

葡萄膜恶性黑色素瘤中血管内皮生长因子水平与肿瘤转移的关系

白惠玲, 刘勤, 文瑾, 吴小玲

作者单位: (730000) 中国甘肃省兰州市, 甘肃省人民医院眼科
作者简介: 白惠玲, 毕业于兰州大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼外伤、眼眶病、眼整形。
通讯作者: 刘勤, 毕业于兰州大学, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障、青光眼、眼眶病. summliu@126.com
收稿日期: 2015-03-28 修回日期: 2015-08-16

Association of serum vascular endothelial growth factor and tumor metastasis in uveal melanoma

Hui-Ling Bai, Qin Liu, Jin Wen, Xiao-Ling Wu

Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Qin Liu. Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. summliu@126.com

Received: 2015-03-28 Accepted: 2015-08-16

Abstract

• AIM: To identify relationship between the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) of uveal melanoma patients whether with uveal melanoma metastasis and prognosis.

• METHODS: The peripheral blood VEGF of uveal melanoma patients and patients in normal control group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expression level of VEGF in uveal melanoma tissues were analyzed through reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western-blot. Uveal melanoma patients were followed up, and the relationship of baseline serum VEGF and postoperative metastasis was analyzed by Kaplan-Meier method.

• RESULTS: The expression level of peripheral blood VEGF was significantly increased in uveal melanoma patients than that in healthy people. The mRNA and protein expression level of VEGF in the uveal melanoma patients with metastasis when seeing a doctor were higher than patients without metastasis. In the process of follow-up, the uveal melanoma patients (serum VEGF ≥ 700 pg/mL) had higher risk for tumor metastasis.

• CONCLUSION: The expression level of VEGF of uveal melanoma patients is closely related to uveal melanoma metastasis.

• KEYWORDS: uveal melanoma; vascular endothelial growth factor; metastasis

Citation: Bai HL, Liu Q, Wen J, et al. Association of serum vascular endothelial growth factor and tumor metastasis in uveal melanoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(9):1596-1599

摘要

目的:分析葡萄膜恶性黑色素瘤患者血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达水平是否与葡萄膜恶性黑色素瘤的转移和预后有关。

方法:采用ELISA法检测葡萄膜恶性黑色素瘤患者和正常对照组中外周血VEGF水平,并采用RT-PCR和Western-blot检测葡萄膜恶性黑色素瘤患者肿瘤组织中VEGF mRNA和VEGF蛋白表达水平。对葡萄膜恶性黑色素瘤患者进行随访,用Kaplan-Meier法分析基线VEGF水平与患者术后转移的关系。

结果:葡萄膜恶性黑色素瘤患者外周血VEGF水平较健康者升高。就诊时肿瘤发生转移的患者VEGF mRNA和VEGF蛋白表达水平均较未发生转移的患者升高。在随访过程中,血清VEGF ≥ 700 pg/mL的患者,肿瘤发生转移的风险较高。

结论:葡萄膜恶性黑色素瘤患者中VEGF的表达水平与葡萄膜恶性黑色素瘤的转移密切相关。

关键词:葡萄膜恶性黑色素瘤;血管内皮细胞生长因子;肿瘤转移

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.9.28

引用:白惠玲,刘勤,文瑾,等.葡萄膜恶性黑色素瘤中血管内皮生长因子水平与肿瘤转移的关系.国际眼科杂志2015;15(9):1596-1599

0 引言

葡萄膜恶性黑色素瘤是成年人最常见的眼眶内恶性肿瘤,恶性程度较高,易发生转移,特别是肝转移,预后差^[1-2]。由于眼部缺乏淋巴管,葡萄膜恶性黑色素瘤主要经血行转移,肿瘤早期转移不易被察觉,部分患者在临床确诊前已发生转移。研究表明,该病一旦发生转移,患者的存活期仅为半年左右^[3]。在首诊的葡萄膜恶性黑色素瘤患者中进行肿瘤转移的风险评估是制定个体化治疗措施、改善患者预后的关键。

肿瘤组织在体内发生侵袭转移是一个多级联反应过程,包括肿瘤的细胞增生、形态功能学改变、侵袭突破基底膜、转移至血管、经血液播散,从而在靶器官形成转移灶。一些转移相关的细胞因子启动细胞信号转导,促进肿瘤细胞的增生,增强细胞的侵袭转移能力。肿瘤的生长和转移需要瘤体组织内有丰富的血管为其提供营养支持。已有的研究表明,在肿瘤血管形成的过程中,血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)发挥着十

表1 研究对象的基本资料

分组	样本量(例)	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	性别(男/女)	肿瘤高度($\bar{x}\pm s$,mm)	肿瘤直径($\bar{x}\pm s$,mm)	病理类型(类上皮/梭形/混合)
肿瘤未转移组	36	47±15	20/16	9.6±4.0	7.6±4.0	2/27/7
肿瘤转移组	9	49±12	5/4	11.3±4.1	10.7±5.1	7/0/2
正常对照组	46	45±14	24/22	-	-	-
$F/\chi^2/t$		0.366	-	-0.602	-1.098	-
P		0.694	0.897	0.550	0.278	<0.001

注:统计分析时,年龄用单因素方差分析;性别和病理类型用 Fisher 确切概率法;肿瘤高度和直径用独立样本 t 检验。

分重要的作用^[4],它的表达情况反应出肿瘤组织形成新生血管的能力。在肺癌^[5]、直肠癌^[6]等肿瘤的研究中发现,检测外周血 VEGF 水平有助于判断肿瘤患者的预后。为明确葡萄膜恶性黑色素瘤患者体内 VEGF 的表达是否与葡萄膜恶性黑色素瘤患者转移和预后有关,我们检测了葡萄膜恶性黑色素瘤患者体内 VEGF 的表达水平,并对其进行了随访,以明确 VEGF 与肿瘤转移以及患者预后的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象 本研究对象来自 2002-08/2009-08 甘肃省人民医院眼科住院患者 45 例,均经术后病理报告诊断为葡萄膜黑色素瘤。正常对照组中,46 例健康对照者为 2009-08 来我院进行常规体检,各项检查检验均正常,查体未见明显异常的健康个体,所有受试对象的临床资料见表 1。本研究得到甘肃省人民医院医学研究伦理委员会的批准,所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 ELISA 法检测葡萄膜恶性黑色素瘤患者和正常对照组血清中 VEGF 的水平 正常对照组和患者(接受治疗前)抽取外周血 2mL 于未加任何抗凝剂的玻璃试管中,待血液自然凝固后以 3 000r/min 的速度离心 10min,收集血清置于-80℃ 保存待测。待所有样本收集完毕后统一复溶并进行 VEGF 浓度的检测。血清 VEGF 的检测采用 ELISA 法(试剂购自 R&D 公司)。所有检测过程均遵照试剂说明书进行,VEGF 的检测和临床解释均采用盲法。

1.2.2 RT-PCR 检测葡萄膜恶性黑色素瘤患者肿瘤组织中 VEGF mRNA 的表达 分别提取葡萄膜恶性黑色素瘤未转移患者和转移患者肿瘤组织总 RNA,测定 RNA 浓度,进行逆转录反应,反应体系:cDNA 1 μ L,SYBR Premix Ex TaqTMII(2 \times) 10 μ L,上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L,双蒸水加至终体积 20 μ L。PCR 条件:94℃ 预变性 5s,以 94℃ 5s,60℃ 30s 为一个循环,进行 40 个循环。引物序列:上游 5'-GAGGGCAGAATCATCACGAA-3';下游 5'-GGGAACGCTCAGGACTTAT-3'。GAPDH 作为内参。

1.2.3 Western-blot 检测葡萄膜恶性黑色素瘤患者肿瘤组织中 VEGF 蛋白的表达 分别提取葡萄膜恶性黑色素瘤未转移患者和转移患者肿瘤组织总蛋白,进行蛋白定量。SDS-PAGE 电泳后转膜,封闭,加一抗(抗 VEGF 抗体,浓度 0.1 μ g/mL),4℃ 过夜,TBST 冲洗 3 次,加二抗(兔抗人,浓度 1:1000),室温孵育 1h,TBST 洗冲 3 次。采用 ECL 进行显色反应,显影、定影。

1.2.4 患者的分组随访 根据患者在就诊时是否出现转移将患者分为转移组和未转移组。对于未转移组患者,随访频次为术后 1a 内每 3mo 1 次,2~5a 每 6mo 复查 1 次。

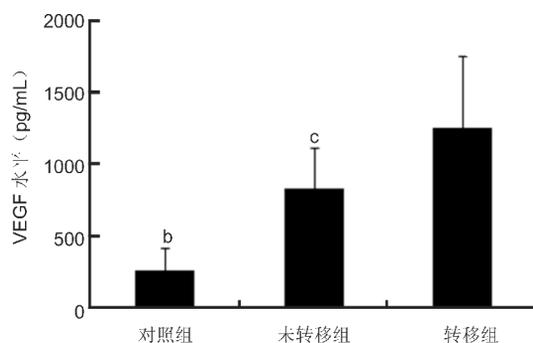


图1 葡萄膜恶性黑色素瘤患者外周血中 VEGF 的表达水平 ^b $P<0.01$ vs 未转移组和转移组;^c $P<0.05$ vs 转移组。

随访内容包括:眼底检查、眼部 A/B 超、彩色超声多普勒、眼底血管荧光造影、眼眶 CT 及 MRI;全身检查:胸部 X 片及腹部 B 超(必要时腹部 CT)等。评价转移的主要依据是:(1)影像学发现该部位存在肿块;(2)经活检或者术后病理证实系转移瘤;(3)患者的临床表现提示存在转移瘤,比如腹水。肿瘤转移的确定均由两位具有副主任医师及以上职称的医师共同做出诊断。

统计学分析:统计学处理均在 Sigmaplot 12.0 和 SPSS 17.0 中完成。定量资料以均数±标准差的形式表示,多组资料的比较采用单因素方差分析,两组资料的比较采用独立样本 t 检验。分类变量之间的比较采用卡方检验或 Fisher 确切概率法。采用 Kaplan-Meier 法和 log-rank 检验分析 VEGF 与患者转移的关系。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 研究对象的基本资料比较 患者的一般情况、眼科检查情况及病理诊断类型见表 1。45 例首次就诊患者中,9 例发生肝转移,占有患者的 20%,肿瘤细胞类型以类上皮细胞型为主。

2.2 葡萄膜恶性黑色素瘤患者和正常对照组血清中 VEGF 的水平 葡萄膜恶性黑色素瘤患者中,肿瘤未转移组血清 VEGF 浓度为 726 ± 464 pg/mL,肿瘤转移组为 1226 ± 427 pg/mL,正常对照组为 256 ± 155 pg/mL。葡萄膜恶性黑色素瘤患者中血清 VEGF 水平较正常对照组明显升高,且葡萄膜恶性黑色素瘤转移患者血清 VEGF 水平较未转移患者升高,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 1)。

2.3 葡萄膜恶性黑色素瘤患者肿瘤组织中 VEGF mRNA 和 VEGF 蛋白的表达 通过 RT-PCR 和 Western-blot 法检测葡萄膜恶性黑色素瘤未转移患者和转移患者肿瘤组织中 VEGF 的表达情况,发现肿瘤转移患者中 VEGF

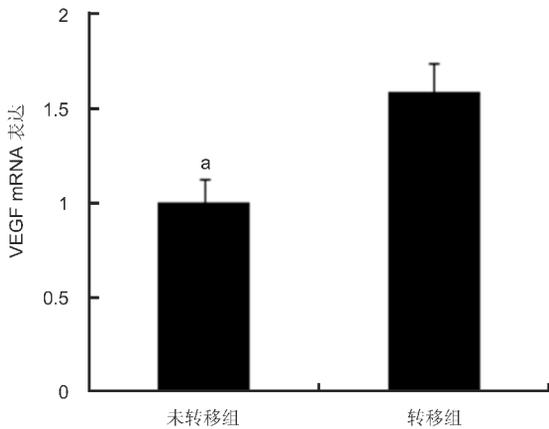


图2 葡萄膜恶性黑色素瘤患者肿瘤组织中 VEGF mRNA 的表达 ^a $P < 0.05$ vs 转移组。

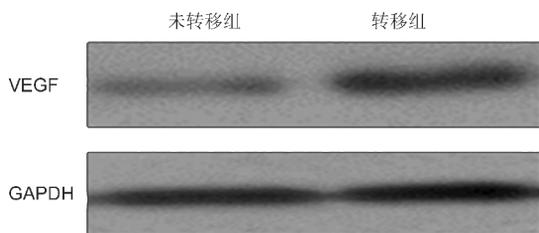


图3 葡萄膜恶性黑色素瘤患者肿瘤组织中 VEGF 蛋白的表达。

mRNA 水平和 VEGF 蛋白表达水平都较肿瘤未转移患者升高(图2,3)。

2.4 血清中 VEGF 水平与肿瘤转移的关系 共9例患者在就诊时已经发生转移,均为肝转移。如图4A所示,发生肝转移的患者血清 VEGF 水平($1281.32 \pm 153.49 \text{pg/mL}$)较未发生肝转移的患者($707.13 \pm 98.87 \text{pg/mL}$)明显增高($t = 40.01, P = 0.002 < 0.01$)。在平均5a的随访时间中,另有9例患者发生了肝转移,与随访期间未发生肝转移的患者相比,发生肝转移的患者基线血清 VEGF 水平($1287.45 \pm 107.81 \text{pg/mL}$)明显增高($t = 41.20, P = 0.002 < 0.01$,图4B)。

在36例就诊时未发生肝转移的患者中,VEGF的中位数为 700pg/mL 。因此,我们以 700pg/mL 为界,将患者分为 VEGF 增高组($\text{VEGF} \geq 700 \text{pg/mL}$)和降低组($\text{VEGF} < 700 \text{pg/mL}$),采用 Kaplan-Meier 分析基线 VEGF 与患者肝转移的关系。血清 $\text{VEGF} \geq 700 \text{pg/mL}$ 的患者,其发生转移的风险较血清 $\text{VEGF} < 700 \text{pg/mL}$ 的患者高($\chi^2 = 7.82, P = 0.02$,图5)。

3 讨论

实体肿瘤的生长与瘤体内新生血管密切相关,一方面,新生血管源源不断地将机体的营养物质提供给肿瘤细胞,同时带走细胞代谢产物,为肿瘤的生长与发育提供良好的条件。另一方面,肿瘤细胞可以通过新生血管向机体的其它部位转移。VEGF 又称血管通透因子,其不仅可以促进血管内皮细胞的生成,同时可以增强血管通透性。大量来自体内外实验的研究均证明,VEGF 对于肿瘤的生长、转移具有十分重要的促进作用^[7]。肿瘤细胞可能通过某种机制上调肿瘤微环境中 VEGF 的表达,为自身的生长和远处转移创造条件^[8-9]。由于肿瘤组织内的 VEGF 可以释放到外周血中,检测血清 VEGF 有助于判断多种恶性肿瘤的远处转移风险和远期预后^[10-12]。

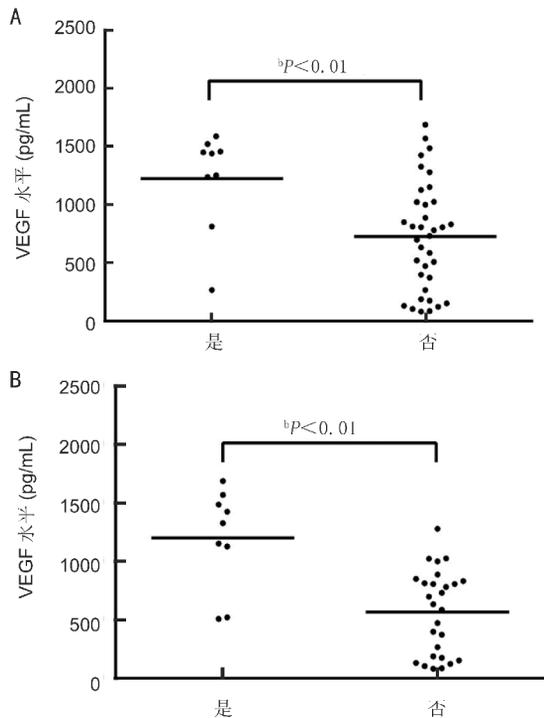


图4 血清 VEGF 水平与肿瘤转移的关系 A:就诊时是否转移;B:随访过程中是否转移。

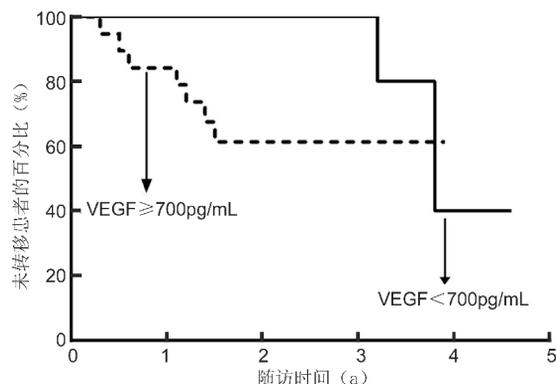


图5 VEGF 水平与肿瘤转移的 Kaplan-Meier 图。

尽管以往的研究发现,葡萄膜恶性黑色素瘤患者外周血 VEGF 水平较健康个体明显增高,且与其临床特征有关^[7]。但尚无直接证据表明血清 VEGF 与葡萄膜恶性黑色素瘤患者转移有关。本研究首先对比葡萄膜恶性黑色素瘤患者和健康个体外周血 VEGF 水平,发现葡萄膜恶性黑色素瘤患者外周血 VEGF 水平较健康个体明显增高,且转移患者外周血 VEGF 水平较未转移患者也增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。我们进一步分析就诊时葡萄膜恶性黑色素瘤未转移患者和转移患者肿瘤组织中 VEGF 的表达情况,发现发生转移的葡萄膜恶性黑色素瘤患者 VEGF mRNA 和蛋白表达水平都较未转移患者明显增高,说明葡萄膜恶性黑色素瘤患者 VEGF 水平与肿瘤的转移具有相关性。因此,我们对未发生转移的患者进行了长达5a的随访,采用 Kaplan-Meier 分析基线 VEGF 水平与患者肝转移的关系,结果发现 $\text{VEGF} \geq 700 \text{pg/mL}$ 的患者,在随访过程中发生转移的风险较高,说明 VEGF 增高是葡萄膜恶性黑色素瘤远处转移的危险因子。因此,我们认为检测初诊葡萄膜恶性黑色素瘤患者体内的 VEGF 水平,有助

于眼科医师判断患者在就诊时发生肝转移的可能性以及以后是否具有较高的转移风险。

对于初诊的葡萄膜恶性黑色素瘤患者,判断其是否发生远处转移具有极为重要的临床价值,在很大程度上决定了患者治疗方案的选择以及随访的强度。本研究结果提示,对于初诊时 VEGF 水平增高的患者,其远处转移的风险较高,可以增加术后的随访频次,以便及早发现肿瘤转移,最终使患者获益。本组患者仅有 45 例,因此这一推测有待于大样本量的随机对照试验予以验证。

总之,本研究发现 VEGF 水平的高低对于判断葡萄膜恶性黑色素瘤发生远处转移具有一定的帮助,因此在该病的诊疗过程中,有必要检测 VEGF 水平,为治疗措施的制定提供参考。

参考文献

- 1 Shields CL, Ganguly A, Bianciotto CG, et al. Prognosis of uveal melanoma in 500 cases using genetic testing of fine-needle aspiration biopsy specimens. *Ophthalmology* 2011;118(2):396-401
- 2 Kivela T, Eskelin S, Kujala E. Metastatic uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin* 2006;46(1):133-149
- 3 Schmittl A, Bechrakis NE, Martus P, et al. Independent prognostic

factors for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma. *Eur J Cancer* 2004;40(16):2389-2395

4 Rapisarda A, Melillo G. Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. *Adv Cancer Res* 2012;114:237-267

5 张胜辉,王轶灵,王明松,等. 血管内皮生长因子表达与肺癌预后的关系. *重庆医学* 2010;39(16):2157-2158

6 张亚武. 结直肠癌患者血清中血管内皮生长因子的水平及其意义. *临床消化病杂志* 2004;16(4):163-164

7 尤程程,黄利鸣. VEGF 及其调控因素的研究进展. *临床与实验病理学杂志* 2011;27(12):1344-1346

8 Brychtova S, Bezdekova M, Brychta T, et al. The role of vascular endothelial growth factors and their receptors in malignant melanomas. *Neoplasma* 2008;155(4):273-279

9 Bakalian S, Marshall JC, Logan P, et al. Molecular pathways mediating liver metastasis in patients with uveal melanoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(4):951-956

10 赵求,郭人花. 血管内皮生长因子与肺癌的治疗和预后. *国际肿瘤学杂志* 2012;39(4):286-288

11 el Filali M, Missotten GS, Maat W, et al. Regulation of VEGF-A in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(5):2329-2337

12 卢明挺,章志坚. 直肠癌患者手术前后血清 VEGF 表达及与远期预后的相关关系. *河北医科大学学报* 2012;33(5):562-563

荷兰《医学文摘》(EMBASE) 2015 年收录的中国眼科期刊

2015 年 EMBASE 共收录中国期刊 173 种,其中大陆 118 种,台湾 34 种,香港 20 种,澳门 1 种。收录中国眼科期刊共 3 种:《国际眼科杂志》中文刊、《国际眼科杂志》英文刊 *International Journal of Ophthalmology* 和《中华实验眼科杂志》。

摘编自 中国高校科技期刊研究会网站