

急性髓系白血病患者造血微环境中EPCs数量、微血管密度与VEGFR-2表达的意义

申政磊¹,朱 萍²,毛文文³,尹列芬²,梁 进¹,沈丽达¹,王存德¹,杨 玲²

Significance of EPCs Number, MVD and VEGFR-2 Expression in Hematopoietic Microenvironment of 30 Patients with Acute Myeloid Leukemia

SHEN Zhenglei¹,ZHU Ping²,MAO Wenwen³,YIN Liefen²,LIANG Jin¹,SHEN Lida¹, WANG Cunde¹,YANG Ling²

1.Department of Hematology, Yunnan Tumor Hospital, 650118 Kunming,China;2. Department of Hematology,The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University;3. Department of Geriatric ,The Second Renming Hospital of Kunming City

Corresponding Author:YIN Liefen,E-mail : ylfynkm@126.com

Abstract:Objective To investigate the clinical significance of MVD, change in EPCs number in peripheral blood and bone marrow, and the expression of VEGFR-2 in bone marrow biopsy specimens of patients with acute myeloid leukemia (AML). **Methods** The number of EPCs was determined by FCM method in 30 patients with AML and 10 healthy cases in control group. Bone marrow pathological sections of 30 AML patients were embedded by conventional paraffin. Microvessel density(MVD) and the expression of vascular endothelial growth factor receptor-2(VEGFR-2) were detected by immunohistochemistry assay and its relationship with clinical features was analyzed. **Results** (1)The number of EPCs in the peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) of patients with AML before treatment was significantly higher than that in control group($P<0.01$). After treatment, the number of EPCs of AML patients in CR group was significantly lower than that in NR group[$P<0.01$ (PB); $P<0.05$ (BM)].(2) MVD and VEGFR-2 expression were significantly higher than that in control group($P<0.05$). Tested by spearman rank correlations, the absolute numbers of EPCs in PB and BM had positive correlation with MVD and VEGFR-2 [$P<0.01$ (PB); $P<0.05$ (BM)]. (3) The survival curves for 100 weeks had significant difference between groups of $>20/\mu\text{l}$ and $<20/\mu\text{l}$ of EPCs. (4) By Cox regression, there were risk factors including the absolute number of EPCs before treatment, the percentage of WBC, VEGFR-2 and $\beta 2$ -MG. Megakaryocytic cells and ECOG performance status were protective factors. **Conclusion** Dynamic observation of EPCs count combined with MVD and VEGFR-2 may be clinically correlated with the evaluation of AML vascular endothelial function in a certain degree. It may be used to evaluate the treatment outcomes and act as a prognostic marker for AML.

Key words:Endothelial progenitor cells(EPCs); Acute myeloid leukemia; Microvessel density(MVD); Vascular endothelial growth receptor-2(VEGFR-2)

摘 要: 目的 探讨急性髓系白血病(AML)患者外周血及骨髓中内皮祖细胞(EPCs)的数量变化以及骨髓活检标本中微血管密度(MVD)和血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)表达的临床意义。**方法** 采用流式细胞仪检测30例AML患者以及10例健康对照组外周血及骨髓中EPCs的数量,进行相对及绝对计数;应用常规石蜡包埋骨髓病理切片进行免疫组织化学染色检测30例AML患者骨髓活组织中MVD和VEGFR-2表达水平,分析其与临床特征的关系。**结果** (1)治疗前AML患者外周血和骨髓中EPCs计数与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);治疗后AML患者完全缓解(CR)组与未缓解(NR)组外周血中EPCs比较,差异有统计学意义($P<0.01$);CR与NR组骨髓中EPCs计数比较差异也

有统计学意义($P<0.05$)。(2)AML骨髓切片上MVD和VEGFR-2表达水平与健康对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。经Spearman秩相关检验,EPCs绝对计数、MVD、VEGFR-2三者之间呈正相关关系。(3)观察外周血中EPCs绝对计数 ≥ 20 个/ μl 以及 <20 个/ μl 两组生存曲

收稿日期:2012-12-14;修回日期:2013-04-09
基金项目:国家自然科学基金资助项目(81241122);
云南省社会发展科技计划应用基础研究专项面上资助项目
(2008CD121)

作者单位:1.650118 昆明,云南省肿瘤医院血液科;
2.昆明医学院第二附属医院血液科;3.昆明市第二人民医院
老年科

通信作者:尹列芬,E-mail: ylfynkm@126.com

作者简介:申政磊(1970-),男,硕士,主治医师,
主要从事血液肿瘤抗血管生成治疗研究

线,以100周为观察终点, <20个/微升 组生存期明显优于前者。(4)经Cox回归分析,发现治疗前外周血EPCs绝对计数、WBC计数、VEGFR-2、 β 2-微球蛋白为危险因素。骨髓巨核细胞数与ECOG评分为保护因素。**结论** EPCs计数结合MVD和 VEGFR-2检测对评价AML血管内皮功能可能有一定的临床意义,可作为判断患者疗效及预后的指标之一。

关键词: 内皮祖细胞计数;急性髓系白血病;微血管密度;血管内皮生长因子受体-2

中图分类号: R733.7 **文献标识码:** A

0 引言

急性髓系白血病(AML)是造血干细胞的恶性克隆性疾病,治愈率低,生存期短。随着对环境因素在肿瘤发病机制中认识的加深以及目前以化疗为主的综合治疗方法很难治愈肿瘤等因素,越来越多的学者希望通过改变肿瘤细胞生长环境来提高治愈率及延长肿瘤患者的长期生存率,白血病也不例外。但目前缺乏一套较完善的评估AML患者体内肿瘤细胞生长环境的体系。内皮祖细胞(EPCs)作为AML细胞赖以生长的造血微环境的重要细胞成分,在AML的肿瘤血管新生中有重要意义,并渐成为近来研究热点^[1-10]。本研究采用FCM技术检测AML患者外周血及骨髓EPCs的数量变化,同时检测骨髓活组织切片中MVD和 VEGFR-2表达水平,探讨其在AML发生、发展中血管内皮微环境的变化了的临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集课题组成员医院2005年3月— 2010年6月住院的30例AML患者(M1型6例、M2型10例、M3型4例、M4型5例、M6型5例),均符合张之南《血液病诊断及疗效标准》,其中男18例,女12例,年龄10~68岁,中位年龄为40.5岁,所有AML患者进行形态学、免疫学、细胞遗传学和分子生物学(MICM)分型诊断;初治患者除M3外均使用柔红霉素+阿糖胞苷(DA)方案,M3使用维A酸诱导缓解,复发难治使用二线方案;对治疗后患者分为完全缓解组(CR)、未缓解组(NR)进行登记,随访直至病情进展或死亡,随访终点为100周。健康对照组10例,为正常体检者,其中男7例,女3例,年龄28~70岁,中位年龄35.7岁。AML组及健康对照组常规采集外周血、骨髓液行流式细胞仪检测,骨髓活检标本送病理科免疫组织化学检查。

1.2 实验方法

1.2.1 流式细胞仪

(1)细胞表面标志 EPCs细胞:KDR+CD133+CD45-CD34+CD34-2FITC及同型对照购自Coulter 公司、CD45-2Cy5、CD133-2RPE 及同型对照均购自Dako公司)。

(2)检测方法 采用荧光抗体标记,流式细胞仪检测。常规抽取抗凝血3~5 ml及骨髓液3 ml,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 个,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。

1.2.2 免疫组织化学-碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶(APAAP)法

(1)所需试剂 VIII 因子相关抗原抗体(vWF),兔抗人抗体,稀释浓度 1:100。VEGFR-2多抗:兔抗人抗体,稀释浓度 1:100;均用 APAAP法,以上试剂均由云南省肿瘤医院病理科提供,以上试剂购自迈新生物试剂有限公司,具体操作步骤严格按照说明书进行。常规HGF染色。

(2)结果判断 MVD采用vWF表达进行表示,定位于内皮细胞的胞质,阳性染色为玫红色颗粒样着色。MVD计数(具体标准参照文献^[3]):结构清晰可辨的被染成玫红色阳性的内皮细胞或内皮细胞簇可作为一个能计数的微血管。VEGFR-2阳性染色定位于包括白血病细胞和内皮细胞的胞质中,也为玫红色颗粒样着色。上述检测由三位经验丰富的病理科专家进行判定,先低倍视野($\times 100$)定位,后高倍视野($\times 400$)计数,取中位值。

1.3 统计学方法

EPCs、MVD和 VEGFR-2以中位数表示,EPCs相对计数百分比转化后进行统计分析,绝对计数直接进行统计学分析;采用SPSS11.5统计软件进行正态检验后行卡方检验和(或)四格表的精确概率法判断,以双侧检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。相关性分析采用Spearman秩相关检验;生存曲线分析采用Kaplan-Meier法,多因素分析采用Cox回归法。

2 结果

2.1 30例AML患者治疗前的临床资料

30例AML患者治疗前的临床资料(年龄、性别、体温、淋巴结、肝脾肿大、LDH、血象、骨髓象、 β 2-MG、染色体、骨髓活检等),见表1。

2.2 AML 患者治疗前EPCs计数与健康对照组比较

AML患者治疗前外周血EPCs相对计数中位数为0.10%,最大值为0.26%,最小值为0.08%;健康对照组分别为0.03%、0.18%、0.01%;两组间比较

表 1 30例急性髓系白血病患者治疗前的临床资料

Table 1 Clinical data of 30 AML patients before treatment

Clinical features	Case	Percent(%)
Age(years)		
< 60	20	66.3
≥60	10	33.3
Gender		
Male	18	60.0
Female	12	40.0
Fever (℃)		
< 39	19	63.3
≥39	11	36.7
Lymphoma node		
<3	9	30.0
≥3	21	70.0
LDH (U/L)		
NC	9	30.0
AC	21	70.0
Liver megaly	24	80.0
Spleno megaly	26	86.7
WBC(×10 ⁹ /L)		
<4	6	20.0
4-10	15	50.0
>10	9	30.0
Hb (g/L)		
<6	5	16.7
6-9	14	46.6
9-12	5	16.7
>12	6	20.0
BPC(×10 ⁹ /L)		
<20	6	20.0
20-100	18	60.0
>100	6	20.0
Blast in PB		
Yes	22	73.3
No	8	26.7
Blast in BM		
≤50%	18	60.0
>50%	12	40.0
β ₂ -MG (μg/ml)		
NC	4	13.3
AC	26	86.7
Chromosomes		
NC	24	80.0
AC	6	20.0
Megakaryocyte(numble/smears)		
<100	15	50.0
>100	15	50.0
Hyperplasia of BM		
Hyperplasia	19	63.3
Hypoplasia	11	36.7

Note:AML:acute myeloid leukemia;NC :normal case; AC:abnormal case;PB:peripheral blood;LDH:lactate dehydrogenase;BM:bone marrow;BPC:blood platelet count

差异有统计学意义 ($P<0.01$)。治疗前骨髓EPCs相对计数中位数为1.48%，最大值为3.12%，最小值为1.01%；对照组分别为0.20%、0.38%、0.07%；两组间比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

AML患者治疗前外周血EPCs绝对计数中位数为13.58个/微升，最大值为40.25个/微升，最小值为5.23个/微升；健康对照组分别为1.90个/微升、3.51个/微升、0.97个/微升；两组间比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)。治疗前骨髓EPCs绝对计数中位数为

为149.25个/微升，最大值为261.12个/微升，最小值为85.67个/微升；健康对照组分别为19.65个/微升、37.92个/微升、11.27个/微升；两组间比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.3 AML患者治疗后EPCs计数的比较

AML患者治疗后CR组外周血EPCs相对计数中位数为0.02%，最大值为0.21%，最小值为0.008%；NR组分别为0.13%、0.34%、0.05%；CR组与NR组间比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)。CR组骨髓EPCs相对计数中位数为0.68%，最大值为1.11%，最小值为0.28%；NR组分别为1.89%、3.85%、1.04%；CR组与NR组间差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

AML患者治疗后CR组外周血EPCs绝对计数中位数为2.53个/微升，最大值为4.26个/微升，最小值为0.87个/微升；NR组分别为11.66个/微升，23.51个/微升，5.84个/微升；CR组与NR组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。CR组骨髓EPCs绝对计数中位数为25.96个/微升，最大值为60.22个/微升，最小值为11.73个/微升；NR组分别为109.38个/微升、190.02个/微升、70.21个/微升；CR组与NR组间比较差异有统计学差意义 ($P<0.05$)。

2.4 AML患者骨髓组织中MVD和 VEGFR-2的表达

AML患者骨髓组织中微血管数量较多,形态不规则；而健康对照组微血管数量较少,形态规则。AML患者的骨髓活组织中VEGFR-2表达明显增高,健康对照组骨髓活组织中VEGFR-2表达较低。不同类型的AML患者VEGFR-2的表达不同,与健康对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),不同类型的AML患者之间差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表2。

2.5 AML患者EPCs绝对计数与MVD和 VEGFR-2的相关性分析

表 2 AML各亚型 MVD和 VEGFR-2的中位数比较

Table 2 The median of MVD (*n*/high power-lens) and VEGFR-2 of each subtype of AML

Groups	M1 (<i>n</i> =6)	M2 (<i>n</i> =10)	M3 (<i>n</i> = 4)	M4 (<i>n</i> = 5)	M5 (<i>n</i> =5)	Control (<i>n</i> =10)
MVD / (<i>n</i> /HP)	20.57	18.01	19.34	18.57	22.67	10.5
VEGFR-2 (%)	60.51	64.71	73.58	71.46	81.27	19.03

Note: MVD:microvessel density; VEGFR-2:vascular endothelial growth receptor-2

经Spearman秩相关检验，外周血EPCs绝对计数与MVD和 VEGFR-2呈正相关，相关系数分别为 ($r=0.605$, $P<0.01$)、($r=0.712$, $P<0.01$)；骨髓EPCs绝对计数与MVD和 VEGFR-2也呈正相关，相

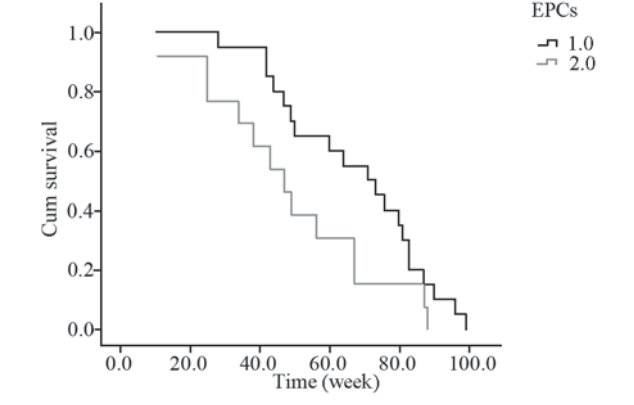
系数分别为 ($r=0.505$, $P<0.05$)、($r=0.492$, $P<0.05$)；MVD和 VEGFR-2也呈正相关, 相关系数为 ($r=0.901$, $P<0.001$)。

2.6 AML患者外周血EPCs绝对计数水平与生存的关系

参考国外资料, 按照外周血中EPCs绝对计数 ≥ 20 个/微升以及 <20 个/微升, 两组绘制生存曲线以100周为观察终点, 结果如下:100周以前, <20 个/微升组生存期明显优于前者, 见图1。

2.7 AML患者临床资料相关因素Cox分析

经Cox回归分析, 进入方程与生存有关变量包括



EPCs:endothelial progenitor cells
图 1 急性髓系白血病患者外周血EPCs绝对计数生存曲线
Figure 1 Survival curves of EPCs (absolute numbers) in PB of AML

外周血EPCs治疗前绝对计数、WBC计数、巨核细胞数、VEGFR-2、ECOG评分、 $\beta 2$ -微球蛋白等；其中除骨髓巨核细胞数与ECOG评分为保护因素外其余为危险因素, 见表3。

表 3 急性髓系白血病患者Cox多因素回归方程中变量结果
Table 3 Valuable results in Cox regression equations of AML

Groups	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
Age	-0.287	0.345	0.694	1	0.405	0.750	0.382	1.475
Gender	63.931	34.873	3.361	1	0.067	5.817	0.012	2.808
WBC	3.889	1.488	6.833	1	0.009	48.883	2.646	902.992
HB	0.712	0.402	3.129	1	0.077	2.038	0.926	4.484
BPC	0.044	0.033	1.785	1	0.182	1.045	0.980	1.116
Megakaryocyte	-0.085	0.033	6.751	1	0.009	0.919	0.862	0.979
FIB	-7.186	7.477	0.924	1	0.336	0.001	0.000	1.751
$\beta 2$ MG	13.408	6.649	4.066	1	0.044	6.653	1.456	3.039
LDH	-0.015	0.011	1.917	1	0.166	0.985	0.964	1.006
ECOG	-50.918	20.104	6.415	1	0.011	0.000	0.000	0.000
EPC (absolute numbers)	2.811	1.083	6.743	1	0.009	16.633	1.993	138.847
MVD	0.855	0.728	1.380	1	0.240	2.352	0.565	9.796
VEGFR2	7.215	2.760	6.833	1	0.009	1.359	6.080	3.039
Blast in BM	7.648	12.575	0.370	1	0.543	2.096	0.000	1.059
Hyperplasia of BM	27.501	40.283	1.852	1	0.213	3.266	0.000	1.009
Chromosomes	55.238	30.546	3.241	1	0.052	4.357	0.056	2.684

3 讨论

目前普遍认为EPCs与造血干细胞 (hemapoietic stem cells, HSCs) 起源于共同的干细胞——血液血管干细胞 (heman-gioblast), EPCs正因为它具有对缺血性疾病的内皮修复和可能成为肿瘤靶向诊治新靶位以及移植治疗而受人关注。VEGFR-2作为 EPCs的重要标记, 是内皮细胞增殖和存活、血管发生、微血管渗透性的主要调控因子。骨髓活组织切片中微血管密度可以直观从组织层面发现新生血管生成。

本研究发现在外周血EPCs较对照组明显增高, 约10~20倍, 基本与国外学者报道一致^[4,9]。骨髓液中EPCs也相应增高, 但变化不如外周血明显, 在5~8倍左右, 分析其原因可能与骨髓中细胞数目总数较多有关。国外学者^[1,3,7]在对淋巴瘤患者外周血干细胞采集过程中对外周血及骨髓CD34+细胞与EPCs细胞进行对比, 发现两者之间有直接相关性, 认为外周血EPCs细胞数目高峰期在化疗后10~13天, 提示骨髓内EPCs的高峰事件也在化疗后10天左右, 因为EPCs细胞来自CD34+细胞。值得注意的是本研究过程中对5例患者进行EPCs数目动态检测, 化疗后1~3周, 外周血中EPCs数目变化明显, 尤其是第3周与前2周相比, 缓解患者下降明显; 而骨髓中EPCs数目在第3周下降不明显, 是否提示外周血EPCs增高变化快, 但持续时间短, 而骨髓EPCs增高较外周血低, 但时间相对较长呢? 针对其原因目前无相关文献报道。目前研究结果提示EPCs在正常外周血中相对比例在0.01%~0.001%, 绝对计数在 (0.1~3) 个/微升。但未见骨髓中EPCs的具体数值, 本研究发现对照组骨髓中EPCs相对比例在0.04%~0.4%, 绝对计数在

(10~100)个/微升。但因样本量少,对其范围有待扩大样本进一步探讨。国外学者^[6-7]把外周血中EPCs绝对计数以20个/微升划分为高危组与低危组,发现>20个/微升的高危组患者与病情进展有明显的关联,对判断预后有一定意义。本研究结果提示100周前两组间生存曲线明显不同。同时EPCs绝对计数超过100个/微升的患者病情进展快、对化疗敏感度差,分析原因可能与本组患者外周血白细胞数目较高有关。

另一方面,应用 APAAP方法在骨髓标本中检测发现,其 MVD和 VEGFR-2均显著增高,与健康对照组比较差异具有统计学意义,提示骨髓新生血管在AML的发展中起着重要作用。据文献报道^[6], VEGFR-2不仅高表达于早期细胞,同时还高表达于成熟血细胞及内皮细胞; vWF抗原不表达于白血病细胞,仅表达于血管内皮细胞,显然两者结合能更准确、直观反映骨髓中血管新生的实际情况。由于目前国内外无综合准确判断肿瘤新生血管的方法,也无外周血EPCs与骨髓VEGFR-2、MVD的同步检测的报道,本研究结果在一定意义上可能提供了一条新的思路,但需扩大样本进一步探讨。相关性分析提示外周血EPCs治疗前绝对计数与骨髓中VEGFR-2和MVD呈正相关也支持这一判断。

经Cox回归分析发现与生存相关变量包括外周血EPCs治疗前绝对计数、WBC计数、巨核细胞数、VEGFR-2、ECOG评分、 β 2-微球蛋白等,但MVD、骨髓增生程度、染色体未显示出相关性可能与其检测及判断方法粗略、病例数、统计学等因素有关。国外有学者认为EPCs男性^[6]以及年轻^[5]患者较高,与病情进展有关,与本研究不符,其中机制不清, EPCs变化规律仍有待深入探讨。

总之,联合外周血EPCs计数与骨髓活检切片上

对 MVD和 VEGFR-2的同步检测,可能为AML疗效及预后判定提供一条新的思路。

参考文献:

- [1] Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, *et al.* Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis[J]. *Science*,2008,319(5860):195-8.
- [2] Bhaskar A,Gupta R,Kumar L, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells as potential prognostic biomarker in multiple myeloma[J]. *Leuk Lymphoma*,2012,53(4) :635-40.
- [3] Igreja C, Courinha M, Cachaco AS, *et al.* Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients[J]. *Haematologica*, 2007,92(4):469-77.
- [4] Wierzbowska A, Robak T, Krawczynska A, *et al.* Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Eur J Haematol*, 2005,75(6):492-7.
- [5] Timmermans F, Plum J, Yöder MC, *et al.* Endothelial progenitor cells: identity defined?[J].*J Cell Mol Med*,2009,13(1):87-102.
- [6] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, *et al.* Expressing of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(-) cells identifies a population of functional endothelial precursors[J]. *Blood*, 2000, 95(3):952-8.
- [7] Fang B, Zheng C, Liao L, *et al.* Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics[J]. *Blood*, 2005,105(7):2733-40.
- [8] Rigolin GM,Fraulini C,Ciccone M,*et al.* Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 13q14 deletion[J]. *Blood*,2006,107(6):2531-5.
- [9] Rigolin G M,Mauro E,Ciccone M, *et al.* Neoplastic circulating endothelial-like cells in patients with acute myeloid leukaemia[J]. *Eur J Haematol*,2007,78(5):365-73.
- [10] Rigolin GM, Maffei R, Rizzotto L, *et al.* Circulating endothelial cells in patients with chronic lymphocytic leukemia: clinical-prognostic and biologic significance[J]. *Cancer*,2010,116(8):1926-37.

[编辑: 黄园玲; 校对: 周永红]