key words**] laryngeal carcinoma; squamous cell carcinoma; endothelial progenitor cells; VEGF

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 315-319]

自从1997年Asahara等^[1]发现内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)以来,已证明EPCs起源于骨髓,可在一定条件下增殖并迁移至外周血,然后定居于血管形成丰富的部位,分化为成熟的内皮细胞,介导新生血管形成^[2]。血管形成在肿瘤的生长与转移等过程中发挥非常重要的作用。近年研究^[3]表明,EPCs在肿瘤的血管形成中发挥重要作用,肺癌^[4]、肝癌^[5-6]、乳腺癌^[7]、淋巴瘤^[8]等肿瘤患者的外周血中循环EPCs数量明显增加,而且与肿瘤的发生、发展具有一定的相关性。

喉癌是头颈部的恶性肿瘤之一,其中喉鳞癌又是喉癌中最常见的类型,占95%以上^[9]。但是,喉鳞癌患者外周血循环中EPCs水平如何,以及EPCs水平与喉鳞癌的疾病进程的关系如何尚未见报道。因此,本研究通过检测喉鳞癌患者外周血CD45^{low}CD34⁺VEGFR2(KDR)⁺EPCs占CD34⁺造血干细胞或淋巴细胞的比例,以及血清中与EPCs动员相关细胞因子的水平,探讨不同临床分期的喉鳞癌患者外周血中EPCs的水平差异及其临床意义,为深入研究EPCs在喉鳞癌的血管形成及肿瘤转移中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 临床资料及标本

标本来源于中国人民解放军第455医院与复旦大学附属金山医院2010年2月至2011年2月门诊就诊与住院的20例喉鳞癌患者,所有患者均经喉镜下活检病理确诊,采集标本前均未行化疗或放射治疗。其中男18例、女2例,年龄36~79岁,平均(60±13.7)岁。其诊断参照病理组织分型及美国癌症联合会推出的国际喉部肿瘤TNM分期,其中临床I期8例、II~IV期12例(其中II期5例、III期3例、IV期4例)。正常对照组10例,全部为健康志愿者,其中男性8例、女性2例,年龄21~62岁,平均(34±13.70)岁。所有受试者均签署知情同意书,并报伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器

抗人CD45-FITC抗体、抗人CD34-PE抗体及同

型对照抗体购自BD公司,抗人VEGF R2-APC抗体及同型对照抗体购自R&D公司,Griess液购自Fluka公司,高效红细胞裂解液购自Immuno Probe公司,SYBR RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司,人VEGF ELISA试剂盒购自R&D公司。流式细胞仪LSR2购自BD公司,Lightcycler定量PCR仪购自Roche公司,酶标仪购自Bio-Rad公司。

1.3 流式细胞术检测外周血EPCs的水平

每个标本取200 μl肝素钠抗凝血,加入5 ml PBS离心5 min(400×g),弃上清,留50 μl的细胞悬液,加入20 μl CD45-FITC单抗、10 μl CD34-PE单抗和10 μl KDR-APC单抗。同型对照管中加入等量的同型对照抗体。轻弹混匀后于4℃避光孵育30 min,直接向每个标记管内加入1 ml 37℃预温的红细胞裂解液,室温孵育2 min,加入10 ml PBS离心5 min(400×g),弃上清,轻弹混匀后,每管加0.4 ml PBS。然后上流式细胞仪检测,每个标本计数约500 000个淋巴细胞,用BD FACSDiva软件分析CD45^{low}CD34⁺KDR⁺EPCs细胞占SSC^{low}CD45^{low}CD34⁺造血干细胞的比例或占FSC/SSC^{low}淋巴细胞的比例。

1.4 实时定量RT-PCR检测PBMC中KDR mRNA和CD133 mRNA的表达

每个标本取1 ml肝素钠抗凝血,采用Ficoll分离获得单个核细胞,然后加入TRIzol试剂并抽提细胞总RNA。经逆转录成cDNA,然后参照文献^[4]进行定量PCR检测。KDR上游引物为5'-CACCCTCAAACGCTGACATGTA-3',下游引物为5'-GCTCGT-TGGCGCACTCTT-3';CD133上游引物为5'-TGGAT-GCAGAACTTGACAACGT-3',下游引物为5'-ATAC-CTGCTACGACAGTCGTGGT-3';β-actin上游引物为5'-TCTGGCACCACACCTTCTAC-3',下游引物为5'-CTCCTTAATGTACGCACGATTTC-3'。mRNA表达量以各样本的β-actin作为内参照,患者的mRNA相对表达量表示为与健康对照组的相对比值。

1.5 ELISA检测血清中VEGF的水平

取1 ml肝素钠抗凝血离心5 min(400×g),分离血清置于-80℃冰箱保存。按照公司说明书,

ELISA 法检测血清中 VEGF 的水平。

1.6 ELISA 检测血清中 NO 水平

取 1 ml 肝素钠抗凝血离心 5 min(400 × g), 分离血清置于 -80 °C 冰箱保存。NO 检测采用间接检测 NO₂⁻ 盐来反映, 即取 50 μl 血清与 50 μl Griess 液混合, 在 5 min 内于 570 nm 波长读取光密度 D 值, 同时采用不同浓度的 NaNO₂ 标准品检测并绘制标准曲线, 计算各组血清中 NO 水平。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用微软 Excel 软件中的两样本 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 晚期喉鳞癌患者外周血中 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 的水平升高

采用三色荧光直接标记血细胞的方法检测外周血中 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 的比例。先根据

FSC/SSC 圈出淋巴细胞区域, 再根据 CD45^{low/-} 设门分析 CD45^{low} CD34⁺ 造血干细胞中 KDR⁺ 细胞, 即为 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs。图 1 所示结果可以显示, CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 占 CD34⁺ 造血干细胞的比例在 IV 期喉鳞癌患者外周血中显著升高, 明显高于 I 期喉鳞癌患者与健康志愿者。临床 II 期 ~ IV 期的喉鳞癌患者外周血 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 占 CD34⁺ 造血干细胞的比例为 (55.4 ± 11.4)%, 显著高于临床 I 期的喉鳞癌患者的 (19.6 ± 4.1)% 与健康对照组的 (21.0 ± 5.8)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

临床 II 期 ~ IV 期的喉鳞癌患者外周血 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 占 FSC/SSC^{low} 淋巴细胞的比例为 (1.27 ± 0.25)‰, 也显著高于临床 I 期的喉鳞癌患者的 (0.20 ± 0.08)‰ 与健康对照组的 (0.25 ± 0.09)‰, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。临床 I 期喉鳞癌患者外周血 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 的水平与健康对照组相比无明显差异。

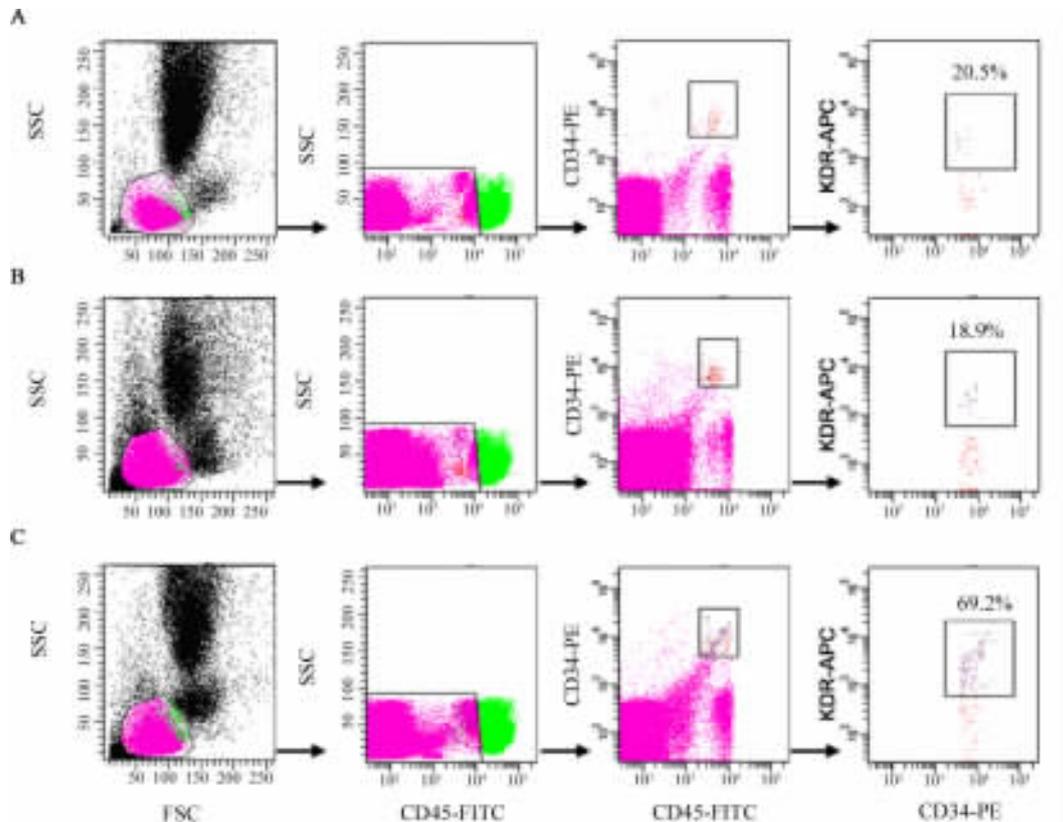


图 1 喉鳞癌患者与健康志愿者外周血 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 的比例

Fig. 1 Ratio of CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs in peripheral blood of laryngeal squamous carcinoma patients and healthy volunteers

A: Healthy control; B: I phase cancer; C: IV phase cancer

2.2 晚期喉鳞癌患者 PBMC 中 KDR mRNA 与 CD133 mRNA 表达水平升高

由于 CD133 也是 EPCs 的一个重要表面标志^[10], 因此本实验采用实时定量 PCR 检测 EPCs 相关标志 KDR 与 CD133 的表达情况。结果(图 2)表明, 与健康对照组相比, 临床 II 期 ~ IV 期的喉鳞癌患者 PBMC 中 KDR mRNA 与 CD133 mRNA 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 而临床 I 期的喉鳞癌患者 PBMC 中 KDR mRNA 与 CD133 mRNA 的表达水平与健康对照组相比无差异 ($P > 0.05$)。

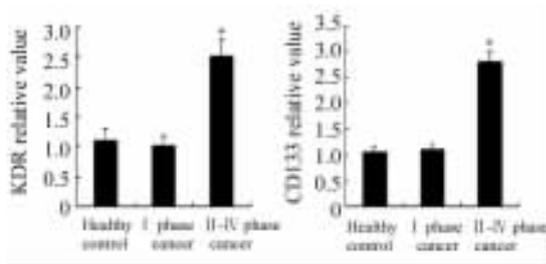


图 2 喉鳞癌患者与健康志愿者 PBMC 中 KDR mRNA 与 CD133 mRNA 的表达

Fig. 2 Expressions of KDR mRNA and CD133 mRNA in PBMC of laryngeal squamous carcinoma patients and healthy volunteers

* $P < 0.05$ vs healthy control

2.3 晚期喉鳞癌患者血清中 VEGF 的水平升高

由于骨髓 EPCs 动员至外周血依赖于 VEGF、NO 等因子的作用, 因此本实验检测喉鳞癌患者血清中 VEGF 与 NO 的水平。结果表明, 与健康对照组相比, 临床 II 期 ~ IV 期的喉鳞癌患者血清中 VEGF 的水平明显升高 ($P < 0.05$), NO 水平没有明显差异(图 3)。而临床 I 期的喉鳞癌患者血清中 VEGF 与 NO 的水平与健康对照组相比均无差异 ($P > 0.05$)。

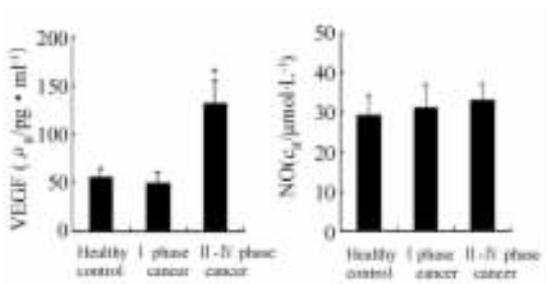


图 3 喉鳞癌患者与健康志愿者血清中 VEGF 与 NO 的水平

Fig. 3 Levels of VEGF and NO in plasma of laryngeal squamous carcinoma patients and healthy volunteers

* $P < 0.05$ vs healthy control

3 讨论

喉癌是好发于男性的头颈部恶性肿瘤, 近年来在我国的发病率不断上升。喉癌在病理类型上最常见的是鳞状细胞癌, 占 95% 以上。喉癌临近转移的部位是颈部淋巴结, 喉癌远处转移的器官主要是肺脏、骨与肝脏。目前关于喉癌的发病机制仍不清楚, 喉癌最常见的危险因素是过度吸烟、饮酒、环境污染、胃食管与胆汁返流、人乳头状病毒感染等^[9]。新生血管形成在组织器官的损伤修复中发挥重要作用, 在肿瘤的生长及转移过程中也发挥了关键的作用。肿瘤组织内的血管形成为肿瘤的生长提供必需的营养成分, 肿瘤细胞可以通过穿过血管进入循环从而为肿瘤的转移提供便利, 而且在转移部位的新生血管形成更为肿瘤在新的部位的生长创造条件。

1997 年 Asahara 等^[1]首次报道了 EPCs 的存在, EPCs 可分化为成熟的内皮细胞, 促进血管的新生。近年来人们对 EPCs 展开了广泛而深入的研究。EPCs 的被广泛认可的表型特征主要为 CD34⁺ CD133⁺ KDR⁺^[11-12]。EPCs 来源于骨髓, 可在一定条件下从骨髓动员至外周血, 定居于需要血管新生的部位并分化为成熟内皮细胞, 从而在成体的血管新生过程中发挥重要的作用^[2]。在心肌缺血和梗死、肢体缺血、动脉粥样硬化、创伤修复、血管内皮损伤修复、类风湿性疾病、肿瘤等各种病理条件下, EPCs 可通过分化为内皮细胞并参与新生血管形成^[2, 13-15]。研究^[3]发现, EPCs 在肿瘤新生血管形成中发挥关键作用, 肿瘤患者外周血或肿瘤组织中的 EPCs 的水平明显升高, 而且与肿瘤的疾病进程存在一定的关系。Dome 等^[4]发现, 非小细胞肺癌患者外周血循环的 EPCs 水平在治疗前明显高于健康对照组, 高水平的 EPCs 与患者总体生存呈负相关, 提示 EPCs 水平与非小细胞肺癌临床预后存在相关性。Ho 等^[5]采用克隆形成实验发现, 肝细胞癌患者的外周血循环 EPCs 水平明显高于肝硬化患者与健康对照组, 而且 EPCs 水平与血清中甲胎蛋白和 VEGF 水平呈正相关, 不可手术切除肝癌患者的 EPCs 水平比可手术切除肝癌患者更高, 提示 EPCs 水平可作为肝细胞癌的一个预后判断指标。Yu 等^[6]也发现, 肝细胞癌患者外周血循环 EPCs 的数量明显高于健康对照组。Igreja 等^[8]采用流式细胞术检测发现, 非霍奇金淋巴瘤患者外周血循环与肿瘤组织中的 EPCs 水平明显高于健康对照组; 而且年轻患者比年长患者的 EPCs 水平更高; 治疗有效

的患者在治疗后 EPCs 水平下降,而治疗无效或部分有效的患者 EPCs 的水平没有变化或继续升高,提示 EPCs 的水平与临床治疗的效果有一定的相关性。

本研究发现,喉鳞癌患者外周血中 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 的水平明显升高, PBMC 中 KDR mRNA 与 CD133 mRNA 表达水平也明显升高;而且与喉鳞癌的进程具有一定的相关性,即与健康志愿者相比,临床 I 期喉鳞癌患者的 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 水平没有明显的变化,但是临床 II 期及以上喉鳞癌患者外周血的 CD45^{low} CD34⁺ KDR⁺ EPCs 水平显著升高,提示临床晚期的喉鳞癌患者中的 EPCs 升高可能通过促进肿瘤的新生血管形成,从而促进肿瘤的生长或转移。囿于样本量的限制,在本研究中未能进一步细化分层研究 EPCs 水平与肿瘤部位、颈部淋巴结转移及远处转移的关系,尽管如此,本研究结果对下一步相关研究具有重要的提示意义。

在肿瘤患者中,骨髓 EPCs 如何动员至外周血,并迁移至肿瘤部位,促进新生血管形成一直是一个研究热点,目前仍不完全清楚。研究^[2,16-19]表明,肿瘤细胞可能通过分泌 VEGF、NO、促红细胞生成素(EPO)、胎盘生长因子或趋化因子 SDF-1 α 等促进 EPCs 从骨髓动员至外周血。本实验发现,临床 II 期及以上喉鳞癌患者血清中 VEGF 的水平明显升高,而 NO 的水平没有明显变化,提示喉鳞癌细胞可能通过分泌 VEGF 来促进 EPCs 的动员。

喉鳞癌患者外周血中 EPCs 水平的监控可能对于喉鳞癌的疾病进程确定、预后判断与治疗评价具有重要的指导意义。EPCs 水平升高提示喉鳞癌的疾病进程可能属于晚期,在治疗过程中可通过检测 EPCs 的水平来反映治疗的效果。因此本研究对于喉鳞癌的诊断与治疗具有一定的指导意义,也为将来研究 EPCs 在喉鳞癌的新生血管形成及肿瘤转移中的作用奠定基础。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [2] Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells [J]. *Annu Rev Med*, 2005, 56: 79-101.
- [3] Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, et al. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: Towards marker and target identification [J]. *Nature Rev Cancer*, 2006, 6(11): 835-845.
- [4] Dome B, Timmr J, Dobos J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(14): 7341-7347.
- [5] Ho JW, Pang RW, Lau C, et al. Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2006, 44(4): 836-843.
- [6] Yu D, Sun X, Qiu Y, et al. Identification and clinical significance of mobilized endothelial progenitor cells in tumor vasculogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(13): 3814-3824.
- [7] Furstenberger G, von Moos R, Lucas R, et al. Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(4): 524-531.
- [8] Igreja C, Coufinha M, Cachaco AS, et al. Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients [J]. *Haeinologica*, 2007, 92(4): 469-477.
- [9] Marioni G, Marchese-Ragona R, Cartei G, et al. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2006, 32(7): 504-515.
- [10] Peichev M, NaiyerAJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors [J]. *Blood*, 2000, 95(3): 952-958.
- [11] Sen S, McDonald SP, Coates PT, et al. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease [J]. *Clinical Science*, 2011, 120(17): 263-283.
- [12] Timmermans F, Plum J, Yöder MC, et al. Endothelial progenitor cells: Identity defined [J]? *J Cell Mol Med*, 2009, 13(1): 87-102.
- [13] Zambelli A, Porta MD, Rosti V. From cancer patients to cancer survivors: The issue of cardioncology-A biological perspective [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(4): 697-702.
- [14] Calzi SL, Neu MB, Shaw LC, et al. EPCs and pathological angiogenesis: When good cells go bad [J]. *Microvasc Res*, 2010, 79(3): 207-216.
- [15] Westerweel PE, Verhaar MC. Endothelial progenitor cell dysfunction in rheumatic disease [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2009, 5(6): 332-340.
- [16] 厉倩, 谭龙益. 循环内皮祖细胞及其与肿瘤关系的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(6): 591-593.
- [17] Aghi M, Cohen KS, Klein RJ, et al. Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(18): 9054-9064.
- [18] Debatin KM, Wei J, Beltinger C. Endothelial progenitor cells for cancer gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(10): 780-786.
- [19] Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization [J]. *Blood*, 2003, 102(4): 1340-1346.

[收稿日期] 2011-03-12

[修回日期] 2011-05-10

[本文编辑] 王莹