

· 临床研究 ·

肝癌放疗前后血浆 VEGF 表达的临床意义*

郑青平[△], 倪秉强, 伍美娟, 罗平, 罗展雄, 张志红, 徐艺安

(广西医科大学第五附属医院/柳州市人民医院肿瘤科 545001)

摘要:目的 观察肝癌患者放疗前后血浆血管内皮生长因子(VEGF)水平与疗效之间的关系。方法 用 ELISA 法检测 42 例非手术肝癌患者放疗前 1d、放疗开始后 7d 及 1 个月时血浆 VEGF 含量。按近期疗效分为有效组与无效组,按治疗前 VEGF 含量分为高水平组与低水平组,分析近期疗效、无疾病进展时间及 1 年生存率与 VEGF 之间的关系。结果 近期有效率(CR+PR)为 71.4%,无效率(NC+PD)为 28.6%。有效组放疗前后血浆 VEGF 水平均低于无效组,差异有统计学意义($P=0.000$)。治疗前高、低水平组无疾病进展时间分别为 3.1、6.9 个月,差异有统计学意义($P=0.000$),1 年生存率分别为 42.9%、76.2%,差异有统计学意义($P=0.000$)。结论 肝癌患者血浆 VEGF 水平可作为放疗效果预测指标。

关键词:肝癌;放射疗法;血管内皮生长因子

中图分类号:R735.7;R730.53

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)03-0288-02

Expression of VEGF in patients with HCC around radiotherapy and its clinical significance*

ZHENG Qing-ping[△], NI Bin-qiang, WU Mei-juan, et al.

(Department of Oncology, the People's Hospital of Liuzhou, Liuzhou 545001, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between effect of radiotherapy and plasma vascular endothelial growth factor(VEGF) level in patients with hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** Plasma VEGF was determined in a total of 42 unresectable HCC cases with enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Samples were collected on 1 day before radiotherapy, 7 days and 1 month after radiotherapy beginning. All the cases were divided into effective group and ineffective group according to short-term efficiency. On the other hand, the cases were divided into high VEGF group and low VEGF group according to plasma VEGF level before radiotherapy. Efficacy rate, progression-free survival(PFS) and 1 year overall survival(OS) were evaluated. **Results** The short-term efficiency(CR+PR) and inefficiency(NC+PD) were 71.4% and 28.6%, respectively. Before or after radiotherapy, VEGF level was lower in effective group than that in ineffective group($P=0.000$). The PFS and OS in groups with high and low VEGF level were 3.1 and 6.9 months ($P=0.000$), 42.9% and 76.2% ($P=0.000$), respectively. **Conclusion** Plasma VEGF level in HCC patients receiving radiotherapy is a predictor of outcome.

Key words: hepatocellular carcinoma; radiotherapy; VEGF

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是肿瘤生长、侵袭和转移的主要调控因子。肝癌患者血浆 VEGF 水平与临床发病特征及预后之间的联系已得到临床研究证实。作者观察非手术切除肝癌患者放疗前后血浆 VEGF 水平变化,分析放疗对患者血浆 VEGF 的影响、血浆 VEGF 水平与肝癌放疗患者预后之间的关系,通过血浆 VEGF 测定预测肝癌放疗效果,为不能手术切除肝癌患者制订合理治疗策略提供方便可行的预测指标。

1 临床资料

1.1 一般资料 2007 年 1 月至 2008 年 3 月在本院初诊原发性肝癌患者 42 例,符合中国抗癌协会制定的诊断标准^[1]。全部病例符合下列入组条件:(1)无明显腹水及远处转移;(2)无手术适应证或患者不愿手术;(3)肝功能 Child-Pugh 评分 A 或 B 级;(4)能实施放射治疗且无放疗禁忌证;(5)预期寿命大于 3 个月;(6)排除未完成放疗或治疗后随访过程中失访病例。其中男 33 例,女 9 例,年龄 23~74 岁,中位 50.2 岁。影像学检查显示单个肿瘤灶 35 例,2 个或 3 个肿瘤灶 7 例。肿瘤直径

或直径之和小于或等于 5cm 5 例,>5cm 37 例。伴门静脉癌栓 5 例。按疗效分为两组,有效组(CR+PR)和无效组(NC+PD),比较两组放疗前后血浆 VEGF 水平。全部病例按治疗前血浆 VEGF 水平从高至低排序平均分为两组,高水平组和低水平组,每组 21 例。

1.2 放射治疗 采用三维适形放射治疗技术,OUR-QGD 型立体定向伽玛射线治疗系统。患者仰卧于立体定位体架上,予负压真空垫固定,CT 增强扫描层厚、层距各为 5mm。扫描数据输入治疗计划系统,影像可见肿瘤灶勾画大体肿瘤体积 GTV,临床靶体积 CTV 在 GTV 上外扩 1.0cm,计划靶体积 PTV 在 CTV 基础上向上下各 2.0cm、左右各 1.0cm 形成。时间-剂量分割方式为每次 3~5Gy,每日或隔日 1 次,每周 3~5 次,总剂量 35~50Gy,处方剂量的 50%~80%等剂量线包括全部 PTV。放疗过程中每周监测肝肾功能,同时予保肝及对症支持治疗。

1.3 血浆 VEGF 测定 放疗前 1d、放疗开始后 7d 及 1 个月采集晨起空腹静脉血 3mL 于 EDTA 抗凝管,室温放置 2h 内

* 基金项目:广西壮族自治区卫生厅课题资助项目(2007310)。△ 通讯作者,E-mail:zhengqp@sina.com。

离心半径 8cm, 3 000r/min 离心 10min。吸取血浆放 -80℃ 冰箱保存待测。人血浆 VEGF 检测试剂盒购于武汉博士德生物工程技术有限公司, 用 ELISA 法定量检测血浆 VEGF 含量, 具体操作按试剂盒说明书进行, 结果在酶标仪 (Anthos 2010, 奥地利) 主波长 450nm 读取光密度值, 绘制标准曲线, 求待测血浆 VEGF 含量。

1.4 随访及疗效评价 自治疗开始时起计算生存时间, 1~3 个月随访 1 次, 至少随访 1 年以上, 统计无疾病进展时间及累积生存率。治疗过程中及治疗后观察毒性反应, 主要是肝功能变化。治疗结束后 3 个月评价近期疗效。近期疗效及毒性评价均采用世界卫生组织 (WHO) 评价标准, 疗效分为完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、无变化 (NC) 及进展 (PD) 4 个级别。分析近期疗效、无疾病进展时间、1 年生存率等与血浆 VEGF 水平的关系。

1.5 统计学方法 采用 Spss10.0 统计分析软件, 计量资料用 *t* 检验和方差分析, 用寿命表法计算累积生存率。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 近期疗效与 VEGF 水平分析 近期疗效评价 42 例中 CR 3 例, PR 27 例, NC 5 例, PD 7 例, 有效率 (CR + PR) 为 71.4%, 无效率 (NC + PD) 为 28.6%。有效组放疗前后血浆 VEGF 水平均低于无效组, 差异有统计学意义; 放疗开始后 1 周 VEGF 水平与放疗前相当, 而放疗 1 个月时 VEGF 水平明显低于放疗前, 差异有统计学意义 (表 1)。

表 1 近期疗效与放疗前后血浆 VEGF 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	放疗前 1d	放疗 7d	放疗 1 个月	F	P
有效组	30	141.8±82.4	144.9±74.2	74.9±39.3	32.45	0.000
无效组	12	543.5±228.7	457.3±218.4	242.7±132.4	21.17	0.000
<i>t</i>		5.934	6.756	4.327		
<i>P</i>		0.000	0.000	0.001		

2.2 生存率与 VEGF 水平分析 VEGF 高、低水平组无疾病进展时间分别为 3.1、6.9 个月, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$), 1 年生存率分别为 42.9%、76.2%, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。

2.3 不良反应 肝癌患者放疗发生的不良反应主要为疲乏、肝肾功能损害、血白细胞下降等。全部病例均有轻到中度疲乏表现, 但不影响治疗, 且休息后症状可减轻。有效组肝功能损害 2 例, 血白细胞下降 1 例; 无效组肝功能损害 1 例。全部病例未出现 IV 级毒性, 治疗中及治疗结束后 3 个月内未发生肝昏迷、出血等危及生命并发症。

3 讨 论

实体肿瘤不断形成的新生血管是瘤细胞生长、侵袭和转移的基础, 肿瘤血管密度高低与患者生存时间密切相关, 了解肿瘤血管形成能力有助于认识其临床特征的差异, 并为制定治疗方案提供一定指导价值^[2]。VEGF 是可溶性促肿瘤血管形成的主要调控因子, 可以在血浆中检测其含量, 血浆 VEGF 水平与肿瘤侵袭转移能力呈正相关。

在肝癌发生发展过程中形成了大量新生血管, VEGF 在肝癌新生血管的形成过程中起关键性作用^[3]。Tseng 等^[4]研究表明, 肝癌 VEGF 表达与肿瘤微血管密度有直接相关性, 是无疾病进展生存率和累积生存率的独立预后因素。

肝癌发病隐匿, 大部分患者就诊时已失去手术治疗机会。近年来放疗成为肝癌非手术治疗的主要措施之一。但临床实践表明, 即使相同发病特征者给予相同条件放疗, 治疗效果却有较大差异。这一方面是由于影响放射生物学效应的因素不同, 如患者体质、贫血状况、伴随疾病等; 另一方面则可能缘于肿瘤本身的放射抗拒差异。放射杀灭肿瘤细胞效应是临床所期望的, 但随着肿瘤内部细胞被杀灭及血管破坏, 肿瘤内部乏氧加重, 乏氧诱导因子表达上调, 诱导 VEGF 表达上调从而促进肿瘤血管形成, 加速肿瘤增殖, 这成为肿瘤抗拒放射攻击的一个重要因素, 也必然影响放疗效果。有实验显示乏氧诱导因子通过 VEGF 发挥保护作用, 降低实体瘤内部瘤细胞对辐射的敏感性^[5]。

黄清南等^[6]研究显示对肝癌患者给予超声聚焦治疗, 1 周内血浆 VEGF 水平先是有有一个明显下降过程, 然后又迅速上升至治疗前水平, 治疗后 1 周至 1 个月再逐渐下降并明显低于放疗前水平。这一血浆 VEGF 水平变化规律提示, 超声通过杀伤瘤细胞及破坏肿瘤血管内皮使 VEGF 含量降低, 表现为抑制血管形成效应; 但很快又诱导 VEGF 上调, 表现为肿瘤的放射抗拒性。1 周后因肿瘤细胞被进一步大量杀灭及其内环境被破坏, 肿瘤总的血管形成能力降低。本研究结果显示, 放疗 1 周时血浆 VEGF 水平与放疗前相当, 放疗 1 个月时 VEGF 则大大低于放疗前水平, 呈现与超声治疗肝癌类似的对血管形成因子的影响, 放射抑制了肝癌血管形成能力。

本研究结果显示, 血管形成能力与放射治疗肝癌疗效具有相关性。有效组放疗前后血浆 VEGF 水平均明显低于无效组; VEGF 高、低水平组分析, 低血管形成能力对应放疗后更长的无疾病进展时间及更高的 1 年生存率。其机制可能是高水平 VEGF 对应高水平肿瘤血管形成能力, 在新生血管支持下, 放疗残留细胞易于增殖、侵袭和转移。从中得到的启示是为非手术肝癌患者制定治疗方案时, 可以检测其血浆 VEGF 含量, 含量低者放疗可能收到较好效果, 而含量高者放疗可能不是首要的选择, 或许介入栓塞化疗等措施可以获得更大疗效。

从理论上分析, 抗血管形成药物结合细胞毒性治疗, 如放疗, 将从根本上改善肝癌临床疗效不理想的现状。抗血管形成靶向治疗应用于临床的药物有贝伐单抗 (bevacizumab)、国产恩度 (endostar) 等, 主要集中于肺癌方面的研究, 近年来也有在肝癌治疗方面的尝试。一项 II 期临床试验证实, 贝伐单抗治疗进展期肝癌取得一定疗效^[7]。但在目前无直接有效对抗肝癌血管形成措施的情况下, 通过检测肝癌患者血浆 VEGF 水平来确定是否选择放疗作为非手术患者的首要治疗方案, 具有积极临床意义, 且血浆 VEGF 检测方便、经济、快捷, 患者易于接受。

参考文献:

[1] 杨秉辉, 夏景林. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准 [J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(6): 324.
 [2] 王东, 仲召阳, 李增鹏, 等. 骨肉瘤 VEGF (下转第 291 页)

片机上预热。将 10 μ L 探针混合物滴于玻片杂交区,立即加盖盖玻片,封片。将玻片置于杂交仪(HYBrite™,VYSIS,UAS)按设定程序进行杂交:75℃变性 5min,42℃杂交 16h。杂交后的玻片去掉盖玻片,用 47℃、含 50%甲酰胺的 2 \times SSC 洗涤 3 次,每次 10min,再用 47℃、2 \times SSC 和含 0.1NP-40 的 2 \times SSC 分别洗涤 1 次,暗处自然干燥。滴加 15 μ L 4,6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)复染液于玻片杂交区,暗处孵育 10~20min。在荧光显微镜下选用合适的滤玻片观察杂交信号。

2 结 果

3 例患者外周血标本染色体核型均为 46,XY。FISH 结果显示,无论是中期分裂相还是间期细胞,X、Y 染色体特异区域均能显示极好的荧光杂交信号(插页 II 图 11)。

3 讨 论

46,XY 女性性反转综合征的表型为女性,性腺呈索条状,睾丸不发育,具有女性内、外生殖器。依据患者表型特征和染色体检测结果,3 例患者均确诊为 46,XY 女性性反转综合征。该综合征遗传方式比较复杂,可由非易位性 SRY 基因突变引起的病例则会呈 Y-连锁遗传,但也可能由 X-连锁或生化缺陷引起而呈 X-连锁隐性遗传或常染色体隐性遗传。XY 女性的发病机制是睾丸性别决定功能的丢失,其遗传学病理机制涉及:(1)X、Y 染色体之间或 Y 染色体与常染色体之间的易位导致含 SRY 基因的 Y_p 末端部分缺失,核型为 46,XY;(2)SRY 基因突变,核型为 46,XY;(3)家族性异质性 SRY 基因突变;(4)雄激素受体基因突变^[2]。

FISH 是 20 世纪 80 年代末在放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性分子细胞遗传学技术,其原理是通过荧光标记的寡核苷酸探针特异地和互补核酸序列在完整的细胞内结合,可以对染色体或特定基因的数目异常,特定片段的缺失、易位和重排进行诊断研究^[3-7]。FISH 具有安全、分辨率好、不需要体外培养、对中期分裂相和间期细胞染色体可快速检测等优点,在生物医学领域已广泛用于染色体或基因异常的细胞、组织样本进行检测和诊断,为各种基因相关疾病的分型、预后和预后提供准确的依据^[8-9]。由于荧光探针主要为国外产品,价值昂贵,国内至今未能将 FISH 技术常规用于染色体异常的诊断。本实验采用国产 X、Y 染色体特异区域探针所进行的 FISH 结果表明,无论是中期分裂相还是间期细胞,X、

Y 染色体特异区域均可显示高分辨荧光杂交信号,具有很高的敏感性和特异性。这说明 FISH 技术对于性反转具有极高的诊断价值,尤其对中期分裂相有限及分散不佳的染色体标本可作出明确的诊断。鉴于国产探针价格相对便宜,将 FISH 技术和常规染色体显带方法结合起来用于染色体异常诊断值得推广。

参考文献:

[1] 陆国辉. 产前遗传病诊断[M]. 广州: 广东科技出版社, 2002:452.
 [2] Scriver CR, Beauder AL, Sly WS, et al. The metabolic and molecular bases of inheritant disease[M]. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995: 739.
 [3] 王云华, 崔英霞, 姚兵, 等. 多色荧光原位杂交技术的临床应用[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(6): 438.
 [4] 陈亚军, 史桂兰, 赵春. 46, XY 女性性反转患者的细胞和分子遗传学检测[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 32(6): 86.
 [5] 王晓兰, 姚凡, 刘楠, 等. FISH 在乳腺癌组织 MER2/neu 原癌基因检测上的应用及其临床意义的研究[J]. 中国医科大学学报, 2008, 37(5): 664.
 [6] 李静然, 魏丽惠, 刘宁, 等. FISH 检测宫颈脱落细胞 hTERT 基因表达及其临床意义[J]. 现代妇产科进展, 2008, 17(10): 725.
 [7] 刘学军, 刘慈, 尹红亚, 等. 荧光原位杂交技术在胎儿染色体数目异常诊断中的应用[J]. 山东医药, 2008, 48(33): 10.
 [8] Klinger K, Langes G, Shook D, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in unculture amniocytes by using fluorecence in situ hybridization (FISH) [J]. Am J Hun Genet, 1992, 51(1): 55.
 [9] Bryndorf T. Rapid detection of numerical aberrations of chromosomes 13, 18 and 21 in chorionic mesenchyma cells [J]. Prenat Diagn, 1993, 13(9): 815.

(收稿日期: 2009-05-07 修回日期: 2009-08-10)

(上接第 289 页)

表达及 VEGF 抗体抑制血管生成的实验研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(15): 1369.
 [3] 吕厚君. ICAM-1 和 VEGF 在原发性肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 医药论坛杂志, 2008, 29(16): 15.
 [4] Tseng PL, Tai MH, Huang CC, et al. Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients[J]. J Surg Oncol, 2008, 98(5): 349.
 [5] 程惠华, 傅志超, 王凤玫. 电离辐射对缺氧条件下肝癌细胞 HIF-1 α 及 VEGF 表达的影响[J]. 南方医科大学学报,

2008, 28(2): 284.

[6] 黄清南, 黄耀, 张卫星. 血管内皮生长因子在原发性肝癌高强度聚焦超声治疗前后变化分析[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(31): 7638.
 [7] Thomas MB, Morris JS, Chadha R, et al. Phase II trial of the combination of bevacizumab and erlotinib in patients who have advanced hepatocellular carcinoma [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(6): 843.

(收稿日期: 2009-08-29 修回日期: 2009-09-09)