

[文章编号] 1007-385X(2006)04-0290-06

血清 VEGF 和 Endostatin 水平与消化系肿瘤临床病理特征的关系

刘福国, 高艳景, 王敏, 许建民, 陈建, 赵幼安(山东大学齐鲁医院消化内科, 济南 250012)

[摘要] **目的:** 探讨消化道肿瘤患者手术前后血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和 Endostatin 的动态变化规律及其与临床病理特征的关系。**方法:** ELISA 法检测胃癌、肝癌、结直肠癌患者术前及术后 2 周血清 VEGF 和 Endostatin 水平, 并分别以慢性胃炎、慢性乙型肝炎、结肠腺瘤患者和健康人群作对照。**结果:** 胃癌、肝癌、结直肠癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平分别显著高于慢性胃炎、慢性乙型肝炎、结肠腺瘤患者及健康人群($P < 0.01$); 术前血清 VEGF、Endostatin 水平与细胞分化程度、肿瘤大小、浸润深度、区域淋巴结转移、远处转移及临床分期密切相关($P < 0.05$), 与性别、肿瘤部位等因素无关($P > 0.05$); 术后 2 周血清 VEGF 水平较术前均有显著性下降($P < 0.01$), 而血清 Endostatin 水平较术前升高($P < 0.01$)。**结论:** 胃癌、肝癌、结直肠癌患者血清 VEGF 和 Endostatin 水平升高, 且与肿瘤细胞分化程度、肿瘤大小、浸润深度、区域淋巴结转移、远处转移及临床分期密切相关, 它们可推荐作为评价胃癌、肝癌、结直肠癌恶性行为、预测浸润和转移程度的有效指标。

[关键词] 胃肿瘤; 肝肿瘤; 结直肠肿瘤; 血管内皮生长因子; Endostatin

[中图分类号] R735 [文献标识码] A

Relationship between serum levels of vascular endothelial growth factor and endostatin with clinico-pathological characteristics of patients with gastrointestinal cancer

LIU Fu-guo, GAO Yan-jing, WANG Min, XU Jian-min, CHEN Jian, ZHAO You-an (Department of Gastroenterology, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To study the relationship between serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), endostatin and pathological characteristics of patients with gastrointestinal cancer. **Methods:** Serum VEGF and endostatin levels were measured by enzyme-linked immunoassay in 60 patients with gastric carcinoma, 55 with hepatocellular carcinoma, 58 with colorectal carcinoma before and after surgical resection (two weeks later) and in control groups, which included 30 patients with chronic gastritis, 30 with chronic hepatitis B, 30 with adenoma of colon and 30 healthy persons. **Results:** The preoperative levels of VEGF and endostatin in patients with gastric carcinoma, hepatocellular carcinoma and colorectal carcinoma were significantly higher than those in patients with chronic gastritis, chronic hepatitis B, adenoma of colon and healthy persons ($P < 0.01$). The pre-operation VEGF and endostatin levels were closely related to the grades of cell differentiation, size of the primary tumors, depth of invasion, regional lymph-node metastasis, distant metastasis and pathological stage ($P < 0.01$), but not to tumor site and sex ($P > 0.05$). The post-operation VEGF levels were significantly lower than that of pre-operation ($P < 0.01$), while postoperative endostatin levels were significantly higher than that of preoperation ($P < 0.01$). **Conclusion:** Elevated serum VEGF and endostatin levels in patients with gastric, hepatocellular and colorectal carcinoma are closely correlated to the grade of cell differentiation, size of the primary tumors, invasion, metastases and pathological stages. Serum VEGF and endostatin levels may be used for evaluating the biological behavior, invasion and metastasis of gastric, hepatocellular and colorectal carcinoma preoperatively.

[Key words] gastric carcinoma; hepatocellular carcinoma; colorectal carcinoma; vascular endothelial growth factor; Endostatin

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(4): 290-295]

[基金项目] 山东省卫生厅科技资助项目(2001CA1CJB9)

[作者简介] 刘福国(1976-),男,主治医师,在读博士,主要从事消化系肿瘤诊治方面的研究

[通讯作者] 高艳景, E-mail: yanjinggao@yahoo.com.cn

肿瘤血管生成是一个多基因、多因子参与的过程,该过程受到“血管生成开关”系统精密调控,使血管生成促进因子和抑制因子保持平衡^[1]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和 Endostatin 分别是目前已知的作用最强的血管生成促进因子和抑制因子^[2-3],深入研究两者在肿瘤生长、浸润、转移中的作用及手术前后的变化规律对肿瘤早期诊断和判断预后具有重要的临床意义。本研究采用 ELISA 法测定胃癌、肝癌、结直肠癌患者手术前后血清 VEGF、Endostatin 浓度,并以相应脏器的良性病变和健康人群作对照,详细探讨了上述 3 种消化系肿瘤患者手术前、后血清 VEGF 和 Endostatin 水平的变化及其与临床病理特征的关系。

1 材料与方法

1.1 病例选择

2004 年 10 月至 2005 年 10 月山东大学齐鲁医院普外科收治的初诊消化系肿瘤患者,其中胃癌 60 例,35~71 岁,平均(53.30±8.24)岁;肝癌 55 例,34~64 岁,平均(49.13±7.11)岁;结直肠癌 58 例,32~70 岁,平均(51.16±8.63)岁,所有患者均经术后病理证实。慢性胃炎[27~59 岁,平均(41.37±8.39)岁]、慢性乙型肝炎[26~61 岁,平均(40.83±8.38)岁]和结肠腺瘤[29~65 岁,平均(45.47±9.73)岁]患者各 30 例均来自本院消化内科同期住院患者。健康人群组 30 例[24~52 岁,平均(38.33±7.76)岁]来自健康志愿者及健康查体者。试验前对所有受试者履行知情同意告知并获同意后入选本试验。

1.2 主要试剂及仪器

人 VEGF ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司,人 Endostatin ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。芬兰产 Multiskan MK3 型全自动酶标仪。

1.3 血清标本的收集与保存

所有患者均于入院未治疗前清晨空腹(健康人群则随机清晨空腹)抽取外周静脉血 4 ml(不抗凝),室温放置 30~60 min 后 3 000 r/min 离心 10 min,分离并留取血清置-70℃低温冷冻备用。手术治疗的癌症患者于术后 2 周同法收集血清冷冻备用。

1.4 ELISA 检测血清 VEGF 及 Endostatin 浓度

双抗体夹心 ELISA 法测定血清 VEGF 及 Endostatin 浓度,检测方法严格按试剂盒说明书进行。全自动酶标仪测定光密度值(D),VEGF 检测波长为 450 nm,Endostatin 检测波长为 490 nm。绘制标准曲线,通过标本的 D 值在标准曲线上查出其对应浓度。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,各组间均数比较用 t 检验或方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平与临床病理学指标的关系

胃癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平均明显高于健康人群组和慢性胃炎组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。健康人群组与慢性胃炎组血清 VEGF、Endostatin 水平无统计学差异($P > 0.05$)。血清 VEGF 和 Endostatin 水平与性别无明显相关性($P > 0.05$),而与胃癌组织学分型、浸润深度、区域淋巴结转移、远处转移及肿瘤分期密切相关,低分化型癌、侵及浆膜、有区域淋巴结转移和远处转移、进展期胃癌患者血清 VEGF 和 Endostatin 水平分别显著高于分化型癌、未侵及浆膜、无区域淋巴结转移和远处转移、早期胃癌患者($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 肝癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平与临床病理学指标的关系

肝癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平均明显高于健康对照组和慢性乙型肝炎组($P < 0.05$)。肿瘤直径 ≥ 5 cm、有门静脉癌栓者血清 VEGF 和 Endostatin 水平明显高于肿瘤直径 < 5 cm、无门静脉癌栓者($P < 0.05$)。血清 VEGF 和 Endostatin 水平与性别、肿瘤类型(单结节或多结节)、是否合并肝硬化无关($P > 0.05$) (表 2)。

2.3 结直肠癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平与临床病理学指标的关系

结直肠癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平均明显高于健康人群组和结肠腺瘤组($P < 0.05$)。血清 VEGF 和 Endostatin 水平与肿瘤大小有关($P < 0.05$);低分化型癌、有区域淋巴结转移及肝脏转移者,血清 VEGF 和 Endostatin 水平分别明显高于分化型癌($P < 0.01$)、无区域淋巴结转移($P < 0.05$)及肝脏转移者($P < 0.05$);VEGF 和 Endostatin 水平随着结直肠癌 Dukes 分期的上升而升高,且有统计学差异($P < 0.05$),但 Dukes A 期与 B 期间、C 期与 D 期间比较无统计学差异($P > 0.05$)。VEGF 和 Endostatin 水平与性别、肿瘤部位无明显相关性($P > 0.05$) (表 3)。

2.4 胃癌、肝癌、结直肠癌患者手术前后血清 VEGF 和 Endostatin 浓度的变化

胃癌、肝癌、结直肠癌患者术后 2 周血清 VEGF 水平较术前均有显著下降,而 Endostatin 水平较术前则升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$) (表 4)。

表 1 胃癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平与临床病理学指标的关系

Tab. 1 Relationship between preoperative serum VEGF and endostatin levels and pathologic factors in gastric carcinoma

Parameters	n	VEGF(pg/ml)		Endostatin(ng/ml)	
		$\bar{x} \pm s$	P	$\bar{x} \pm s$	P
Sex					
Male	37	377.18 ± 162.47		54.79 ± 14.19	
Female	23	423.19 ± 153.81	>0.05	58.07 ± 13.38	>0.05
Histologic types ^①					
Well differentiation	24	331.90 ± 116.17		51.37 ± 10.05	
Poor differentiation	36	436.76 ± 171.71	<0.05	59.17 ± 15.25	<0.05
Depth of invasion					
T ₁	5	176.08 ± 40.96		39.20 ± 1.39	
T ₂	20	309.07 ± 83.84		48.55 ± 5.94	
T ₃	26	415.79 ± 113.15		56.82 ± 9.39	
T ₄	9	646.29 ± 95.84	<0.01	79.84 ± 10.05	<0.05
Regional lymph-node metastasis					
Yes	38	459.67 ± 143.76		61.64 ± 13.19	
No	22	282.80 ± 119.55	<0.01	44.53 ± 5.17	<0.01
Distant metastasis					
Yes	17	507.06 ± 170.24		66.17 ± 15.56	
No	43	350.44 ± 132.57	<0.01	52.05 ± 10.95	<0.01
Clinicopathological stage					
I	7	186.01 ± 56.77		41.17 ± 3.86	
II	18	334.22 ± 88.37		49.56 ± 6.71	
III	26	404.28 ± 100.04		57.68 ± 11.29	
IV	9	651.07 ± 129.32	<0.05	75.89 ± 13.14	<0.01*
Groups					
Healthy persons	30	117.54 ± 25.27		32.82 ± 6.71	
Chronic gastritis	30	125.90 ± 18.09		34.01 ± 4.39	
Gastric carcinoma	60	394.81 ± 159.49	<0.01 [△]	56.05 ± 13.86	<0.01 [△]

① Well differentiation: Papillary adenocarcinoma, tubular adenocarcinoma; Poor differentiation: Poorly differentiated adenocarcinoma, signet-ring cell carcinoma, mucinous adenocarcinoma. ② T₁: Tumor invades lamina propria or submucosa; T₂: Tumor invades muscularis propria; T₃: Tumor invades adventitia; T₄: Tumor invades adjacent structures

* P > 0.05 Stage I vs stage II ; [△] P > 0.05 healthy persons vs chronic gastritis

3 讨 论

肿瘤血管新生是肿瘤生长和转移的基础,当实体肿瘤直径大于 1~2 mm 后,它的生长就必须依靠新生血管。肿瘤如果不能血管化,生长至 2~3 mm 便发生

退化^[4,5]。因此新生血管形成是肿瘤发生发展中的关键环节之一。肿瘤血管生成包括血管周围细胞外基质重塑、基膜降解、内皮细胞增殖迁移、新生血管成形等多个步骤,这一过程中有多种细胞因子参与其中,共同

影响新生血管的形成。O'Reilly 等^[3]认为原发性肿瘤成,这一假说已由许多试验所证实。可分泌两种相互拮抗的因子,分别抑制和刺激血管生

表 2 肝癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平与临床病理学指标的关系
Tab. 2 Relationship between preoperative serum VEGF and endostatin levels and clinicopathologic factors in hepatocellular carcinoma

Parameters	n	VEGF(pg/ml)		Endostatin(ng/ml)	
		$\bar{x} \pm s$	P	$\bar{x} \pm s$	P
Sex					
Male	38	394.71 ± 116.11		40.30 ± 10.30	
Female	17	437.11 ± 102.91	>0.05	44.10 ± 10.28	>0.05
Tumor size					
≥5 cm	39	442.08 ± 103.69		43.61 ± 10.54	
<5 cm	16	324.30 ± 90.70	<0.01	36.26 ± 7.98	<0.01
Tumor number					
Solitary	39	405.39 ± 100.89		41.12 ± 9.74	
Multiple	16	413.74 ± 141.83	>0.05	42.34 ± 12.02	>0.05
Portal vein tumor thrombus					
Yes	15	516.99 ± 77.17		50.28 ± 8.78	
No	40	366.88 ± 96.10	<0.01	38.17 ± 8.93	<0.01
Underlying cirrhosis					
Yes	9	397.95 ± 74.10		38.66 ± 6.34	
No	46	409.75 ± 119.66	>0.05	42.02 ± 10.93	>0.05
Groups					
Healthy persons	30	117.54 ± 25.27		32.82 ± 6.71	
Chronic hepatitis B	30	129.36 ± 29.37		34.61 ± 6.89	
Hepatocellular carcinoma	55	407.81 ± 112.98	<0.01*	41.47 ± 10.35	<0.01*

** P>0.05 healthy persons vs chronic hepatitis B

有研究显示多种恶性肿瘤患者的血清 VEGF 和 Endostatin 水平明显增高^[6-7]。VEGF 是目前已知的作用最强、特异性最高的血管生成调控因子^[2],它不仅能与位于血管、淋巴管内皮细胞表面的受体结合,通过调节血管和淋巴管的生成、增加其通透性而促进肿瘤生长和转移,还能通过自分泌途径与肿瘤细胞表面的受体相结合,直接促进肿瘤生长^[8]。近年发现的 Endostatin 则被认为是迄今为止最有效的内源性血管生长抑制因子之一^[3]。体外和动物实验表明 Endostatin 及其类似物在体外能有效抑制内皮细胞的生长、移行,在体内显著退缩和停滞原发瘤和转移瘤的生长^[3]。Endostatin 可竞争性阻断 VEGF 诱导血管生成的信号传

导通路,减少血管内皮细胞膜 VEGF 受体的数量、降低体内 VEGF mRNA 水平表达^[9]。Endostatin 和 VEGF 的作用相互拮抗,共同影响肿瘤新生血管的生成。但迄今有关联合检测消化道肿瘤患者血清 VEGF 和 Endostatin 水平及其手术前后动态变化的研究国内尚未见报道。

本研究中胃癌、肝癌、结直肠癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平均显著高于相应脏器的良性病变(慢性胃炎、慢性乙型肝炎、结肠腺瘤)患者和健康对照组(P<0.05),与 Kuroi 等^[7]的研究结果一致,表明这三种消化道肿瘤细胞确能分泌大量 VEGF,促进肿瘤血管生成,以提供肿瘤细胞生长所需的营养物质

并为肿瘤转移提供条件。同时,肿瘤组织通过多种途径刺激机体产生大量 Endostatin,经血液循环到达肿瘤

部位,抑制原发和继发肿瘤血管的生成,与血管生成促进因子的作用相拮抗,达到一种平衡。

表 3 结直肠癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平与临床病理学指标的关系
Tab.3 Relationship between preoperative serum VEGF and endostatin levels and clinicopathologic factors in colorectal carcinoma

Parameters	n	VEGF(pg/ml)		Endostatin(ng/ml)	
		$\bar{x} \pm s$	P	$\bar{x} \pm s$	P
Sex					
Male	37	277.31 ± 90.21		58.97 ± 20.73	
Female	21	282.77 ± 65.88	>0.05	60.37 ± 15.22	>0.05
Tumor size					
≥5 cm	25	316.31 ± 84.71		66.67 ± 18.03	
<5 cm	33	251.24 ± 67.94	<0.01	54.03 ± 17.73	<0.05
Tumor site					
Colon	21	266.13 ± 92.50		55.63 ± 20.88	
Rectum	37	286.75 ± 75.15	>0.05	61.67 ± 17.42	>0.05
Histologic types					
Poor differentiation	20	324.27 ± 92.15		68.83 ± 18.96	
Well differentiation	38	255.60 ± 65.15	<0.01	54.56 ± 16.95	<0.01
Regional lymph-node metastasis					
Yes	32	300.93 ± 77.92		64.38 ± 16.70	
No	26	252.64 ± 79.61	<0.05	53.45 ± 19.77	<0.05
Liver metastasis					
Yes	14	327.21 ± 98.36		69.39 ± 20.21	
No	44	264.03 ± 70.21	<0.05	56.33 ± 17.39	<0.05
Dukes' stage					
A	7	218.22 ± 67.97		47.32 ± 16.62	
B	15	241.96 ± 55.90		51.36 ± 17.25	
C	21	297.67 ± 67.73		63.65 ± 15.59	
D	15	319.35 ± 99.55	<0.01*	67.44 ± 20.89	<0.05*
Groups					
Healthy persons	30	117.54 ± 25.27		32.82 ± 6.71	
Adenoma of colon	30	126.60 ± 23.81		35.19 ± 6.35	
Colorectal carcinoma	58	279.28 ± 81.67	<0.01 [△]	59.48 ± 18.79	<0.01 [△]

* P>0.05 stage A vs stage B, stage C vs stage D; [△]P>0.05 healthy persons vs adenoma of colon

Feldman 等^[10]发现结直肠癌伴肝转移患者血清 Endostatin 水平明显增高,并与 VEGF 水平及疾病的进

展相关。本研究观察到,胃癌、肝癌、结直肠癌患者术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平与原发肿瘤大小、临床

病理分期、区域淋巴结转移、远处转移密切相关,随着肿瘤增大,血清 VEGF、Endostatin 浓度明显升高,有区域淋巴结转移及远处转移者血清 VEGF 及 Endostatin 浓度亦明显高于无区域淋巴结及远处转移者($P < 0.05$)。实验还发现,术前血清 VEGF 和 Endostatin 水平与肿瘤组织学分型及浸润深度亦有密切关系,细胞分化程度越低、浸润越深,血清 VEGF、Endostatin 水平越高。这一结果反映了随着恶性程度升高,肿瘤分泌 VEGF、Endostatin 均增加,但两者增加的程度可能并不平行,加之肿瘤组织还可产生其它血管生成促进因子和抑制因子,使得“血管生成开关”处于开放状态,促血管生成效应占据优势,恶性肿瘤得以无限制地生长、

侵袭和远处转移。有研究表明快速生长的癌组织极易出现缺血缺氧,导致 VEGF 大量分泌,以加速血管内皮细胞的增殖和分化,促使新生血管生成,从而满足肿瘤生长的需求。肿瘤的恶性程度越高,对氧的需求越高,VEGF 的分泌也越多。同时,随肿瘤恶性程度增高,蛋白水解酶(如弹性蛋白酶、基质金属蛋白酶及组织蛋白酶 L 等)分泌增加,降解血管基底膜中的胶原蛋白 X VIII,使 Endostatin 的生成也相应增加^[11-12]。本研究认为,术前血清 VEGF、Endostatin 水平可反映肿瘤部位的血管增生程度及体内肿瘤负荷的大小,作为评价胃癌、肝癌、结直肠癌肿瘤恶性程度及进展程度的指标,并有可能作为抗血管治疗的效应指标。

表 4 胃癌、肝癌、结直肠癌患者手术前后血清 VEGF 和 Endostatin 浓度变化

Tab.4 Pre- and post-operative serum VEGF and endostatin levels in patients with gastric, hepatocellular and colorectal carcinoma

Groups	n	VEGF($\bar{x} \pm s$, pg/ml)		Endostatin($\bar{x} \pm s$, ng/ml)	
		Preoperation	Postoperation	Preoperation	Postoperation
Gastric carcinoma	60	394.81 ± 159.49	203.28 ± 97.31**	56.05 ± 13.86	65.96 ± 14.33**
Hepatocellular carcinoma	55	407.81 ± 112.98	219.26 ± 90.22**	41.47 ± 10.35	51.45 ± 10.05**
Colorectal carcinoma	58	279.28 ± 81.67	175.40 ± 58.23**	59.48 ± 18.79	71.33 ± 17.39**

** $P < 0.01$ vs preoperation

本研究结果显示,胃癌、肝癌、结直肠癌患者行根治性手术治疗后血清 VEGF 水平较术前均有明显降低,而 Endostatin 水平则较术前升高(P 均 < 0.01)。提示作为有效的治疗手段,根治性手术的“去肿瘤负荷作用”解除了肿瘤对机体的浸润及血管生成的影响,使得肿瘤新生血管生成减少,在一定程度上减缓了肿瘤的进展,可作为判断手术疗效及预后的指标。

[参考文献]

[1] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(6 Suppl 16): 15-18.

[2] Brooks PC, Montgomery AM, Cheresch DA. Use of the 10-day-old chick embryo model for studying angiogenesis [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 129: 257-269.

[3] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.

[4] Folkman J, Watson K, Ingber D, et al. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia [J]. *Nature*, 1998, 339(6219): 58-61.

[5] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. *Cell*, 1996, 86(3): 353-364.

[6] Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(4): 1207-1225.

[7] Kuroi K, Tanaka C, Toi M. Circulating levels of endostatin in cancer patients [J]. *Oncol Rep*, 2001, 8(2): 405-409.

[8] Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, et al. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(3): 854-859.

[9] Kim YM, Hwang S, Kim YM, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(31): 27872-27879.

[10] Feldman AL, Alexander HR Jr, Bartlett DL, et al. A prospective analysis of plasma endostatin levels in colorectal cancer patients with liver metastases [J]. *Ann Surg Oncol*, 2001, 8(9): 741-745.

[11] Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(26): 15809-15814.

[12] Wen W, Moses MA, Wiederschain D, et al. The generation of endostatin is mediated by elastase [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(24): 6052-6056.

[收稿日期] 2006-05-10

[修回日期] 2006-07-06

[本文编辑] 王莹