

Thesis Title	The Contribution of Expression and Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor on Tumor Progression
Author	Miss Onusa Wattananupong
Degree	Master of Science (Medical Technology)
Thesis Advisor	Dr. Ratchada Cressey

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent mitogen for microvascular and macrovascular endothelial cells derived from arteries, veins, and lymphatics, and VEGF overexpression has been correlated with increased tumor angiogenesis. In humans, six different isoforms of VEGF have been identified. While VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ are secreted in soluble forms, the larger isoforms, VEGF₁₈₉ remains cell-associated. Although numerous publications dealing with the measurement of circulating VEGF for diagnostic and therapeutic monitoring of malignant diseases have been published over the last 10 years, the relationship between the production of tissue VEGF and its concentration in blood is still insufficient. Therefore, the aims of this study were to determine: 1) The protein expression pattern of VEGF isoforms in tumor and normal tissues in order to understand whether which VEGF protein isoforms play an important role during tumorigenesis. 2) The relationship between the expression pattern of VEGF in tumor tissues and circulating level of VEGF in blood to clarify whether measuring VEGF in serum is usable as a predictor for the VEGF expression level in tumor tissues. 3) Comparing level of circulating VEGF in cancer patients and in healthy volunteers.

A total of 114 tissue samples and 77 preoperative serum samples were obtained from patients with colorectal, liver and lung cancer. VEGF protein expression pattern and total circulating VEGF were examined using western blot analysis and capture ELISA, respectively.

Three major protein bands were predominately detected in tumor samples with an apparent molecular mass under reducing conditions of 18, 23 and 26 kDa, which are believed to represent VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉, respectively. In colorectal tumors, VEGF₁₂₁ was found to be equally expressed in both tumor and normal tissues, whereas the VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉ were only detected or detected at higher level in tumor tissues. However, in lung tumor VEGF₁₂₁ appeared to be predominately expressed in normal tissues, where as VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉ were predominately expressed in tumors tissues. Unexpectedly, normal tissues of liver expressed higher level of all 3 isoforms of VEGF in comparison to tumor tissues. Expression of VEGF₁₆₅ was significantly correlated with smaller tumor size, whereas VEGF₁₈₉ was significantly correlated with advanced clinical stage of the colorectal tumors. The measurement of total VEGF by capture ELISA showed that total VEGF protein level were significantly higher in tumor tissues of colorectal and lung compared to normal tissues, indicating that these types of tumor cells selectively induce the expression of certain isoforms of VEGF to help with their progression during tumorigenesis, thus resulted in the induction total level of VEGF.

Determination of the VEGF in serum revealed that circulating level of VEGF in patients with colorectal (mean = 1,069 pg/ml), liver (mean = 837 pg/ml), and lung cancer (mean = 1,251 pg/ml) were significantly higher than those in healthy volunteers (mean = 605 pg/ml) ($p = 0.001$). However, it is very difficult to decide the cut-off value, as some normal volunteers possessed quite a high level of circulating VEGF and also no correlation between the circulating level of VEGF and pathological features was observed. From this investigation, it can be concluded that circulating level of VEGF may have potential to be used as a tumor marker, however, careful considerations have to be taken, as it may not entirely represent the VEGF production level in tumor tissues and tumor stage since other pathological conditions can also cause the induction of this protein in the circulation.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การสนับสนุนของการแสดงออกและการหลังของ Vascular Endothelial Growth Factor ต่อการพัฒนา ของมะเร็ง
ผู้เขียน	นางสาวอรอุษา วัฒนะนุพงษ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.รัชดา เกรสซี่

บทคัดย่อ

Vascular endothelial growth factor หรือ VEGF มีความสามารถเป็น mitogen ช่วยในการสร้างหลอดเลือดใหม่ ซึ่งถูกสร้างมาจาก หลอดเลือดแดง หลอดเลือดดำ และหลอดน้ำเหลือง และการแสดงออกของ VEGF ที่เพิ่มขึ้นพบว่ามีความสัมพันธ์กับกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็งด้วย (tumor angiogenesis) พบว่าในมนุษย์มี VEGF ทั้งหมด 6 isoforms ที่มีขนาดแตกต่างกัน โดย VEGF₁₂₁ และ VEGF₁₆₅ เป็น isoform ที่สามารถหลั่งออกมาในกระแสเลือดได้ ซึ่งต่างกับ VEGF₁₈₉ ที่มีขนาดใหญ่กว่ามักพบมากบนเซลล์และพบได้น้อยมากในกระแสเลือดถึงแม้ว่าในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาจะมีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ในการตรวจวัดระดับ VEGF ในกระแสเลือดเพื่อใช้สำหรับการวินิจฉัยและการตรวจติดตามผลการรักษาโรคมะเร็ง แต่ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้าง VEGF ในเนื้อเยื่อกับระดับของ VEGF ในกระแสเลือดนั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจกันมากนัก ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้จึงมีเพื่อ 1) ศึกษารูปแบบการแสดงออกของ VEGF isoforms เปรียบเทียบระหว่างในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติเพื่อดูว่า isoform ใดที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของโรคมะเร็ง 2) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการแสดงออกของ VEGF ในเนื้อเยื่อ กับระดับของ VEGF ในกระแสเลือดเพื่อทดสอบว่าการตรวจวัดระดับของ VEGF ในกระแสเลือดสามารถใช้ทำนายรูปแบบการแสดงออกของ VEGF ในเนื้อเยื่อมะเร็งได้หรือไม่ และ 3) เปรียบเทียบระดับของ VEGF ในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกับของคนสุขภาพดี

ได้ทำการศึกษาในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งจำนวน 114 ราย และซีรัมจำนวนทั้ง 77 ราย ซึ่งประกอบไปด้วยผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ ผู้ป่วยมะเร็งตับ และผู้ป่วยมะเร็งปอด โดยทำการศึกษารูป

แบบการแสดงออกของ VEGF ในระดับโปรตีนและตรวจวัดระดับของ VEGF ทั้งในเนื้อเยื่อและกระแสเลือด โดยใช้วิธี western blot analysis และวิธี capture ELISA ตามลำดับ จากผลการทดลองพบการแสดงออกของแถบโปรตีนหลักทั้งหมด 3 แถบในเนื้อเยื่อมะเร็งซึ่งมี ขนาดมวลโมเลกุลที่แตกต่างกันได้แก่ 18 kDa, 23 kDa, และ 26 kDa ซึ่งเชื่อว่าเป็น VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ และ VEGF₁₈₉ ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งลำไส้พบการแสดงออกของ VEGF₁₂₁ ได้ระดับเท่ากันทั้งในเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งตรงข้ามกับการแสดงออกของ VEGF₁₆₅ และ VEGF₁₈₉ ที่พบว่ามีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็ง อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยมะเร็งปอดพบว่าการแสดงออกของ VEGF₁₂₁ มีมากในเนื้อเยื่อปกติ ตรงข้ามกับการแสดงออกของ VEGF₁₆₅ และ VEGF₁₈₉ ที่พบว่ามีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อมะเร็ง ส่วนการแสดงออกของ VEGF ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยกลับพบว่าการแสดงออกของ VEGF ทุก isoform มีมากในเนื้อเยื่อปกติเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อมะเร็ง การแสดงออกของ VEGF₁₆₅ พบว่ามีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็งที่มีขนาดเล็ก ตรงข้ามกับการแสดงออกของ VEGF₁₈₉ ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ ผลการตรวจวัดระดับของ total VEGF ในเนื้อเยื่อโดยวิธี capture ELISA พบว่าระดับของ VEGF ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ และมะเร็งปอดมีระดับสูงในเนื้อเยื่อมะเร็งมากกว่าในเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์มะเร็งของอวัยวะดังกล่าวสามารถเพิ่มการแสดงออกของ VEGF บาง isoform เพื่อซึ่งช่วยในการพัฒนาการเกิดมะเร็งจึงทำให้ค่าปริมาณ VEGF โดยรวมทั้งหมดมีระดับสูงขึ้น

เมื่อทำการตรวจวัดระดับของ VEGF ในซีรัมพบว่าในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ (ค่าเฉลี่ย = 1,069 pg/ml) มะเร็งตับ (ค่าเฉลี่ย = 837 pg/ml) และ มะเร็งปอด (ค่าเฉลี่ย = 1,251 pg/ml) มีระดับของ VEGF ในกระแสเลือดสูงกว่ากลุ่มคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (ค่าเฉลี่ย = 605 pg/ml) ($p = 0.001$) อย่างไรก็ตาม พบว่าการเลือกค่า cut-off มีความยาก เนื่องจากระดับของ VEGF ในซีรัมคนสุขภาพดีบางรายมีค่าค่อนข้างสูง และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของระดับ VEGF กับลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิกของผู้ป่วยพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันแต่อย่างใด ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าระดับของ VEGF ในกระแสเลือดอาจสามารถใช้เป็น tumor marker ได้ แต่อย่างไรก็ตามระดับของ VEGF ที่ตรวจได้อาจไม่บ่งถึงการเพิ่มการสร้าง VEGF ของเนื้อเยื่อมะเร็งและระยะของโรคมะเร็งที่ตื้นัก ทั้งนี้เนื่องจากความผิดปกติทางพยาธิสภาพของร่างกายอย่างอื่นที่สามารถทำให้ระดับของ VEGF สูงได้เช่นกัน