

血管内皮生长因子作为结直肠癌新生血管标志的临床价值

李杨, 李大林

【摘要】

目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)在结直肠癌组织中的表达及其作为肿瘤新生血管标志的临床价值。

方法 采用免疫人 VEGF 单克隆抗体及鼠抗人因子Ⅷ相关抗原(F-8 RAg)单克隆抗体,通过免疫组化技术对48例结直肠癌手术切除的癌组织及癌旁正常组织(对照组织)中 VEGF 和 F-8 RAg 的表达进行检测。

结果 结直肠癌组织 VEGF 表达阳性率为 62.5% (30/48), 对照组为 16.7% (8/48), $\chi^2=64.352$, $P<0.01$ 。结直肠癌组织 F-8 RAg 标记的 MVD 为 100.9 ± 16.0 , 对照组为 46.8 ± 11.9 , $t=18.351$, $P<0.01$ 。VEGF 的表达与大肠癌的淋巴结转移 ($P<0.01$)、远处转移 ($P<0.05$) 及临床分期有关 ($P=0.01$); 而 F-8 RAg 标记的 MVD 与大肠癌的淋巴结转移、远处转移及临床分期无明显相关 ($P>0.05$)。VEGF 在结直肠癌组织的表达与 F-8 RAg 的表达无相关性 ($P>0.05$)。

结论 VEGF 在结直肠癌组织新生血管有良好表达, 可以作为结直肠癌新生血管有价值的标志。

【关键词】 血管内皮生长因子类; 结直肠肿瘤; 腺癌; 肿瘤标记, 生物学

中国医药生物技术, 2006, 1(1):42-45
www.cmbp.net.cn

研究发现, 肿瘤的生长和转移依赖于新生血管的形成^[1]。血管内皮生长因子(VEGF)对肿瘤新生血管的生成起决定性作用^[2]。肿瘤检测的标志从肿瘤细胞表面分子进展到与肿瘤发生、发展相关的领域, 如血管新生等; 对于肿瘤的治疗将从针对肿瘤细胞扩展到肿瘤的新生血管。本研究旨在探讨 VEGF 作为肿瘤新生血管标志在结直肠癌的表达及其临床意义。因子Ⅷ相关抗原(F-8 RAg)是一类广泛存在血管内皮细胞上的标志, 大多数研究者在检测肿瘤新生血管的微血管密度时一般采用 F-8 RAg 为血管标志, 它最初被认为是血管内皮细胞的“金标志”, 所以本研究以 F-8 RAg 的表达作为对照研究, 来验证 VEGF 作为肿瘤新生血管标志的价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2004 年 7 月至 2005 年 3 月我院 48 例结直肠癌(结肠癌 20 例, 直肠癌 28 例)患者手术切除的癌组织及癌旁正常组织(距癌组织 10~15 cm)。48 例患者中男性 23 例, 女性 25 例; 年龄 38~84 岁, 平均 63.4 岁。所有患者的癌标本均经组织病理学检查诊断为腺癌, 有淋巴结转移的 31 例, 肝转移 7 例, 肺转移 2 例, 癌组织侵及膀胱及输尿管各 2 例, 侵及子宫、胃及小肠系膜各 1 例, 癌组织广泛侵及周围组织 2 例; Dukes A 期病人 1 例、B 期 16 例、C 期 13 例、D 期 18 例。

1.2 实验材料

1.2.1 主要试剂 免疫人 VEGF 单克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品, 鼠抗人 F-8 RAg 单克隆抗体为丹麦 Dako 公司产品。

1.2.2 标本处理 所有标本均在手术切除后 2 h 内收集于无菌冷冻管中, 置液氮罐内保存。冷冻组织作 5 μm 连续切片。

1.3 方法

采用 SP 法对癌组织及癌旁正常组织冷冻切片进行免疫人 VEGF 单克隆抗体及鼠抗人 F-8 RAg 单克隆抗体免疫组化染色。

1) VEGF 表达: 阳性表现为细胞质或细胞膜出现棕黄色细颗粒。在 40 倍镜下观察全部视野, 选取 5 个血管丰富的视野, 计数每张切片中阳性细胞数占总细胞数的百分比, 然后求其均值。所得数值为单位面积中细胞数或血管数目的相对值。阳性细胞数 $<10\%$ 为阴性, 阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性。

2) F-8 RAg 表达: 阳性表现为细胞质或细胞膜出现棕黄色或棕褐色颗粒。将染成棕黄色或棕褐色的内皮细胞或细胞簇作为一条微血管计数, 这些血管之间必须要有清楚的分界, 是否形成明显的管

作者单位: 266071 青岛市立医疗集团东院普外科

通讯作者: 李大林, Email: lidlqd@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-05

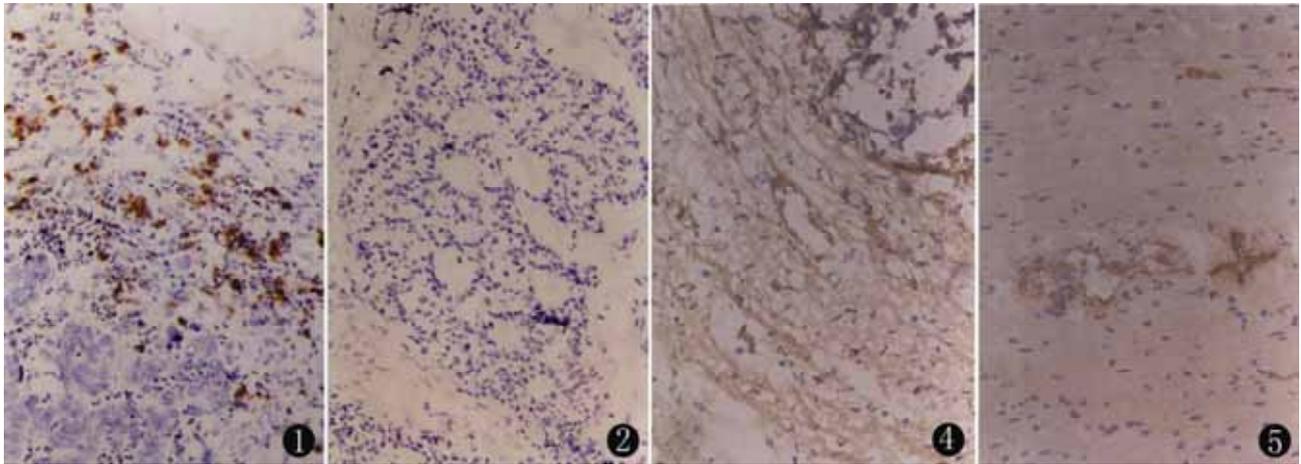


图1 结肠癌组织中 VEGF 的表达, 阳性内皮细胞呈条索状和团簇状, SP 染色 $\times 200$ 图2 癌旁正常组织 VEGF 染色呈阴性, SP 染色 $\times 200$ 图4 癌组织中 F-8 RAg 的表达, 阳性内皮细胞呈条索状和团簇状, SP 染色 $\times 200$ 图5 癌旁正常组织中 F-8 RAg 的表达, 阳性内皮细胞呈团簇状, SP 染色 $\times 200$

Figure 1 Expression of VEGF in colorectal cancer. VEGF-positive epithelial cells arranged in cords or clusters (SP staining, original magnification $\times 200$) **Figure 2** No expression of VEGF in normal adjacent tissues of the colorectal cancer (SP staining, original magnification $\times 200$) **Figure 4** Expression of FVIII-rAg in colorectal cancer. FVIII-rAg-positive epithelial cells arranged in cords or clusters (SP staining, original magnification $\times 200$) **Figure 5** Expression of FVIII-rAg in normal adjacent tissues of colorectal cancer. FVIII-rAg-positive epithelial cells arranged in cords or clusters (SP staining, original magnification $\times 200$)

腔、腔内有无红细胞存在不能成为判断标准。按 Weidner 等^[3]的微血管计数方法计数其微血管密度 (MVD)。在 40 倍镜下观察全部视野, 选取 5 个血管丰富的视野, 即棕黄色密度最高区域, 于 100 倍镜下用北航 CMIAS 图像分析系统对染色阳性血管进行密度定标, 由计算机自动求和并取平均值。分析 VEGF 表达与 F-8 RAg 标记的 MVD 之间的相关关系, 以及 VEGF 表达、F-8 RAg 标记的 MVD 与各临床病理因素之间的相互关系。

1.4 统计学处理

癌组织与癌旁正常组织 VEGF 表达的比较采用配对计数资料 χ^2 检验, MVD 的比较采用配对样本 t 检验; VEGF 表达与 F-8 RAg 标记的 MVD 之间关系的分析采用 Pearson 相关分析方法; VEGF 表达、F-8 RAg 标记的 MVD 与各临床病理因素之间关系的分析采用完全随机设计资料单因素方差分析方法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有统计数据应用 SPSS 11.0 软件进行处理。

2 结果

2.1 VEGF 表达及其影响因素

48 例患者中癌组织 VEGF 表达阳性 (图 1) 者 30 例, 阳性率为 62.5%; 癌旁正常组织 VEGF 表达

多数呈阴性 (图 2), 阳性者仅 8 例, 阳性率为 16.7%。癌组织与癌旁正常组织比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=64.352, P < 0.01$)。相关分析表明, VEGF 表达与 F-8 RAg 标记的 MVD 之间无明显相关关系 ($r=0.232, P=0.112$) (图 3)。

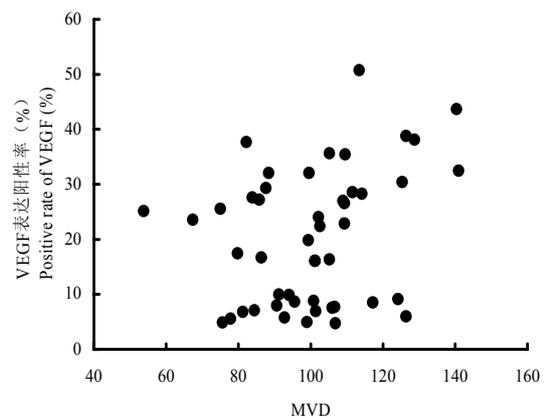


图3 VEGF 表达与 F-8 RAg 标记的 MVD 相关性散点图 **Figure 3** Correlation between the expression of VEGF and density of microvessels (MVD) labeled with FVIII-rAg

方差分析表明, VEGF 表达与淋巴结转移、远处转移及 Dukes 分期等临床病理因素有关 (表 1), 与患者的性别、年龄及肿瘤分化程度无明显相关。

表1 结直肠癌组织 VEGF 表达及 MVD
与肿瘤病理因素的关系

Table 1 Relationship of VEGF expression and MVD
in colorectal cancer with pathological characteristics

病理因素 Pathological characteristic	VEGF	F-8 RAg MVD
淋巴结转移 Lymph-metastasis		
F 值 F value	12.665	3.645
P 值 P value	0.001	0.062
远处转移 distant-metastasis		
F 值 F value	4.718	3.370
P 值 P value	0.035	0.063
Dukes 分期 Dukes staging		
F 值 F value	4.279	1.937
P 值 P value	0.010	0.138

注: 样本间的比较采用方差分析

Note: ANOVA employed in the contrast.

2.2 鼠抗人 F-8 RAg 抗体染色结果分析

48 例患者的癌组织切片中, F-8 RAg 染色阳性的血管具有明显的管腔, 许多含有多层平滑肌成分的厚壁大腔血管内皮细胞也有着色(图4); 在癌旁正常组织的血管内皮 F-8 RAg 也有良好表达(图5)。

以 F-8 RAg 抗体作为新生血管标志在癌组织测得的 MVD (100.9 ± 16.0) 明显高于癌旁正常组织 (46.8 ± 11.9), 差异具有统计学意义 ($t=18.351$, $P<0.01$)。

方差分析表明, F-8 RAg 标记的 MVD 与患者的性别、年龄和肿瘤分化程度、淋巴结转移、远处转移及 Dukes 分期均无明显相关 ($P>0.05$) (表1)。

3 讨论

20 世纪 80 年代以来, 国内外对肿瘤标志进行了广泛研究, 但迄今尚未发现一种敏感性与特异性均令人满意的与消化道肿瘤有关的标志。随着基因工程抗体研究的迅速发展, 单克隆抗体得到广泛应用。近年来的进展主要表现在两个方面, 一是检测的标志从肿瘤细胞表面分子进展到与肿瘤发生、发展相关的领域, 如血管新生等相关的新标志; 另一方面是用于发现微小残留肿瘤灶、鉴别诊断和转移癌灶的定位。与肿瘤有关的血管新生及抗肿瘤血管生成治疗引起临床肿瘤学界的极大兴趣和关注。

目前普遍认为, 肿瘤的生长、转移依赖新生血管的生成, 丰富的血管可持续不断地向肿瘤提供营养, 促进肿瘤细胞的生长; 新生血管管壁薄弱, 基底膜不健全, 故肿瘤细胞容易侵入微血管而发生转移。Josko 等^[4]的实验证实 VEGF 在肿瘤内及肿瘤周

围诱导新生血管的形成, 并且在到达靶器官后通过促进增生而增强癌细胞的转移能力。VEGF 是一种与肿瘤转移和预后有关的分子^[5]。

Ishigami 等^[6]对 60 例大肠癌患者的肿瘤组织和无瘤组织的 VEGF 表达比值进行研究, 结果表明 VEGF 表达比值与肿瘤的浸润深度 ($P=0.046$)、肝转移发生率 ($P<0.01$) 及淋巴结转移率 ($P=0.036$) 明显相关, VEGF mRNA 过表达的患者预后较差, 认为 VEGF 在肿瘤组织及无瘤组织内的表达比值可以作为预测大肠癌患者预后的一种独立的标志。

F-8 RAg 对血管计数意义非常大^[7], 但有报道认为, F-8 RAg 抗体虽然与大血管内皮细胞结合良好, 但在许多组织中, 这些抗体却不能与其中的毛细血管内皮细胞相结合^[8]。因此, F-8 RAg 在肿瘤新生血管研究中的适用性大大降低, 缺乏特异性。尽管 F-8 RAg 最初被认为是内皮细胞的“金标志”, 但大量的实验证明, F-8 RAg 只局限于某些特定的血管, 即内皮细胞已完全成熟的血管。这恰恰限制了 F-8 RAg 在恶性肿瘤组织内新生血管研究中的应用。

本研究中 48 例大肠癌患者癌组织标本中 VEGF 和 F-8 RAg 的表达均明显高于癌旁正常组织, 差异均具有统计学意义 ($P<0.01$), 但只有 VEGF 的表达与肿瘤的淋巴结的转移、肿瘤的远处转移及临床 Dukes 分期有关 ($P<0.01$); VEGF 的表达与 F-8 RAg 标记的 MVD 无明显相关性 ($P=0.112$)。研究结果提示, VEGF 可以作为大肠癌新生血管的标志, 具有重要的临床应用价值。

可以推测应用 VEGF 单克隆抗体进行抗肿瘤血管生成治疗的可能性, 肿瘤组织会因新生血管内皮细胞形成受到抑制、得不到足够的养分而致生长缓慢、停止甚至发生坏死, 从而达到治疗的目的。若将 VEGF 单克隆抗体与化疗药物进行偶联, 可同时针对肿瘤细胞及肿瘤新生血管发挥作用, 并增强化疗对肿瘤细胞的杀伤作用, 减少化疗药物对人体的副作用; 若将 VEGF 单克隆抗体与放射性核素进行偶联, 使放射性物质特异性地定位于含有大量新生血管的肿瘤组织, 则对于肿瘤的诊断、有无转移及肿瘤术后复发的监测, 具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] Li C, Guo B, Bernabeu C, et al. Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD105. *Microsc Res Tech*, 2001, 52(4):437-449.
- [2] Zachary I. Vascular endothelial growth factor. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998, 30(11):1169-1174.

- [3] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic factor in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(24):1875-1887.
- [4] Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit*, 2000, 6(5):1047-1052.
- [5] Ariei S, Mori A, Uchida S, et al. Implication of vascular endothelial growth factor in the development and metastasis of human cancers. *Hum Cell*, 1999, 12(1):25-30.
- [6] Ishigami SI, Ariei S, Furutani M, et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer*, 1998, 78(10):1379-1384.
- [7] Abdalla SA, Behzad F, Bsharah S, et al. Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours. *Oncol Rep*, 1999, 6(4): 839-842.
- [8] Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, et al. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery*, 2002, 131(Suppl 1):109-113.

Clinical value of vascular endothelial growth factor as a marker of angiogenesis in colorectal cancer

LI Yang, LI Da-lin

【Abstract】

Objective To determine the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in colorectal cancer and its clinical value as a marker of neoplasm-related angiogenesis.

Methods Samples of colorectal cancer and adjacent normal (control) tissues were obtained from 48 patients with colorectal cancer, and stained with anti-VEGF monoclonal antibody (mAb) or anti-factor VIII-related antigen mAb (anti-FVIII-RAG mAb). The expression of VEGF and FVIII-RAG in the samples was detected by immunohistochemistry.

Results The positive rate of VEGF in colorectal cancer tissue was 62.5% (30/48), significantly higher than that of control tissue [16.7% (8/48), $\chi^2=64.352$, $P<0.01$]. The MVD of colorectal cancer with F-8 RAG marker (100.9 ± 16.0) was significantly greater than that of control group (46.8 ± 11.9 , $t=18.351$, $P<0.01$). The expression of VEGF was significantly correlated with lymph node metastasis ($P<0.01$), distant metastasis ($P<0.05$) and Dukes stages ($P=0.01$); but MVD had no significant correlation with them ($P>0.05$). There was no significant correlation between the expression of VEGF and F-8 RAG in colorectal cancer tissue ($P>0.05$).

Conclusions VEGF is highly expressed in the vascular endothelium of neoplasm-related microvessels of colorectal cancer. It can be used as a marker of angiogenesis in colorectal cancer.

【Key words】 Vascular endothelial growth factors; Colorectal neoplasms; Adenocarcinoma; Tumor markers, biological

Author Affiliation: Department of General Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, China

Corresponding Author: LI Da-lin, Email: lidlqd@yahoo.com.cn