

## 急性白血病患者外周血中 CECs、VEGF-C、VEGFR-2 的变化及其临床意义

何文娴<sup>1)</sup>, 申政磊<sup>2)</sup>, 沈秀芬<sup>1)</sup>, 耿丛丛<sup>1)</sup>, 夏梅花<sup>1)</sup>, 尹列芬<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学第二附属医院血液科, 云南昆明 650101; 2) 云南省肿瘤医院血液科, 云南昆明 650118)

**[摘要]** **目的** 探讨循环内皮细胞 (CECs) 在急性白血病 (AL) 患者外周血中的数量变化及血清中血管内皮生长因子 -C (VEGF-C) 及其受体 2 (VEGFR-2) 水平的变化及其临床意义. **方法** 采用流式细胞仪 (FCM) 检测 66 例 AL 患者 CECs 的相对计数. 采用 ELISA 的方法检测 66 例患者血清中 VEGF-C、VEGFR-2 的水平, 并动态观察 43 例 AL 患者治疗前后的变化. **结果** (1) AL 患者初治组、CR 组、NR 组 CECs 外周血相对计数较对照组明显增高 ( $P < 0.05$ ); CR 组 CECs 相对计数较 NR 组明显减低 ( $P < 0.05$ ); (2) AL 患者初治组血清 VEGF-C 及 VEGFR-2 水平较对照组升高, 2 组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 治疗后患者血清 VEGF-C 及 VEGFR-2 水平较治疗前降低, 2 组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ). **结论** AL 患者初治组外周血中 CECs 相对计数明显增高, 治疗后 CR 组较 NR 组相对计数减降低; AL 患者初治组血清中 VEGF-C、VEGFR-2 水平显著增高. CECs、VEGF-C、VEGFR-2 其水平可能与 AL 患者病情发展、疗效及预后有一定关系.

**[关键词]** 急性白血病; 循环内皮细胞; VEGF-C; VEGFR-2

**[中图分类号]** R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0050-04

## The Change and Significance of CECs, VEGF-C, VEGFR-2, 3 in Peripheral Blood of Patients with Acute Leukemia

HE Wen-xian<sup>1)</sup>, SHEN Zheng-lei<sup>2)</sup>, SHEN Xiu-fen<sup>1)</sup>, GENG Cong-cong<sup>1)</sup>, XIA Mei-hua<sup>1)</sup>, YIN Lie-fen<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Haematology, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Hematology, The Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650118, China.)

**[Abstract]** **Objectives** To explore the change and clinical significance of circulating endothelial cells (CECs) in the peripheral vascular as well as ascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and its receptor (VEGFR-2 2, 3, 3) in patients' serum with acute leukemia. **Methods** We detected the percentage of CECs in 66 cases of acute leukemua patients using flow cytometry (FCM) and the level of VEGF-C and VEGFR-2 in serum from 66 acute leukemua patients by ELISA. And dynamic observation of 43 patients with AL changes before and after treatment. **Results** 1. The comparative counting of CECs in the peripheral blood of AL patients at the time of diagnosis as well as CR group and NR group were significantly higher than control group ( $P < 0.05$ ). The comparative counting of CECs of in the peripheral blood of CR group were decreased than NR group ( $P < 0.05$ ). 2. The levels of VEGF-C and VEGFR-2 of AL patients at the time of diagnosis were significantly higher than control group ( $P < 0.05$ ), there was a significant difference between the two groups ( $P < 0.01$ ). Patients' serum levels of VEGF-C and VEGFR-2 were reduced after treatment, and there was a significant difference between the two

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81241122,81360089);云南省科技厅应用基础研究基金资助项目(2008CD121)

**[作者简介]** 何文娴 (1981~), 女, 云南永胜县人, 在读硕士研究生, 主治医师, 主要从事血液肿瘤学临床工作.

**[通讯作者]** 尹列芬. E-mail:ylyfynkm@126.com

groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** In patients with acute leukemia, comparative counting of the CECs is increased significantly in the peripheral blood. Comparative counting of CR group is decreased, as compared with that of NR group after treatment. The levels of VEGF-C, VEGFR-2 related to the growth regulation of CECs are significantly higher than those of control group. There is a certain relationship between progression of disease, curative effect and prognosis and the levels of CECs, VEGF-C and VEGFR-2 in patients with acute leukemia.

[**Key words**] Acute leukemia; Circulating endothelial cells; Vascular endothelial growth factor-C; Vascular endothelia growth factor receptor-2

急性白血病 (acute leukemia, AL) 是造血系统恶性克隆性疾病, 严重威胁人类健康和生命, 5 a 无病生存率仅 30% ~ 60%。目前研究多集中在对白血病细胞恶性转化机制方面, 越来越多的学者希望通过改变白血病细胞赖以生存的造血微环境来提高治愈率及延长患者的长期生存率。新生血管的形成, 在许多实体瘤以及血液系统恶性肿瘤的发病过程中起着非常重要的作用<sup>[1,2]</sup>。而循环内皮细胞 (circulating endothelial cells, CECs)、血管内皮生长因子-C (VEGF-C) (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 及其受体-2 (vascular endothelia growth factor receptor-2, VEGFR-2) 与实体瘤血管新生有密切关系。有关 CECs 在白血病血管新生中的研究甚少。本研究检测 AL 患者外周血中 CECs 的相对计数及血清中 VEGF-C、VEGFR-2 水平的变化, 初步探讨 CECs、VEGF-C、VEGFR-2 在 AL 中的临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

**1.1.1 病例采集** 选取 2009 年 1 月至 2011 年 7 月昆明医科大学第二附属医院血液科住院 66 例急性白血病患者为研究对象, 其中 43 例接受治疗并观察其治疗后的各项指标, 男 23 例, 女 20 例, 中位年龄 42 岁 (19 ~ 68) 岁, 按 MICM 诊断, 符合《血液病诊断及疗效标准》<sup>[3]</sup>。AML 共 25 例, 其中 M<sub>0</sub> 2 例, M<sub>2</sub> 9 例, M<sub>3</sub> 5 例, M<sub>4</sub> 3 例, M<sub>5</sub> 2 例, M<sub>6</sub> 2 例, 双表型 2 例, ALL 共 18 例。其中完全缓解 (complete remission, CR) 组 28 例, 未缓解 (no remission, NR) 组 15 例。选取良性血液病 10 例做对照组 (特发性血小板减少性紫癜 2 例、缺铁性贫血 5 例、巨幼细胞性贫血 3 例), 中位年龄 32 岁 (15 ~ 66 岁)。

**1.1.2 化疗方案** AML 患者采用 DA (柔红霉素 + 阿糖胞苷) 或 HA (高三尖杉酯碱 + 阿糖胞苷) 方案治疗, M<sub>3</sub> 患者首选维甲酸, 急性白血病双表型采用 VDAC 方案 (长春新碱 + 柔红霉素 + 阿糖胞

苷 + 强的松); 部分 AML 患者采用 CAG (小剂量阿糖胞苷 + 阿克拉霉素 + G-CSF) 方案治疗。ALL 患者采用 VDLP (长春新碱 + 柔红霉素 + 左旋门冬酰胺酶 + 泼尼松) 或 VDCP (长春新碱 + 柔红霉素 + 环磷酰胺 + 醋酸泼尼松) 方案治疗。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 流式细胞检测方法** CECs 细胞表面标志: CD45 CD31<sup>+</sup> (CD31+2FITC 及同型对照、CD45 ~ 2Cy5 购自美国 Beckman Coulter 公司)。采用荧光抗体标记流式细胞仪 (Beckman Coulter Cytomics FC 500 MPL 流式细胞仪) 检测。取患者骨髓及空腹外周血各 2 mL 存于 EDTA 管, 用 PBS 对倍稀释, Ficoll 分离, 1 500 r/min 离心 20 min, PBS 洗涤 2 次。将细胞加入 96 孔板中, 每孔  $5 \times 10^5$ , 加入抗体 5  $\mu$ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 ~ 60 min, 用 PBS 洗涤标本 2 次, 100  $\mu$ L 的 1% 多聚甲醛固定, 流式细胞仪检测。

**1.2.2 ELISA 的方法** 全部病例在化疗前和完成 1 ~ 2 个疗程标准剂量的诱导化疗后 2 周 EDTA 管留取外周血 3 mL, 缓解病例于缓解期留取标本, 收集对照组标本; 取患者及对照组空腹静脉血 3 mL, 低速离心 (1500 r/min) 5 min 后, 分离血清, 于 -80 $^{\circ}$ C 冻存待测。采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法 (ELISA), VEGF-C、VEGFR-2 酶联免疫分析试剂盒购于美国 R&D 公司, 血清标本经室温融化后, 操作按说明书进行, 用酶联免疫检测仪, 在 450 nm 处测吸光度 (OD) 值, 通过绘制标准曲线求出线性回归方程, 经计算可得出标本中 VEGF-C、VEGFR-2 浓度再乘以稀释倍数, 得出的数值为样品的实际浓度 (pg/mL)。

### 1.3 统计学分析

流式细胞仪检测得出 CECs 相对计数, CECs 以均数  $\pm$  标准差表示; 采用 SPSS 统计软件进行  $t$  检验。VEGF-C、VEGFR-2 样品实际浓度以均数  $\pm$  标准差表示, 在患者组与对照组之间, 使用  $t$  检验。

AL 患者初治组、完全缓解组、未缓解组之间采用方差分析, 使用 SNK (Student Newman Keuls) 法进行两两之间的比较; 统计软件包采用 SPSS。

数据用  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 两均数比较采用 t 检验, 使用统计软件 SPSS 软件包对实验数据进行统计学处理.

## 2 结果

43 例接受治疗并观察治疗后的 CECs, VEGF-C、VEGFR-2 的变化. 将 43 例 AL 患者分为初治组、完全缓解 (CR) 组、未缓解 (NR) 组与对照组进行比较

### 2.1 CECs 相对计数的检测

AL 患者 CECs 流式细胞术检测结果见图 1.

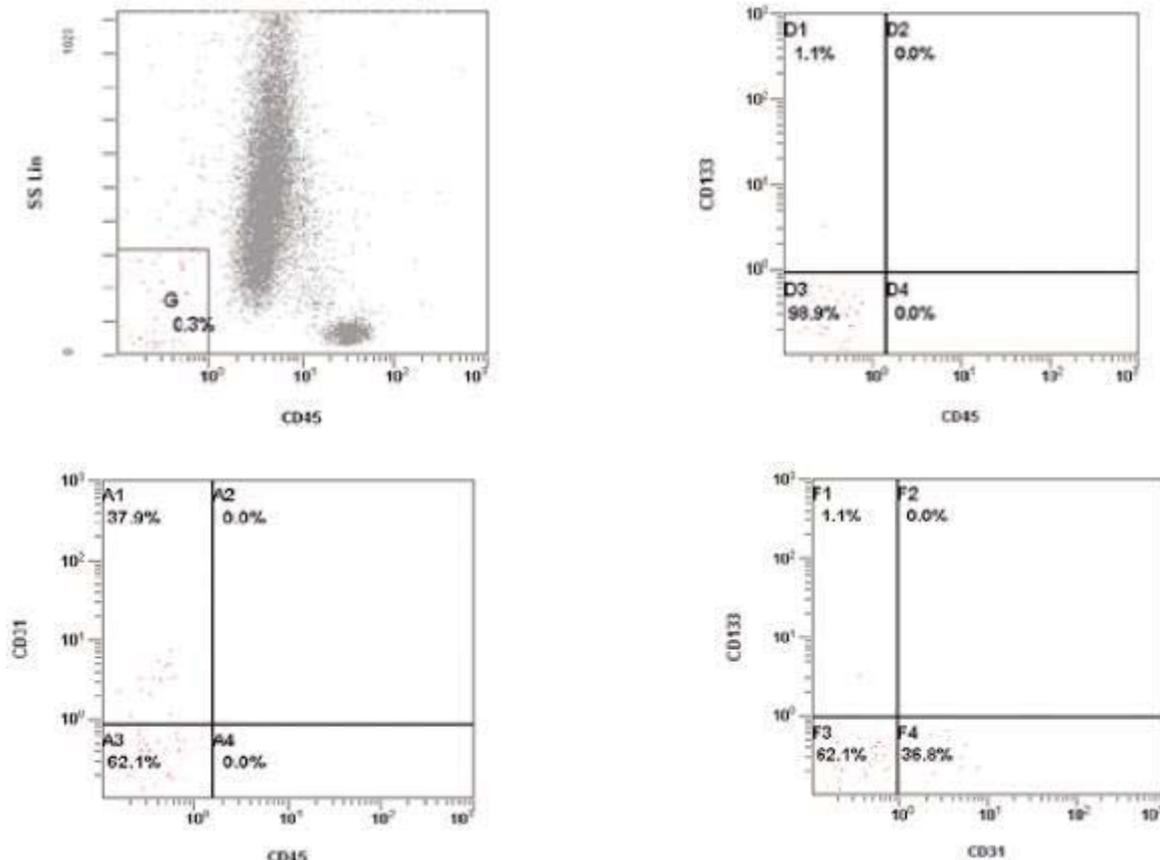


图 1 AL 患者外周血 CECs 流式细胞仪检测结果

Fig. 1 The test results of peripheral blood CECs in AL patients by flow cytometry

### 2.2 AL 患者初治组、CR 组、NR 组与对照组外周血中 CECs 相对计数的比较

AL 患者初治组、CR 组、NR 组外周血中相对计数较对照组明显增高,  $P < 0.05$ ; CR 组 CECs 相对计数较 NR 组明显减低 ( $P < 0.05$ ), 见表 1.

### 2.3 AL 患者血清中 VEGF-C、VEGFR-2 水平的变化

AL 患者血清中 VEGF-C、VEGFR-2 水平较对照组明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); AL 患者治疗后 VEGF-C、VEGFR-2 水平缓解组低于未缓解组, 缓解组与未缓解组 2 组差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 2.

表 1 AL 患者初治组、CR 组、NR 组与对照组外周血中 CECs 相对计数的比较 [ $\%$ ,  $(\bar{x} \pm s)$ ]

Tab. 1 Comparison of peripheral blood CECs between first treatment group, CR group, NR group and control group [ $\%$ ,  $(\bar{x} \pm s)$ ]

组别	n	CECs 相对计数 (%)
初治组	43	$0.019 \pm 0.129^*$
CR 组	28	$0.005 \pm 0.022^{*\Delta}$
NR 组	15	$0.020 \pm 0.130^{\Delta}$
对照组	10	$0.003 \pm 0.012$

与对照组比较,  $*P < 0.05$ ; 与 NR 组比较,  $\Delta P < 0.05$ .

表 2 AL 患者初治组与对照组 VEGF-C、VEGFR-2 水平的比较 [%,( $\bar{x} \pm s$ )]Tab. 2 Comparison of peripheral blood VEGF-C and VEGFR-2 levels between first treatment group and control group [%,( $\bar{x} \pm s$ )]

组 别	n	VEGF-C 浓度 (pg/mL)	VEGFR-2 浓度 (pg/mL)
初治组	43	2.8922E2 ± 77.11323**	7.9646E2 ± 129.04400**
CR	28	179.30 ± 67.94 <sup>△△</sup>	497.27 ± 112.36**
NR	15	267.22 ± 85.61	779.16 ± 109.98
对照组	10	1.8630E2 ± 71.74327	5.1447E2 ± 108.86364

与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 NR 组比较, <sup>△△</sup> $P < 0.01$ .

### 3 讨论

内皮细胞微环境是主要的骨髓微环境, 对干细胞的调控有主要的作用, 而急性髓细胞白血病是一种常见的干细胞分化异常的白血病, 疾病状态下的内皮细胞微环境对白血病细胞的增殖和发展有促进作用, 在 AML 患者中, 内皮细胞对白血病细胞起到保护作用, 而白血病细胞促进了骨髓的血管新生<sup>[1]</sup>. 血管内皮生长因子 (vascularendothelial growth factor, VEGF) 是主要作用于血管内皮细胞的一种细胞因子, 具有促进内皮细胞增殖、分化, 增加微血管通透性及诱导血管生成等功能<sup>[2]</sup>. VEGF 在调节肿瘤血管生成中是一种主要因素, 它作为一种低氧因子可以促进血管新生, 它在表达 VEGFR-2 的患者体内可通过自分泌或旁分泌发挥作用<sup>[3]</sup>.

研究发现, CECs 数量在淋巴瘤、黑色素瘤和神经胶质瘤患者以及乳腺、结肠、胃、食管、肾、卵巢、睾丸、前列腺和头颈部癌症患者中均有不同程度增高<sup>[5,6]</sup>. 万振洲等<sup>[7]</sup>用流式细胞术检测 80 例肿瘤患者外周血中 CECs 的数量, 肿瘤组较正常对照组 CECs 数量显著升高, 肿瘤缓解组 CECs 数量显著低于未缓解组. Zhang<sup>[8]</sup>等人在多发性骨髓瘤中也证实 CECs 数量增加. 本研究发现 AL 患者外周血中 CECs 相对计数较对照组明显升高, 化疗后 CR 组外周血中 CECs 相对计数较治疗前降低, 与上述作者检测非白血病的其他肿瘤患者外周血中 CECs 的变化是一致的, 提示 CECs 对白血病的发展有重要作用, 其检测对判断 AL 疗效有一定的作用.

Zhang 等<sup>[9]</sup>对 CECs 和 AML 之间的相互作用进行研究, 发现初治的 AML 患者 VEGF、VEGFR2 表达均增高. 刘芳等<sup>[10]</sup>应用酶联免疫吸附测定的方法检测 86 例初治淋巴瘤患者血浆中 VEGF-C、VEGFR2 的表达水平结果表明, 多因素分析结果显示, VEGF-C 在非霍奇金淋巴瘤患者中呈低表达水平, 而在霍奇金淋巴瘤患者中表达水平较高; 在年龄 > 60 岁淋巴瘤患者中表达较高; 本研究对 AL 患者血清 VEGF-C、VEGFR2 含量进行测定, 发现在初治的 AL 患者血清 VEGF-C、VEGFR2 含量都较对照组明显升高, 与 Zhang 等报道一致, 化疗后 CR 组血清 VEGF-C、VEGFR2 含量明显下降, 提

示 VEGF-C、VEGFR-2 在白血病发病中有重要血管新生在白血病的发生和疗效有着密切的关系, 其检测对判断 AL 疗效有一定的作用.

本研究的结果也为急性白血病抗血管新生治疗提供可能的实验依据, CECs、VEGF-C、VEGFR-2 可能成为抗白血病血管生成治疗新的靶点, 因此, 希望通过研究白血病患者内皮细胞微环境, 进一步提高白血病的疗效, 延长白血病患者的生存期.

### [参考文献]

- [1] HUSSONG J W, RODGERS G M, SHAMI P J. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2000, 95:309 - 313.
- [2] YANCOPOULOS G D, DAVIS S, GALE N W, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation[J]. Nature, 2000, 407:242 - 248.
- [3] 张之南, 沈悝. 血液病治疗及疗效标准[M]. 北京: 科学技术出版社, 1998: 168 - 178.
- [4] PADRO T, BICKER R, RUIZ S, et al. Overexpression of vascular endothelial growth (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 2002, 16:1 302 - 1 310.
- [5] BERTOLINI F, MANCUSO P, SHAKED Y. Circulating endothelial cells as biomarkers for patients receiving bevacizumab[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(3):217 - 218.
- [6] STRIJBOS M H, GRATAMA J W, KRAAN J, et al. Circulating endothelial cells in ontology: pitfalls and promises[J]. Br J Cancer, 2008, 98(11):1 731 - 1 735.
- [7] 万振洲, 叶军. 肿瘤患者外周血循环内皮细胞数量变化的初步研究[J]. 中国微循环, 2009, 13(4):284 - 286.
- [8] ZHANG H, VAKIL V, BRAUNSTEIN M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance[J]. Blood, 2005, 105(8):3 286 - 3 294.
- [9] ZHANG J, YE J, MA D, et al. Cross-talk between leukemia and endothelial cells promotes angiogenesis by VEGF activation of the Notch/Dll4 pathway [J]. Carcinogenesis, 2013, 34:667 - 677.
- [10] 刘芳, 宋玉琴, 张晨, 等. 初治淋巴瘤患者血浆中 VEGF-C VEGF-D VEGFR-2 及 VEGFR-3 的表达水平及临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(5): 1 184 - 1 188.

(2014 - 05 - 10 收稿)