

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.01.023

外周血循环肿瘤细胞上皮-间质转化机制调控的 EP 方案 治疗小细胞肺癌的研究*

聂启鸿, 刘华峰, 卢燕军

(江西省赣州市人民医院肿瘤科 341000)

[摘要] **目的** 研究外周血循环肿瘤细胞(CTCs)上皮-间质转化机制调控的 EP 方案治疗小细胞肺癌的效果。**方法** 以该院 2015 年 5 月至 2017 年 5 月收治的 100 例小细胞肺癌患者(观察组)为研究对象,研究依托泊苷联合顺铂(EP)方案治疗小细胞肺癌的临床效果,以该院同期伊立替康联合顺铂(IP)方案治疗的 100 例小细胞肺癌患者为对照组,分析治疗前后 CTCs 及钙离子依赖的细胞黏附素家族(E-cadherin)、细胞角蛋白-19(CK-19)和波形蛋白(Vimentin)变化。**结果** 观察组完全缓解(CR)+部分缓解(PR)比例为 60.0%,明显高于对照组($P<0.05$);两组治疗后 CTCs 阳性表达例数及计数均明显降低($P<0.05$), E-cadherin、 β -catenin、Vimentin 蛋白水平明显降低($P<0.05$),而 CK-19 蛋白水平明显升高($P<0.05$),观察组患者的上述指标降低更显著($P<0.05$)。**结论** EP 治疗方案对小细胞肺癌有较好的效果。

[关键词] 临床方案;上皮-间质转化;癌,小细胞;肺肿瘤;肿瘤循环细胞

[中图法分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)01-0091-03

Effects of EP therapy regulated by epithelial-mesenchymal transition mechanism in peripheral blood circulating tumor cells on the treatment of small-cell lung cancer*

NIE Qihong, LIU Huaifeng, LU Yanjun

(Department of Oncology, Ganzhou People's Hospital, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

[Abstract] **Objective** To study the EP therapy regulated by epithelial-mesenchymal transition mechanism in peripheral blood circulating tumor cells (CTCs) in the treatment of small-cell lung cancer. **Methods** 100 patients with small-cell lung cancer (the observation group) from May 2015 to May 2017 in our hospital were enrolled. The clinical effect of etoposide combined with cisplatin (EP) in the treatment of small-cell lung cancer was studied. 100 patients treated with irinotecan combined with cisplatin (IP) in the same period in the hospital were used as the control group. The changes of CTCs E-cadherin, cytokeratin-19 (CK-19) and Vimentin in peripheral blood were analyzed before and after treatment. **Results** Complete response (CR) + partly response (PR) ratio in the observation group was 60%, significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). The cases and counts of CTC-positive expression significantly decreased ($P<0.05$) after treatment. E-cadherin, β -catenin, Vimentin protein decreased significantly while CK-19 increased significantly ($P<0.05$). The reduction of the above indicators was more significant in the observation group. **Conclusion** EP therapy has a good effect on the extensive stage of small cell lung cancer.

[Key words] clinical protocols; epithelial mesenchymal transition; carcinoma, small cell; lung neoplasms; neoplasm circulating cells

肺癌是世界范围内病死率较高的恶性肿瘤之一,而小细胞肺癌占肺癌发病率的 20%~25%^[1],其为临床上常见的未分化恶性肿瘤,细胞倍增时间短、进展速度快^[2]。小细胞肺癌患者早期表现为血行转移,对化疗较为敏感^[3]。外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是恶性肿瘤复发和转移的关键因素,与患者的预后密切相关^[4]。分析 CTCs 水平对评估恶性肿瘤的复发和药物疗效及指导临床合理用药

具有重要的价值。美国国立综合癌症网络(NCCN)指南推荐的小细胞肺癌一线治疗方案为依托泊苷联合顺铂(EP)方案和伊立替康联合顺铂(IP)方案^[5]。本研究分析外周血 CTCs 上皮-间质转化机制调控的 EP 方案治疗小细胞肺癌的效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2015 年 5 月至 2017 年 5 月 EP 方案治疗的 100 例小细胞肺癌患者(观察组),

* 基金项目:江西省卫生和计划生育委员会科技计划项目(20177257)。 作者简介:聂启鸿(1988—),主治医师,本科,主要从事结肠肿瘤诊治研究。

其中男 64 例,女 36 例,年龄 43~67 岁,平均(55.1±9.8)岁。以本院同期 IP 方案治疗的 100 例小细胞肺癌患者为对照组,其中男 63 例,女 37 例,年龄 42~68 岁,平均(55.9±10.2)岁。纳入标准:(1)符合原卫生部《原发性肺癌诊疗规范》(2011 年版)中非小细胞肺癌的诊断标准;(2)均经过病理学确诊为小细胞肺癌;(3)临床资料完整并同意本研究。排除标准:(1)并发其他恶性肿瘤;(2)临床资料不完整;(3)有严重的认知功能障碍;(4)有严重的心肾功能异常。本研究经医院伦理委员会批准,所有对象均知情同意。两组患者性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 对照组患者行 IP 方案:第 1、8 天静脉滴注伊立替康 165 mg/m² 和顺铂 30 mg/m²。观察组患者行 EP 方案:第 1~3 天静脉滴注依托泊苷 100~125 mg/m² 和顺铂 25 mg/m²。两组治疗 21 d 为 1 个周期,共治疗 4 个周期,治疗结束后评价疗效。

1.2.2 外周血 CTCs 分离计数 采集患者清晨空腹静脉血 5 mL,常温保存并富集肿瘤细胞。3 000 r/min 离心 15 min 后弃去上清液,加入红细胞裂解液,温孵震荡后离心去除上层红细胞。再次离心去除上清液后将所得细胞液与 Miltenyi 免疫磁珠混合、孵育,并经过强磁场作用去除白细胞,富集上皮来源的稀有细胞,用免疫荧光染色技术鉴定 CTCs 并进行计数。

1.2.3 疗效评价 本研究按照实体瘤疗效标准对两组研究对象的治疗效果进行评价,完全缓解(CR):目标病灶消失,至少维持 4 周;部分缓解(PR):基线病灶最大径之和降低 30%,至少维持 4 周;稳定(SD):基线病灶最大径之和减少但达不到 30%;进展(PD)。客观缓解(CR+PR)认为有治疗效果。

1.2.4 荧光定量 PCR 法 荧光定量 PCR 采用罗氏 LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪进行。扩增体系:2×qPCR Mix 5 μL,上下游引物各 10 pmol,cDNA 模板 2 μL,超纯水 1 μL,反应体系共 10 μL。扩增反应条件:95 °C,10 s;60 °C,40 s,共 30 个循环。 ΔCt =待检基因 Ct-内参基因 Ct。

1.2.5 酶联免疫吸附测定法 钙离子依赖的细胞黏附素家族(E-cadherin)检测试剂盒购自 R&D 公司, β -catenin 检测试剂盒购自 Abcam 公司,细胞角蛋白-19(CK-19)检测试剂盒购自 ABclonal 公司,波形蛋白

(Vimentin)检测试剂盒购自 Omega 公司,所有检测过程均按照试剂盒说明书要求进行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组治疗小细胞肺癌临床效果分析 观察组 CR+PR 比例为 60.0%,明显高于对照组的 46.0%,差异有统计学意义($\chi^2=3.546, P=0.007$),见表 1。

表 1 两方案治疗小细胞肺癌临床效果分析[n(%)]

组别	治疗效果				
	CR	PR	SD	PD	CR+PR
对照组	6(6.0)	40(40.0)	33(33.0)	21(21.0)	46(46.0)
观察组	9(9.0)	51(51.0)	26(26.0)	14(14.0)	60(60.0)

2.2 两组治疗后 CTCs 数目及表型变化分析 两组治疗后 CTCs 阳性表达例数及计数均明显降低,且对照组患者的上述指标降低更显著($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组治疗后 CTCs 数目及表型变化分析

组别	CTCs 阳性表达数[n(%)]		CTCs 计数($\bar{x}\pm s$,个)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	65(65.0)	59(59.0)	15.40±2.08	4.50±1.02
观察组	66(66.0)	50(50.0)	15.50±2.91	3.10±0.88
χ^2/t	0.384	6.942	0.981	5.227
P	0.394	0.005	0.412	0.007

2.3 两组治疗后 E-cadherin 及 β -catenin mRNA 变化分析 两组治疗后 E-cadherin 及 β -catenin mRNA 水平明显降低,且观察组患者的上述指标降低更显著($P<0.05$),见表 3。

表 3 两组治疗后 E-cadherin 及 β -catenin mRNA 变化分析($\bar{x}\pm s$)

组别	E-cadherin		β -catenin	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	6.01±1.84	3.47±1.02	4.71±0.74	3.76±0.85
观察组	6.09±1.77	2.87±0.55	4.82±1.05	2.55±0.39
t	0.542	3.754	0.849	4.554
P	0.285	0.015	0.785	0.022

表 4 两组治疗前后 E-cadherin、 β -catenin、CK-19 及 Vimentin 蛋白表达变化分析($\bar{x}\pm s$)

组别	E-cadherin/GAPDH		β -catenin/GAPDH		CK-19/GAPDH		Vimentin/GAPDH	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	0.59±0.08	0.48±0.10	0.45±0.07	0.40±0.10	0.36±0.07	0.44±0.08	0.61±0.13	0.52±0.17
观察组	0.60±0.12	0.41±0.06	0.45±0.06	0.35±0.07	0.37±0.08	0.52±0.15	0.62±0.14	0.48±0.11
t	0.542	3.154	0.394	4.178	0.285	4.117	0.257	6.345
P	0.236	0.015	0.374	0.023	0.414	0.047	0.369	0.022

2.4 两组治疗后 E-cadherin、 β -catenin、CK-19 及 Vimentin 蛋白表达变化分析 两组治疗后 E-cadherin、 β -catenin、Vimentin 蛋白水平明显降低而 CK-19 蛋白水平明显升高,且观察组患者的上述指标降低更显著($P < 0.05$),见表 4。

3 讨 论

肺癌是威胁人类健康和生存的自常见的恶性肿瘤,且随着环境条件的恶化,其发病率和病死率有逐年升高的趋势^[6]。小细胞肺癌分化程度低、生长快,早期易于转移和侵犯血管,但对放疗和化疗较为敏感^[7]。EP 方案和 IP 方案是临床治疗小细胞肺癌的推荐方案,且已经证实其对小细胞肺癌的疗效。

上皮-间质转化是具有极性的上皮细胞在特定的病理或生理条件下转化为间充质细胞的过程。上皮-间质转化是恶性肿瘤迁移能力和侵袭能力的重要机制,参与了恶性肿瘤的发生、发展过程。上皮-间质转化的发生与一系列蛋白的表达有关,如 E-cadherin 和 Vimentin 等。已有的证据显示上皮-间质转化涉及的信号通路或细胞因子包括转化生长因子- β (TGF- β)、转录因子、雄激素受体及 CTCs 等。在分析上皮-间质转化调控蛋白在前列腺癌侵袭、转移中的作用及其临床预后诊断价值的研究中发现上皮-间质转化与肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移有关,E-cadherin 有可能作为患者临床预后的诊断指标之一^[8]。E-cadherin、Vimentin 在不同病理分期宫颈癌中的表达存在差异性,即上皮-间质转化在宫颈癌的发生、发展过程中起到关键的作用^[9]。Vimentin 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)组织中表达增强,而 E-cadherin 则表达降低,提示上皮-间质转化过程在 OSCC 发生及进展过程中发挥重要作用^[10],同时锌指转录因子 Snail 可能通过参与调控上皮-间质转化过程从而在乳腺癌的发生和侵袭过程中发挥重要作用,并推动乳腺癌的远处淋巴结转移^[11]。本研究也发现 EP 方案和 IP 方案治疗后 E-cadherin、Vimentin 蛋白水平明显降低,且 EP 方案患者的上述指标降低更显著。 β -catenin 也是与肿瘤病理学过程密切相关的生物大分子,且与肿瘤的增殖及细胞凋亡过程密切相关^[12-13]。在分析 β -catenin 和 E-cadherin 在食管鳞癌肿瘤芽殖中的表达时也证实食管鳞癌肿瘤芽殖中的 β -catenin 高表达和 E-cadherin 低表达与肿瘤浸润、转移关系密切^[14]。以往的研究也证实 β -catenin 在胃肿瘤组织中表达水平显著升高,增殖细胞核抗原(PCNA)诊断胃肿瘤的价值高于 β -catenin,但 PCNA、 β -catenin 均可以作为胃肿瘤预后评估指标^[15]。本研究也证实 EP 方案和 IP 方案治疗后 CTCs 阳性表达例数及计数均明显降低, β -catenin 蛋白水平明显降低,且 EP 方案患者的上述指标降低更显著,表明 EP 治疗方案对小细胞肺癌有较好的效果,

可能与其抑制上皮-间质转化分子 β -catenin 有关。

综上所述,EP 治疗方案对小细胞肺癌有较好的效果,可能与其抑制上皮-间质转化有关。

参考文献

- [1] 马进元,于鹏,祝毓琳,等.晚期或转移性非小细胞肺癌全身治疗进展[J].中国实用内科杂志,2013,33(S1):164-166.
- [2] 努尔兰·吐尔逊,周永,韩文广,等.MSCT 联合肿瘤标志物检查对中央型小细胞肺癌及非小细胞肺癌的鉴别诊断价值[J].临床放射学杂志,2016,35(5):711-716.
- [3] 王大权,徐利明,赵路军,等.诱导化疗无效的局限期小细胞肺癌可能不宜原方案同期放化疗[J].中国肺癌杂志,2016,19(12):871-878.
- [4] 焦丽敏,梁进,王琼,等.卵巢癌外周血循环肿瘤细胞水平及其与临床病理特征之间的关系[J].中国临床研究,2016,29(1):1-4.
- [5] 石磊,丛晓凤,杨雷,等.EP 方案序贯 IP 方案一线治疗广泛期小细胞肺癌的临床对比分析[J].癌症进展,2017,15(2):172-174.
- [6] 张爽,柳菁菁,程颖.小细胞肺癌个体化治疗进展[J].中国肿瘤临床,2017,44(12):571-576.
- [7] 曾丽,杨濡溪,王佳,等.小细胞肺癌组织中 LncRNA EXOC7 的表达及其与预后的关系[J].肿瘤,2017,37(3):269-274.
- [8] 周毅,姚远,杨剑文,等.上皮-间质转化调控蛋白在前列腺癌侵袭、转移中的作用及其临床预后诊断价值[J].华中科技大学学报(医学版),2017,46(4):397-403.
- [9] 陈晓红,黄俊花,赖宜段.上皮-间质转化标志物 E-cadherin, vimentin 在不同病理分期宫颈癌中的表达及意义[J].齐齐哈尔医学院学报,2016,37(25):3124-3126.
- [10] 陈震,郭燕.E-cadherin 和 Vimentin 在 OSCC 上皮-间质转化中的作用及表达[J].口腔医学研究,2016,32(8):857-860.
- [11] 刘志容,吴诚义.Snail 在乳腺癌中的表达及其与上皮-间质转化的关系[J].中国医药生物技术,2012,7(1):37-42.
- [12] 金槿,赵雨佳,章健,等.靶向 Wnt/ β -catenin 通路的溶瘤腺病毒携带抑癌基因 TSLC1 抑制肿瘤细胞增殖的研究[J].中国细胞生物学学报,2017,39(11):1407-1414.
- [13] JO V Y, SHOLL L M, KRANE J F, et al. CTNNB1/ β -catenin:涎腺基底细胞肿瘤鉴别标志物[J].临床与实验病理学杂志,2016,32(11):1269.
- [14] 娄丹,李延荣. β -Catenin 和 E-Cadherin 在食管鳞癌肿瘤芽殖中的表达及意义[J].基因组学与应用生物学,2017,36(4):1307-1311.
- [15] 童杨委,李汉林.增殖细胞核抗原、 β -连环蛋白与胃肿瘤病理因素及预后的关系[J].临床血液学杂志:输血与检验,2017,30(6):940-944.