

结直肠癌患者血清血管内皮生长因子及白介素-35 的水平及临床意义

莫世友, 李玉容, 刘新福, 张辉

南华大学附属邵阳医院肿瘤内科, 湖南 邵阳 422000

摘要: **目的** 探讨结直肠癌患者血清中血管内皮生长因子(VEGF)及白介素(IL)-35 的水平及与临床病理因素的关系。**方法** 收集 2016 年 1 月至 6 月 60 例结直肠癌患者(观察组),及体检中心同期体检健康成年人 60 例(对照组)。应用酶联免疫吸附测定法(ELISA 法)测定血清 VEGF 及 IL-35 水平并分析其与结直肠癌临床分期(TNM 分期、Dukes 分期)及临床病理特征的关系。**结果** 观察组血清 VEGF 及 IL-35 水平明显高于对照组(P 均 < 0.01)。血清 VEGF 水平在不同 TNM 分期、Dukes 分期及不同组织分化程度的结直肠癌患者中差异具有统计学意义(P 均 < 0.01),血清 IL-35 水平在不同 TNM 分期、Dukes 分期结直肠癌患者中具有统计学差异(P 均 < 0.01)。Pearson 相关性分析显示结直肠癌患者血清 VEGF 与 IL-35 的表达水平呈正相关($r = 0.629, P < 0.05$)。VEGF 筛查结直肠癌的敏感度为 68.33%,特异度为 88.33%,且 VEGF 筛查结直肠癌结果与病理组织学检测诊断具有较高一致性(Kappa 值 = 0.567)。**结论** 结直肠癌患者血清 VEGF 及 IL-35 水平升高,并与临床分期相关,且 VEGF 与病理分化程度相关,可作为结直肠癌患者病情评估及预后判断的辅助指标。VEGF 在结直肠癌筛查中具有较高敏感度及特异度,是一个重要的辅助诊断指标。

关键词: 结直肠癌; 酶联免疫吸附测定法; 血管内皮生长因子; 白介素-35

中图分类号: R 735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)02-0178-04

Levels and clinical significance of serum vascular endothelial growth factor and interleukin-35 in patients with colorectal cancer

MO Shi-you, LI Yu-rong, LIU Xin-fu, ZHANG Hui

Department of Medical Oncology, Shaoyang Hospital Affiliated to University of South China, Shaoyang, Hunan 422000, China

Corresponding author: Zhang Hui, E-mail: huizhang@sohu.com

Abstract: Objective To investigate the levels of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-35 (IL-35) in patients with colorectal cancer and the association with clinicopathological factors. **Methods** Sixty patients with colorectal cancer between January 2016 and June 2016 were selected as observation group, and 60 medically examined healthy adults at the same time were selected as control group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum VEGF and IL-35 levels, and their associations with clinical stage (TNM stage, Dukes stage) and clinicopathological features of tumor were analyzed. **Results** Serum VEGF and IL-35 levels in observation group were significantly higher than those in control group (all $P < 0.01$). There were significant differences in serum VEGF levels for colorectal cancer patients with different TNM stages, Dukes stages and different tissue differentiation degrees (all $P < 0.01$), and there were significant differences in serum IL-35 levels for colorectal cancer patients with different TNM stages and Dukes stages (all $P < 0.01$). Pearson correlation analysis showed that serum VEGF level was positively correlated with serum IL-35 level in colorectal cancer patients ($r = 0.629, P < 0.05$). The sensibility of VEGF for screening colorectal cancer was 68.33%, and the specificity for screening colorectal cancer was 88.33%. The diagnosis of VEGF screening was in higher accordance with the diagnosis of histopathological examination (Kappa = 0.567). **Conclusions** Serum VEGF and IL-35 levels rises in patients with colorectal cancer, and they are related to clinical staging in which VEGF is also related to pathological differentiation degree. They may be served as the auxiliary markers for evaluating severity of the disease and estimating prognosis. VEGF has higher sensitivity and specificity in screening colorectal cancer, so it may be served as an important auxiliary

diagnosis marker.

Key words: Colorectal cancer; Enzyme-linked immunosorbent assay; Vascular endothelial growth factor; Interleukin-35

肿瘤的生长取决于血管生成,血管内皮生长因子(VEGF)是目前最强的血管生成刺激因子之一,能促进肿瘤血管生成及增强血管通透性,与肿瘤生长及转移密切相关。而机体免疫抑制因子白介素-35(IL-35)^[1]能抑制机体对肿瘤细胞免疫应答,通过免疫逃逸而促进肿瘤生长。我们对患者血清中 VEGF 及 IL-35 水平变化进行测定,分析 VEGF 及 IL-35 水平与结直肠癌发生、组织分化程度及临床分期等方面的关系,探讨其在结直肠癌诊断及预后评估中的作用及价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 1 月至 6 月在湖南省邵阳市中心医院胃肠外科及肿瘤科首次诊断为结直肠癌患者 60 例为观察组,男 35 例,女 25 例;年龄(62.47 ± 12.31)岁;直肠癌 26 例,结肠癌 34 例;采用国际抗癌联盟公布的结直肠癌 TNM 分期(2010 年第 7 版) I 期 10 例, II 期 14 例, III 期 18 例, IV 期 18 例; Dukes 分期 A + B 期 24 例, C + D 期 36 例;所有患者均经肠镜活检组织病理学确诊为结肠癌或直肠癌,且未经放、化疗或手术治疗。收集同期在邵阳市中心医院体检中心体检健康成人 60 例为对照组,男 32 例,女 28 例;年龄(62.3 ± 12.48)岁。排除标准:(1)合并第二肿瘤;(2)有可引起血清 VEGF 水平升高的其他因素,如怀孕、视网膜病变、风湿性关节炎等;(3)合并有乙型肝炎、I 型糖尿病、炎症性肠病、支气管哮喘等可引起 IL-35 升高疾病。两组观察对象性别、年龄比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 VEGF 测定试剂盒购于北京健平九星生物医药科技有限公司,IL-35 酶联免疫分析试剂盒购于德国 IBL 公司。酶标仪(北京普析通用仪器公司), $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱(青岛海尔公司), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 电热恒温水浴箱(天津泰新特仪器公司),Labofuge400 台式离心机(德国 Heraeus 公司)。

1.2.2 方法 观察组患者在根治性手术或放疗/化疗前采集空腹肘静脉血 4 ml,对照组清晨采集空腹肘静脉血 4 ml,放入抗凝管中, $3\ 500\ \text{r}/\text{min}$ 离心 20 min,分离血清后放置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存,集中检测,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)分别测定血清中 VEGF 及 IL-35 水平。VEGF 阳性判断标准采用北京健平九

星生物医药科技有限公司 VEGF 测定试剂盒提供参考值范围: $0 \sim 142.2\ \text{pg}/\text{ml}$, $> 142.2\ \text{pg}/\text{ml}$ 为阳性,敏感性 = [真阳性样本数 / (真阳性样本数 + 假阴性样本数)] $\times 100\%$;特异性 = [真阴性样本数 / (真阴性样本数 + 假阳性样本数)] $\times 100\%$ 。严格按操作说明进行实验。

1.3 统计学方法 所有数据均用 SPSS 18.0 软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用独立样本均数 t 检验,多样本均数比较采用单因素方差分析,相关性分析用 Pearson 线性相关分析,VEGF 诊断与组织病理诊断(金标准)的一致性分析采用 Kappa 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组和对照组血清 VEGF 及 IL-35 水平比较 观察组患者血清 VEGF 和 IL-35 水平显著高于对照组,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。见表 1。

2.2 结直肠癌患者 VEGF 及 IL-35 在不同临床分期及肿瘤分化程度中表达水平差异 观察组中,通过亚组分析发现血清 VEGF 水平在不同 TNM 分期、Dukes 分期及组织分化程度结直肠癌患者中差异有统计学意义(P 均 < 0.01),血清 IL-35 水平在不同 TNM 分期、Dukes 分期有统计学差异(P 均 < 0.01);而不同年龄分组、性别分组患者血清 VEGF 及 IL-35 水平比较无统计学差异(P 均 > 0.05)。见表 2。

2.3 结直肠癌患者血清中 VEGF 与 IL-35 水平相关性分析与病理组织学检测大肠癌一致性 Pearson 相关性分析显示,结直肠癌患者血清 VEGF 与 IL-35 呈正相关($r = 0.629$, $P < 0.01$)。对照组中 60 例健康人定义为组织病理学阴性组,而观察组中 60 例患者为组织病理学阳性组,分析发现 VEGF 检测结直肠癌敏感度为 68.33%,特异度为 88.33%,VEGF 筛查结直肠癌与病理组织学检测诊断具有较高一致性(Kappa 值 = 0.567)。见表 3。

表 1 观察组和对照组血清 VEGF 及 IL-35 水平比较

($\bar{x} \pm s$)			
组别	例数	VEGF (pg/ml)	IL-35 (pg/ml)
对照组	60	95.67 \pm 37.282	13.65 \pm 2.898
观察组	60	243.73 \pm 143.605	22.35 \pm 6.238
t 值		7.730	9.798
P 值		< 0.01	< 0.01

表 2 结直肠癌患者 VEGF 与 IL-35 水平与各临床特征关系 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

项目	例数	VEGF	t/F 值	P 值	IL-35	t/F 值	P 值
性别							
男	35	255.00 ± 145.05	0.716	>0.05	22.46 ± 6.00	0.156	>0.05
女	25	227.96 ± 142.99			22.20 ± 6.68		
年龄(岁)							
≥60	33	268.12 ± 148.56	1.468	>0.05	23.18 ± 6.98	1.145	>0.05
<60	27	213.93 ± 134.01			21.33 ± 5.14		
TNM 分期							
I 期	10	125.90 ± 47.95	11.397	<0.01	16.60 ± 3.20	12.026	<0.01
II 期	14	163.71 ± 78.58			19.36 ± 2.44		
III 期	18	258.83 ± 133.93			22.94 ± 5.39		
IV 期	18	356.33 ± 143.49			27.28 ± 6.57		
Dukes 分期							
A + B 期	24	147.96 ± 68.94	5.695	<0.01	18.21 ± 3.05	5.645	<0.01
C + D 期	36	307.58 ± 145.46			25.11 ± 6.32		
组织分化							
低/未分化	22	331.77 ± 132.55	4.060	<0.01	24.50 ± 6.15	2.089	>0.05
中/高分化	38	192.76 ± 125.05			21.11 ± 6.02		

表 3 VEGF 检测结直肠癌与病理组织学检查一致性 (例)

组织病理学检查	VEGF		合计
	阳性	阴性	
阳性	41	19	60
阴性	7	53	60
总计	48	72	120

3 讨论

肿瘤的生长取决于丰富新生血管输送营养物质, VEGF 是目前最强的血管生成刺激因子之一, 能刺激肿瘤血管生成及增强血管通透性, 与肿瘤生长及转移密切相关^[2-3]; 同时肿瘤细胞可分泌免疫抑制因子(如 IL-35)抑制机体免疫系统, 抑制机体对肿瘤细胞免疫应答, 通过免疫逃逸促进肿瘤生长。Moreira 等^[4]应用不同标记物对结直肠癌血管密度和面积的免疫组化分析及与临床病理因素的比较发现, 结直肠癌高表达 VEGF, 并通过与相应受体结合, 促进肿瘤血管生成。Nicholl 等^[5]通过免疫组织化学方法发现胰腺癌组织高表达 IL-35, 而 Gu 等^[6]应用 ELISA 方法分析发现非小细胞肺癌患者血浆 IL-35 水平明显高于正常人, 且与淋巴结受累及 TNM 分期具有显著相关性。本研究通过测定结直肠癌患者血清中 VEGF 及 IL-35 水平, 发现 VEGF 及 IL-35 高水平表达, 明显高于正常健康人组, 且与临床分期、肿瘤组织分化程度有关, 未/低分化组明显高于中/高分化组, 而进一步根据 Dukes 分期分组分析, 发现 Dukes(A + B)期患者外周血 VEGF 及 IL-35 水平明显低于 Dukes(C + D)期, 而根据 TNM 分期, 已经有远处转移的 IV 期结直肠癌患者较仅有区域淋巴结转移 III 期结直肠癌患者, 外周血中 VEGF 及 IL-35 水平明显升高, 但是, 对于局限于肠道内不同浸润深度的 I 期、II 期结

直肠癌患者, 虽然 II 期患者较 I 期患者外周血 VEGF 及 IL-35 水平高, 但无统计学差异, 因此, 我们可推测区域淋巴结或远处转移是结直肠癌患者外周血 VEGF 及 IL-35 主要影响因素。陈相军等^[7]通过外周血 IL-35 与肿瘤相关性的 Meta 分析也表明 IL-35 可以作为肿瘤有无淋巴结转移独立预测因素。有区域淋巴结或远处转移的中/晚期结直肠癌患者, 肿瘤负荷大, 需分泌更多 VEGF 刺激肿瘤血管生成, 提供营养物质促其生长, 同时分泌高水平 IL-35, 抑制机体免疫系统, 逃避免疫监视而促使肿瘤细胞分裂。通过上述分析, VEGF 及 IL-35 在外周血中表达水平与结直肠癌组织分化程度及转移情况相关, 表达水平越高, 病理组织恶性程度或淋巴结及远处转移可能性越大。

综上所述, 结直肠癌患者血清 VEGF 及 IL-35 明显升高, 且与促进肿瘤生长及侵袭性有关。Wang 等^[8]研究发现肿瘤源性 IL-35 能促进 CD11b + Gr1 + 髓源抑制性细胞(MDSCs)聚集, MDSCs 可以诱导 Treg 产生间接抑制机体免疫应答, 从而使肿瘤细胞成功避免机体免疫杀伤作用, 另外, 其通过促进肿瘤细胞分泌 VEGF 刺激肿瘤血管生成, 促进肿瘤生长。也有研究表明 MDSCs 可分泌 VEGF^[9]。王柯等^[10]通过建立小鼠肠炎相关结直肠癌模型研究发现病灶组织高表达 VEGF 及小鼠体内 MDSCs 大量累积, 认为 VEGF 信号在小鼠肠炎相关结直肠癌形成过程中发挥重要的促瘤功能, 其作用机制可能与诱导 MDSCs 在病灶部位的聚集有关。因此, 我们推测 IL-35 及 VEGF 共同作用于 MDSCs 促进肿瘤生长, 且 IL-35 能促进肿瘤细胞分泌 VEGF, IL-35 与 VEGF 在恶性肿瘤中有相关性。本组实验结果提示在结直肠癌患者中 VEGF 与 IL-35 呈正相关性, 可推测两者共同促进

肿瘤生长。

VEGF 作为一种血管生长刺激因子,广泛分布于各类肿瘤患者体内,本组实验资料提示,肿瘤患者外周血 VEGF 较正常健康人群明显升高。贾志凌等^[11]通过化学发光法检测不同恶性肿瘤患者血清 VEGF 水平发现,VEGF 诊断胰腺癌、胃癌、肾癌、结直肠癌及子宫内膜癌阳性率均大于 70%;VEGF 对肿瘤检测的灵敏度为 70.9%,特异度为 89.29%,与组织病理学检查结果有较高一致性。本研究结果显示,VEGF 筛查结直肠癌灵敏度为 68.33%,特异度为 88.33%,其筛查结直肠癌结果与病理诊断结果有较强一致性,与文献报道基本一致,提示 VEGF 在肿瘤早期筛查方面有一定临床诊断价值,可作为一种广谱肿瘤筛查标志物。

综上所述,VEGF 及 IL-35 在结直肠癌患者中高表达,与结直肠癌病理恶性程度及转移情况呈正相关,可作为结直肠癌患者病情评估及预后判断辅助指标。而 VEGF 在结直肠癌筛查中具有较高敏感性 & 特异性,是一个重要辅助诊断指标。

参考文献

[1] Sawant DV, Hamilton K, Vignali DA. Interleukin-35: expanding its job profile[J]. J Interferon Cytokine Res, 2015, 35(7): 499-512.
[2] Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer[J]. Oncology, 2005, 69(suppl 3): 4-10.

[3] Rapisarda A, Melillo G. Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy[J]. Adv Cancer Res, 2012, 114: 237-267.
[4] Moreira LR, Schenka AA, Latuf-Filho P, et al. Immunohistochemical analysis of vascular density and area in colorectal carcinoma using different markers and comparison with clinicopathologic prognostic factors[J]. Tumour Biol, 2011, 32(3): 527-534.
[5] Nicholl MB, Ledgewood CL, Chen X, et al. IL-35 promotes pancreas cancer growth through enhancement of proliferation and inhibition of apoptosis: evidence for a role as an autocrine growth factor[J]. Cytokine, 2014, 70(2): 126-133.
[6] Gu X, Tian T, Zhang B, et al. Elevated plasma interleukin-35 levels predict poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer [J]. Tumour Biol, 2015, 36(4): 2651-2656.
[7] 陈相军, 吴青霞, 陈敏, 等. 外周血白介素-35 与肿瘤相关性的 Meta 分析[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(6): 1075-1079.
[8] Wang Z, Liu JQ, Liu Z, et al. Tumor-derived IL-35 promotes tumor growth by enhancing myeloid cell accumulation and angiogenesis [J]. J Immunol, 2013, 190(5): 2415-2423.
[9] Donkor MK, Lahue E, Hoke TA, et al. Mammary tumor heterogeneity in the expansion of myeloid-derived suppressor cells[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(7/8): 937-948.
[10] 王柯, 王一, 刘桂君, 等. VEGF 在溃疡性结肠炎癌变中的作用及其可能的机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(2): 159-165.
[11] 贾志凌, 杨永昌, 张淑艳, 等. 血管内皮生长因子诊断多种恶性肿瘤临床价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(7): 701-702, 705.

收稿日期: 2016-11-05 修回日期: 2016-11-20 编辑: 王国品

(上接第 177 页)

[6] 蒋连勇, 王明松, 李国庆, 等. 单操作孔完成全胸腔镜肺癌完全切除 329 例经验报告[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(6): 1006-1008.
[7] Ettinger DS, Bepler G, Bueno R, et al. Non-small cell lung cancer clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2006, 4(6): 548-582.
[8] 张勇, 陆善伟, 王明松. 单操作孔胸腔镜技术治疗早期肺癌[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(18): 3066-3068.
[9] 徐凯, 谢宏亚, 马海涛, 等. 单操作孔电视胸腔镜解剖性肺段切除术 47 例报告[J]. 中国微创外科杂志, 2015, 15(11): 995-997.
[10] 谢宏亚. 单操作孔胸腔镜肺癌根治术后胸腔引流管拔除指征的

研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.

[11] Salati M, Brunelli A, Rocco G. Uniportal video-assisted thoracic surgery for diagnosis and treatment of intrathoracic conditions[J]. Thorac Surg Clin, 2008, 18(3): 305-310, vii.
[12] 谢宏亚, 倪斌, 马海涛, 等. 单操作孔电视胸腔镜肺癌根治术 93 例报告[J]. 中国微创外科杂志, 2014, 14(6): 529-530, 544.
[13] 刘高峰, 李保田, 李保军, 等. 单操作孔全胸腔镜右肺下叶切除体会[J]. 实用医药杂志, 2013, 30(4): 314-315.
[14] 朱乐伟, 杨劫, 叶国麟, 等. 全电视胸腔镜肺叶切除术治疗肺良性疾病 58 例临床分析[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2011, 18(6): 580-581.

收稿日期: 2016-10-23 修回日期: 2016-11-20 编辑: 王国品