

研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2022.10.009

监测外周血中性粒细胞胞外诱捕网含量对食管癌远处转移的预测价值

林杰 钱佶 蒋国军 陈明治

【摘要】 目的 评价中性粒细胞胞外诱捕网 (NET) 生成对食管癌远处转移的预测价值。方法 前瞻性纳入食管癌患者 (远处转移 25 例、非远处转移 35 例) 和 30 名健康志愿者, 检测其外周血 NET 含量并进行分析。结果 食管癌远处转移者外周血 NET 含量高于非远处转移者和健康志愿者。外周血 NET 含量升高是食管癌远处转移的独立危险因素 (OR=1049.592, 95%CI: 24.313~45310.558)。监测 NET 含量可预测食管癌的远处转移 (AUC=0.37, 95%CI: 0.737~0.937), 其预测价值高于中性粒细胞与淋巴细胞比值 (NLR); NET 联合 NLR 可以提高 NET 预测食管癌远处转移的灵敏度和特异度。结论 NET 生成是食管癌远处转移的高危因素, 监测外周血 NET 的含量可预测食管癌远处转移, NET 联合 NLR 能够提高 NET 的预测价值。

【关键词】 食管癌; 远处转移; 中性粒细胞胞外诱捕网; 中性粒细胞与淋巴细胞比值

Value of neutrophil extracellular trap formation in predicting esophageal cancer distant metastasis Lin Jie, Qian Ji, Jiang Guojun, Chen Mingzhi. Department of Cardiac and Thoracic Surgery, the Affiliated Yixing Hospital of Jiangsu University, Wuxi 214299, China

Corresponding author, Chen Mingzhi, E-mail: staff1229@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the value of neutrophil extracellular trap (NET) formation in predicting esophageal cancer distant metastasis. **Methods** A total of 60 patients diagnosed with esophageal cancer (25 cases of distant metastasis and 35 cases of non-distant metastasis) and 30 healthy volunteers were included in this prospective study. Peripheral blood was collected to detect the level of NET. **Results** The level of NET in the peripheral blood of patients with esophageal cancer distant metastasis was higher than those of their counterparts without distant metastasis and healthy volunteers. Logistic regression analysis showed that increased peripheral blood NET content was an independent risk factor for esophageal cancer distant metastasis (OR=1049.592, 95%CI: 24.313-45310.558). Monitoring NET content could predict distant metastasis of esophageal cancer (AUC=0.37, 95%CI: 0.737-0.937), and its predictive value was higher than that of the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR). However, the combination of NET and NLR improved the sensitivity and specificity of NETs in predicting esophageal cancer distant metastasis. **Conclusions** NET formation is a high risk factor for distant metastasis of esophageal cancer. Monitoring NET in the peripheral blood yields high predictive value for esophageal cancer distant metastasis. NETs combined with NLR can improve the predictive value of NET.

【Key words】 Esophageal cancer; Distant metastasis; Neutrophil extracellular trap; Neutrophil-to-lymphocyte ratio

食管癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤之一, 发病率和病死率均居高不下^[1,3]。转移是食管癌高病死率的主要原因之一^[4]。中性粒细胞和淋巴细胞是机体含量最多的先天性免疫细胞, 与食管癌患者的临床预后密切相关^[5]。近年来的研究表明中性粒细胞胞外诱捕网 (NET) 在肿瘤的局部生长和远处转移过程中扮演了重要角色^[6]。Zhang 等^[7]的研

究证实术前肿瘤中 NET 含量的增加与食管癌患者的不良预后密切相关。但尚未见 NET 生成与食管癌远处转移的研究报道, 因此, 本研究将检测食管癌患者外周血中 NET 含量, 采用 logistic 回归分析和受试者操作特征 (ROC) 曲线评价 NET 生成的相关指标对食管癌远处转移的预测价值, 旨在为食管癌的防治提供新视角。

对象与方法

一、研究对象

前瞻性选取2020年1月至2021年12月在本院就诊的60例中晚期食管癌患者为研究对象,根据是否发生远处转移将其分为非远处转移组(35例)和远处转移组(25例)。纳入标准:①成年人(年龄 ≥ 18 周岁);②经纤维胃镜及病理组织学检查确诊食管癌。排除标准:①合并严重血液疾病;②合并其他恶性肿瘤;③合并感染;④合并严重的难以控制的糖尿病。匹配30名同期在本院进行体检的健康志愿者作为对照组。本研究获得本院伦理委员会批准(意见号:伦申2022文112)。所有入组者均对本研究知情同意,并签署知情同意书。3组的基本资料具可比性,见表1。

二、双抗体夹心法检测外周血中NET[髓过氧化物酶(MPO)-DNA]含量

采用EDTA抗凝管采集患者外周静脉血2 mL,在室温条件下 $600 \times g$ 离心10 min,收集上清液,采用双抗体夹心法检测NET含量。具体方法如下:将抗MPO单克隆抗体(购自Merck Millipore Corp公司)包被于96孔培养板中,置于4℃冰箱孵育过夜。用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗洗涤3次后加入5%牛血清白蛋白(BSA),室温封闭2 h。用PBS洗涤后加入上述上清液标本,室温孵育2 h。再次洗涤3次后加入辣根过氧化物酶偶联的抗DNA单克隆抗体(DNA-HRP,购自Roche Diagnostics的细胞凋亡ELISA检测试剂盒),室温孵育2 h。洗涤3次,加入二铵盐,避光室温孵育1 h。在多功能酶标仪中检测吸光度(OD_{405}),用其表示外周血NET含量。

三、中性粒细胞与淋巴细胞比值(NLR)

收集3组的中性粒细胞计数和淋巴细胞计数,计算NLR,公式为 $NLR = \text{中性粒细胞计数} / \text{淋巴细胞计数}$ 。

四、统计学处理

采用SPSS 20.0进行数据分析,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验(2组)或单因素方差分析(3组及以上);3组以上数据间的两两比较采用LSD法。非正态分布计量资料采用中位数(四分位数间距)表示,组间比较采用非参数检验。计数资料采用例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用Spearman相关分析探讨外周血NET含量与食管癌转移的相关性,采用Pearson相关分析探讨NET含量与NLR的相关性;采用logistic回归分析外周血NET含量是否为食管癌远处转移的危险因素;采用ROC曲线评估外周血NET含量对食管癌远处转移的预测价值,并计算曲线下面积(AUC)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一、外周血NET含量与食管癌远处转移密切相关

与对照组相比,食管癌患者外周血NET(MPO-DNA)含量和NLR均升高,且远处转移组高于非远处转移组(NET: $F = 61.486$, $P < 0.001$; NLR: $F = 38.123$, $P < 0.001$),见表2。

Spearman相关分析结果显示:外周血中NET含量($r = 0.770$, $P < 0.001$)和NLR($r = 0.6943$, $P < 0.001$)均与食管癌远处转移密切相关。Pearson

表1 2组食管癌患者与健康志愿者基本资料比较

项目	对照组 (30例)	非远处转移组 (35例)	远处转移组 (25例)	F/χ^2 值	P 值
年龄/岁	66.70 \pm 6.04	67.37 \pm 6.81	66.52 \pm 6.67	0.148	0.863
性别/(男/女,例)	20/10	22/13	18/7	0.549	0.760
吸烟/(有/无,例)	15/15	20/15	16/9	1.094	0.579
酗酒/(有/无,例)	21/9	28/7	20/5	1.118	0.572
高血压/(有/无,例)	12/18	18/17	10/15	1.131	0.568
糖尿病/(有/无,例)	18/12	22/13	17/8	0.381	0.826
心脏病/(有/无,例)	14/16	15/20	13/12	0.490	0.783
肿瘤类型/(鳞癌/腺癌,例)	-	29/6	20/5	0.080	0.778
TNM分期/(II~III期/IV期,例)	-	35/0	0/25	60.000	< 0.001

相关分析结果显示：食管癌患者外周血 NET 含量和 NLR 亦密切相关 ($r = 0.404$, $P = 0.001$)。

二、外周血 NET 生成是食管癌远处转移的独立危险因素

以食管癌是否远处转移为因变量，以外周血 NET 含量和 NLR 为自变量进行多因素 logistic 回归分析，结果显示：患者外周血 NET 含量升高是食管癌发生远处转移的独立危险因素。见表 3。

三、外周血 NET 生成对食管癌远处转移的预测价值

ROC 曲线分析结果显示：外周血 NET 含量预测食管癌远处转移的 AUC 大于 NLR ($Z = 1.979$, $P = 0.048$)；NET 联合 NLR 能够提高预测食管癌远处转移的特异度和灵敏度。见表 4 和图 1。

四、食管癌远处转移的亚组分析

根据 ROC 曲线分析的 NET 和 NLR 的截断值将食管癌患者分为 2 组，分别对 2 组患者远处转移率进行分析，结果显示：外周血 NET 含量 ≥ 1.13 的食管癌患者远处转移率高于 NET 含量 < 1.13 患者 ($P < 0.001$)；NLR ≥ 2.18 的食管癌患者远处转移率高于 NLR < 2.18 患者 ($P < 0.05$)。见表 5。

讨 论

随着对肿瘤发生和发展规律的深入研究，学

表 2 不同组研究对象外周血 NET 含量及相关中性粒细胞指标的差异

组 别	例数	NET 含量	NLR 值
对照组	30	0.62 ± 0.23	1.44 ± 0.45
非远处转移组	35	0.97 ± 0.19	2.15 ± 0.49
远处转移组	25	1.25 ± 0.22 ^{ab}	2.38 ± 0.26 ^{ac}
F 值		61.486	38.123
P 值		<0.001	<0.001

注：与对照组相比，^a $P < 0.001$ ；与非远处转移组相比，^b $P < 0.001$ ；与非远处转移组相比，^c $P = 0.039$ 。

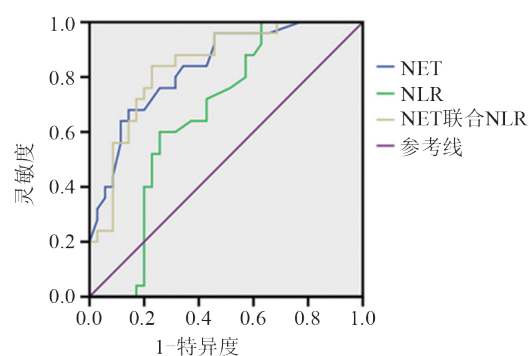


图 1 ROC 曲线评价外周血 NET 含量对食管癌远处转移的预测价值

者们发现全身炎症反应在肿瘤的发生和发展中扮演着重要角色^[8]。中性粒细胞可以分泌血管生长因子，促进肿瘤血管生成，加快肿瘤生长速度^[9]。淋巴细胞是机体抗肿瘤的重要细胞之一，参与肿瘤细胞的凋亡过程^[10]。NLR 反映机体炎症反应和抗炎反应之间的平衡，是预测炎症性疾病预后的重

表 3 食管癌转移患者危险因素的多因素 logistic 回归分析

变 量	B 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95%CI
外周血 NET 含量	6.956	1.921	13.112	< 0.001	1049.592	24.313~45310.558
NLR	1.305	0.776	2.833	0.092	3.689	0.807~16.868
常量	-11.041	3.006	13.488	-	-	-

表 4 ROC 曲线分析结果

变 量	截断值	AUC 值	P 值	95%CI	灵敏度 / %	特异度 / %
外周血 NET 含量	1.13	0.837	< 0.001	0.737~0.937	76.00	74.29
NLR	2.18	0.664	0.021	0.525~0.803	60.00	71.43
NET 联合 NLR	-	0.843	< 0.001	0.744~0.943	84.00	77.14

表 5 食管癌远处转移的亚组分析

项 目	总例数	转移例数	转移率 / %	χ^2 值	P 值
外周血 NET 含量 < 1.13	32	6	18.75	14.816	< 0.001
外周血 NET 含量 ≥ 1.13	28	19	67.86		
NLR < 2.18	35	10	28.57	5.927	0.015
NLR ≥ 2.18	25	15	60.00		

要指标^[11]。近年来的研究亦表明 NLR 与食管癌临床病理特征及预后密切相关, 可以作为食管癌和重症胰腺炎患者预后的评估指标^[5,12-15]。本研究亦提示术前外周血 NLR \geq 2.18 的食管癌患者发生转移的风险高于 NLR $<$ 2.18 患者。但 NLR 预测食管癌的 AUC、灵敏度和特异度均不佳, 不适宜用于临床诊断。分析其原因主要为中性粒细胞和淋巴细胞计数的影响因素众多, 因此不能真实反映肿瘤的转移情况。

NET 是中性粒细胞捕杀入侵病原微生物的重要手段, 然而近年来的研究显示 NET 与多种肿瘤的发生和发展密切相关。Ho-Tin-Noé 等 (2009 年) 在肺癌小鼠体内发现肿瘤组织中存在肿瘤相关的中性粒细胞和细胞外染色质的积聚, 提示 NET 在肿瘤组织中存在的可能^[16]。Berger-Achituv 等 (2013 年) 首次观察到肿瘤组织内 NET 生成量的增加与尤因肉瘤患者不良预后有关^[17]。随后, 越来越多的证据表明 NET 通过促进肿瘤细胞离开原发部位、降解细胞外基质、捕获循环中的肿瘤细胞、诱导上皮间质化和促进血管生成来影响肿瘤的远处转移^[18]。Zhang 等 (2020 年) 的研究证实了术前肿瘤组织中 NET 含量的增加与食管癌患者不良预后密切相关^[7]。但目前尚不清楚 NET 生成在食管癌转移中的作用。

本研究显示, 食管癌患者外周血 NET 含量增加, 且发生转移患者外周血 NET 含量高于未转移患者。进一步研究显示外周血 NET 生成是食管癌远处转移的独立危险因素, 检测其含量能够预测食管癌转移的发生, 且其诊断价值优于 NLR; 联合两者可以提高诊断的灵敏度和特异度。分析其原因主要考虑以下 2 个方面: 首先, 食管癌患者体内会形成一定的肿瘤微环境, 大量的中性粒细胞被招募进入肿瘤微环境中, 在多种因素刺激下形成 NET, NET 通过与肿瘤细胞的相互作用促进肿瘤细胞的转移。其次, 肿瘤细胞所产生的各种因子作用于骨髓造血系统, 导致外周血中性粒细胞计数显著增加。

综上所述, 本研究证实了 NET 生成是食管癌转移的危险因素, 检测外周血 NET 含量能够预测食管癌转移, 联合 NLR 能够提高 NET 的预测价值。但本研究是单中心的小样本研究, 病例数较少, 其结果需要多中心大样本的研究来进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] 赵学科, 徐瑞华, 雷玲玲, 等. 食管癌高发区无症状居民食管癌前病变 36a (1986-2021) 随访转归. *郑州大学学报 (医学版)*, 2022, 57 (1): 6-9.
- [3] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.
- [4] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135 (5): 584-590.
- [5] 郑森中, 陈魏, 牟吉, 等. 术前系统免疫炎症指数和中性粒细胞/淋巴细胞比值与食管癌临床病理特征及预后的关系. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29 (7): 818-822.
- [6] Yang L, Liu Q, Zhang X, et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature*, 2020, 583 (7814): 133-138.
- [7] Zhang H, Lv H, Weng M, et al. Preoperative leukocytosis is associated with increased tumor-infiltrating neutrophil extracellular traps and worse outcomes in esophageal cancer. *Ann Transl Med*, 2020, 8 (7): 441.
- [8] Franciosi M L M, Carmo T I T D, Zanini D, et al. Inflammatory profile in cervical cancer: influence of purinergic signaling and possible therapeutic targets. *Inflamm Res*, 2022, 71 (5): 555-564.
- [9] Poto R, Cristinziano L, Modestino L, et al. Neutrophil extracellular traps, angiogenesis and cancer. *Biomedicines*, 2022, 10 (2): 431.
- [10] Calvo V, Izquierdo M. T lymphocyte and CAR-T cell-derived extracellular vesicles and their applications in cancer therapy. *Cells*, 2022, 11 (5): 790.
- [11] 周双炉, 常玲, 邢芳芳. PCT、NLR、N/LPR 对重症急性胰腺炎并发急性肾损伤的预测价值. *新医学*, 2022, 53 (2): 133-137.
- [12] Vartolomei M D, Porav-Hodade D, Ferro M, et al. Prognostic role of pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC): a systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol Semin Orig Investig*, 2018, 36 (9): 389-399.
- [13] 叶小龙, 魏波, 黄勇, 等. 术前中性粒细胞淋巴细胞比率和红细胞分布宽度对胃肠道间质瘤患者预后的预测价值. *新医学*, 2020, 51 (1): 27-32.
- [14] Wang J, Zhang X, Tian J, et al. Predictive values of systemic inflammatory responses index in early neurological deterioration in patients with acute ischemic stroke. *J Integr Neurosci*, 2022, 21 (3): 94.
- [15] 田界勇, 徐广文, 熊燃, 等. 术前中性粒细胞与淋巴细胞比

在食管鳞癌中的预后意义. 中山大学学报(医学科学版), 2021, 42(3): 462-467.

- [16] Ho-Tin-Noé B, Carbo C, Demers M, et al. Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am J Pathol*, 2009, 175(4): 1699-1708.
- [17] Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed U A, et al. A proposed

role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front Immunol*, 2013, 4: 48.

- [18] 徐亦鸣, 应可净. 中性粒细胞胞外诱捕网与肿瘤相关研究进展. *浙江大学学报(医学版)*, 2020, 49(1): 107-112.

(收稿日期: 2022-04-22)

(本文编辑: 洪悦民)

