

• 肿瘤介入 Tumor intervention •

血管内皮生长因子基因型对介入化疗栓塞
治疗原发性肝癌预后的评估

王黎洲, 李 兴, 宋 杰, 蒋天鹏, 吴晓萍, 周 石

【摘要】 目的 通过检测血管内皮生长因子(VEGF)的基因类型,探讨不同类型基因与原发性肝癌(HCC)患者 TACE 术后生存率的关系。**方法** 通过 384 孔板 DNA 提取试剂盒检测 2007 年 1 月到 2008 年 1 月 156 例经过病理确诊 2 个月内接受 TACE 治疗 HCC 患者的 VEGF 基因型并收集所有患者的临床资料,分析不同基因类型与患者预后的关系。**结果** 本研究共检测出 VEGF-2578C/A, VEGF-1154G/A, VEGF-634C/G 和 VEGF-1498T/C 4 种基因型,患者的 5 年生存率为 55.47%。经多变量分析显示,肿瘤分期(TNM)、癌灶转移、VEGF-2578 AA 和 VEGF-1154 AA 基因型是独立预后因素。肝癌 TNM 分期为Ⅲ至Ⅳ期将极大增加肝癌患者死亡风险($HR=3.64, 95\% CI=1.67-6.79$; $HR=2.91, 95\% CI=1.30-6.27$)。然而 VEGF-2578 AA 和 VEGF-1154 AA 基因类型患者相比野生基因类型死亡风险更高($HR=3.65, 95\% CI=1.35-11.13$; $HR=7.13, 95\% CI=1.46-65.8$)。**结论** VEGF-2578C/A 和 VEGF-1154G/A 基因类型与接受 TACE 治疗的原发性肝癌患者预后密切相关,可能对预测介入治疗 HCC 的预后有一定帮助。

【关键词】 临床结果; 多态性; 肝癌; 血管内皮生长因子

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2015)-05-0396-04

Application of polymorphisms of vascular endothelial growth factor in evaluating the prognosis of hepatocellular carcinoma patients after transcatheter arterial chemoembolization treatment WANG Li-zhou, LI Xing, SONG Jie, JIANG Tian-peng, WU Xiao-ping, ZHOU Shi. Department of Radiology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: ZHOU Shi, E-mail: 156722229@qq.com

【Abstract】 Objective Through detecting the genotypes of vascular endothelial growth factor (VEGF) to investigate the correlation between the different VEGF genotypes and survival rate of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) after receiving transcatheter arterial chemoembolization (TACE). **Methods** A total of 156 patients with pathologically confirmed HCC, who were admitted to authors' hospital during the period from January 2008 to January 2009 and received TACE within 2 months after the disease was confirmed by pathology, were included in this study. The genotypes of VEGF-2578C/A, -1154G/A, -634C/G, and -1498T/C were determined using a blood kit on a 384-well plat. The clinical data were collected, and the correlations between the genotypes and the patient's prognosis were analyzed. **Results** In this study, a total of four genotypes were detected, including VEGF-2578C/A, VEGF-1154G/A, VEGF-634C/G and VEGF-1498T/C. The mean 5-year survival rate was 55.47%. Multivariate analysis revealed that only the tumor-node-metastasis(TNM) stage, metastasis, and the VEGF-2578 AA and VEGF-1154 AA genotypes were independent prognostic factors. HCC of TNM stage Ⅲ-Ⅳ would greatly increase the risk of death in HCC patients ($HR=3.64, 95\% CI=1.67-6.79$; $HR=2.91, 95\% CI=1.30-6.27$). Moreover, the death risk in patients with the VEGF-2578 AA and VEGF-1154 AA genotypes was much higher than that in patients with the wild-type genotype ($HR=3.65, 95\% CI=1.35-11.13$; $HR=7.13, 95\% CI=1.46-65.8$). **Conclusion** VEGF-2578C/A genotype and VEGF-1154G/A genotype are closely related to the prognosis of HCC patients after TACE

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2015.05.008

基金项目: 贵州省科技计划课题(黔科合 SY 字[2012]:3145 号)

作者单位: 550004 贵阳 贵阳医学院附属医院影像科

通信作者: 周 石 E-mail: 156722229@qq.com

treatment, which may be helpful for predicting the clinical outcome of HCC patients after interventional treatment. (J Intervent Radiol, 2015, 24: 396-399)

【Key words】 clinical outcome; polymorphism; hepatocellular carcinoma; vascular endothelial growth factor

在恶性肿瘤中,原发性肝癌(HCC),常见于发展中国家。2008年,中国有292 966例患者确诊为HCC,病例数在恶性肿瘤中位列第3^[1]。HCC切除术后5年生存率为26%~44%^[2],目前,针对失去外科手术机会的患者,经动脉灌注化疗(TACE)或单纯栓塞术是延缓病情发展的主要治疗方法^[3-4]。

TACE适用于已失去手术机会,Child-Pugh分级为A或B级患者,同时也用于外科手术及肝移植术前辅助治疗。

血管内皮生长因子受体1(VEGFR-1)和VEGFR-2是与HCC相关的强效血管生长素,我们通过对这2个受体基因型研究探索其与TACE术后预后的关系。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集2007年1月至2008年1月我院通过病理学检查确诊、甲胎蛋白(AFP \geq 400 ng/ml)且影像学检查符合HCC的146例患者临床资料。临床资料如肿瘤分型、大小、Child-Pugh分级及手术方式均来源于病历记录。所有患者均接受TACE作为基础治疗且未做其他治疗。术前无肝外转移、淋巴结转移或其他组织器官转移。146例患者均随访至2012年。每2个月随访1次,患者死亡作为终点,生存期为患者疾病确诊至死亡的时间,通过末次随访统计,65例(44.5%)患者死亡。中位生存期数为34.6个月。

1.2 方法

1.2.1 TACE手术步骤 Seldinger法穿刺股动脉置入血管鞘后,常规行肝动脉、肠系膜上动脉造影明确肿瘤的位置、大小及主要供血血管,通过微导管尽可能超选择插管至肿瘤供血动脉,先经导管注入奥沙利铂,剂量为130 mg/m²。随后将碘化油及吡柔比星混合乳剂缓慢经导管注入,吡柔比星及碘油的用量根据肿瘤的大小及血供情况选择,多柔比星剂量为25~40 mg/m²,碘油剂量为5~20 ml,对于碘油用量超过20 ml仍未达到满意栓塞的患者则加用明胶海绵颗粒进一步加强栓塞,直到再次造影示对比剂反流或淤滞时结束。

1.2.2 血液样本和基因分析 抽取5 ml静脉血,加入适量0.05 mg/ml 乙二胺四乙酸抗凝剂,-20℃保存。按通用基因组DNA提取试剂盒说明书提取基因组DNA,采用MassARRAY时间飞行质谱仪(美国Sequenom提供)检测VEGF-2578C/A, -1154G/A, -634C/G, -1498T/C的基因分型。通过PCR扩增,SAP酶处理,延伸引物单碱基延伸,树脂除盐纯化,芯片点样,质谱检测等步骤,使用Sequenom Assay Design3.1软件分析实验数据,获得基因分型结果。

1.3 统计学处理

统计学软件使用SPSS 16.0对所以数据进行对比分析,对正态分布的连续变量采用均数 \pm 标准差表示,分类变量采用频率和百分比来表示,患者的一般情况包括肝癌的分期、肝功能评分等采用卡方检验和 t 检验,患者的生存率采用Kaplan-Meier检验进行分析,基因类型和生存率的关系采用多因素Cox比例风险模型进行分析,可变风险通过相应95%可信区间的危险比来表示。如 $P<0.05$ 则认为差异有统计学意义。

2 结果

146例入组患者,其中男104例(71.2%),女42例(28.8%),平均年龄为(55.1 \pm 8.4)岁(24~81岁)。累计生存率的评估通过患者的年龄、性别、病毒感染情况、是否合并肝硬化、TMN分期、Child-Pugh分级、癌灶转移、肿瘤大小、AFP水平及VEGF基因类型等情况。所有患者5年生存率为55.5%。乙型肝炎及丙型肝炎患者5年生存率明显降低,而无肝炎感染患者5年生存率为73.1%。TMN分期I至II期患者较III至IV期患者生存率明显提高($P=0.037$)。同样无癌灶转移患者/肿瘤直径 <5 cm生存率高于已有转移者/巨大肿瘤患者($P=0.039/P=0.027$)。(表1)

经过TACE治疗患者的生存评估作为单因素变量并采用Cox回归分析。结果显示,TNM分期,癌灶转移,肿瘤大小及VEGF-2578C/A、VEGF-1154G/A基因类型患者病死率增加,每个变量的风险比率(HR)为2.31~3.84。乙肝病毒阳性患者病死率显著较高($HR=2.57, 95\%CI=1.03\sim6.17$)。TNM为III或IV级的患者病死率较I或II级的患者明显为

表 1 接受 TACE 治疗肝癌患者的一般情况及术后生存率

参数	病例数 (n=146)	比率/%	死亡 (n=65)	比率/%	生存 率/%	P 值
性别/n						
男性	104	71.23	48	73.85	53.85	
女性	42	28.77	17	26.15	59.52	0.53
病毒感染因素/n						
无	26	17.81	7	10.77	73.08	
HBsAg 阳性	87	59.59	40	61.54	54.02	
抗 HCV 抗体阳性	28	19.18	15	23.08	46.43	
2 者均有	5	3.42	3	4.62	40.00	0.19
肝硬化/n						
无	39	26.71	19	29.23	51.28	
有	107	73.29	46	70.77	57.01	0.54
TNM 分期/n						
I、II	60	41.10	17	26.15	71.67	
III、IV	86	58.90	48	73.85	44.19	0.037
Child-Pugh 分期/n						
A	43	29.45	17	26.15	60.47	
B	62	42.47	27	41.54	56.45	
C	41	28.08	21	32.31	48.78	0.55
远处转移/n						
无	95	65.07	33	50.77	65.63	
有	51	34.93	32	49.23	36.00	0.039
肿瘤大小						
<5 cm	93	63.70	35	53.85	62.37	
≥5 cm	53	36.30	30	46.15	43.40	0.027
肿瘤数目						
1	87	59.59	31	47.69	64.37	
≥2	59	40.41	34	52.31	42.37	0.108
AFP/(ng/ml)						
<400	54	34.62	20	30.77	64.91	
≥400	92	65.38	45	69.23	49.44	0.25
VEGF						
-2578C/A/n						
CC	64	43.84	23	35.38	64.06	
CA	50	34.25	21	32.31	58.00	
AA	32	21.92	21	32.31	34.38	0.25
-1154G/A/n						
GG	86	58.90	34	52.31	60.47	
GA	47	32.19	20	30.77	57.45	
AA	13	8.90	11	16.92	15.38	0.23
-634C/G/n						
CC	66	45.21	28	43.08	57.58	
CG	55	37.67	25	38.46	54.55	
GG	25	17.12	12	18.46	52.00	0.88
-1498T/C/n						
TT	69	47.26	28	43.08	59.42	
TC	60	41.10	28	43.08	53.33	
CC	16	10.96	9	13.85	43.75	0.49

高(HR=3.07,95%CI=1.36~6.47)。有转移患者病死率比未转移患者高 3.13 倍,癌灶>5 cm 患者病死率较小病灶患者高 2.31 倍。对于 VEGF 不同类型的患者,VEGF-2578 AA,VEGF-1154 AA 风险较野生型高 3.40 倍及 8.41 倍。(表 2)

多变量分析显示仅有 TNM 分级,癌灶转移及 VEGF-2578 AA,VEGF-1154 AA 患者为独立危险因

表 2 影响肝癌患者生存率的单因素分析

参数	中位生存期 (95%CI,月)	Log-rank P	HR(95%CI) ¹	P 值
病毒感染				
无	37.8±7.4		1.0(Ref.)	
HBsAg(+)	30.4±8.2	0.07	2.57(1.03~6.17)	0.03
抗 HCV 抗体(+)	31.7±7.7	0.06	3.07(0.82~10.92)	0.05
两者均有	29.4±8.9	0.12	3.84(0.34~51.63)	0.15
TNM 分期				
I、II	36.4±8.8		1.0(Ref.)	
III、IV	30.7±9.2	0.001	3.07(1.36~6.47)	<0.001
远处转移				
无	37.7±7.4		1.0(Ref.)	
有	32.5±8.3	0.002	3.13(1.40~6.55)	0.002
肿瘤大小				
<5 cm	33.6±7.4		1.0(Ref.)	
≥5 cm	35.8±8.3	0.015	2.31(1.04~4.75)	0.023
VEGF				
-2578C/A				
CC	37.8±8.1		1.0(Ref.)	
CA	31.1±7.9		1.29(0.56~2.95)	0.51
AA	27.9±8.5	0.004	3.40(1.28~9.20)	0.006
-1154G/A				
GG	38.4±6.5		1.0(Ref.)	
GA	32.5±8.1		1.13(0.51~2.48)	0.73
AA	28.4±8.2	0.007	8.41(1.65~81.1)	0.002

素(表 3)。TMN 为 III 或 IV 级和有远处转移的患者病死率大幅度增高(HR=3.64,95%CI=1.67~6.79; HR=2.91,95%CI=1.30~2.67),此外,基因类型为 VEGF-2578 AA 和 VEGF-1154 AA 的患者病死率较野生型明显为高(HR=3.65,95%CI=1.35~11.13; HR=7.13,95%CI=1.46~65.8)。(表 3)

表 3 影响肝癌患者生存率的多变量分析

参数	HR(95%CI)	P 值
TNM 分期		
I、II		
III、cIV	3.64(1.67~6.79)	0.006
远处转移		
无		
有	2.91(1.30~6.27)	0.003
VEGFR-2,ng/L		
-2578C/A		
CC		
CA	1.37(0.47~3.16)	0.24
AA	3.65(1.35~11.13)	<0.001
-1154G/A		
GG		
GA	1.25(0.63~2.78)	0.47
AA	7.13(1.46~65.8)	<0.001

3 讨论

目前的研究提示基因因素可能影响 HCC 发展,不同类型的基因对其预后的影响可能不尽相同。涉及血管生成的基因可作为各种肿瘤发展及预后评

估的重要指标,比如胃癌,肺癌及肾癌^[5-7]。VEGF 作为一种血管生长因子,其作用被认为是刺激血管生成,因此可认为是能够调节肿瘤血管生成,从而成为对肿瘤的转移、复发及扩散的重要影响因素^[8]。VEGF 的多种基因类型现已基本确定,其中 VEGF-2578 AA, VEGF-1154 AA 类型为改变基因转录和表达的启动子^[6,9]。本研究发现 VEGF-2578C/A 和 VEGF-1154G/A 的多态性与肿瘤分期、大小密切相关,同时与 HCC 患者的生存时间成反比。

VEGF 基因定位于人类基因组 6p21.3 位,据估计有约 30 多个单核苷酸多态性,其 DNA 序列的多样性,可通过影响肿瘤血管生成的途径造成不同个体间对肺癌的敏感性不同。VEGF 多态性的研究揭示了不同种类的肿瘤组织病理学特征的不同^[6,10-13]。前期研究发现有 4 种不同的基因型,如 VEGF-2578C/A, VEGF-1154G/A, VEGF-634C/G 和 VEGF-1498T/C 等能调节 VEGF 的分泌水平,这 4 种类型基因与多种疾病相关,比如乳腺癌,胰腺癌,口腔恶性肿瘤,肝癌,非小细胞肺癌及胃癌。我们的研究显示 VEGF-2578C/A 和 VEGF-1154G/A 为 HCC 预后和发展的的重要相关因素。虽然曾有研究表明这两种基因能够明显降低某些肿瘤的侵袭性^[12,14-15],与本研究的结论不太一致,但是考虑到基因的多态性,相同的基因对于不同的肿瘤在功能上的不同在生物学上应该是合理的。

本研究仍有一些不足,病例选择均在同一所医院,不能代表普通人群,另外,其他未纳入研究类型基因也可能影响 HCC 的预后。因此需进行大样本,多中心研究,包括不同种族 VEGF 基因类型与 HCC 预后的关系。

总之,我们发现 VEGF-2578C/A 和 VEGF-1154G/A 基因类型与肝癌患者的预后相关。这可能有助于对预测患者临床结果。今后的进一步研究需要证实这些结果的临床意义。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61: 69-90.
- [2] Wu KT, Wang CC, Lu LG, et al. Hepatocellular carcinoma: clinical study of long-term survival and choice of treatment modalities[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19: 3649-3657.
- [3] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update[J]. Hepatology, 2011, 53: 1020-1022.
- [4] Lewandowski RJ, Mulcahy MF, Kulik LM, et al. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma: comprehensive imaging and survival analysis in a 172-patient cohort[J]. Radiology, 2010, 255: 955-965.
- [5] Súenz-López P, Vazquez F, Cozar JM, et al. VEGF polymorphisms are not associated with an increased risk of developing renal cell carcinoma in Spanish population[J]. Hum Immunol, 2013, 74: 98-103.
- [6] Oh SY, Kwon HC, Kim SH, et al. The relationship of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and clinical outcome in advanced gastric cancer patients treated with FOLFOX: VEGF polymorphism in gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2013, 13: 43.
- [7] Sun SF, Huang DB, Cao C, et al. Polymorphism of VEGF-460C/T associated with the risk and clinical characteristics of lung cancer in Chinese population[J]. Med Oncol, 2013, 30: 410.
- [8] 李 丁, 向 华. 血管内皮生长因子在原发性肝癌中的诊断及预后意义[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 1018-1021.
- [9] Absenger G, Szkandera J, Stotz M, et al. A common and functional gene variant in the vascular endothelial growth factor a predicts clinical outcome in Early-Stage breast cancer [J]. Mol Carcinog, 2013, 52: 96-102.
- [10] Chien MH, Liu YF, Hsin CH, et al. Impact of VEGF-C gene polymorphisms and environmental factors on oral cancer susceptibility in Taiwan[J]. PLoS One, 2013, 8: e60283.
- [11] Luo T, Chen L, He P, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms and breast cancer risk in a Chinese population[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14: 2433-2437.
- [12] Sa - Nguanraksa D, Chuangsuwanich T, Pongpruttipan T, et al. Vascular endothelial growth factor-634G/C polymorphism is associated with increased breast cancer risk and aggressiveness [J]. Mol Med Rep, 2013, 8: 1242-1250.
- [13] Wu X, Xin Z, Zhang W, et al. Polymorphisms in the VEGFA promoter are associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma by altering promoter activity [J]. Int J Cancer, 2013, 133: 1085-1093.
- [14] Tamura T, Kuwahara A, Yamamori M, et al. VEGF - 634C/G genotype is predictive of long-term survival after treatment with a definitive 5 - fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Med Sci, 2012, 9: 833-837.
- [15] 杨柏帅, 施裕新, 袁 敏, 等. TACE 治疗既往有肝功能衰竭史肝癌患者七例[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 805-808.

(收稿日期:2015-01-09)

(本文编辑:俞瑞纲)