

VEGF 表达预测鼻咽癌放疗效应的价值

刘阳云,刘庚勋,李正贤,江文,毛坤华,陈琼
(湖南师范大学第二附属医院,解放军第163医院,湖南长沙410003)

摘要: [目的] 探讨血管内皮生长因子(VEGF)预测鼻咽癌(NPC)放疗效应的价值。[方法] 应用免疫组化法检测 50 例放射敏感和 30 例放射抵抗的鼻咽部低分化鳞状细胞癌在接受放疗前的肿瘤组织中 VEGF 的表达情况,分析 VEGF 的表达与放疗效应的关系。[结果] VEGF 在 NPC 中总的阳性表达率为 58.75% (47/80)。在 50 例放射敏感的 NPC 组织中,33 例 (66.00%) VEGF 阳性表达,在 30 例放射抵抗的 NPC 组织中,14 例 (46.67%) VEGF 阳性表达;两组比较,差异无统计学意义 ($\chi^2=2.892, P=0.105$)。根据 VEGF 阳性表达预测 NPC 放疗抵抗,其预测鼻咽癌放疗效应的敏感性 46.67%,特异性 34.00%,准确率 38.75%。ROC 曲线下面积为 0.625 (95% CI: 0.491~0.760; $P=0.062$)。[结论] 放疗前鼻咽部低分化鳞状细胞癌肿瘤组织中 VEGF 表达对预测放疗效应的价值有限。

关键词: 血管内皮生长因子;鼻咽癌;放射治疗

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2014)04-0329-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.04.A012

The Value of VEGF Expression to Predict the Effect of Radiotherapy in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma

LIU Yang-yun, LIU Geng-xun, LI Zheng-xian, et al.

(The Second Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410003, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the value of vascular endothelial growth factor(VEGF) expression to predict the effect of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma(NPC). [Methods] The expression of VEGF protein in 50 radiosensitive tissue samples and 30 tissue samples radioresistant with poorly differentiated NPC (before radiotherapy) were detected by immunohistochemical staining (SP method). The association of the expression of VEGF and the effect of radiotherapy was analyzed. [Results] The positive rates of VEGF expression in all NPC tissues were 58.75% (47/80). The positive rate of VEGF was 66.00% (33/50) and 46.67% (14/30) in radioresistant and radiosensitive NPC tissues, respectively, there was no statistical difference between the two groups ($\chi^2=2.892, P=0.105$). Based on the positive expression of VEGF to predict the effect of radiotherapy, the sensitivity, specificity and accuracy were 46.67%, 34.00% and 38.75%, respectively. The area under ROC curve was 0.625 (95% CI: 0.49~0.76, $P=0.062$). [Conclusions] The value of the VEGF expression as a marker for predicting response to radiotherapy was limited for NPC.

Key words: VEGF; nasopharyngeal carcinoma; radiotherapy

血管内皮生长因子(VEGF)在许多肿瘤中呈高表达,它与肿瘤放疗效应的关系已见于大量的研究中。有研究表明,肿瘤组织中 VEGF 的高表达与放疗抵抗显著相关,是一个独立的预后不良的标志^[1-5]。然而,这一观点并不被所有学者认同,目前至少有 5 种相互矛盾、甚至完全相反的观点^[1-11]。鼻咽癌(NPC)首

选放疗,且 NPC 肿瘤组织中 VEGF 的高表达与 NPC 各种生物学行为密切相关^[1,4,7,12],为探讨 NPC 肿瘤组织中 VEGF 表达与 NPC 放疗疗效的关系及 VEGF 能否作为预测 NPC 放疗效应的指标,本研究回顾性分析了 50 例放射敏感和 30 例放射抵抗的鼻咽部低分化鳞状细胞癌患者在接受放疗前的肿瘤组织中 VEGF 表达情况,以探讨 VEGF 作为预测 NPC 放疗效应的指标的临床价值。

收稿日期:2013-07-21;修回日期:2013-08-19
基金项目:湖南省卫生厅科研项目(C2012-009)
通讯作者:刘阳云, E-mail:lyyundr@aliyun.com

1 资料与方法

1.1 临床资料

关于放射抵抗和放射敏感目前没有一个明确的定义^[13],本研究参考相关文献^[13,14]。入选放射抵抗组标准:①首次就诊活检时未接受任何治疗;②病理确诊为鼻咽低分化鳞状细胞癌者给予单纯放射治疗(本研究所有Ⅲ~Ⅳ期患者均接受了以铂剂为主的同步放化疗);③在放疗结束后12个月内肿瘤复发,且复发部位在原发肿瘤位置,复发肿瘤病理确诊为低分化鳞状细胞癌。入选放射敏感组的标准:①首次就诊活检时未接受任何治疗;②病理确诊为鼻咽部低分化鳞状细胞癌者给予单纯放射治疗(本研究所有Ⅲ~Ⅳ期患者均接受了以铂剂为主的同步放化疗);③放疗结束后最少随访3年没有明显的鼻咽肿瘤复发。放射敏感组鼻咽部低分化鳞状细胞癌石蜡标本50例,男性31例,女性19例,年龄17~78岁,平均年龄46.5岁;放射抵抗组鼻咽部低分化鳞状细胞癌石蜡标本30例,男性17例,女性13例,年龄18~79岁,平均年龄44.8岁。采用2003年修改的国际抗癌联盟(UICC)和美国肿瘤联合会(AJCC)联合制定的TNM分期法:放射敏感组Ⅰ~Ⅱ期15例,Ⅲ~Ⅳ期35例;放射抵抗组Ⅰ~Ⅱ期7例,Ⅲ~Ⅳ期23例。所有病例活检前均未接受抗癌治疗。两组的TNM分期、性别比例、平均年龄差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 试剂

VEGF抗体、UltraSensitiveTMS-P超敏SP试剂盒、酶底物显色剂DAB kit(20×)、内源性生物素阻断试剂盒IHC Biotin Block Kit、EDTA抗原修复缓冲液(50×)(pH8.0)均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 方法

石蜡标本做成3 μ m厚的组织切片,均再次病理确诊为鼻咽部低分化鳞状细胞癌。

1.3.1 免疫组化方法

采用常规S-P法,石蜡切片常规脱蜡水化。每张切片滴加过氧化物酶阻断液,室温下孵育10min。组织抗原微波修复。滴加非免疫动物血清,室温下孵育10min。滴加一抗(工作浓度为1:100),湿盒中37℃孵育60min。滴加生物素标记的二抗,室温下孵育10min。链霉菌抗生物素—过氧化物酶孵育10min。

上述各步骤之间均以PBS(0.01mol/L,pH7.4)洗片3次。DAB显色,苏木素复染细胞核,中性树胶封片。用PBS代替第一抗体作阴性对照,用已知乳腺癌阳性片作为阳性对照。

1.3.2 免疫组织化学结果判定

在光学显微镜下观察,参照文献^[12],细胞浆或细胞膜上呈棕黄色染色为VEGF阳性细胞,结果评分采用双盲法,选有代表性的高视野计数500个癌细胞,结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色强度两方面计算VEGF免疫组化染色评分:(1)阳性细胞百分比:无阳性细胞为0分,阳性细胞 $\leq 5\%$ 为1分,阳性细胞6%~50%为2分,阳性细胞50%~75%为3分,75%~100%为4分。(2)阳性细胞染色强度:阴性为0分无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色。两项的乘积即为该例病变的免疫组化评分,0~1分为(-),2~4分为(+),5~7分为(++), ≥ 8 分为(+++);+~+++为阳性表达。

1.3.3 治疗方法

全部研究对象均接受6MV-X线调强适形放疗。剂量分布:大体肿瘤区(GTV) D_T 7000cGy,32~33次;临床靶区(CTV):CTV1(高危区),包括鼻咽各壁、咽后间隙、颅底、翼腭窝、咽旁间隙(含茎突前、后间隙)、蝶窦、后组筛窦及后1/3的鼻腔和上颌窦、所有颈部淋巴结, D_T 6400~6600cGy,32~33次;CTV2(低危区)为颈部预防照射区, D_T 5400~5600cGy,32~33次。同步化疗方案为在放射治疗的第1、5周给予2个周期顺铂化疗,第1~5d顺铂30mg/m²连续静脉滴注。

1.4 统计学处理

所有数据均用SPSS15.0 for windows统计程序包进行统计学分析。放射抵抗组与放射敏感组间VEGF阳性表达率的差异及VEGF表达强度与NPC放射效应的关系采用 χ^2 检验;绘制ROC曲线并计算曲线下面积,行Z检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 VEGF的表达情况

VEGF在NPC中总的阳性表达率为58.75%(47/80)。50例放射敏感的NPC组织中,33例(66.00%) VEGF阳性表达。30例放射抵抗的NPC组织中,14例

(46.67%)VEGF 阳性表达。两组比较,差异无统计学意义($\chi^2=2.892, P=0.105$)。

2.2 VEGF 表达对 NPC 放疗效应的预测价值

VEGF 表达对 NPC 放疗效应的预测价值见表 1。敏感性为 46.67%;特异度为 34.00%;准确率为 38.75%;阳性预测值(PPV)为 29.79%;阴性预测值(NPV)为 51.52%;假阳性率为 70.21%;假阴性率为 48.48%。Table 1。

ROC 曲线(Figure 1)下面积 $A=0.625$ (95%CI: 0.491~0.760; $P=0.062$), 表明放疗前 NPC 肿瘤组织中 VEGF 表达情况对预测鼻咽部低分化鳞状细胞癌放疗效应的价值有限。

Table 1 The value of VEGF to predict the effect of radiotherapy in NPC

VEGF	The effect of radiotherapy	
	Radioresistant(30)	Radiosensitive(50)
Negative(47)	True positive(14)	False positive (33)
Positive(33)	False negative(16)	True negative(17)

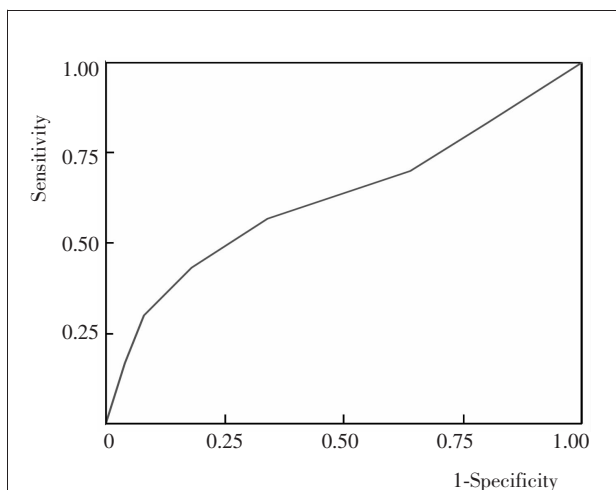


Figure 1 ROC curve of VEGF

3 讨论

VEGF 是促肿瘤血管生成的重要因素, 与肿瘤放疗抵抗有关。然而关于 VEGF 与肿瘤放疗效应及预后之间的关系, 目前尚有颇多争议, 至少有以下 5 种不同的观点: ①肿瘤组织中 VEGF 的高表达与肿瘤发生发展及侵袭转移有关, 是肿瘤放疗抵抗的标志, 是一个独立的预后不良标志^[1-5]; ②肿瘤细胞对放疗是否敏感, 不取决于放疗前肿瘤细胞 VEGF 的

表达水平, 而取决于随着放疗剂量的增加肿瘤细胞中 VEGF 分泌增加的量, 其增加的幅度与放疗抵抗性呈正相关^[6]。③只有血清中 VEGF 升高才可作为鼻咽癌预后不良的标志, 而肿瘤组织中 VEGF 的表达水平与鼻咽癌预后没有相关性^[7]; ④放疗前血清 VEGF 低水平才是放疗效果欠佳的标志, 是影响肿瘤预后的危险因素^[8]; ⑤无论是血浆中还是肿瘤组织中 VEGF 的表达水平与肿瘤放疗及预后均无关^[9-11]。

由于目前关于血浆 VEGF 受放疗影响的发展趋势在不同的研究中并不一致, 而且其调节机制非常复杂, 因此, 测量血浆 VEGF 作为放疗效应及预后指标的价值有限^[15,16]。基于此, 本研究仅评估 NPC 肿瘤组织中的 VEGF 表达作为预测 NPC 放疗效应指标的价值。

VEGF 在 NPC 肿瘤组织中的阳性率各家文献报道不一, 多在 60%左右^[4,12], 但 Kurnianda 等^[7]报道仅 36.67%(11/30)。造成这种差异的原因可能与种族差异、组织特异性、所用的免疫组化方法、试剂和实验条件, 以及所用的判断标准不同有关, 也许还有其它一些尚不清楚的因素, 但总的说来, VEGF 在 NPC 组织中表达阳性率不是太高。本研究中, 其表达阳性率为 58.75%(47/80), 提示 VEGF 不是一个理想的预测放疗效应及预后的指标。

在 50 例放射敏感的 NPC 组织中, 33 例(66.00%) VEGF 阳性表达, 在 30 例放射抵抗的 NPC 组织中, 14 例(46.67%) VEGF 阳性表达, 两组差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究结果与许多研究^[1-5]的观点相左, 与 Hovinga 等^[6,7]的观点一致。Brown 等^[17]认为, 肿瘤细胞的放射抵抗由两个方面的因素决定: 一是肿瘤细胞通过启动其遗传不稳定基因组的抗拒性表型, 使肿瘤细胞抗拒放射线; 二是通过肿瘤细胞影响内皮细胞的基因表型, 使得内皮细胞也抗拒放疗。他指出, 肿瘤细胞分泌 VEGF 促进了这些基因型的表达, 这种由于旁分泌所致的基因上调, 提高了与肿瘤相关的内皮细胞的放射抗拒性, 是肿瘤抗拒放疗的因素之一, 应用抗 VEGF 抗体可以增加放射诱导的凋亡。因此, 我们认为, 在放射抵抗组与放射敏感组的肿瘤组织中, VEGF 表达无统计学差异并不说明 VEGF 与放疗效应无关, 而是说明放疗前肿瘤组织中的 VEGF 表达对 NPC 的放疗效应并不产生决定性的影响。Hovinga 等^[6]明确指出, 肿瘤细胞对放

疗是否敏感,不取决于放疗前肿瘤细胞 VEGF 的表达水平,而取决于随着放疗剂量的增加肿瘤细胞中 VEGF 分泌增加的量,其增加的幅度与放疗抵抗性呈正相关。

从本研究结果分析,根据放疗前肿瘤细胞中 VEGF 的表达来预测 NPC 的放疗效应,敏感性为 46.67%,假阳性率为 70.21%。如果因此而预测这些患者对放射抵抗,在放疗开始的同时使用 VEGF 抑制剂,则有 70.21%(假阳性者)的患者实际上接受了过度治疗,加重了他们的经济负担及增加了他们的治疗风险。特异度为 34.0%,准确率仅 38.75%,说明肿瘤组织中 VEGF 的表达不能很好地预测 NPC 的放疗效应,放疗前 VEGF 的表达对治疗方案的选择意义不大。

ROC 曲线是反映某指标敏感性和特异性连续变量的综合指标,以真阳性率为纵坐标,假阳性率为横坐标。在坐标上由无数个临界值求出的无数对真阳性率与假阳性率作图构成,ROC 曲线下面积可用来评价诊断效率,目前已成为广泛应用于临床诊疗和人群筛检研究的一种统计方法^[18]。ROC 曲线下面积实际的取值范围为 0.5~1,而一般认为:对于一个诊断试验,ROC 曲线下面积在 0.5~0.7 之间时诊断价值较低,在 0.7~0.9 之间时诊断价值中等,在 0.9 以上时诊断价值较高。本研究中,ROC 曲线下面积 0.625,说明放疗前 NPC 肿瘤组织中 VEGF 表达对预测鼻咽部低分化型鳞状细胞癌放疗效应的价值有限。寻找 NPC 更好的放疗效应预测指标,并根据其预测结果制订个性化的治疗方案依然任重而道远。

参考文献:

- [1] Pan J,Tang T,Xu L,et al.Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2,vascular endothelial growth factor,and epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma[J]. Head Neck,2013,35(9):1238-1247.
- [2] Zhan P,Wang J,Lv XJ,et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis[J]. J Thorac Oncol,2009,4(9):1094-1103.
- [3] Rades D,Golke H,Schild SE,et al.Impact of VEGF and VEGF receptor 1(FLT1) expression on the prognosis of stage III esophageal cancer patients after radio-chemotherapy[J]. Strahlenther Onkol,2008,184(8):416-420.
- [4] Liu YM,Liang BL,Lu TX,et al.The relationships among the expression of vascular endothelial growth factor,microvessel density and radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma [J]. Journal of Sun Yat-sen University(Medical Sciences),2003,24(2):160-163,167.[刘宜敏,梁碧玲,卢泰祥,等.鼻咽癌血管内皮生长因子及微血管与放射敏感性[J]. 中山大学学报(医学科学版),2003,24(2):160-163,167.]
- [5] Nomiya T,Nemoto K,Miyachi H,et al. Relationships between radiosensitivity and microvascular density in esophageal carcinoma: significance of hypoxic fraction[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2004,58(2):589-596.
- [6] Hovinga KE,Stalpers LJ,van Bree C,et al. Radiation-enhanced vascular endothelial growth factor(VEGF) secretion in glioblastoma multiforme cell lines-a clue to radioresistance [J]. J Neurooncol,2005,74(2):99-103.
- [7] Kurnianda J,Hardianti MS,Harijadi,et al. Elevation of vascular endothelial growth factor in indonesian advanced stage nasopharyngeal carcinoma[J]. Kobe J Med Sci,2009,55(2):E36-E44.
- [8] AI YQ,Liu GX,Li R,et al. Clinical significance of the serum VEGF before and after radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. Medicine and Pharmacy of Yunnan,2010,31(1):67-69.[艾毅钦,刘光贤,李荣,等.鼻咽癌患者放疗前后测定血清 VEGF 的临床意义[J]. 云南医药,2010,31(1):67-69.]
- [9] Pan L,Baek S,Edmonds PR,et al.Vascular endothelial growth factor(VEGF) expression in locally advanced prostate cancer: secondary analysis of radiation therapy oncology group (RTOG) 8610[J]. Radiat Oncol,2013,8:100.
- [10] Katanyoo K,Chantarasri A,Chongtanakon M,et al. Pre-treatment levels of serum vascular endothelial growth factor do not correlate with outcome in patients with locally advanced cervical cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev,2011,12(3):699-702.
- [11] Zou Y,Cheng C,Omura-Minamisawa M,et al.The suppression of hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor by siRNA does not affect the radiation sensitivity of multicellular tumor spheroids [J]. J Radiat Res,2010,51(1):47-55.
- [12] Liu YY,Zhao SP,Liu GX.Combined expression of inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma [J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery,2008,14(3):181-184.[刘阳云,赵素萍,刘庚勋.诱导型一氧化氮合酶与血管内皮生长因子在鼻咽癌中的表达及意义 [J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2008,14(3):181-184.]
- [13] Condon LT,Ashman JN,Ell SR,et al. Overexpression of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the larynx: a marker of radioresistance[J]. Int J Cancer,2002,100: 472-475.
- [14] Liu Y,Zhao S,Liu G,et al.The value of cyclooxygenase-2 to predict the effect of radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma[J].Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery,2007,21(5):199-202. [刘阳云,赵素萍,刘庚勋,等.环氧合酶-2 在预测鼻咽癌放疗效应中的价值[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,21(5):199-202.]
- [15] Zheng QP,Chen LH.Vascular endothelial growth factor and radiotherapy for tumors [J]. Foreign Medical Sciences (oncologyr section),2005,32(9):659-662.[郑青平,陈龙华.血管内皮生长因子与肿瘤放射治疗[J].国外医学肿瘤学分册,2005,32(9):659-662.]
- [16] Wergin MC,Ballmer-Hofer K,Roos M,et al. Preliminary study of plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) during low-and-high-dose radiation therapy of dogs with spontaneous tumors[J]. Vet Radiol Ultrasound,2004,45(3): 247-254.
- [17] Brown CK,Khodarev NN,Yu J,et al. Glioblastoma cells block radiation-induced programmed cell death of endothelial cells[J].FEBS Lett,2004,565(1-3):167-170.
- [18] Zhou LL,Yu XJ,Min J,et al.Application and development of roc curve approach for medical diagnostic tests[J]. Journal of Southeast University (Medical Science Edition),2003,22(1):67-69.[邹莉玲,余小金,闵捷,等.ROC 曲线在医学诊断中的应用与进展[J].东南大学学报(医学版),2003,22(1):67-69.]