

文章编号:1005-6947(2006)02-0116-06

· 实验研究 ·

大肠癌中 VEGF-C 分泌水平的检测及其意义

陈剑雄¹, 许天文², 陈剑英²

(1. 广东省深圳市第二人民医院 免疫室, 广东 深圳 518029; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 普通外科, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 检测大肠癌患者血清及不同的细胞系中血管内皮生长因子 C (VEGF-C) 和血管生长因子 (VEGF) 的分泌水平, 评估其在诊断大肠癌淋巴结转移中的意义。方法 采用酶联免疫法检测 66 例大肠癌 (观察组) 和 30 例健康者 (对照组) 血清中及 4 株大肠癌细胞系培养液中 VEGF-C 和 VEGF 的分泌的水平。结果 观察组血清 VEGF-C 和 VEGF 均高于对照组 ($P < 0.01$); 有淋巴结转移组的血清 VEGF-C 和 VEGF 均高于无淋巴结转移组 ($P < 0.01$); 有淋巴管和/或血管浸润组上述两指标均高于无浸润组 ($P < 0.01$)。血清 VEGF-C 水平在 1438.0 pg/mL 以上者其灵敏度为 81.0%, 特异性为 76.0%; 血清 VEGF 水平在 240.2 pg/mL 以上者其灵敏度为 72.0%, 特异性为 74.0%。联合检测 VEGF-C 和 VEGF 对淋巴结转移阳性率的预测价值达 84.6%, 阴性预测价值达 94.4%, 精确度达 93.7%。LoVo 及 LOVo-5FU 培养液中 VEGF-C 分泌水平明显升高 ($P < 0.01$)。结论 检测 VEGF-C 为判断大肠癌患者淋巴结是否转移可能提供新的诊断依据。VEGF-C 可望成为治疗大肠癌淋巴道转移的新靶点。

关键词: 结直肠肿瘤/药理学; 淋巴转移; 血管内皮生长因子 C/血液

中图分类号: R735.35; R733.4

文献标识码: A

Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with colorectal carcinoma and its clinical significance

CHEN Jian-xiong¹, XU Tian-wen², CHEN Jian-ying²

(1. Department of Immunology, the Second Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518029, China; 2. Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, 430022, China)

Abstract: Objective To measure circulating vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) levels in patients with colorectal carcinoma, and assess the clinical significance in diagnosis of lymph node metastasis.

Methods Sixty-six patients with colorectal carcinoma and 30 healthy control patients were included in this study. Circulating VEGF-C and VEGF levels were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results**

Serum VEGF-C and VEGF concentration was higher in patients with colorectal carcinoma than in healthy control patients ($P < 0.01$). Patients with lymph node metastasis revealed higher serum VEGF-C and VEGF concentrations than those without lymph node metastasis ($P < 0.01$). The level of VEGF-C and VEGF in lymphatic vessel invasion and venous invasion was higher in the group with invasion than in the group without invasion ($P < 0.01$). Serum VEGF-C levels reached a sensitivity of 81.0% and a specificity of 76.0% with a cutoff value of 1438.0 pg/mL, whereas VEGF levels reached 72.0% sensitivity and 74.0% specificity at 240.2 pg/mL. With combined determination of VEGF-C and VEGF levels, the positive predictive value was 84.6%, the negative predictive value was 94.6%, and accuracy was 93.7%. **Conclusions** Circulating VEGF-C levels may provide additional information for distinguishing between the absence or presence of lymph node metastasis in patients with colorectal carcinoma. VEGF-C can

收稿日期:2005-06-30; 修订日期:2005-11-28。

作者简介:陈剑雄,男,湖北赤壁人,广东省深圳市第二人民医院副主任医师,主要从事肿瘤免疫方面的研究。

通讯作者:陈剑雄 电话:027-85351530(O)。

become a new target spot in the treatment of lymphatic metastasis in patients with colorectal cancer.

Key words: Colorectal Neoplasms/pathol; Lymphatic Metastasis; VEGF-C/blood

CLC number: R735.35; R733.4

Document code: A

近年的文献资料^[1-2]表明,检测包括大肠癌在内的多种恶性肿瘤患者血清中血管内皮生长因子(VEGF)的水平对大肠癌的淋巴结转移及患者术前临床分期具有一定的诊断价值。然而,作为最重要的淋巴管生成因子的 VEGF-C 分泌水平的检测,目前国内尚未见报道,国外的报道也仅限于原发性非小细胞肺癌患者^[3-4]。本研究的前期实验^[5]已证实大肠癌组织中 VEGF-C 的表达与淋巴结转移的相关性,本实验进一步检测和分析大肠癌患者血清及不同细胞系中 VEGF-C 分泌水平,并与文献作比较,以期阐明 VEGF-C 分泌水平与淋巴结转移之间的关系,评估它作为大肠癌淋巴结转移的诊断价值及抗淋巴道转移治疗的潜在意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例来源 采集 2003 年 11 月 1 日—2004 年 11 月 30 日我院原发性大肠癌手术患者 66 例(观察组)。所有病例皆未接受输血、放疗或化疗等治疗。Dukes 分期:A 期 12 例,B 期 22 例,C 期 26 例,D 期 6 例。组织病理类型:高、中、低分化腺癌分别为 17,24 及 25 例。

1.1.2 结肠癌细胞株 另取 30 例无已知肿瘤、无新近创伤或外科手术、无妊娠或月经来潮的门诊健康体检者(对照组男 18 例,女 12 例,年龄 20~72 岁,平均 53.4 岁)做为对照组。4 株结直肠癌细胞 Het-8, Sw-480, LoVo 和 LoVo-5FU 均购自武汉大学典型培养物保藏中心和中国科学院上海细胞研究所。

1.1.3 试剂 VEGF-C 试剂盒购于 Zymed Laboratories Inc. (USA), VEGF 购于深圳晶美生物工程有限公司,皆为商业化的夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒。检测值范围分别是 31.025~2 000.0 pg/mL 和 94.0~6 000.0 pg/mL。兔抗人 VEGF-3 多克隆抗体(一抗)购自武汉博士德生物工程有限公司,抗 CD34 单抗和免疫组化试剂盒(SP kit)为美国 MAXIM 公司产品,购自福州迈新生物技术公司。细胞培养基 RPMI-1640 和小牛血清均购自 GIBCO 公司。

1.2 方法

1.2.1 血样本的采集 观察组于术前,对照组于门诊体检时抽取外周静脉血,分装入不含抗凝剂的离心试管中并静置,在 1h 内以 2 000 r/min 速度离心 10 min。所得血清置 -20℃ 保存。

1.2.2 细胞培养上清的制备 4 株结直肠癌细胞皆以 2.5×10^5 mL 接种于 6 孔培养板,用含体积分数为 10% 的灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液 2.5 mL 培养 24h,在 1h 内以 2 000 r/min 离心 10 min,收获上清 2 mL, -20℃ 保存备用。每种细胞各再接种 2 个复孔。

1.2.3 VEGF-C 和 VEGF 含量检测 检测步骤均按照试剂盒测试步骤进行。每个血清样本皆行正、副 2 个测试孔,细胞培养上清标本每种细胞行 3 个测试孔,最后取它们的平均 OD 值。最终反应板在 DYNA TECH-MR500 型酶标测定仪于 450 nm 处读取 OD 值。所测值按标准曲线换算成 VEGF-C 和 VEGF 含量。

1.2.4 免疫组化染色 按 SP 法试剂盒说明书步骤进行。抗 VEGFR-3 (1:1000) 经高压修复预处理,抗原修复液为 pH6.0 柠檬酸缓冲液。经 DAB 染色后,苏木精对比染色,中性树脂封片。PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。

1.2.5 阳性染色结果的判断 CD34 判定标准为由内皮细胞形成的条状、隙状等孤立或簇状结构棕黄染色及有管腔者,管腔小于 8 个红细胞大小按一条血管计数^[6]。VEGFR-3 在内皮细胞上表达的判定标准亦参照此。CD34 阳性管腔视为微血管,CD34 阳性且 VEGFR-3 表达阳性的管腔视为淋巴管。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件包对所得数据进行统计学分析,采用 *t* 检验、方差分析等统计学方法。 $P < 0.05$ 即有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 VEGF-C 和 VEGF 水平

观察组血清 VEGF-C 和 VEGF 浓度均显著高于对照组(均为 $P < 0.01$)(表 1)。

表1 两个受试组中血清 VEGF-C 和 VEGF 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	平均年龄(岁)	VEGF-C(pg/mL)	<i>t</i> , <i>P</i> 值	VEGF(pg/mL)	<i>t</i> , <i>P</i> 值
对照组	30	50.9	950.60 ± 248.50		131.81 ± 55.30	
观察组	66	53.4	1786.8 ± 428.04	9.95, <0.01	308.60 ± 108.72	9.92, <0.01

2.2 临床病理因素与血清 VEGF-C 和 VEGF 水平的关系

VEGF-C 和 VEGF 水平与患者的年龄、性别及组织学类型无关。血清 VEGF-C 和 VEGF 浓度均随着

Dukes 分期而升高;有淋巴结转移组血清 VEGF-C 和 VEGF 明显高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$)。有淋巴管浸润和血管浸润组(图 1, 2)的 VEGF-C 和 VEGF 水平皆高于无浸润组 ($P < 0.05$)(表 2)。

图1 肿瘤组织中 VEGFR-3 阳性染色示淋巴管浸润 (SP × 400)

图2 肿瘤组织中 CD34 阳性染色示淋巴管浸润 (SP × 400)

表2 66例原发性结直肠癌患者临床病理因素与血清 VEGF-C 和 VEGF 浓度的关系 ($\bar{x} \pm s$)

病理因素	<i>n</i>	VEGF-C(pg/mL)	<i>t</i> 或 <i>F</i> 值	<i>P</i> 值	VEGF(pg/mL)	<i>t</i> 或 <i>F</i> 值	<i>P</i> 值
总数	66	1786.81 ± 428.04			308.60 ± 108.72		
年龄(岁)							
<60	22	1870.80 ± 368.42	<i>t</i> = 1.59	0.1167	326.20 ± 118.42	<i>t</i> = 0.15	0.8812
≥60	44	1682.32 ± 491.34			321.90 ± 103.44		
病理类型							
高分化	17	1766.42 ± 380.12	<i>F</i> = 2.45	0.0945	320.78 ± 91.34	<i>F</i> = 2.38	0.1008
中分化	24	1663.20 ± 256.58			322.78 ± 108.86		
低分化	25	1799.56 ± 705.40			380.22 ± 206.24		
Dukes 分期							
A	12	1462.12 ± 430.50	<i>F</i> = 29.31	<0.001	238.20 ± 94.86	<i>F</i> = 21.28	<0.001
B	22	1816.20 ± 480.25			348.14 ± 102.22		
C	26	2212.54 ± 352.44			439.32 ± 125.66		
D	6	2088.20 ± 614.20			490.68 ± 177.55		
淋巴结转移							
N ₀	39	1445.30 ± 392.20	<i>t</i> = 5.95	<0.001	258.20 ± 104.20	<i>t</i> = 5.03	<0.001
N ₁	27	2002.60 ± 345.30			390.50 ± 106.12		
淋巴管浸润							
L ₀	38	1400.42 ± 450.56	<i>t</i> = 5.84	<0.001	289.74 ± 97.20	<i>t</i> = 2.45	0.0017
L ₁	28	1998.12 ± 348.60			358.21 ± 130.22		
血管浸润							
V ₀	46	1522.81 ± 322.40	<i>t</i> = 3.54	0.0008	298.96 ± 92.44	<i>t</i> = 4.14	0.0001
V ₁	20	1887.55 ± 501.32			420.18 ± 141.62		

2.3 预测淋巴结转移的敏感性和特异性

以对照组血中 VEGF 浓度上限 $X + 1.96S$ 为正常值界限,血清 VEGF-C 浓度在 1438.0pg/mL 以上数值者达到 81% 的灵敏性和 76% 的特异性,而

血清 VEGF 浓度在 248.5pg/mL 以上数值者达到 72% 的灵敏性和 74% 的特异性。用 ROC 曲线下面积评估两种标志物的实用性,VEGF-C 为 0.762, VEGF 为 0.723(表 3)。

表 3 血清 VEGF-C 和 VEGF 预测淋巴结转移的敏感性和特异性 (n)

组别	n	VEGF(<248.5pg/mL)	VEGF(>248.5pg/mL)	VEGF-C(<1438.0pg/mL)	VEGF-C(>1438.0pg/mL)
N ₀	39	25	14	29	10
N ₁	27	9	18	8	19

2.4 VEGF-C 和 VEGF 水平联合检测的预测价值

66 例患者按照 VEGF-C 和 VEGF 的联合检测被分为 4 组:I 组的 VEGF-C 和 VEGF 均增高,II 组的 VEGF-C 低而 VEGF 高,III 组的 VEGF-C 高而 VEGF 低,IV 组的 VEGF-C 和 VEGF 均低。同样以对照组血中 VEGF 浓度上限 $X + 1.96S$ 为正常值界限,I 组 84.6% 的患者显示有淋巴结转移,而 IV 组 94.4% 的患者显示无淋巴结转移(表 4)。

2.5 4 株细胞系的培养液中 VEGF-C 分泌水平的检测结果

Hct-8 和 Sw-480 培养液中 VEGF-C 分泌水平极低,两者差别无显著性意义 ($P > 0.05$); LoVo 和 LoVo-5FU 培养液中 VEGF-C 分泌水平较高,两者差

别无显著性 ($P > 0.05$); 但前两者与后两者分别比较的差别皆有显著性 (均为 $P < 0.05$)。可见 LoVo 及 LoVo-5FU 耐药细胞株的培养液中可检测到高水平的 VEGF-C(表 5)(图 3-7)。

表 4 VEGF-C 和 VEGF 水平的联合检测与淋巴结转移

组别	n	无淋巴结转移(%)	有淋巴结转移(%)
I	13	2(15.4)	11(84.6)
II	18	11(61.1)	7(38.9)
III	16	8(50.0)	8(50.0)
IV	19	18(5.6)	1(94.4)
合计	66	39	27

图 3 结直肠癌 Hct-8 细胞系 ($\times 200$)

图 4 结直肠癌 Sw-480 细胞系 ($\times 200$)

图 5 结直肠癌 LoVo 细胞系 ($\times 200$)

图 6 结直肠癌 LoVo-5FU 细胞系 ($\times 200$)

表 5 4 株结直肠癌细胞系培养液中 VEGF-C 的分泌水平

序号	结直肠癌细胞系名称	VEGF-C 浓度 (pg/ml)	t 值	P 值
1	Hct-8	46.82 ± 10.28	$t_{21} = 0.80$	$P_{21} = 0.507$
2	Sw-480	46.45 ± 11.06	$t_{32} = 6.72$	$P_{32} = 0.021$
3	LoVo	1432.24 ± 368.04	$t_{43} = 1.78$	$P_{43} = 0.216$
4	LoVo-5FU	1376.54 ± 422.12	$t_{31} = 6.71$	$P_{31} = 0.022$
			$t_{41} = 5.59$	$P_{41} = 0.031$
			$t_{42} = 5.60$	$P_{42} = 0.030$

图 7 4 株结直肠癌细胞系培养液中 VEGF-C 分泌水平比较

注: t, P 值角注为组间比序号

3 讨论

转移是恶性肿瘤的重要生物学特征,是其难以根治和病死率高的重要原因。淋巴道转移是实体瘤发展中的一个重要事件,因此,淋巴管和区域淋巴结中肿瘤细胞的检测对肿瘤的分期、手术和放疗有重要的指导意义^[7]。目前,关于淋巴管内皮细胞特异性标记物和肿瘤的淋巴管浸润及淋巴结转移的一系列研究均表明^[8-9]: VEGF 家族的新成员 VEGF-C 在此过程中起着关键的作用。

本研究结果表明,大肠癌患者中,血清 VEGF-C 和 VEGF 浓度高于健康对照组,并且该两指标随着病理分期而升高,与患者的年龄、性别及组织学类型无关;但有淋巴结转移组与无淋巴结转移组比较,血清 VEGF-C 和 VEGF 浓度差异有显著性;且淋巴管浸润的患者中血清 VEGF-C 及 VEGF 水平均高于无浸润组。通过 ROC 曲线下面积评估了这两种标志物的实用性,笔者发现 VEGF-C (0.762) 在诊断性鉴别力方面比 VEGF (0.723) 明显更好。在诊断淋巴结转移方面,应用 VEGF 和 VEGF-C 的联合检测,有 84.6% 的阳性预测价值和 94.4% 的阴性预测价值。这种高特异性将有助于治疗方案的制定和预后的评估。另一方面,对于制定淋巴结阳性的大肠癌患者的术前新辅助化疗方案,化疗药的高敏感性也是非常重要的。因为通过术前新辅助化疗,可以明确大肠癌患者的术前的相应临床分期,并有助于提高手术切除率和疗效。同时,与组织标本检查及影像学检查相比,血清检测具有侵入性小、费用低,并可早期、反复地进行等优点,故具有重要的临床实用价值和社会经济效益。

本研究应用 ELISA 法检测 4 株结直肠癌细胞系,其中 LoVo 及 LoVo-5FU 细胞培养液中 VEGF-C 的浓度升高(均 $P < 0.05$)。这与本课题组的前期研究采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)方法检测 4 株同样的细胞系中 LoVo 及 LoVo-5FU VEGF-C mRNA 呈阳性表达结果想吻合^[5]。本研究结果在细胞生物学水平上进一步论证了前部分的实验研究结果。

值得一提的是,免疫基因靶向治疗已成为治疗结直肠癌的第 4 大治疗手段,特别是创新性 VEGF 靶向抗肿瘤药物 avastin 在临床上的应用已初见成效^[10-11]。结合本实验可以推测,作为 VEGF 家族

新成员的 VEGF-C,其在大肠癌淋巴管浸润及淋巴道转移中可能起着重要作用,而应用靶向 VEGF-C 的阻断性免疫基因治疗将可能阻止肿瘤的淋巴道转移。因此,除了前述作为一种新的预后指标外,VEGF-C 将可能成为肿瘤治疗的新靶点。

概言之,在不同的结直肠癌患者及培养的细胞系中,其 VEGF-C 的分泌水平是不一样的;在判断术前淋巴结转移的价值方面,血清 VEGF-C 的检测优于已用于临床的 VEGF,血清 VEGF-C 水平可为大肠癌患者淋巴结是否转移提供更确切的诊断依据;同时,VEGF-C 是以蛋白水平,通过旁分泌的机制作用于 LEC 和/或通过自分泌机制作用于肿瘤细胞自身,从而导致肿瘤的淋巴管生成、淋巴管浸润及淋巴结转移。故认为,VEGF-C 的检测可能成为抗大肠癌淋巴道转移治疗的潜在靶点。

参考文献:

- [1] Takeda A, Shiimada H, Imaseki H, *et al.* Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in colorectal cancer patients: correlation with clinical-pathological factors and tumor markers [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(2):333-338.
- [2] Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, *et al.* The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients [J]. *Respir Med*, 2004, 98(7):632-636.
- [3] Tamura M, Ohta Y. Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary non-small cell lung carcinoma; a possible diagnostic tool for lymph node metastasis [J]. *Cancer*, 2003, 98(6):1217-1222.
- [4] Tamura M, Oda M, Matsumoto I, *et al.* The combination assay with circulating vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, matrix metalloproteinase-9, and VEGF for diagnosing lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2004, 11(10):928-933.
- [5] 许天文,陈道达,陈剑英,等. 血管内皮生长因子-C 在结直肠癌中的表达及其与淋巴结转移的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(5):24-26.
- [6] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(2):169-173.
- [7] Tille JC, Nisato R, Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumour metastasis [J]. *Novartis Found Symp*, 2004, 256(1):112-131.
- [8] 计俊,严超,张俊,等. 血管内皮生长因子-C 在胃癌中的表达及其与淋巴结转移的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(5):530-532.
- [9] 王勇杰,刘相萍,沈毅,等. 血管内皮生长因子-C 及其受体 3 mRNA 在肺癌及癌旁组织中的表达与临床意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(11):1322-1323.
- [10] Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(3):671-680.
- [11] Iqbal S, Lenz HJ. Angiogenesis inhibitors in the treatment of colorectal cancer [J]. *Semin Oncol*, 2004, 31(6):10-16.