

鼻咽癌血管内皮生长因子及微血管与放射敏感性

刘宜敏¹, 梁碧玲¹, 卢泰祥³, 崔念基³, 李海刚², 沈溪明²

(中山大学 1. 附属第二医院放射科, 2. 附属第二医院病理科, 3. 附属肿瘤医院放疗科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨鼻咽癌组织中血管内皮生长因子(VEGF)表达及微血管(MVD)在预测鼻咽癌放射敏感性中的价值。【方法】对39例病理确诊为鼻咽癌的单纯放疗患者放疗前的鼻咽活检组织,进行Von Willebrand因子、VEGF免疫组化染色;用动态MRI观察肿瘤放疗后的体积变化,在MR机上直接测量肿瘤体积。【结果】VEGF表达与MVD密切相关($r=0.553$, $P<0.05$)。VEGF表达与肿瘤体积缩小百分比相关,有统计学意义(38~40 Gy时 $r=-0.45$, $P<0.05$; 68~76 Gy时 $r=-0.42$, $P<0.05$)。MVD与肿瘤体积缩小百分比的相关无统计学意义(38~40 Gy时, $r=-0.183$, $P=0.265$; 68~76 Gy时, $r=-0.244$, $P=0.135$)。【结论】鼻咽癌组织内VEGF表达与放射敏感性呈负相关;VEGF表达与MVD呈正相关;MVD与放射敏感性的相关无统计学意义。

关键词:鼻咽肿瘤; 血管内皮生长因子; 微血管密度; 放射敏感性

中图分类号:R739.63

文献标识码:A

文章编号:1000-257X(2003)02-0161-03

The Relationships Among the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Microvessel Density and Radiosensitivity in Nasopharyngeal Carcinoma

LIU Yi-min¹, LIANG Bi-ling¹, LU Tai-xiang³, CUI Nian-ji³, LI Hai-gang², SHEN Xi-ming²

(1. Department of Radiology, 2. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital,

3. Department of Radiotherapy, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To evaluate the value of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density (MVD) in nasopharyngeal carcinoma in predicting the radiosensitivity (RS). 【Methods】 39 patients, with their pathologic final diagnosis are nasopharyngeal carcinoma, and only treated by radiotherapy were studied. Immunohistochemical analysis was performed on NPC biopsy specimen section. The sections were stained with polyclonal antibodies against VEGF and Von Willebrand factor. Dynamic MRI was employed to observe the regression of NPC after radiotherapy. The tumor volumes were measured on the MR console directly. 【Results】 There was a significant correlation between the expression of VEGF and MVD ($r=0.553$, $P<0.05$). Significant correlation also existed between the expression of VEGF in NPC and the percentage of the volume of tumor regression (38~40 Gy, $r=-0.45$, $P<0.05$, (68~76) Gy, $r=-0.42$, $P<0.05$). There was no significant correlation between MVD and the percentage of the volume of tumor regression (38~40 Gy, $r=-0.183$, $P=0.265$, (68~76) Gy, $r=-0.244$, $P=0.135$). 【Conclusion】 The expression of VEGF in NPC is negative correlated with RS. The expression of VEGF in NPC is positively correlated with MVD. There was no significant correlation between MVD in NPC and RS.

Key words: nasopharyngeal neoplasms; vascular endothelial growth factor; microvessel density; radiosensitivity

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(2): 161~163, 167]

本研究通过免疫组化方法检测鼻咽癌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达水平及微血管密度(microvessel density, MVD),分析它们与鼻咽癌放射敏感性的相关性;探讨它们在预测鼻咽癌放射敏感性中的价值;为鼻咽

癌治疗的个体化设计提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收稿日期:2002-06-24

基金项目:中山医科大学中青年科研基金资助项目(B002001008)

作者简介:刘宜敏(1965-),男,广东大埔人,硕士,主治医师。

2000年1月至2001年2月期间于我院病理确诊为鼻咽癌做单纯放疗患者39例,男31例,女8例,年龄16~70岁;37例低分化鳞癌,1例未分化癌,1例中等分化鳞癌。T1期7例(18%),T2期13例(33%),T3期7例(18%),T4期12例(31%);N0期15例(38%),N1期20例(51%),N2期4例(10%),临床分期I期2例(5%),II期15例(38%),III期10例(26%),IV期12例(31%)。TNM分期根据福州92鼻咽癌分期。

1.2 放射治疗方法

放疗设备为SIEMENS PRIMUS直线加速器。采用常规分割连续放疗,2.0 Gy,每天1次,每周5次。用低熔点铅挡块不规则面颈联合野与面颈分野等中心治疗。鼻咽靶区根治剂量为68~76 Gy。

1.3 VEGF表达和MVD检测

兔抗人VIII相关抗原(F-VIII RA_g)多克隆抗体购于北京中山生物公司,链霉素抗生物素蛋白(Ultraseptive S-P)试剂盒购于福建迈新公司。用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组织化学方法(S-P法),方法按试剂盒的要求进行。用已知阳性肝癌切片作阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照。F-VIII RA_g染色不需要抗原修复处理。

1.4 VEGF表达结果判断

癌细胞浆或/和细胞膜着色为棕黄色或棕褐色颗粒为VEGF阳性。计数整张玻片的癌细胞,按阳性细胞所占的百分率分为:(++)30%以上阳性细胞,(+)30%以下阳性细胞,(-)无阳性细胞。

1.5 微血管计数

根据Bosari^[1]方法,首先在显微镜(10×10)筛选出最高MVD区,然后在(10×20)镜下记录下3个视野内微血管数,求平均数作为该肿瘤的平均微血管数。孤立的棕色点或圈以及单根棕色线条认为是1条血管,管径大于8个红细胞直径的血管或有

较厚平滑肌的血管不计数。

1.6 鼻咽原发灶的观察

放疗前、放疗中期(38~40 Gy)、放疗结束时(68~76 Gy)、结束后3月、6月,各做1次磁共振成像(MRI)平扫及增强扫描。使用Philips Gyroscan T5-II型0.5Tesla超导型磁共振成像系统。运用感兴趣区域(ROI)体积测量技术,在MR机上直接逐层勾画肿瘤边缘并读出每层的肿瘤体积(tumor volume, TV),各层体积相加即为肿瘤总体积。放疗前期、中期、结束时、结束后3个月、结束后6个月的肿瘤体积分别用TV₁, TV₂, TV₃, TV₄, TV₅代表,放疗中期肿瘤缩小百分比以TV₂₁表示,TV₂₁=(TV₁-TV₂)/TV₁,放疗结束肿瘤缩小百分比以TV₃₁表示,TV₃₁=(TV₁-TV₃)/TV₁。

1.7 统计分析

实验数据使用SPSS10.0数据处理软件包,进行Spearman等级相关分析及偏相关分析。所有结果取P≤0.05为有统计学意义。

2 结果

39例患者中,VEGF-15例(38%),VEGF+15例(38%),VEGF++9例(23%)。MVD平均为16,标准差为7,最小值为5,最大值为31。除4例未到时间行放疗后半年MRI扫描外,本组病例放疗结束后6月的肿瘤体积(TV₅)全为0。

2.1 VEGF表达与MVD关系

VEGF-的MVD为12±6;VEGF+的MVD为16±4;VEGF++的MVD为22±7,Spearman等级相关分析,表明鼻咽癌组织中VEGF表达与MVD呈正相关(r=0.553 P<0.05),即VEGF表达越强MVD越大。

2.2 VEGF表达与放射敏感性的关系

表1 VEGF表达与TV₂₁、TV₃₁的关系

Table 2 The relationship between the expression of VEGF and TV₂₁ and TV₃₁

VEGF	Case (n)	TV ₂₁			TV ₃₁		
		Max (%)	Min (%)	$\bar{x} \pm s$	Max (%)	Min (%)	$\bar{x} \pm s$
-	15	100	5.1	60 ± 30	100	26	86 ± 23
+	15	100	14	54 ± 28	100	28	77 ± 27
++	9	57	2	23 ± 21	96	28	57 ± 21
Total	39	100	2	49 ± 30	100	26	76 ± 26

r=0.45, P<0.05, in the middle of RT. r=0.42, P<0.05, RT finished. TV₁, TV₂, TV₃, TV₄, TV₅ stand for tumor volume before RT, in the mid-term of RT, RT finished, 3 month after RT, 6 month after RT respectively. TV₂₁=(TV₁-TV₂)/TV₁ stands for the percentage of the volume of tumor regression in the mid-term of RT. TV₃₁=(TV₁-TV₃)/TV₁ stands for the percentage of the volume of tumor regression when RT finished

运用 Spearman 等级相关,分析放疗中期、放疗结束时,肿瘤体积缩小百分比与 VEGF 表达的关系,表明鼻咽癌 VEGF 表达与肿瘤体积缩小百分比均呈显著的负相关(放疗中期等级相关系数 $r = -0.45$, $P < 0.05$; 放疗结束时等级相关系数 $r = -0.42$, $P < 0.05$),即 VEGF 表达越强肿瘤体积缩小百分比越小,也就是说 VEGF 表达越强放射敏感性越差,见表 2。

在 VEGF、MVD、 TV_{21}/TV_{31} 3 个因素同时存在的条件下,放疗中期 VEGF 与 TV_{21} 的相关系数 $r = -0.3848$, $P = 0.017$; 放疗结束时 VEGF 与 TV_{31} 的相关系数 $r = -0.3261$, $P = 0.046$ 。从相关系数来看,当 MVD(X_2)控制时,VEGF(X_1)与

$TV_{21}/TV_{31}(X_3)$ 的相关性仍有显著性意义。

放疗结束后 3 月肿瘤基本全消,39 例患者中,仅有 6 例仍可见未完全消散肿瘤,其中 VEGF-1 例(1/15),VEGF+2 例(2/15),VEGF++3 例(3/9),从这结果也隐约可看出 VEGF 表达越强肿瘤消退越慢。其中 1 例未分化癌,为 T1 期患者,其 VEGF 表达呈强阳性,MVD 为 16(平均 16 ± 7),放疗前肿瘤体积仅 5.7 cm^3 ,但并未因为分化不良、肿瘤体积小而放射敏感性好,反而肿瘤消退速度慢。

2.4 MVD 与放射敏感性的关系

运用 Spearman 双变量相关,分析放疗中期、放疗结束时,肿瘤体积缩小百分比与 MVD 的关系,则显示它们的相关性无显著性意义,见表 2。

表 2 MVD 与 TV_{21} 、 TV_{31} 的关系

Table 2 The relationship between MVD and TV_{21} and TV_{31}

MVD	Case (n)	TV_{21}			TV_{31}		
		Max (%)	Min (%)	$\bar{x} \pm s$	Max (%)	Min (%)	$\bar{x} \pm s$
< 16	19	100	5	52 ± 32	100	26	78 ± 27
≥ 16	20	100	2	47 ± 29	100	28	73 ± 26
Total	39	100	2	49 ± 30	100	26	76 ± 26

$r = -0.185$, $P = 0.265$, in the middle of RT. $r = -0.244$, $P = 0.135$, RT finished

3 讨 论

肿瘤的放射敏感性除与病理学类型,肿瘤大小、大体类型等肿瘤细胞本身内在特性有关,还与肿瘤细胞氧含量有密切关系。VEGF 是一种能特异地作用于血管内皮细胞,对血管生长有极强诱导作用的生长因子。很多实验证实 VEGF 表达与肿瘤内 MVD 呈明显正相关^[2],本研究结果亦支持这种相关性。

美国 Smith 等^[3]对口腔及口咽癌的研究表明,VEGF 表达增加放疗的抵抗。Gorski 等^[4]对肺癌、食管癌、脑胶质瘤和黑色素瘤的研究认为放疗可诱导 VEGF 表达,阻滞 VEGF 表达可增加射线的杀伤力,增加放射敏感性。本研究结果亦显示 VEGF 与鼻咽癌放射敏感性有显著相关性,VEGF 表达强者放射敏感性差,VEGF 表达弱者放射敏感性好。其原因可能是乏氧细胞放射敏感性差,而缺氧是 VEGF 表达的最主要的调节因素之一,缺氧条件下,VEGF 的 mRNA 水平、蛋白和生物活性明显升

高^[5]。本研究中 5 例 VEGF 表达强阳性(其中 1 例为未分化癌)的 T1、T2 期患者,放射敏感性均较差,这提示不管 T 分期的早晚、还是肿瘤分化差,只要 VEGF 表达高(氧含量低),放射敏感性就差。放疗前 VEGF 高表达者可适当增加放射增敏剂,采用 VEGF 受体拮抗剂或直接对抗 VEGF 的抗体,或许可提高其放射敏感性,提高疗效。

有研究认为 MVD 与放射敏感性关系最为密切,高 MVD 的肿瘤比低 MVD 者放射敏感性好^[6]。也有作者认为肿瘤内 MVD 与放射敏感性无关^[3]。本结果显示鼻咽癌 MVD 与放射敏感性的相关性统计学无显著性意义。因此并非肿瘤组织内 MVD 越高血流就越好,氧含量就越高,放射敏感性越好,因为肿瘤快速增殖时,血管形成相对不足,而且肿瘤新生血管结构及功能异常,并不能给肿瘤有效地带来氧。Louvar 等^[7]用彩色多普勒检查前列腺癌发现癌灶内微血管数与血流无明显相关性。1990 年 Skinner^[8]发现肿瘤血管结构、功能异常造成肿瘤组织缺氧。

(下转第 167 页 to page 167)

U/L 差异无统计学意义,但早期流产率(包括生化妊娠)是 LH > 0.5IU/L 的 5 倍。不同学者报道差异较大,一方面可能与使用的 GnRH-a 制剂、剂量不同有关,另一方面可能与 IVF-ET 术后的黄体支持方案、妊娠的诊断标准不同有关。

以上表明,在 IVF-ET 超排卵中使用 GnRH-a 降低 LH 水平、抑制隐匿 LH 峰的发生是必要的,但卵泡发生、发育、卵巢甾体激素的生成及卵母细胞成熟是复杂的过程,需要适量的 FSH 及 LH 协同作用,本研究显示在 IVF-ET 的 COH 中血清 LH 水平不应低于 1 IU/L,否则,对 COH 有不利的影响,如患者 LH 水平过低,应适当减少 GnRH-a 用量或加用 LH 或人绝经期促性腺激素(HMG),维持适当的 LH 水平。

参考文献:

- [1] 钟依平,周灿权,庄广伦,等. 输卵管积水造口术对体外受精与胚胎移植的影响[J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(3): 215.
- [2] Porter R N, Smith W, Craft I L, *et al.* Induction of ovulation for in-vitro fertilization using busorelin and gonadotropins[J]. *Lancet*, 1984, 2(8414): 1284.
- [3] 周灿权,钟依平. 促性腺激素释放激素激动剂的临床应用[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 1999, 15(12): 754.
- [4] Filicori M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction[J]. *Fertil Steril*, 1999, 71(3): 405.
- [5] Fleming R, Chung C C, Yates R W, *et al.* Purified urinary follicle stimulating hormone induces different hormone profiles compared with menotrophins, dependent upon the route of administration and endogenous luteinizing hormone activity[J]. *Hum Reprod*, 1996, 11(9): 1854.
- [6] Yim S F, Lok I H, Cheung L P, *et al.* Dose-finding study for the use of long-acting gonadotrophin-releasing hormone analogues prior to ovarian stimulation for IVF[J]. *Hum Reprod*, 2001; 16(3) 492.
- [7] Esposito M A, Barnhart K T, Coutifaris C, *et al.* Role of periovulatory luteinizing hormone concentrations during assisted reproductive technology cycles stimulated exclusively with recombinant follicle-stimulating hormone[J]. *Fertil Steril*, 2001; 75(3): 519.
- [8] Wu T C, Wang L, Wan Y J. Detection of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human oocytes and cumulus-oocyte complexes using reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. *Fertil Steril*, 1993, 59(1): 54.
- [9] Bertrand E, Van-den-Bergh M, Englert Y. Clinical parameters influencing human zona pellucida thickness[J]. *Fertil Steril*, 1996, 66(3): 408.
- [10] Westergaard L G, Laursen S B, Andersen C Y. Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction[J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(5): 1003.

(编辑 张恩健)

(上接第 163 页 from page 163)

参考文献:

- [1] Bosari S, Delellis R A, Healtley G J. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 1992, 23(4): 755.
- [2] 郑丰平,袁世珍,王俊雅,等. 血管内皮生长因子表达与结肠癌血管生成、转移的关系[J]. 中山医科大学学报. 2002, 23(1), 73.
- [3] Smith B D, Smith G L, Carter D, *et al.* Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(10): 2046.
- [4] Gorski D H, Beckett M A, Jaskowiak N T, *et al.* Blockade of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(15): 3374.
- [5] Scott P A, Gleadle J M, Bicknell R, *et al.* Role of the hypoxia sensing system, acidity and reproductive hormones in the variability of vascular endothelial growth factor induction in human breast carcinoma cell lines[J]. *Int J Cancer*. 1998, 75(5): 706.
- [6] Kamijo T, Yokose T, Hasebe T, *et al.* Potential role of microvessel density in predicting radiosensitivity of T1 and T2 stage laryngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(8): 3159.
- [7] Louvar E, Littrup P J, Goldstein A, *et al.* Correlation of color Doppler flow in the prostate with tissue microvasculature[J]. *Cancer*, 1998, 83(1): 135.
- [8] Skinner S A, Tutton P J, O'Brien P E. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat[J]. *Cancer Res*, 1990, 50(8): 2411.

(编辑 黄小延)