

中枢神经影像学

Vascular endothelial growth factor and the angiogenesis
and peritumorous brain edema in astrocytomas

CHEN Jun, ZHOU Yi-cheng, ZHU Wen-zhen, XIA Li-ming,

FENG Ding-yi, ZOU Ming-li, WANG Cheng-yuan

(Department of Radiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its relationship with angiogenesis and peritumorous brain edema (PTBE) and with its pathologic grading in astrocytoma. **Methods** Thirty-four patients with astrocytomas were examined by MRI and proved by surgery and pathology. The volume of tumor and the extent of PTBE were determined on MRI. Edema index (EI), which is the ratio of the volume of PTBE to that of tumor was used to estimate the extent of peritumorous brain edema. Expression of VEGF were examined by immunohistochemical method of streptavidin-biotin-peroxidase (SP). The vascular development was measured by micro-vascular density (MVD) which was immunostained with anti-factor VIII-related antigen monoclonal antibody. **Results** Both of the angiogenesis and PTBE in astrocytoma were found significantly correlated to the expression of VEGF ($r=0.77, P<0.001; r=0.336, P=0.05$, respectively). The expression of VEGF, MVD and EI in high-grade astrocytomas were significantly higher than that in low-grade astrocytomas ($t=7.08, 3.37, 2.74; P=0.01, 0.011, 0.025$, respectively). **Conclusion** VEGF may contribute to the progression of glioma by playing an important role in leading to both angiogenesis and brain edema. The signs of PTBE on MRI may indirectly reflect the angiogenesis of astrocytoma and predict its malignant degree.

[Key words] Astrocytoma; Magnetic resonance imaging; Vascular endothelial growth factor; Angiogenesis; Peritumorous edema

VEGF 与星形细胞瘤血管生成和瘤周脑水肿的相关性研究

陈 军¹, 周义成², 朱文珍², 夏黎明², 冯定义², 邹明丽², 王承缘²

(1. 武汉大学人民医院放射科, 湖北 武汉 430060; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科)

[摘要] **目的** 探讨星形细胞瘤的血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达与血管生成和瘤周脑水肿(PTBE)及病理分级的关系。**方法** 术前进行 MRI 检查且经手术病理证实的 34 例星形细胞瘤患者。在 MRI 计算星形细胞瘤的瘤体体积和瘤周脑水肿体积, 从瘤周脑水肿与肿瘤本身的体积之比获得水肿指数(EI), 估价脑水肿的程度。采用免疫组化方法(SP 法)检测 34 例星形细胞瘤 VEGF 表达; VIII 因子相关抗原单克隆抗体免疫组织化学(SP 法)染色显示微血管, 测量微血管密度(MVD)表示肿瘤血管生成。**结果** VEGF 表达与脑星形细胞瘤的血管生成、瘤周脑水肿均呈显著正相关($r=0.77, P<0.001; r=0.336, P=0.05$); 高级别星形细胞瘤 VEGF、MVD、EI 分别显著高于低级别星形细胞瘤($t=7.08, 3.37, 2.74; P=0.01, 0.011, 0.025$)。**结论** VEGF 可能通过参与星形细胞瘤血管生成和脑水肿发生, 对胶质瘤的恶性演进起促进作用; MRI 瘤周脑水肿征象能间接反映星形细胞瘤的肿瘤血管形成和预测星形细胞瘤的恶性程度。

[关键词] 星形细胞瘤; 磁共振成像; 血管内皮细胞生长因子; 血管生成; 瘤周水肿

[中图分类号] R739.41; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2004)02-0216-04

本文通过对 34 例星形细胞瘤血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和微血管密度(microvessel density, MVD)研究, 探讨星形细胞瘤血管内皮细胞生长因子与肿瘤血管生成、肿瘤体积、瘤周水肿及病理分

级的关系, 为临床术前评估肿瘤良恶性程度及治疗方案的制定提供可靠的影像学依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料 顺序收集术前进行 MRI 检查且经手术病理证实的 34 例星形细胞瘤患者, 其中男 18 例, 女 16 例; 年龄 10~73 岁, 平均 38.41 岁。术前均未行放疗及化疗, 病理按 WHO 神经系统肿瘤分类(2000)对星形细胞瘤分级, I~II 级(低级别)26 例, III~IV 级(高级别)8 例。磁共振检查日期

[作者简介] 陈军(1968-), 男, 湖北武汉人, 博士, 主治医师。研究方向: 中枢神经系统影像。E-mail: chenjun82@21cn.com

[收稿日期] 2003-08-10

距离手术时间为 1~34 天,平均 9.46 天。

1.2 常规磁共振检查 所有病例均用 1.5 T(GE Signa CV/i, NV/i)磁共振扫描仪进行检查,常规 MR 检查序列包括平扫矢状位 FSE T1WI 定位,轴位 SE T1WI, FSE T2WI,快速液体衰减反转恢复序列(fluid attenuation inversion recovery, Fast FLAIR)。按 0.1 mmol/kg 注入造影剂钆喷替酸葡甲胺(Gd-DTPA)行增强轴位、冠状位和矢状位 SE T1WI 扫描。

SE T1WI 序列扫描参数:TR/TE=600/11 ms,FOV 24 cm×24 cm, Matrix 256×224, NEX=2, Bandwidth 12.5 kHz。层厚 6 mm,间距 2 mm,共扫描 16 层。FSE T2WI 序列 TR/TE=3 500/85 ms,其他参数同 SET1WI。Fast FLAIR 序列参数:TR/TE=9 000/120 ms,反转时间(time of inversion, TI)=2 200 ms, NEX=1, Matrix 256×192,其余参数同 SE T1WI 序列。增强后冠状位和矢状位扫描以病灶的轴位像为中心定位,层厚 5 mm,间距 1 mm。余同轴位。

1.3 水肿指数(edema index, EI)测量 参照 Inamura 等^[1]估计瘤周脑水肿的方法,所有患者术前常规行 MRI 检查,测量 SET1W 平扫或增强层面测量肿瘤最大直径和与其垂直的径线长度以及冠状位或矢状位瘤体的最大高度,三者乘积即为瘤体体积。同样方法在 T2WI 测算出水肿(包括瘤体)体积,则 EI=水肿体积/瘤体体积。

1.4 标本来源 肿瘤标本均系常规外检取材,10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,3 μm 厚连续切片备用,并做 HE 染色确定诊断。

1.5 微血管密度测量 微血管密度测量采用链菌素-生物素-过氧化酶连接法(streptavidin-biotin-peroxidase, SP 法)进行免疫组化染色。SP 试剂盒, DAB(3,3'-二氨基联苯胺, 3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride, DAB)显色试剂盒,兔抗人第八因子相关抗原(factor VIII related antigen, FVIII-RAg)单克隆抗体。采用 HPIAS-2000 高清晰度彩色病理图文分析系统测量 MVD,方法按照 Weidner^[2]方法,双盲法阅片,先在低倍镜下选择血管密集区域,然后在 200 倍视野下,每张切片选择 3 个血管着色最密集区域计数微血管数量,内皮细胞及微小血管均予计数,取均值即作为该例肿瘤的 MVD 值。

1.6 VEGF 免疫组化检测 采用 SP 法进行。SP 试剂盒,

DAB 显色试剂盒。VEGF 免疫组化数据处理方法:首先在低倍(40×)视野下扫描整个组织切片,找到染色清晰、背景对照良好的“热点(hot spot)”,然后在 200 倍视野下随机选择视野存盘。最后采用 HPIAS-2000 型彩色病理图文分析系统免疫组织化学分析程序对 VEGF 染色进行积分光密度分析,每个切片随机选取 3 个视野进行定量分析。

1.7 统计学分析 用 SPSS 10.0 软件对资料进行处理,所有计量资料以均数±标准差表示,不同组别之间的参数比较采用非配对 *t* 检验,相关分析采用 Pearson 法,以 *P*<0.05 作为显著性检验的标准。

2 结果

2.1 VEGF 与肿瘤体积 经 Pearson 相关分析处理,34 例星形细胞瘤 VEGF 表达水平与其对应的肿瘤体积不相关(*r*=0.22, *P*=0.22),并且高级别星形细胞瘤 VEGF 表达显著高于低级别星形细胞瘤(*t*=7.08, *P*<0.01)(表 1,图 1)。

表 1 高低级别星形细胞瘤微血管密度、VEGF 积分光密度、水肿指数的关系($\bar{x} \pm s$)

	低级别	高级别	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
微血管密度	19.93±9.02	74.14±45.18	3.37	0.011
VEGF 积分光密度	13.45±14.09	54.89±15.74	7.08	0.01
水肿指数	2.11±1.17	4.38±2.25	2.74	0.025

2.2 VEGF 表达与 MVD 经 Pearson 相关分析处理,34 例星形细胞瘤 VEGF 表达水平与其对应的 MVD 呈显著正相关(*r*=0.77, *P*<0.001)(图 2)。

2.3 VEGF 表达与 EI 本实验 34 例星形细胞瘤的 EI 与其对应的 VEGF 表达水平经 Pearson 相关分析处理呈明显正相关(*r*=0.336, *P*=0.05)(图 3),并且高级别星形细胞瘤 EI 显著高于低级别星形细胞瘤的 EI(*t*=2.74, *P*=0.025)(表 1,图 1)。

2.4 MVD 与肿瘤体积 经 Pearson 相关分析处理,34 例星形细胞瘤 MVD 表达水平与其对应的肿瘤体积不相关(*r*=0.063, *P*=0.724),并且高级别星形细胞瘤 MVD 表达显著高于低级别星形细胞瘤(*t*=3.37, *P*=0.011)(表 1,图 1)。

2.5 MVD 与 EI 本组 34 例星形细胞瘤的 MVD 与 EI 经

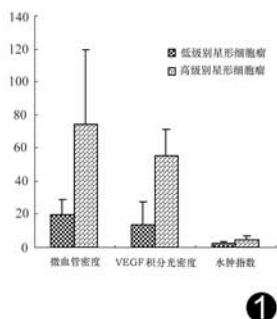


图 1 高低级别星形细胞瘤微血管密度、VEGF 积分光密度、水肿指数的关系

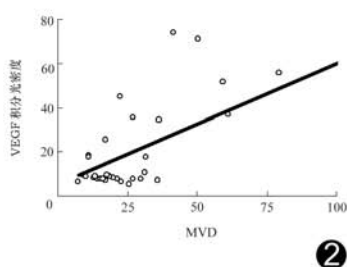


图 3 星形细胞瘤 VEGF 表达水平与水肿指数相关关系

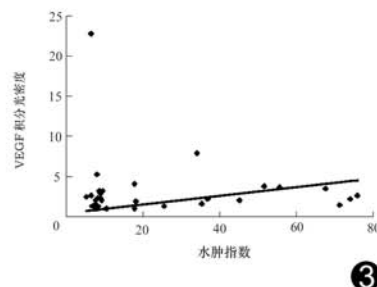


图 2 星形细胞瘤 VEGF 表达水平与 MVD 相关关系

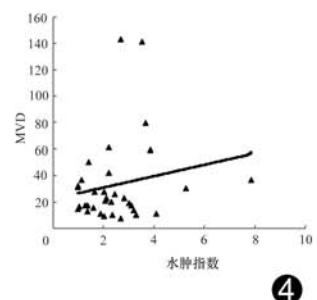


图 4 MVD 与水肿指数相关关系

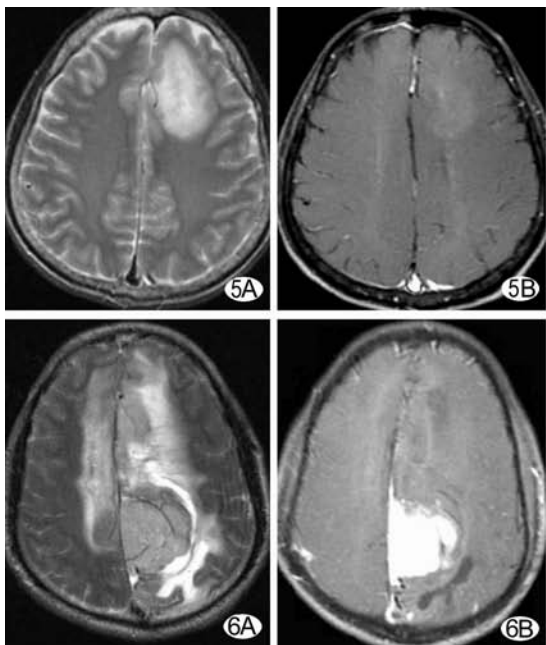


图 5 II 级星形细胞瘤 A. T2WI; B. 增强像; C. VEGF 免疫组织化学染色图($\times 200$); D. MVD 免疫组织化学染色图($\times 200$), EI=1.29, VEGF 积分光密度为 7.92, MVD 为 17.3

图 6 III 级星形细胞瘤 A. T2WI; B. 增强像; C. VEGF 免疫组织化学染色图($\times 200$); D. MVD 免疫组织化学染色图($\times 200$) EI=3.89, VEGF 积分光密度为 51.76, MVD 为 59.33

Pearson 相关分析处理呈明显正相关关系($r=0.402$, $P=0.019$)(图 4)。

3 讨论

3.1 VEGF 表达与肿瘤血管生成的关系 肿瘤血管生成是一个受基因调控、细胞因子等复杂因素作用的过程。肿瘤细胞分泌的某些生长因子构成了肿瘤的发生、演进及血管生成微环境元素,其中 VEGF 在脑肿瘤的血管形成过程中最为重要^[3,4]。从正常牛垂体滤泡细胞中分离出一种对体外培养的内皮细胞具有选择性促分裂作用的蛋白,为血管内皮生长因子(VEGF)^[5]。1983 年 Senger 等^[6]用层析法发现分子量为 34~42 kD 的活性肝素结合蛋白,由于此蛋白具有促进腹水积累的作用,故称之为血管通透性因子(vascular permeability factor, VPF)。由于正常垂体中的 VEGF 与肿瘤源性 VPF 编码基因和氨基酸结构极相似,同属血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)家族,故合称为 VEGF/VPF。人类 VEGF 以四种亚型存在——VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉、VEGF₂₀₆,其中两个较小的单体 VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅大量分泌,而 VEGF₁₆₅表达最显著^[7]。VEGF/VPF 是高度特异性的血管内皮细胞有丝分裂素,有着双重功能:一是直接刺激血管内皮细胞增殖并诱导新生血管形成;二是使血管通透性增加。

Bruce 和 Criscuolo^[8]首先证实胶质瘤细胞合成与分泌 VEGF。肿瘤血管生成具有一定的组织侵蚀性,肿瘤细胞可沿新生血管开启的组织裂隙向外侵袭,侵蚀周围组织,伴随血管内皮细胞增生的大量微血管生成是恶性胶质瘤的标志,故血管生成被作为胶质瘤恶性度分级的标准之一。本研究结果显示,VEGF 表达水平与其对应的 MVD 呈显著正相关($r=0.77$, $P<0.001$),并且高级别星形细胞瘤 VEGF 表达显著

高于低级别星形细胞瘤($t=7.08$, $P<0.01$)(图 5,6)。VEGF 主要分布在高恶性胶质瘤细胞和血管内皮细胞,定位于胞浆,低恶性胶质瘤表达相对较低。结合 VEGF 具有的特异性强刺激血管内皮增殖及血管生成的生物学功能,认为 VEGF 基因可能是人脑胶质瘤血管生成的重要调节基因,VEGF 参与脑胶质瘤的血管生成和侵袭发展过程^[3,4,9]。

3.2 VEGF 表达与 EI 瘤周水肿是胶质瘤常见的表现,其严重程度与肿瘤的恶性度相关,发生机制尚未完全阐明。Pro-nin 等^[10]认为,胶质瘤瘤周水肿主要为血管源性水肿,水肿始于血脑屏障破坏区。肿瘤内血管增生、血管通透性增高和血脑屏障的破坏,为水肿液的漏出提供了解剖学基础。从组织学来看,肿瘤细胞或间质细胞可分泌一些可溶性血管生成因子如:PDGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、VEGF 等,其中以 VEGF 和 bFGF 作用最显著^[11]。VEGF 增加血管通透性的作用比组胺强 1 000 倍^[12],这种作用在血管源性脑水肿形成过程中有重要意义。正是由于这些因子的作用,使得肿瘤新生血管具有结构不完整,管壁薄弱,仅排列一层内皮细胞,缺乏平滑肌,基底膜稀疏且易于泄漏;血管内皮窗孔、紧密连接增宽、胞饮泡增多等特点,使它们比正常成熟血管更容易被肿瘤细胞穿透,使血脑屏障受损、血管通透性增高,血浆和一些大分子物质可渗漏到细胞间隙中,并在肿瘤周围聚集,形成广泛的瘤周水肿。

Struger 等^[13]对 22 例脑转移瘤组织进行免疫组织化学研究,结果 21 例 VEGF 染色阳性,而术前 MRI 均显示有血管源性脑水肿,提示 VEGF 增加血管通透性作用与临床常见的脑肿瘤周围水肿有关。瘤体水肿能分离瘤组织,有利于与侵袭相关的细胞基质及黏附分子运动,从而促进肿瘤细胞向宿

主组织侵袭;瘤周水肿致组织疏松,减少局部宿主结构的抵抗,亦有利于肿瘤的恶性生长,因此,瘤周水肿的严重程度与肿瘤的恶性度有关。在本研究中,星形细胞瘤的 VEGF 表达水平与 EI 显著正相关($r=0.336, P=0.05$),且高级别星形细胞瘤 VEGF 表达水平、EI 分别显著高于低级别星形细胞瘤($t=7.08, P<0.01; t=2.74, P=0.025$)(图 5, 6)。表明 VEGF 增加血管通透性作用在人脑胶质瘤水肿发生和恶性演进中可能起重要作用^[3,4,9]。

3.3 MVD 与肿瘤体积和 EI 的关系 Folkman^[14]于 1971 年首次提出实体肿瘤在没有血管生成的情况下,其直径将局限在 2~3 mm 的假说,并首次提出肿瘤细胞能分泌一种称为“肿瘤血管生成因子(tumor angiogenesis factor, TAF)”的可溶性物质,该物质可刺激内皮细胞的增生。此后,有关肿瘤血管生成的研究取得了很大进展。实体瘤的生长和转移依赖于血管的生成。

研究表明,实体肿瘤组织自发增长的肿瘤结节形成后即进入无血管生长期,此时肿瘤直径小于 2~3 mm,细胞数在 10^6 以内,故肿瘤的体积保持在微小状态。当实体肿瘤细胞数达到 10^6 时,即需要产生新生血管以适应肿瘤继续生长^[15]。

肿瘤血管生成是一个连续的过程,这一过程实际上是肿瘤与宿主相互作用的结果,一方面肿瘤刺激内皮细胞的增殖和迁徙,另一方面内皮细胞也通过自分泌及旁分泌功能刺激其自身、成纤维细胞甚至肿瘤细胞的增殖^[16]。

Leon 等^[17]对人脑胶质瘤 MVD 进行了研究,发现恶性胶质瘤 MVD 值明显高于良性胶质瘤,并指出 MVD 是判别预后的一个较好的间接指标。本研究结果显示,随着星形细胞瘤病理级别的增加, MVD 值逐渐增高,高级别星形细胞瘤 MVD 表达显著高于低级别星形细胞瘤($t=3.37, P=0.011$),与 Leon 和 Tynnenen 等^[17,18]研究结果相同,提示血管生成可作为星形细胞瘤恶性度分级的指标之一。

本研究还显示随着瘤周水肿程度的加重,微血管密度值逐渐增高, MVD 越高,瘤周水肿越明显($P=0.019$),说明 MRI 对星形细胞瘤瘤周水肿程度及范围的显示更接近肿瘤生物学行为,与文献报道相似^[10],同时进一步提示血管生成与瘤周水肿及肿瘤的恶性度之间有密切的关系。由于高恶性度星形细胞瘤的发生率和患者死亡率主要由肿瘤的血管化程度和瘤周水肿所决定,因此 MRI 所显示的肿瘤水肿范围可以较客观地反映星形细胞瘤的恶性程度,可作为预测星形细胞瘤恶性度及预后的一个重要征象。

本组 34 例星形细胞瘤的资料显示,虽然高级别星形细胞瘤 MVD 表达显著高于低级别星形细胞瘤($t=3.37, P=0.011$),但星形细胞瘤 MVD 表达水平与其对应的肿瘤体积不相关($r=0.063, P=0.724$),说明尽管肿瘤生长与 MVD 有关,但尚不能单纯以肿瘤大小来判定其恶性度。肿瘤的生长呈浸润性,无控性生长,肿瘤的生长有赖于血管的形成,即血管形成是肿瘤生长的主要条件,但不是充分条件,因为肿瘤的生长还有赖于肿瘤细胞自身的增殖活性和分化能力,另外因肿瘤恶性程度,生长部位,手术时机等诸多因素所决定的生长时间,也是决定肿瘤大小的因素。

[参考文献]

- [1] Inamura T, Nishio S, Takeghita I, et al. Peritumoral brain edema in meningiomas influence of vascular supply on its development[J]. Neurosurgery, 1992, 31(2): 179-185.
- [2] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875-1887.
- [3] Jensen RL. Growth factor mediated angiogenesis in the malignant progression of glioma tumors: a review[J]. Surg Neurol, 1998, 49(2): 189-196.
- [4] Valter MM, Hugel A, Huang HJ, et al. Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase 1 (Flt1)/vascular endothelial growth factor receptor 1 synthesis and neoangiogenesis[J]. Cancer Res, 1999, 59(21): 5608-5614.
- [5] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen[J]. Science, 1989, 246(4935): 1306-1309.
- [6] Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid[J]. Science, 1983, 219(4587): 983-985.
- [7] Machein MR, Plate KH. VEGF in brain tumors (Review)[J]. J Neurooncol, 2000, 50(1-2): 109-120.
- [8] Bruce JN, Criscuolo GR, Merrill MJ, et al. Vascular permeability induced by protein product of malignant brain tumors: inhibition by dexamethason[J]. J Neurosurg, 1987, 67(6): 80-84.
- [9] Carroll RS, Zhang J, Bello L, et al. KDR activation in astrocytic neoplasms[J]. Cancer, 1999, 86(7): 1335-1341.
- [10] Pronin IN, Holodny AI, Petraitkin AV. MRI of high-grade glial tumors: correlation between the degree of contrast enhancement and the volume of surrounding edema[J]. Neuroradiology, 1997, 39(5): 348-350.
- [11] Bian XW, Du LL, Shi JQ, et al. Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas[J]. Analyt Quant Cytol Histol, 2000, 22(3): 267-274.
- [12] Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function (Review)[J]. J Cell Biochem, 1991, 47(3): 219-223.
- [13] Struger J, Rothbart D, Harrington W, et al. Vascular permeability factor in brain metastases: correlation with vasogenic brain edema and tumor angiogenesis[J]. J Neurosurg, 1994, 81(5): 560-566.
- [14] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [15] Fox SB, Gatter KC, Harris AL. Tumor angiogenesis[J]. J Pathol, 1996, 179(1): 232-237.
- [16] Nomura M, Yamagishi S, Harada S, et al. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes[J]. J Biol Chem, 1995, 270(47): 28316-28324.
- [17] Leon SP, Folkner RD, Black PM. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors[J]. Cancer, 1996, 77(2): 362.
- [18] Tynnenen O, Aronen HJ, Ruhala M, et al. MRI enhancement and microvascular density in gliomas correlation with tumor cell pro-