

• 临床探讨 •

血管内皮生长因子与结肠癌的相关性研究

白梅¹, 任孟军^{2△}

(1. 重庆市黔江中心医院消化内科 409099; 2. 重庆市人民医院三院院区消化内科 400014)

摘要:目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)血浆中的表达及其基因多态性(C936T)与结肠癌发病的相关性。方法 选取重庆市黔江中心医院 2011 年 10 月至 2014 年 10 月收治的 92 例结肠镜检查或手术病理证实的结肠癌患者作为结肠癌组,同时从健康体检中心选取 92 例健康个体作为健康对照组,采用酶联免疫吸附试验检测两组血浆中 VEGF 水平,并采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RELP)技术检测两组的 VEGF(C936T)基因多态性分布,比较结肠癌组与健康对照组间 VEGF 表达量及其基因频率的差异。结果 结肠癌组患者血浆 VEGF 表达水平显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);结肠癌组 C936T 基因型的 T 基因频率显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 临床上结肠癌患者血浆中的 VEGF 水平与结肠癌发病具有一定关联,且 VEGF 基因多态性 C936T 的 T 基因型可能是结肠癌发病的危险因子之一。

关键词:结肠癌; 血管内皮生长因子; 基因多态性**DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.05.048 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)05-0719-02**

结肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,好发年龄在 40~50 岁人群^[1]。由于结肠癌发病隐匿,早期结肠癌诊断缺乏有效的特异性临床生物学指标,大多数患者一经确诊,已属于中晚期。结肠癌的发生受遗传、环境等多个因素影响。近年来,血管内皮生长因子(VEGF)由于其在肿瘤组织生长,肿瘤细胞浸润、侵袭及转移等病理过程发挥重要调控作用而逐渐被重视^[2]。大量结肠癌患者结肠组织病理切片结果提示,结肠癌组织中 VEGF 水平显著升高^[3-4]。张莹等^[5]发现 VEGF 基因启动子区-460T/C 与-634G/C 多态性位点组成的单倍型 C-C 与结肠癌的发生有风险关联,提示 VEGF 的表达水平与结肠癌的发生及发展之间存在一定联系。因此,本研究中检测结肠癌患者和健康人群血中的 VEGF 表达水平及 VEGF 最常见的 C936T 基因型分布情况,探讨 VEGF 与结肠癌发病的关联性。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 10 月至 2014 年 10 月重庆市黔江中心医院消化内科门诊及住院的结肠癌患者 92 例作为结肠癌组,同时从体检中心随机选取 92 例健康体检者作为健康对照组。结肠癌组中男 49 例,女 43 例,平均年龄(52.0±8.5)岁;健康对照组中男 46 例,女 46 例,平均年龄(49.4±5.2)岁。两组的性别和年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。两组结肠癌流行病学相关资料比较,见表 1。

表 1 两组一般资料及流行病学相关资料比较

组别	n	男/女(n/n)	年龄(±s,岁)	吸烟(n)	饮酒(n)
结肠癌组	92	49/43	52.0±8.5	36	37
健康对照组	92	46/46	49.4±5.2	41	43

1.2 纳入标准 (1)经结肠镜镜检及病理检查证实结肠黏膜存在癌性病变的患者,排除溃疡性结肠炎、结肠息肉、炎症性肠病、克罗恩病等其他常见的结肠病变。(2)未接受相关抗肿瘤药物化疗及物理治疗。(3)未接受结肠癌手术治疗。(4)不伴有其他器官肿瘤性病变,如肝脏、呼吸系统、胰腺和生殖系统等

癌性病变。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集及处理 抽取两组研究对象空腹静脉血 6 mL,乙二胺四乙酸抗凝,3 mL 血液用于提取血浆,3 400 r/min 离心 15 min,吸取血浆并分装,-80 ℃保存待用;余下 3 mL 全血采用常规酚-氯仿法抽提血中基因组 DNA,提取后的 DNA 全部保存于-20 ℃冰箱待用。

1.3.2 酶联免疫吸附试验(ELISA) 人血浆 VEGF 检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司,用 ELISA 定量检测血浆 VEGF 水平,具体操作按试剂盒说明书进行,结果在酶标仪(美国 Thermo 公司)主波长 450 nm 处读取光密度值,绘制标准曲线,求待测血浆 VEGF 水平。

1.3.3 基因多态性检测 通过 NCBI 的 GenBank 获取 VEGF 的基因序列,并通过 Primer5.0 软件设计相对应的引物序列,上游引物序列为 5'-AGG AAG AGG GAC TCT GCG CAG AGC-3',下游引物序列为 5'-TAA ATG TAT GTA TGT GGG TGG GTG TGT CTA CAG G-3'。聚合酶链反应(PCR)中样品扩增参照 Rykala 等相关步骤进行,PCR 反应总体积为 25 μL,包括 50 ng 基因组 DNA,上游及下游引物各 10 pmol, dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 200 mmol/L, 20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 μL MgCl₂,以及 1 个单位的 Taq 多聚酶。扩增条件为 95 ℃变性 5 min, 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s 进行 40 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。取 18 μL 产物与 2 U 限制性内切酶 BseNI, 37 ℃水浴 16 h,用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析基因型。比较分析两组 C936T 的基因频率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 H-W 软件对基因进行 Hardy-Weinberg 定律的遗传平衡吻合度检验。

2 结果

2.1 两组血浆 VEGF 水平比较 结肠癌患者血浆中 VEGF

△ 通信作者, E-mail: renmengjun6@163.com。

水平为 312.8 pg/mL,健康对照组血浆中 VEGF 水平为 238.1 pg/mL,结肠癌患者血浆中 VEGF 的表达水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 两组 C936T 基因型频率比较 结肠癌组和健康对照组的 VEGF 基因位点的 C936T 基因型频率均符合 Hardy-Weinberg 定律平衡。结肠癌组和健康对照组 C936T 的 T 基因频率及基因型比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组人群的 C936T 基因型频率比较[n(%)]

组别	n	基因型			基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
结肠癌组	92	54(58.7)	15(16.3)	23(25.0)	121(65.8)	63(34.2)
健康对照组	92	69(75.0)	16(17.4)	7(7.60)	154(83.7)	30(16.3)
P			0.002 1			0.001 3

3 讨 论

结肠癌是消化系统肿瘤中最常见的一种,其发病机制至今仍不明确,但是发病与环境因素以及遗传因素密切相关。结肠癌的癌变是一个多因素、多步骤、多阶段发展过程,癌基因的改变,肿瘤血管形成和浸润等相关的病理改变参与结肠癌的发生发展。大量临床数据显示,与健康人群相比,患有不同类型消化系统肿瘤,如肝癌、食道癌患者血清中的 VEGF 水平显著增高^[6-7]。部分研究显示,在结肠癌病理过程中,肠黏膜上形成大量新生血管,VEGF 因其具有促进细胞增殖、促进血管生成的功能,而被认为在肿瘤的发生、发展及转移等病理过程中发挥着重要作用^[8]。

Brown 等^[9]研究表明,VEGF 在结肠癌患者肠黏膜中的新生血管中表达量显著升高。Takahashi 等^[10]也证实了结肠癌患者伴有 VEGF 及其受体的表达水平增高。因此,推测 VEGF 与结肠癌密切相关,且 VEGF 在结肠癌患者血浆中可以检测到。近几年关于血浆 VEGF 水平与结肠癌关系的临床试验在国外逐渐开展,并已证实 VEGF 可以作为结肠癌的一项诊断预后指标^[11]。George 等^[12]发现了结肠癌患者血浆中的 VEGF 表达量较健康者显著升高,Nakayama 等^[13]也发现结肠癌患者血浆中 VEGF 表达的升高情况,并且发现 VEGF 水平随着结肠癌疾病的恶化进展逐渐升高。与国外研究相符的是,本研究也发现了同健康对照组相比,结肠癌患者血浆中 VEGF 的表达量显著升高。这意味着血浆 VEGF 可以作为判断结肠癌发病的一项潜在临床诊断指标。此外,本研究同时研究 VEGF 基因多态性 C936T 与结肠癌 2 者之间关系,发现 VEGF 的基因多态性 C936T 与结肠癌的发病具有一定关系。结肠癌患者 C936T 的 T 基因频率显著高于健康对照者的 T 基因频率。因此推断-936C/T 型基因突变可能是结肠癌发病基因水平的危险因素。

本研究通过血浆 VEGF 检测以及基因多态性检测,证实了 VEGF 与结肠癌的发病具有一定关联。然而值得注意的是,本研究收集的患者标本较少,且结肠癌发病有地域性,结肠癌发病还受饮食、环境等多因素的影响,所以尚需开展全国性的大样本基因标本检测来支持本研究结论。

参考文献

[1] 吕强,邢沈阳,赵志辉,等. 结肠癌的研究现状及展望[J].

中国实验诊断学,2009,13(8):1134-1137.

[2] Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer[J]. Oncology,2005,69(Suppl 3):4-10.

[3] 周青,王冬芽,刘星. Heregulin 和 VEGF 在结肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国老年学杂志,2014,33(22):6289-6291.

[4] Akagi K,Ikeda Y,Miyazaki M,et al. Vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues[J]. Br J Cancer,2000,83(7):887-891.

[5] 张莹,孙秀静,朱圣韬. 中国人群中 VEGF 基因启动子区-460T/C 与-634G/C 单倍型与结肠癌的易感性研究[J]. 首都医科大学学报,2012,33(6):793-797.

[6] Maeda K,Chung YS,Ogawa Y,et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma[J]. Cancer,1996,77(5):858-863.

[7] Yasuda S,Arii S,Mori A,et al. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance[J]. J Hepatol,2004,40(1):117-123.

[8] 李占霞,杨翔,张国锋. 结肠癌抗血管生成治疗研究进展[J]. 中国普通外科杂志,2006,15(9):707-709.

[9] Brown LF,Berse B,Jackman RW,et al. Expression of vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract [J]. Cancer Res,1993,53(19):4727-4735.

[10] Takahashi Y,Kitadai Y,Bucana CD et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor,KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer[J]. Cancer Res,1995,55(18):3964-3968.

[11] Ishigami SI,Arii S,Furutani M,et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor(VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer[J]. Br J Cancer,1998,78(10):1379-1384.

[12] George ML,Eccles SA,Tutton MG,Abulafi AM & Swift RI(2000) Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer:clinical evidence of platelet scavenging[J] Clin Cancer Res,2000,6(8):3147-3152.

[13] Nakayama Y,Sako T,Shibao K,et al. Relationship between plasma levels of vascular endothelial growth factor and serum levels of interleukin-12 in patients with colorectal cancer [J]. Anticancer Res,2000,20(6A):4097-4102.

(收稿日期:2016-08-25 修回日期:2016-11-13)