

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.08.016

I 期非小细胞肺癌组织血管内皮生长因子 C、细胞角蛋白 19 表达与患者预后的相关性 *

何 刚 王洪斌[△] 刘海林 杨忠杰 姜志标 熊佳时

(上海交通大学附属第六人民医院南院(奉贤区中心医院) 上海 201499)

摘要 目的:分析 I 期非小细胞肺癌(NSCLC)组织血管内皮生长因子 C(VEGF-C)、细胞角蛋白 19(CK19)水平的变化,并探讨其与患者预后的相关性。**方法:**采用免疫组化检测肺癌组织中 VEGF-C、CK19 蛋白的表达,分析其与肺癌患者临床病理特点的相关性。随访至少 3 年,采用 Kaplan-Meier 法分析不同 VEGF-C、CK19 蛋白表达患者术后复发及疾病进展时间的差异。**结果:**VEGF-C 和 CK19 在不同分化程度、胸膜侵犯患者肺癌组织中的表达比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。VEGF-C 表达与 CK19 表达呈显著正相关($r=0.483, P<0.05$)。术后 3 年,VEGF-C 和 CK19 阳性患者复发率均显著高于 VEGF-C 和 CK19 阴性患者($\chi^2=14.16, 17.25, P<0.05$)。Kaplan-Meier 法显示 VEGF-C 阳性、阴性者中位 TTP 分别为 29.2 个月(95%CI: 27.5~30.9)、36.2 个月(95%CI:35.0~37.5); CK19 阳性、阴性者中位 TTP 分别为 28.4 个月(95%CI: 26.6~30.2)、37.8 个月(95%CI:36.4~39.1)。VEGF-C、CK19 阴性者与阳性者的中位 TTP 比较差异有统计学意义($\chi^2=15.77, 18.45, P<0.05$)。**结论:**I 期 NSCLC 患者肺癌组织 VEGF-C、CK19 呈高表达,与术后局部复发密切相关,并可作为患者预后评估的参考指标。

关键词: I 期非小细胞肺癌;血管内皮生长因子 C;细胞角蛋白 19;预后

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)08-1471-05

Correlation of the Level of Vascular Endothelial Growth Factor C, Cytokeratin 19 with the Prognosis of Patients with Non-small Cell lung Cancer of Stage I*

HE Gang, WANG Hong-bin[△], LIU Hai-lin, YANG Zhong-jie, JIANG Zhi-biao, XIONG Jia-shi

(South Hospital of the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University

(Fengxian District Central Hospital), Shanghai, 201499, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the changes in the level of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), cytokeratin 19 (CK19) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) of stage I, and investigate its correlation with the prognosis of postoperative patients. **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the expression level of VEGF-C, CK19 protein in lung cancer tissue, and its correlation with the clinicopathological characteristics of lung cancer patients was analyzed. All the patients were followed for at least 3 years, Kaplan-Meier was used to analyze the difference of postoperative recurrence and time to progress (TTP) between different levels of VEGF-C, CK19 protein expression. **Results:** There were significant differences in the expression of VEGF-C and CK19 between the lung cancer tissues with different degrees of differentiation and pleural invasion($P<0.05$). The expression of VEGF-C and CK19 showed a significant positive correlation ($r=0.483, P<0.05$). Three years after surgery, the recurrence rates of patients with VEGF-C and CK19 positive expression were significantly higher than those of patients with VEGF-C and CK19 negative expression ($\chi^2=14.16, 17.25, P<0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the median TTP in positive and negative VEGF-C expression group were 29.2 months (95%CI: 27.5~30.9), 36.2 months (95%CI:35.0~37.5). The median TTP in positive and negative CK19 expression group were 28.4 months (95%CI: 26.6~30.2), 37.8 months (95%CI:36.4~39.1). There were significant difference on the median TTP between positive and negative VEGF-C and CK19 expression ($P<0.05$). **Conclusions:** The expression of VEGF-C and CK19 in the lung cancer tissue of NSCLC patients of stage I were upregulated and closely related to the postoperative local recurrence, it can be used as a reference index for the prognostic evaluation.

Key words: Non-small cell lung cancer of stage I; Vascular endothelial growth factor C; Cytokeratin 19; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)08-1471-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81600219);上海市奉贤区科学技术委员会基金项目(21041302)

作者简介:何刚(1979-),男,硕士,主治医师,研究方向:胸部肿瘤,胸外伤诊治,E-mail: 18901927772@163.com

[△] 通讯作者:王洪斌(1964-),男,博士,主任医师,研究方向:胸部肿瘤,心脏先天畸形病等诊治,电话:021-57421691

(收稿日期:2018-09-20 接受日期:2018-10-15)

前言

外科手术切除是 I 期非小细胞肺癌(NSCLC)患者首选且最有效的治疗手段,其预后相对较好,术后 5 年生存率可达 75%以上,但仍有 20%的患者出现术后复发,甚至死亡^[1,2]。临床分期是评估 NSCLC 预后的重要参考指标,但影响 NSCLC 预后的因素复杂多样,且当患者存在隐匿性微转移灶(OMs),常规检查无法检出,会导致临床分期被低估^[3]。肺癌肿瘤标志物以无创、简便、敏感等优势已逐渐广泛应用于临床,但单项检测对肺癌的诊断缺乏足够的敏感性与特异性,故筛选合理有效的肿瘤标志物进行联合检测尤为关键^[4-8]。本研究回顾性分析了 I 期 NSCLC 患者血管内皮生长因子 (VEGF-C)、细胞角蛋白 19(CK19)表达水平的变化,旨在探讨其与术后患者预后的相关性,为肺癌的综合治疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2012 年 1 月~2015 年 6 月上海市奉贤区中心医院肿瘤科、心胸外科收治的 I 期 NSCLC 患者 480 例的病历资料进行回顾性分析。入组标准:①行根治性手术切除,并经第七版国际抗癌联盟标准分期为 I 期 NSCLC;②年龄≤80 岁,随访资料完整,未接受放疗、化疗及抗肿瘤相关治疗;③排除术前存在转移病灶、术后合并严重并发症、心肝肾等严重功能障碍或全身状况较差者。其中,男 287 例,女 193 例,年龄 44~79 岁(51.5±5.8)岁。病理类型:鳞癌 206 例,腺癌 147 例,腺鳞癌 127 例;病理分期: I a 期 215 例, I b 期 265 例;分化程度:高分化 186 例,中分化 120 例,低分化 174 例。

1.2 免疫组化染色

将肺癌病灶组织标本通过固定、保存、石蜡包埋、切片等制

作成厚度为 4 μm 的连续组织切片,采用免疫组化 S-P 三步法染色。VEGF-C 兔抗人单克隆抗体购自福州迈新生物技术开发公司,CK19 鼠抗人单克隆抗体购自晶美生物工程有限公司。阳性对照采用已知阳性切片,阴性对照采用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。

1.3 判定标准

采用半定量计分方法^[9]判定 VEGF-C、CK19 蛋白表达,染色强度:0 分:基本不着色;1 分:着淡黄色;2 分:着色适中;3 分:着深黄色;着色阳性细胞比例:0 分:比例≤5%;1 分:6%~25%;2 分:26%~50%;3 分:≥50%。将切片的染色程度得分×着色阳性细胞比例得分,总分≥2 分为阳性,否则为阴性。

1.4 术后随访

患者术后出院后采用门诊复查、电话等方式追踪随访,记录患者局部复发等预后转归情况。随访时间从手术之日起计算,截至 2018 年 6 月。以手术之日至出现局部复发之间的时间作为疾病进展时间(TTP)。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析。计数资料以例数或百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Spearman 秩相关分析,采用 Kaplan-Meier 生存分析法分析 VEGF-C 和 CK19 的表达与 TTP 的相关性,采用 Log-rank 检验进行差异性分析,以 $P<0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌组织中 VEGF-C 和 CK19 的表达与病理特点的相关性

分化程度越高,胸膜侵犯患者肺癌组织中 VEGF-C 和 CK19 的表达明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);不同年龄、性别、病理类型、肿瘤直径肺癌组织中 VEGF-C 和 CK19 表达比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 肺组织中 VEGF-C 和 CK19 的表达与病理特点的相关性(例)

Table 1 Correlation of the expression of CK19 and VEGF-C with the pathological characteristics of lung cancer tissue(n)

Indicator	N	VEGF-C expression				CK19 expression			
		Negative	Positive	χ^2	P	Negative	Positive	χ^2	P
Age(year)									
≥ 60	207	126	81	0.23	0.365	135	72	0.03	0.870
<60	273	172	101			180	93		
Gender									
Male	287	217	70	0.40	0.529	187	100	0.07	0.792
Female	193	141	52			128	65		
Pathological type									
squamous cell carcinoma	206	125	81	1.75	0.418	135	71	0.83	0.660
adenocarcinoma	147	88	59			93	54		
adeno-squamous carcinoma	127	85	42			87	40		
Grade of Differentiation									
High differentiated	186	134	52	13.36	0.001	135	51	16.31	<0.001
Moderate differentiated	120	70	50			86	34		
Low differentiated	174	94	80			94	80		

表 1 肺组织中 VEGF-C 和 CK19 的表达与病理特点的相关性(例)(续表)

Table 1 Correlation of the expression of CK19 and VEGF-C with the pathological characteristics of lung cancer tissue(n)

Indicator	N	VEGF-C expression				CK19 expression			
		Negative	Positive	χ^2	P	Negative	Positive	χ^2	P
Diameter of tumor									
≥ 3cm	165	105	60	0.26	0.612	104	61	0.75	0.386
<3cm	315	193	122			211	104		
Invasion of pleura									
Yes	74	55	19	5.57	0.018	59	15	7.72	0.006
No	406	243	163			256	150		

2.2 肺癌组织中 VEGF-C 与 CK19 表达的相关性分析

系,相关系数 $r=0.483(P<0.05)$,见表 2。

肺癌组织中 VEGF-C 表达与 CK19 表达呈显著正相关

表 2 肺癌组织中 VEGF-C 与 CK19 表达的相关性分析(例)

Table 2 Correlation of the expression of VEGF-C with CK19(n)

VEGF-C expression	CK19 expression		r	P
	Negative	Positive		
Positive	116	66	0.483	<0.001
Negative	49	249		

2.3 不同 VEGF-C 和 CK19 表达水平肺癌患者术后复发情况比较

所有患者随访 36~48 个月,平均 (42.8 ± 3.5) 个月。术后 1 年,VEGF-C 和 CK19 阳性表达患者的复发率与 VEGF-C 和 CK19 阴性表达的患者比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。术后 3 年,VEGF-C 和 CK19 阳性患者的复发率显著高于 VEGF-C 和 CK19 阴性表达的患者,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.4 VEGF-C 和 CK19 的表达与 TTP 的相关性

本研究以手术时间至出现复发时间作为 TTP。Kaplan-Meier

结果显示:480 例 NSCLC 患者的中位 TTP 为 33.1 个月(95% CI: 31.7~35.5),其中 VEGF-C 阳性者中位 TTP 为 29.2 个月(95%CI: 27.5~30.9),VEGF-C 阴性表达者中位 TTP 为 36.2 个月(95%CI:35.0~37.5);CK19 阳性者中位 TTP 为 28.4 个月(95% CI: 26.6~30.2),CK19 阴性表达者中位 TTP 为 37.8 个月(95% CI:36.4~39.1)。经 log-rank 检验,VEGF-C、CK19 阴性者中位 TTP 显著高于阳性者中位 TTP,二者比较差异有统计学意义($\chi^2=15.77,18.45,P<0.05$)。见图 1、2。

表 3 不同 VEGF-C 和 CK19 表达水平患者术后复发情况比较[例(%)]

Table 3 Comparion of the postoperative recurrence between lung cancer patients with different levels of VEGF-C and CK19 expression[n(%)]

Indicator		N	1 year after surgery	3 year after surgery
VEGF-C	Positive	182	31(17.0)	85(46.7)
	Negative	298	33(11.1)	74(24.8)
	χ^2		3.47	14.16
	P		0.062	<0.001
CK19	Positive	165	26(15.8)	81(49.1)
	Negative	315	38(12.1)	78(24.8)
	χ^2		1.28	17.25
	P		0.258	<0.001

3 讨论

近年来,肺癌的早期诊断及治疗技术的不断提高,但其远期生存率并未有效提高,术后复发是影响 I 期 NSCLC 患者长期生存的关键因素^[10,11]。研究数据显示根治性切除的 I 期 NSCLC

患者,虽常规临床方法检测未能检测到残余肿瘤细胞,但发生局部复发或远处转移的比例仍高达 25%~30%^[12-14]。Sebastian 等^[15]研究认为早期 NSCLC 患者可能存在 OMs,通过淋巴、血液系统发生远处转移,转移部位尚无任何临床表现。TNM 分期对肺癌的治疗指导及判断预后具有重要的临床意义,对于 I 期

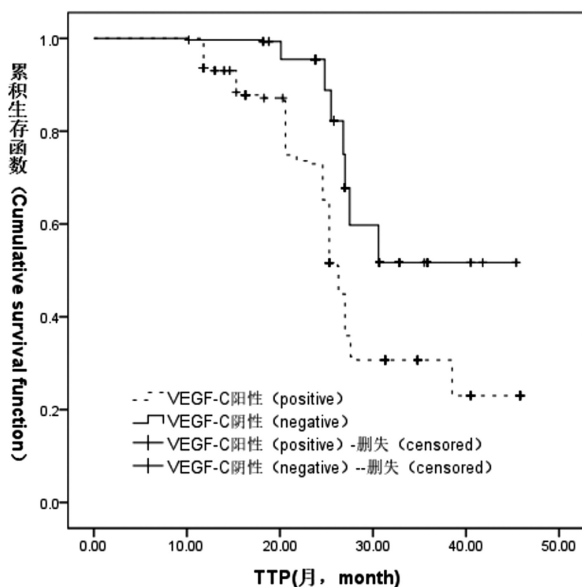


图1 NSCLC 患者 VEGF-C 表达水平与 TTP 的关系

Fig. 1 Correlation of VEGF-C expression level with the TTP in NSCLC patients

肺癌而言,美国国立综合癌症网络(NCCN)不建议给予术后化疗等辅助治疗,但其5年生存率仅有61.3%^[16]。因此,探寻一些辅助指标更好地指导肺癌术后临床治疗是减少复发并提高5年生存率的关键。

VEGF-C 是一种特异性淋巴管刺激因子,可诱导和促进微小淋巴管的生成及肿瘤细胞淋巴结转移,进而导致肿瘤细胞向全身转移扩散。现研究已证实抑制 VEGF-C 的表达有助于控制肿瘤淋巴结转移,改善患者预后^[17]。CK19 主要分布于上皮组织细胞,淋巴结、骨髓等间叶组织中缺乏表达,对于上皮细胞及其肿瘤组织具有较高的敏感性和特异性,其中 CK19 特异性最高,检测敏感度可达 0.001%~0.0001%^[18-20]。研究表明 CK19 可作为靶基因用于肺癌等上皮肿瘤 OM 检测,且与淋巴结转移密切相关^[21,22]。本研究结果显示分化程度越高,合并胸膜侵犯的 I 期 NSCLC 患者,VEGF-C 和 CK19 表达水平明显升高,由此推测 VEGF-C 和 CK19 水平可反映肺癌的肿瘤生物学特性及恶性程度。相关分析结果显示肺癌组织中 VEGF-C 表达与 CK19 表达呈显著正相关,可能共同促进了肿瘤的恶性进展,托娅等^[23]研究显示 VEGF-C 过度表达患者更容易出现 CK19 标记的早期淋巴结微转移,但其具体机制尚不清楚。

经过 3 年的随访观察,VEGF-C 和 CK19 阳性表达患者复发率均较阴性表达患者,提示 VEGF-C 和 CK19 与 I 期 NSCLC 患者术后局部复发密切相关,与王耀鹏等^[24]研究结果一致。Lai 等^[25]研究显示 VEGF-C 和 CK19 在肿瘤的浸润、转移过程中发挥重要作用,与肿瘤细胞的转移能力的早期形成直接相关,诱导了肿瘤术后复发转移。进一步生存分析结果显示 VEGF-C、CK19 阳性表达者 TTP 较阴性者明显缩短。由此我们认为 VEGF-C、CK19 过度表达 I 期 NSCLC 患者可能存在肺癌分期低估,术后可以考虑按照 NCCN 诊疗指南 II A 期治疗方案给予相应治疗,以期提高 5 年生存率。

综上所述,I 期 NSCLC 患者 VEGF-C、CK19 高表达与肺癌的生物学特性及局部复发密切相关,可作为 TNM 分期的有益

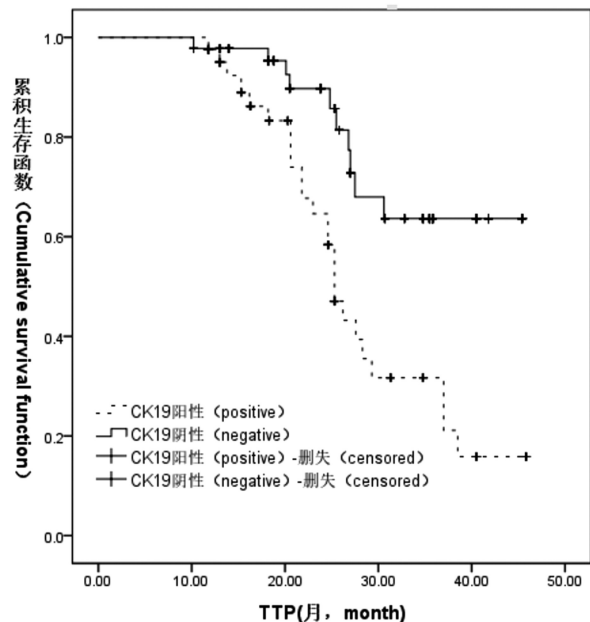


图2 NSCLC 患者 CK19 表达水平与 TTP 的关系

Fig. 2 Correlation of CK19 expression level with the TTP in NSCLC patients

补充。联合检测 VEGF-C、CK19 患者有助于指导 I 期 NSCLC 患者术后综合治疗,并改善患者预后。

参考文献(References)

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [2] 韩仁强, 郑荣寿, 张思维, 等. 1989 年-2008 年中国肺癌发病性别、城乡差异及平均年龄趋势分析 [J]. 中国肺癌杂志, 2013, 16(9): 445-451
- [3] Jiang W, Chen X, Xi J, et al. Selective mediastinal lymphadenectomy without intraoperative frozen section examinations for clinical stage I non-small-cell lung cancer: retrospective study of 403 cases[J]. World J Surg, 2013, 37(2): 392-397
- [4] 邵丰, 张晓膺. 非小细胞肺癌患者术后细胞角蛋白 19 片段水平与预后的关系[J]. 江苏医药, 2014, 40(4): 425-427
- [5] Lee S, Kang HG, Jin Eun Choi, et al. The Different Effect of VEGF Polymorphisms on the Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer according to Tumor Histology [J]. J Korean Med Sci, 2016, 31(11): 1735-1741
- [6] Eilertsen M, Pettersen I, Andersen S, et al. In NSCLC, VEGF-A response to hypoxia may differ between squamous cell and adenocarcinoma histology [J]. Anticancer Res, 2012, 32 (12): 4729-4736
- [7] Tu J, Wang S, Zhao J, et al. rs833061 and rs699947 on promoter gene of vascular endothelial growth factor (VEGF) and associated lung cancer susceptibility and survival: a meta-analysis[J]. Med Sci Monit, 2014, 20(12): 2520-2526
- [8] Samik C, Arghya A, Minakshi M, et al. Capsaicin-Induced Activation of p53-SMAR1 Auto-Regulatory Loop Down-Regulates VEGF in Non-Small Cell Lung Cancer to Restrain Angiogenesis[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99743-99751
- [9] Bidard FC, Hajage D, Bachelot T, et al. Assessment of circulating tumor cells and serum markers for progression-free survival prediction in metastatic breast cancer: a prospective observational

- study[J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(1): R29
- [10] Pang L, Wang J, Jiang Y, Chen L, et al. Decreased levels of serum cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 predict objective response to chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(12): 355-360
- [11] Uhlig S, Hettwer K, Colson B, et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) and cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) for assessment of therapy response in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. PROSPERO, 2015, 17(12): 974-985
- [12] Hung JJ, Jeng WJ, Hsu WH, et al. Predictors of death, local recurrence, and distant metastasis in completely resected pathological stage-I non small-cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(7): 1115-1123
- [13] Satoh Y, Motosugi U, Saito A, et al. Pretreatment ¹⁸F-fluorodeoxyglucose Uptake in the Lung Parenchyma Predicts Poor Survival After Stereotactic Body Radiation Therapy in Patients With Stage I Non-Small Cell Lung Cancer[J]. Technol Cancer Res Treat, 2018, 17(8): 109-123
- [14] Ardizzoni A, Cafferata MA, Tiseo M, et al. Decline in serum carcinoembryonic antigen and cytokeratin 19 fragment during chemotherapy predicts objective response and survival in patients with advanced nonsmall cell lung cancer [J]. Cancer, 2014, 108(12): 2842-2849
- [15] Sebastian NT, Xu-Welliver M, Williams TM, et al. Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for early stage non-small cell lung cancer (NSCLC): contemporary insights and advances [J]. J Thorac Dis, 2018, 10(Suppl 21): S2451-S2464
- [16] Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for the revision of the TNM stage grouping in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumors[J]. J Thorac Oncol, 2007, 2(8): 706-714
- [17] Lai X, Li Y, Gao M. Biochanin A regulates the growth and migration of NSCLC through suppressing the VEGF/VEGFR2 signaling pathway[J]. Oncol Res, 2018, 23(5): 14-19
- [18] Stefan H, Birgit W, Karina H, et al. Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2017, 116(8): 1037-1045
- [19] Holdenrieder S, Nagel D, Stieber P, et al. Estimation of prognosis by circulating biomarkers in patients with non-small cell lung cancer[J]. Cancer Biomark, 2015, 6(12): 179-190
- [20] Wong SCC, Cheung MT, Luk LLY, et al. Prognostic significance of Cytokeratin 20-positive lymph node vascular endothelial growth factor A mRNA and chromodomain helicase DNA binding protein 4 in pN0 colorectal cancer patients [J]. Oncotarget, 2017, 9(6): 6737-6751
- [21] Videtic GMM, Donington J, Giuliani M, et al. Stereotactic body radiation therapy for early-stage non-small cell lung cancer: Executive Summary of an ASTRO Evidence-Based Guideline [J]. Pract Radiat Oncol, 2017, 7(45): 295-301
- [22] Nisman B, Biran H, Heching N, et al. Prognostic role of serum cytokeratin 19 fragments in advanced non-small-cell lung cancer: association of marker changes after two chemotherapy cycles with different measures of clinical response and survival [J]. Br J Cancer, 2013, 98(12): 77-79
- [23] 托娅,宋静慧,苏一乐,等.CXCR4、VEGF-C、CK19和EMA在宫颈癌原位灶和淋巴结中的表达及相互关系[J].疾病监测与控制,2013, 14(5): 273-275
- [24] 王耀鹏,王明钊,罗宜人,等.血管内皮生长因子C与细胞角蛋白19检测在I期非小细胞肺癌中的临床研究[J].中国胸心血管外科临床杂志,2012, 19(4): 385-387
- [25] Lai Y, Wang X, Zeng T, et al. Serum VEGF levels in the early diagnosis and severity assessment of non-small cell lung cancer [J]. J Cancer, 2018, 9(9): 1538-1547

(上接第 1445 页)

- [26] García-Martínez A, Sottile J, Sánchez-Tejada L, et al. DNA Methylation of Tumor Suppressor Genes in Pituitary Neuroendocrine Tumors[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(4): 1272-1282
- [27] 李利玲,王少帅.宫颈癌组织中DNA甲基转移酶表达及其与HPV感染、肿瘤恶性程度的关系[J].海南医学院学报,2017, 23(3): 408-410, 414
- [28] Gnyszka A, Jastrzebski Z, Flis S. DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer[J]. Anticancer Res, 2013, 33(8): 2989-2996
- [29] Choi SJ, Jung SW, Huh S, et al. Alteration of DNA Methylation in Gastric Cancer with Chemotherapy[J]. J Microbiol Biotechnol, 2017, 27(8): 1367-1378
- [30] Maeda M, Moro H, Ushijima T. Mechanisms for the induction of gastric cancer by Helicobacter pylori infection: aberrant DNAmethylation pathway[J]. Gastric Cancer, 2017, 20(Suppl 1): 8-15