

## TAM与VEGF在外周T细胞淋巴瘤非特指型中表达及临床意义

任旭升 王华庆 孟祥睿 钱正子 周世勇 张会来 邱立华 郝希山

**摘要** 目的:探讨肿瘤相关巨噬细胞(TAM)及血管内皮生长因子(VEGF)在外周T细胞淋巴瘤非特指型(PTCL-NOS)中的表达及临床意义。方法:采用免疫组织化学方法对60例PTCL-NOS患者肿瘤组织中的CD68和VEGF进行检测,15例正常人淋巴结组织为对照。结果:肿瘤组织中CD68阳性细胞平均含量为(56.5±18.6)个/高倍镜视野,而对照组为(12.4±6.2)个/高倍镜视野( $P<0.01$ ),肿瘤组织与对照组VEGF阳性表达率分别为78.3%和26.7%( $P<0.05$ )。TAM与骨髓侵犯、IPI评分及疗效相关( $P<0.05$ )。TAM高表达组和低表达组的2年总生存率(overall survival, OS)分别为23.6%和55.3%( $P<0.05$ )。VEGF的表达与肿瘤分期、骨髓侵犯和IPI评分相关( $P<0.05$ ),VEGF表达阳性组和阴性组的2年OS分别为22.9%和83.3%( $P<0.01$ )。单变量生存分析显示VEGF表达、TAM计数、肿瘤分期、IPI评分和疗效是独立的预后影响因素( $P<0.05$ )。多变量分析显示VEGF和疗效是独立的预后影响因素( $P<0.05$ )。结论:TAM和VEGF在PTCL-NOS中表达明显升高,单因素分析显示二者是PTCL-NOS的不良预后因素。多因素分析显示仅VEGF是独立的预后影响因素。

**关键词** 外周T细胞淋巴瘤 肿瘤相关巨噬细胞 血管内皮生长因子 临床意义

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.21.018

## Expression and Clinical Significance of Tumor-associated Macrophages and VEGF in Peripheral T-cell Lymphoma Not Otherwise Specified

Xusheng REN, Huaqing WANG, Xiangrui MENG, Zhengzi QIAN, Shiyong ZHOU, Huilai ZHANG, Lihua QIU, Xishan HAO

Correspondence to: Huaqing WANG; E-mail: huaqingw@163.com

Department of Lymphoma, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Tianjin City, Tianjin 300060, China

**Abstract Objective:** This work aims to detect the expression and to identify the clinical significance of tumor-associated macrophages (TAMs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified (PTCL-NOS). **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect CD68 and VEGF expressions in the tumor specimens of 60 cases with PTCL-NOS. A normal lymph node biopsy was used as the control sample. **Results:** The average content of the CD68-positive cells was 56.5±18.6 per high-power field (HPF) in the PTCL-NOS tissues and 12.4±6.2 per HPF in the control sample ( $P<0.01$ ). The VEGF-positive rates for the PTCL-NOS tissues and the control sample were 78.3% and 26.7% ( $P<0.05$ ), respectively. TAMs were significantly correlated to bone marrow invasion, IPI score, and treatment response ( $P<0.05$ ). The two-year overall survival (OS) was 23.6% and 55.3% in the groups with high-TAM- and low-TAM-expression, respectively ( $P<0.05$ ). VEGF expression was closely correlated to tumor staging, bone marrow invasion, and IPI score ( $P<0.05$ ). The two-year OS was 22.9% and 83.3% in the VEGF-positive and VEGF-negative groups, respectively ( $P<0.01$ ). A univariate survival analysis revealed that the VEGF expression, TAMs content, tumor staging, IPI score, and treatment response were the prognostic factors of patients with PTCL-NOS ( $P<0.05$ ). A multivariate Cox regression model showed that VEGF and treatment response were both independent OS predictors ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** TAMs and VEGF are overexpressed in PTCL-NOS. A univariate survival analysis reveals that TAMs and VEGF are both predictive factors for PTCL-NOS prognosis, and the multivariate survival analysis using Cox regression model data show that only VEGF is an independent predictive factor for OS.

**Keywords** Peripheral T-cell lymphoma; Tumor-associated macrophage; Vascular endothelial growth factor; Clinical significance

外周T细胞淋巴瘤非特指型(peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, PTCL-NOS)是外周T细胞淋巴瘤中最常见的一种类型,是一种在我国常见而欧美少见的恶性淋巴瘤类型<sup>[1]</sup>。PTCL-NOS具

有恶性程度高、预后差的特点<sup>[2]</sup>,目前尚无标准的治疗方案,预后指标亦参照弥漫性大B细胞淋巴瘤的IPI。与弥漫性大B细胞淋巴瘤相比,PTCL-NOS有很多不同的生物学特点,因此探讨IPI以外更适合于

作者单位:天津医科大学附属肿瘤医院淋巴瘤科,天津市肿瘤防治重点实验室,中美淋巴瘤血液诊治中心(天津市300060)

通信作者:王华庆 huaqingw@163.com

PTCL-NOS的预后预测指标无疑具有重要的临床意义。肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)是肿瘤微环境中的一种重要的炎症细胞,活化后的TAM通过分泌多种细胞因子和趋化因子促进肿瘤相关的血管生成、侵袭、浸润和转移<sup>[3]</sup>。TAM与多种人类实体瘤和血液系统恶性肿瘤预后不良相关<sup>[4-7]</sup>,而TAM与PTCL-NOS的预后是否相关尚不清楚。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是刺激血管生成最重要、最具特异性的调节因子<sup>[8]</sup>,在许多实体肿瘤中表达并与预后相关。研究亦显示VEGF及受体的表达与淋巴瘤的分类、分期、疗效及预后密切相关<sup>[9]</sup>。本研究对60例PTCL-NOS患者肿瘤组织中TAM和VEGF的表达情况进行检测,旨在探讨TAM和VEGF在PTCL-NOS中的表达及其临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

收集2002年1月至2008年1月在天津医科大学附属肿瘤医院收治、经病理学证实的60例PTCL-NOS患者的临床资料及组织标本。男性39例,女性21例;中位年龄42(14~74)岁,≤60岁为28例,>60岁为32例;按Ann Arbor分期法,I~II期12例,III~IV期48例;IPI评分0~2分(低危组)为24例,IPI评分3~5分(高危组)为36例;19例存在骨髓受累;所有患者接受了平均6(1~18)个周期的化疗;经过诱导化疗,有12例患者达到CR(20.0%),11例患者达到PR(18.3%),总体有效率(CR+PR)为38.3%,11例患者达到SD(18.3%),26例患者出现PD(43.4%);中位随访时间为33(2~72)个月,总体中位生存时间为19.2(1~60)个月;1、2、3年总体生存率分别为51.7%、38.3%、20.0%。为了显示CD68与VEGF在正常人淋巴结组织中表达的情况,随机收集15例正常人淋巴结组织为对照。符合伦理委员会认可。

### 1.2 方法

**1.2.1 检测方法** 采用免疫组织化学染色(S-P)方法。鼠抗人VEGF单克隆抗体、鼠抗人CD68单克隆抗体购自北京中杉金桥生物公司。操作严格按照说明书进行,抗原进行高压热修复5 min,已知阳性切片作为阳性对照,PBS代替一抗作为阴性对照。

**1.2.2 结果判断** 免疫组织化学结果采用半定量评分系统,在高倍镜(×400)下对每张切片随机选取5个视野,计数CD68表达阳性的巨噬细胞数目的平均值。VEGF阳性细胞染色定性标准为胞浆出现棕黄色细颗粒,以每张切片阳性细胞占细胞总数的百分比作为标准判断表达程度,阳性细胞数<10%为阴性,阳性细胞数≥10%为阳性。

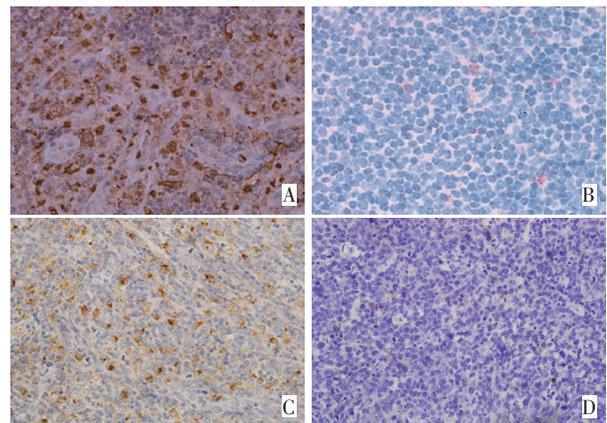
### 1.3 统计学方法

应用SPSS 17.0统计软件包进行统计分析。计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验。OS定义为从患者开始确诊至死亡的日期或末次随访时间。分别采用Kaplan-Meier曲线分析和Cox回归模型进行单因素和多因素生存分析,不同组间的差异采用Log rank检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CD68和VEGF在PTCL-NOS肿瘤组织中的表达

肿瘤组织中TAM表达明显升高( $P<0.01$ ),可见大量CD68阳性细胞浸润在肿瘤组织及基质组织中(图1A),CD68阳性细胞为(6~80)个/高倍镜视野,平均含量为(56.5±18.6)个/高倍镜视野,而正常对照组织中仅见少量CD68阳性细胞(图1B)。肿瘤组织中VEGF阳性表达率也明显升高( $P<0.05$ ),肿瘤细胞和基质细胞之中可见淡黄色到黄褐色结节,肿瘤内皮细胞中亦可见(图1C),阳性率为78.3%(47/60),而在正常淋巴结组织中未见明显表达(图1D),阳性率为26.7%(4/15)。



A: CD68(+)细胞在肿瘤组织中的表达; B: CD68(+)细胞在正常组织中的表达; C: VEGF在肿瘤组织中的表达; D: VEGF在正常组织中的表达

图1 CD68(+)细胞及VEGF在PTCL-NOS患者肿瘤组织及正常组织中的表达(S-P×400)

Figure 1 CD68 and VEGF immunohistochemical staining of PTCL-NOS and normal lymph node tissues (S-P×400)

### 2.2 TAM和VEGF与PTCL-NOS临床特点的关系

TAM计数与IPI评分、骨髓侵犯及疗效显著相关( $P<0.05$ ),但与患者年龄、性别及肿瘤分期无关( $P>0.05$ )。VEGF的表达与肿瘤分期、骨髓侵犯及IPI评分之间存在相关性( $P<0.05$ ),但与患者年龄、性别以及疗效无关( $P>0.05$ ,表1)。

### 2.3 TAM和VEGF与PTCL-NOS预后的关系

根据TAM表达水平进行分组,TAM计数>50个/高倍镜视野为高表达组,≤50个/高倍镜视野为低表

达组。TAM高表达组和低表达组的2年OS分别为23.6%和55.3% ( $P < 0.05$ , 图2), VEGF表达阳性组和阴性组的2年OS分别为22.9%和83.3% ( $P < 0.01$ , 图3)。单变量生存分析显示VEGF表达、TAM计数、肿瘤分期、IPI评分和疗效均为PTCL-NOS独立的预后影响因素 ( $P < 0.05$ , 表2)。多变量Cox回归模型结果显示VEGF和疗效为独立的预后影响因素 ( $P < 0.05$ , 表3)。

表1 TAM和VEGF的表达与临床特征的关系

Table 1 Correlation between TAMs and VEGF expressions and clinical characteristics

组别	例数	TAM平均含量 (个/高倍镜视野)	P	VEGF阳性 率(%)	P
年龄(岁)					
≤60	28	59.3 ± 18.9	0.784	76.2	0.920
>60	32	53.6 ± 15.3		79.8	
性别					
男	39	47.5 ± 18.8	0.442	79.5	0.690
女	21	53.4 ± 23.5		80.2	
IPI评分					
低危(0~2)	24	39.8 ± 20.0	0.028	60.2	0.001
高危(3~5)	36	60.2 ± 22.3		97.4	
肿瘤分期					
I~II	12	43.2 ± 22.9	0.120	24.5	0.001
III~IV	48	58.6 ± 24.3		89.6	
骨髓受累					
+	19	73.5 ± 22.8	0.034	94.5	0.001
-	41	42.8 ± 25.6		42.4	
治疗反应					
CR+PR	23	39.8 ± 18.2	0.001	73.4	0.120
NR	37	60.2 ± 23.5		87.2	

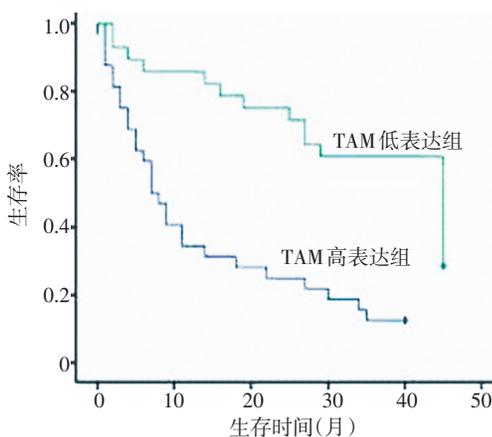


图2 TAM高表达组和低表达组生存曲线比较

Figure 2 Survival rate analysis among the groups with different TAM expressions

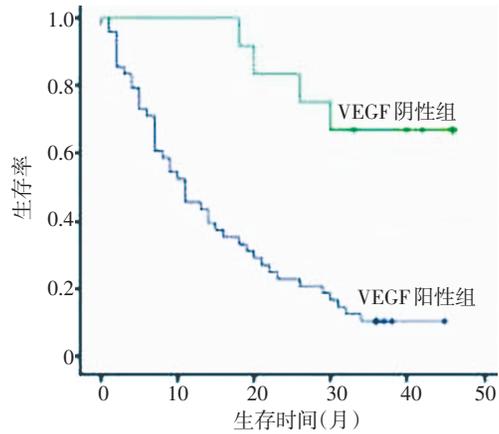


图3 VEGF阳性组和阴性组生存曲线比较分析

Figure 3 Survival rate analysis among the groups with different VEGF expressions

表2 PTCL-NOS患者预后影响因素的单因素分析

Table 2 Univariate survival analysis of prognostic factors for PTCL-NOS patients

因素	例数	P
年龄(岁)		
≤60	28	0.812
>60	32	
性别		
男	39	0.685
女	21	
肿瘤分期		
I~II	12	0.003
III~IV	48	
IPI评分		
低危	24	0.001
高危	36	
治疗反应		
CR+PR	23	0.001
NR	37	
骨髓受累		
有	19	0.615
无	41	
VEGF		
阳性	47	0.002
阴性	13	
CD68含量(个/高倍镜视野)		
>50	35	0.020
≤50	25	

表3 PTCL-NOS患者预后影响因素的多因素分析

Table 3 Multivariate survival analysis of prognostic factors for PTCL-NOS patients

项目	回归系数	标准误	Wald	P	风险比	95%CI
治疗反应	0.387	0.43	6.721	0.010	0.150	0.055 ~ 0.348
VEGF	1.089	0.32	18.336	0.001	0.112	0.035 ~ 0.610

### 3 讨论

PTCL-NOS是我国常见的淋巴瘤类型,恶性程度高,预后欠佳,目前尚无特异性的预后预测指标,探讨IPI以外更适合PTCL-NOS预后的预测指标具有重要的临床意义<sup>[10-11]</sup>。

TAM是肿瘤基质细胞中重要的细胞类型,研究发现TAM被IL-10、IL-4等信号激活后,参与调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)的分化与免疫抑制,此外,TAM还可以分泌多种生长因子(EGF、PDGF、HGF、EGFR及bFGF)来促进肿瘤血管生成、侵袭、浸润和转移<sup>[12]</sup>。Zheng等<sup>[13]</sup>发现TAM能与骨髓瘤细胞直接作用并降低半胱天冬酶依赖凋亡信号转导通路的活性,在骨髓瘤细胞生存与化疗耐药中起着至关重要的作用。研究证实,TAM与多种人类实体肿瘤和血液系统恶性肿瘤预后不良相关<sup>[4-7]</sup>,然而TAM与PTCL-NOS的预后是否相关尚不清楚。本研究发现,肿瘤组织中TAM的数量明显高于正常组织,提示TAM可能在PTCL-NOS的发生、发展中起一定的作用。同时还发现,TAM与骨髓侵犯、IPI评分及疗效相关,提示TAM不仅参与了原发肿瘤的发生过程,而且在远处转移、化疗耐药中起重要作用。根据肿瘤相关巨噬细胞的数量,本研究将患者分为TAM高表达组和低表达组,比较了两组的生存时间。结果发现,两组的生存曲线显示出了明显的不同( $P<0.05$ );TAM高表达组的1、2、3年生存率分别为36.9%、23.6%、11.8%,而TAM低表达组的1、2、3年生存率分别为71.6%、55.3%、27.5%。单变量分析TAM的表达水平是影响PTCL-NOS预后的一个影响因素,多因素分析TAM并非PTCL-NOS独立的预后因素。

本研究分析了VEGF在PTCL-NOS中的表达及与临床、预后的相关性,发现其在PTCL-NOS中亦高表达,并与肿瘤分期、骨髓侵犯、IPI评分及生存时间相关( $P<0.05$ )。根据多变量Cox回归分析显示:VEGF的表达可作为PTCL-NOS患者独立的预后影响因素,这与Jørgensen等<sup>[14]</sup>研究结果一致,提示常规化疗联合VEGF靶向治疗可能会取得更好的疗效,并有可能改变PTCL-NOS尚无标准治疗方案、疗效欠佳的窘境。在肿瘤微环境中(主要是厌氧环境),TAM被乏氧诱导因子-1(HIF-1)激活后能够分泌VEGF,进而促进血管生成并促进肿瘤侵犯和转移,而肿瘤细胞能通过分泌VEGF促进单核细胞/巨噬细胞的聚集。本研究在肿瘤细胞和巨噬细胞中均发现了一些棕色的颗粒,提示肿瘤细胞和TAM均表达VEGF,TAM与VEGF相互作用,共同影响肿瘤生物学行为。同时,应用散点图检测了TAM计数和VEGF表达之间的联系,结果显示二者之间呈正相关。

综上所述,TAM和VEGF在PTCL-NOS中有相当高的表达率,其表达又与PTCL-NOS临床病例特征及预后相关,TAM和VEGF表达的检测以及相应靶向治疗药物的开发,对于提高PTCL-NOS患者治疗疗效和改善预后具有重要的指导意义。

#### 参考文献

- 1 Savage KJ. Update: peripheral T-cell lymphomas[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2011, 6(4):222-230.
- 2 Foss FM, Zinzani PL, Vose JM, et al. Peripheral T-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2011, 117(25):6756-6767.
- 3 Mantovani A, Germano G, Marchesi F, et al. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(9):2522-2525.
- 4 Sánchez-Espiridión B, Martín-Moreno AM, Montalbán C, et al. Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma[J]. *Haematologica*, 2012, 97(7):1080-1084.
- 5 Cai QC, Liao H, Lin SX, et al. High expression of tumor-infiltrating macrophages correlates with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(4):2317-2322.
- 6 Zaki MA, Wada N, Ikeda J, et al. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma[J]. *Virchows Arch*, 2011, 459(4):361-366.
- 7 Fujiwara T, Fukushi J, Yamamoto S, et al. Macrophage infiltration predicts a poor prognosis for human ewing sarcoma[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(3):1157-1170.
- 8 Maae E, Olsen DA, Steffensen KD, et al. Prognostic impact of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor A in patients with breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 133(1):257-265.
- 9 Alshenawy HA. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, basic fibroblastic growth factor, and microvessel density and their relation to cell proliferation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2010, 14(5):321-327.
- 10 Piccaluga PP, Agostinelli C, Gazzola A, et al. Prognostic markers in peripheral T-cell lymphoma[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2010, 5(4):222-228.
- 11 Went P, Agostinelli C, Gallamini A, et al. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(16):2472-2479.
- 12 Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumor-associated macrophages as a prototypic type II polarized phagocyte population: role in tumor progression[J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(11):1660-1667.
- 13 Zheng Y, Cai Z, Wang S, et al. Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis[J]. *Blood*, 2009, 114(17):3625-3628.
- 14 Jørgensen JM, Sørensen FB, Bendix K, et al. Expression level, tissue distribution pattern, and prognostic impact of vascular endothelial growth factors VEGF and VEGF-C and their receptors Flt-1, KDR, and Flt-4 in different subtypes of non-Hodgkin lymphomas[J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(10):1647-1660.

(2012-05-17收稿)(2012-09-05修回)

(本文编辑:张佶)