

文章编号: 1005-6947(2013)04-0442-05

· 基础研究 ·

生长激素荷人结肠癌裸鼠 GH/IGF-I/IGFBP-3 轴的影响

张毅, 梁道明, 李思齐, 袁勇, 赵辉, 陈嘉勇

(昆明医科大学第二附属医院急诊科, 云南昆明 650101)

摘要

目的: 探讨外源性生长激素 (GH) 对荷瘤裸鼠 GH/胰岛素样生长因子 (IGF)/胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP-3) 轴的影响。

方法: 采用人结肠癌细胞株 (HCT116) 建立人结肠癌细胞裸鼠移植瘤模型。取 48 只荷瘤裸鼠随机均分为生理盐水处理组 (NS 组)、氟尿嘧啶处理组 (FU 组)、GH 处理组 (GH 组)、FU+GH 处理组 (FU+GH 组)。每组连续给药 6 d, 在给药结束后 24, 72 h 分别处死每组 6 只动物, 取血及移植瘤标本, 应用 ELISA 法检测血清 GH, IGF-I, IGFBP-3 含量和 RT-PCR 法检测移植瘤 IGF-I, IGF-I 受体 (IGF-IR), IGFBP-3 的 mRNA 表达。

结果: ELISA 结果显示, 给药结束后 24 h, GH 组和 FU+GH 组血清 GH, IGF-I, IGFBP-3 含量较 NS 组与 FU 组明显升高 (均 $P < 0.05$); 给药结束后 72 h, 各组 GH, IGF-I 的水平无统计学差异 (均 $P > 0.05$), 但 GH 组和 FU+GH 组 IGFBP-3 水平仍高于 NS 组和 FU 组 (均 $P < 0.05$)。RT-PCR 结果显示, 给药结束后 24 h, GH, FU, FU+GH 组移植瘤组织 IGF-I mRNA 与 IGF-IR mRNA 的表达较 NS 组明显降低, 而 IGFBP-3 mRNA 表达明显增加; 给药结束后 72 h, IGF-I mRNA 与 IGF-IR mRNA 表达各组间无差别, 但 GH 组, FU 组和 FU+GH 组 IGFBP-3 mRNA 表达量仍明显高于 NS 组。

结论: 短期应用外源性 GH 所致 GH/IGF/IGFBP-3 轴的变化对人结肠癌移植瘤生长无促进作用。

关键词

结肠肿瘤; 人生长激素; 异种移植模型抗肿瘤试验; 小鼠, 裸

中图分类号: R735.35 文献标志码: A



DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.04.012
<http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3459.shtml>

Impact of exogenous growth hormone on GH/IGF/IGFBP axis in colon cancer-bearing nude mice

ZHANG Yi, LIANG Daoming, LI Siqi, YUAN Yong, ZHAO Hui, CHEN Jiayong

(Department of Emergency Medicine, the Second Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650101, China)

Corresponding author: CHEN Jiayong, Email: cjy125@163.com

ABSTRACT

Objective: To observe the impact of exogenous growth hormone (GH) on the axis of GH/insulin-like growth

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30460133)。

收稿日期: 2012-06-26; 修订日期: 2013-01-11。

作者简介: 张毅, 昆明医科大学第二附属医院主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤临床与基础方面的研究。

通信作者: 陈嘉勇, Email: cjy125@163.com

factor I (IGF-I)/insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) in colon cancer-bearing nude mice.

Methods: Nude mice xenograft models of human colon cancer were established by using human colon cancer HCT116 cells. Subsequently, 48 tumor-bearing mice were equally randomized into normal saline treatment group (NS group), fluorouracil treatment group (FU group), GH treatment group (GH group) and FU plus GH treatment group (FU+GH group), and all treatment regimens were continued for 6 days. Mice were sacrificed to collect the blood and tumor xenograft samples at 24 and 72 h after the termination of regimens with 6 mice in each group. The serum contents of GH, IGF-I and IGFBP-3 were determined by ELISA assay, and the mRNA expressions of IGF-I, IGF-I receptor (IGF-IR) and IGFBP-3 in xenograft were detected by RT-PCR method.

Results: The results of ELISA showed that the serum levels of GH, IGF-I and IGFBP-3 were significantly increased in GH group and FU+GH group compared with either NS group or FU group at 24 h after regimen discontinuation (all $P < 0.05$); at 72 h after regimen discontinuation, the serum levels of GH and IGF-I were similar among groups (both $P > 0.05$), but the IGFBP-3 levels in GH group and FU+GH group were still higher than that in NS group or FU group (all $P < 0.05$). The results of RT-PCR showed that the mRNA expressions of IGF-I and IGF-IR were obviously decreased but IGFBP-3 mRNA expression was markedly increased in tumor xenografts in either GH group or FU group or FU+GH group compared with NS group at 24 h after regimen discontinuation; at 72 h after regimen discontinuation, both IGF-I and IGF-IR mRNA expressions were similar among groups, but IGFBP-3 mRNA expressions in above three groups were still higher than that in NS group.

Conclusion: The alteration in GH/IGF/IGFBP axis resulting from short-term exogenous GH application exerts no growth-promoting effect on tumor xenograft of human colon cancer.

KEY WORDS

Colonic Neoplasms; Human Growth Hormone; Xenograft Model Antitumor Assays; Mice, Nude

CLC number: R735.35 **Document code:** A

DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.04.012

生长激素 (GH) 在机体内可通过组织细胞的 GH 受体直接起作用, 而大部分作用是通过 GH/胰岛素样生长因子 (IGF) / 胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP) 轴系统而发挥的。但给予外源性的 GH 是否会对荷瘤宿主的 GH/IGF/IGFBP 轴产生影响? 本实验通过建立人结肠癌 HCT116 裸鼠皮下移植瘤模型, 给予外源性 GH, 研究其对荷瘤裸鼠 GH/IGFs/IGFBP 轴的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验动物: Nu/Nu 裸鼠, 6 周龄, 体质量 16~22 g, 雌性, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [动物合格证: SCXK (京) 2002-0003]。实验动物在昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室无特殊病原体 (SPF) 级条件下标准饲养。细胞株: 人结肠癌细胞株 HCT116, 低分化腺癌, 购自于中国科学院上海细胞生物所

细胞库。重组人生长激素 (rhGH): 安徽安科生物工程 (集团) 股份有限公司。氟尿嘧啶 (FU) 注射液: 天津金耀氨基酸有限公司。生长激素 (GH) 酶联免疫试剂盒、胰岛素样生长因子 I (IGF-I) 酶联免疫试剂盒、胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP-3) 酶联免疫试剂盒: 美国 Immunodiagnostic Systems Limited (IDS Ltd) 产品, 晶美生物工程 (北京) 有限公司代理。

1.2 实 验 方 法

1.2.1 造 模 将人结肠癌细胞 HCT116 置于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 全培养液中, 37 ℃, 5%CO₂, 95% 空气的培养箱中培养。取对数生长期细胞, 调整细胞悬液浓度为 2×10^7 个/mL 用于裸鼠细胞接种, 以每只 0.2 mL 接种于 2 只裸鼠的右臀部皮下。接种后自由取食和饮水, 4~10 d 肿瘤全部形成。待裸鼠结肠癌移植瘤生长至长径约 1.5 cm 时, 处死裸鼠, 无菌取出移植瘤, 将瘤体切取成 2 mm × 2 mm × 2 mm 的组织块, 另取 2 只裸鼠用臀部皮下肿瘤组织包埋法行鼠间传代。

经2次鼠间传代后,将生长稳定的人结肠癌移植瘤按上述方法,分别接种于58只裸鼠臀部,建立裸鼠结肠癌移植瘤模型。术后裸鼠给予标准喂养,自由取食饮水。

1.2.2 实验分组 接种后12 d,选取瘤体生长良好的48只裸鼠,随机均分为生理盐水处理组(NS组)、氟尿嘧啶处理组(FU组)、GH处理组(GH组),FU+GH处理组(FU+GH组)。

1.2.3 给药方法 实验分组后当日给药,连续6 d,NS组:生理盐水0.2 mL/只,皮下注射,1次/d;FU组:每只FU 10 mg/kg,腹腔注射,1次/d;GH组:每只GH 2.0 IU/kg,皮下注射,1次/d;FU+GH组:每只FU 10 mg/kg,腹腔注射,1次/d;GH 2.0 IU/kg,皮下注射,1次/d。

1.3 检测指标及检测方法

1.3.1 血清GH, IGF-I, IGFBP-3含量 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)的方法。分别于给药后24, 72 h取裸鼠血检测血清GH, IGF-I及IGFBP-3的OD值。结果判定:在白色背景上,用肉眼直接观察结果,阳性程度越强,反应孔内颜色越深,阴性反应为无色或极浅色。用ELISA检测仪测各孔光密度值(OD),以OD值为测定单位。

1.3.2 IGF-I, IGF-IR, IGFBP-3的mRNA表达 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)的方法。分别于给药后24, 72 h处死裸鼠,取移植瘤进行RT-PCR,检测IGF-I, IGF-I受体(IGF-IR)和IGFBP-3的mRNA扩增产物(表1)。

表1 IGF-I, IGF-IR和IGFBP-3引物序列

基因	引物序列	退火温度 (°C)	产物大小 (bp)
IGF-I	ATT TCA ACA AGC CCA CAG TCC CTC	56	219
	TAC TTG CGT TCT		
IGF-IR	CCT ACA ACA TCA CCG ACC CGC	58	464
	CAC GAC CCA TTC CCA GA		
IGFBP-3	CCC TCT ACT TGC TCG ATT CAC GTG	54	240
	CCT ACC CAC CTC		
GAPDH	GGA GCC AAA CGG GTC ATC ATC	62	233
	TCG AGG GGC CAT CCA CAG TCT TCT		

1.4 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS11.5统计软件包进行单因素方差分析或秩和检验,检验标准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 给药结束后荷瘤裸鼠血清GH, IGF-I, IGFBP-3的OD值

给药结束后24 h, GH组和FU+GH组血清GH, IGF-I, IGFBP-3的含量较NS组和FU组明显升高(均 $P<0.05$)。给药结束后72 h, GH组和FU+GH组血清中GH, IGF-I的水平已下降,与NS组和FU组比较无统计学差异(均 $P>0.05$); IGFBP-3的血清水平在GH组和FU+GH组虽较给药后24 h有所下降,但仍高于NS组和FU组(均 $P<0.05$)(表2-4)。

表2 各组给药后结束后24, 72 h血清GH含量(OD值)
Table 2 The serum GH levels in each group at 24 and 72 h after regimen discontinuation (OD value)

组别	24 h	72 h
NS组	24.72 ± 0.67	24.77 ± 1.48
GH组	29.67 ± 1.18 ^{1,2)}	24.90 ± 1.09
FU组	24.78 ± 0.84	24.57 ± 1.60
FU+GH组	29.23 ± 0.98 ^{1,2)}	24.77 ± 0.83

注: 1) 与NS组比较, $P<0.05$; 2) 与FU组比较, $P<0.05$

1) $P<0.05$ vs. NS group; 2) $P<0.05$ vs. FU group

表3 各组给药后结束后24, 72 h血清IGF-I含量(OD值)
Table 3 The serum IGF-I levels in each group at 24 and 72 h after regimen discontinuation (OD value)

组别	24 h	72 h
NS组	1727.40 ± 69.23	1741.68 ± 83.30
GH组	1921.05 ± 96.09 ^{1,2)}	1809.62 ± 119.85
FU组	1735.33 ± 67.06	1744.83 ± 117.71
FU+GH组	1908.12 ± 67.66 ^{1,2)}	1800.37 ± 94.53

注: 1) 与NS组比较, $P<0.05$; 2) 与FU组比较, $P<0.05$

1) $P<0.05$ vs. NS group; 2) $P<0.05$ vs. FU group

表4 各组给药后结束后24, 72 h血清IGFBP-3含量(OD值)
Table 4 The serum IGFBP-3 levels in each group at 24 and 72 h after regimen discontinuation (OD value)

组别	24 h	72 h
NS组	0.59 ± 0.05	0.58 ± 0.06
GH组	1.15 ± 0.20 ^{1,2)}	0.81 ± 0.04 ^{1,2)}
FU组	0.60 ± 0.09	0.61 ± 0.05
FU+GH组	1.22 ± 0.21 ^{1,2)}	0.84 ± 0.06 ^{1,2)}

注: 1) 与NS组比较, $P<0.05$; 1) 与FU组比较, $P<0.05$

1) $P<0.05$ vs. NS group; 2) $P<0.05$ vs. FU group

2.2 给药后IGF-I, IGF-IR, IGFBP-3的mRNA表达水平

RT-PCR检测结果采用半定量分析。给药结束后24 h, NS, GH, FU, FU+GH组均可检

测到 IGF-I, IGF-IR, IGFBP-3 的 mRNA 扩增产物。IGF-I mRNA 表达水平: NS 组高于 GH, FU, FU+GH 组, 而 FU+GH 组又明显低于 GH, FU 组。IGF-IR mRNA 表达水平: FU+GH 组 IGF-IR mRNA 的表达水平较 NS, GH, FU 组明显降低。GH 组与 NS 组比较未见明显增加。IGFBP-3 的 mRNA 表达水平: NS 组明显表达减弱, 而 GH, FU, FU+GH 组的表达明显增加。给药结束后 72 h 各组移植瘤均表达 IGF-I, IGF-IR, IGFBP-3 mRNA 扩增产物。IGF-I 和 IGF-IR mRNA 表达水平: NS, GH, FU, FU+GH 组之间无差别, 均呈弱表达。IGFBP-3 的 mRNA 表达量: NS 组的表达水平较低, 而 GH, FU, FU+GH 组表达量明显增加, 其中 GH 组和 FU+GH 组尤为明显 (图 1-2)。

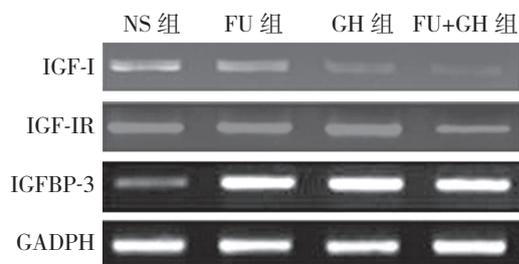


图 1 给药后 24 h 结肠癌组织 mRNA 的表达情况

Figure 1 The mRNA expressions detection at at 24 h after regimen discontinuation

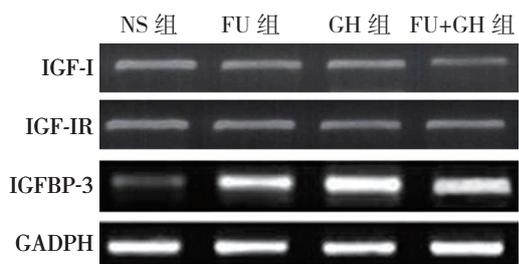


图 2 给药后 72 h 结肠癌组织 mRNA 的表达情况

Figure 2 The mRNA expressions detection at at 72 h after regimen discontinuation

3 讨论

国内外一些学者已将 rhGH 应用于肿瘤术后患者, 临床显示在给患者营养的同时加用 rhGH 可明显促进蛋白质合成和组织修复, 增强患者免疫力, 并能明显减少术后并发症。但 GH 是否存在促进恶性肿瘤细胞生长的危险是一个重要而又争议的问题, 笔者前期的研究也发现结直肠癌

组织中均有 GH 受体表达^[1-2]; GH 促进肿瘤细胞生长涉及多方面机制, 因此在肿瘤治疗中的作用和机制多年来也一直存在争议。

GH/IGF/IGFBP 轴对体细胞的作用较为明确, 并有许多证据表明该轴对肿瘤组织生长有促进作用。流行病学调查提示 GH/IGF/IGFBP 轴的改变及长期应用生长激素可能是肿瘤发生的因素。GH 的生物学效应绝大部分是通过 IGF-I 介导而发挥的, 循环中的 IGF-I 以 IGFBP 结合形式存在, 其中 IGFBP-3 是 IGF-I 的主要载体; 且 IGF-I 主要由肝脏分泌, 另外身体的其他组织细胞也能通过内分泌、旁分泌和自分泌 IGF-I, 作用于靶细胞促进细胞的增殖分化, 同时 IGF-I 也是通过与它的受体 IGF-IR 结合后发挥其大部分的细胞生物学效应, IGF-I 与受体结合后通过有丝分裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 途径和磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 途径促进细胞的增殖、存活及迁移, 并抑制细胞凋亡。IGFBP 通过与 IGF 竞争性结合 IGF, 以 IGF 依赖性和非依赖性方式抑制或促 IGF 的作用; IGF 活性的双重调控因素^[3]在恶性肿瘤的发生过程中具有重要作用。

IGF-I 作为一个重要的有丝分裂原, 具有多种生理功能的生长因子, 在机体内的主要作用是促进细胞的生长分化, 主要由 GH 调控, 同时介导 GH 的促生长作用, 与人体多种肿瘤的发生有一定的关系^[4]。

IGF-I 是较 GH 更为有效的亲肠因子^[3], 近年来大量研究及流行病学调查表明循环中 IGF-I 的水平与结肠癌等恶性肿瘤的发病风险相关^[4]。医学健康研究 (Physician Health Study, PHS) 的报道^[5]也指出, IGF-I 水平的增高使结肠癌等肿瘤的发病率提高了 2~4 倍, 并发现 IGF-I 水平的变化与一些肿瘤的联系似乎比部分已知的癌症高危因子更为密切。有证据表明过度的营养摄取有可能导致 IGF-I 增加肠癌和肠纤维变性的风险。血液中高水平的 IGF-I 可增加结肠癌的风险^[6]。结肠癌前病变如腺瘤的高发病率与循环中 IGF-I 的高水平密切相关, 提示 IGF 系统可能在组织转化和致癌作用的早期阶段发挥作用^[7]。Jenkins 等^[5]的研究结果显示结肠癌血清 IGF-I 水平明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), 提示高水平 IGF-I 是结肠癌发生、发展的重要作用因素之一。

IGFBP 是重要的自分泌或旁分泌生长调控因子, 在调控 IGF 活性中起着重要作用。IGFBP

不仅能转运 IGF 分子至其受体,而且也能与细胞表面黏附^[8]。IGFBP-3 是 IGF-I 的主要载体,维持血 IGF-I 水平稳定方面起重要作用,而当 IGFBP-3 过多时,即可抑制 IGF-I 的活性。

有研究^[9-11]显示血清中高浓度的 IGF 和/或低水平的 IGFBP 可增加结直肠癌的发病率。Lund 等^[12]在肠中发现有 IGFBP-3, IGFBP-4 和 IGFBP-5 的表达,并且它们可以调控局部 IGF-I 的生物作用和 IGF-I 与 IGF-IR 之间的相互作用。Schoen 等^[13]发现 IGF-I 血浆浓度、IGF-I/IGFBP-3 比值和胰岛素水平的升高使得结直肠腺瘤和进展期腺瘤的发生率升高到正常者的 2 倍,提示胰岛素和 IGF-I 增加了结直肠黏膜不典型增生的危险性。另一项研究^[14]也发现高水平的 IGF-I 和低水平的 IGFBP-3 与高危腺瘤,特别是腺瘤直径 ≥ 1 cm 或组织学为管状绒毛状腺瘤、绒毛状腺瘤及 3 个以上多发腺瘤明显相关,因而认为 IGF-I 和 IGFBP-3 水平关系到结直肠癌发生的风险,并可预测腺瘤的进展。Jenkins^[15]对 222 例患者重复进行结肠镜检查 and 血浆 IGF-I 水平检测,结果显示复发的结直肠腺瘤患者血浆 IGF-I 水平明显高于未复发者。

本研究显示短期应用外源性的 GH 后,荷瘤裸鼠血清中 GH, IGF-I 和 IGFBP-3 暂时性升高,但停药后可恢复至正常,不会在体内持续升高。在移植瘤中,应用 GH 后对结肠癌移植瘤的 IGF-I mRNA 和 IGF-IR mRNA 水平的表达没有明显影响,反而增加了 IGFBP-3 mRNA 水平的表达,与 FU 联合应用能明显降低结肠癌移植瘤的 IGF-I mRNA 和 IGF-IR mRNA 的表达水平,增加 IGFBP-3 mRNA 的表达水平。从 GH/IGF/IGFBP 轴角度部分提示短期应用 GH 对肿瘤组织生长无促进作用,与化疗药物联合应用可能刺激 IGFBP-3 的产生。

参考文献

- [1] 梁道明,陈嘉勇,廖庚进,等.生长激素受体在直肠癌组织中的表达[J].中国普通外科杂志,2009,18(4):414-416.
- [2] 周东,张毅,梁道明,等.生长激素受体靶向 siRNA 联合 5-FU 对人结肠癌肝转移的影响[J].中国普通外科杂志,2011,20(7):731-735.
- [3] Theiss AL, Fruchtmann S, Lund PK. Growth factors in inflammatory bowel disease: the actions and interactions of growth hormone and insulin-like

- growth factor-I[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2004, 10(6):871-880.
- [4] Ibrahim YH, Yee D. Insulin-like growth factor-I and cancer risk[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2004, 14(4):261-269.
- [5] Jenkins PJ, Bustin SA. Evidence for a link between IGF-I and cancer[J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151(Suppl 1):S17-22.
- [6] Soubry A, Il'yasova D, Sedjo R, et al. Increase in circulating levels of IGF-1 and IGF-1/IGFBP-3 molar ratio over a decade is associated with colorectal adenomatous polyps[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(2):512-517.
- [7] Giovannucci E, Pollak MN, Platz EA, et al. A prospective study of plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and risk of colorectal neoplasia in women[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000, 9(4):345-349.
- [8] Grimberg A, Cohen P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 183(1):1-9.
- [9] Probst-Hensch NM, Yuan JM, Stanczyk FZ, et al. IGF-I, IGF-2 and IGFBP-3 in prediagnostic serum: association with colorectal cancer in a cohort of Chinese men in Shanghai[J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(11):1695-1699.
- [10] Palmqvist R, Hallmans G, Rinaldi S, et al. Plasma insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3, and risk of colorectal cancer: a prospective study in northern Sweden[J]. *Gut*, 2002, 50(5):642-646.
- [11] Feik E, Baierl A, Hieger B, et al. Association of IGF1 and IGFBP3 polymorphisms with colorectal polyps and colorectal cancer risk[J]. *Cancer Causes Control*, 2010, 21(1):91-97.
- [12] Lund PK. IGFs and the digestive tract: the insulin-like growth factors system[A]. In: *The IGF System* [M]. Totowa, NJ: Humana Press, 1999, 517-544.
- [13] Schoen RE, Weissfeld JL, Kuller LH, et al. Insulin-like growth factor-I and insulin are associated with the presence and advancement of adenomatous polyps[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(2):464-475.
- [14] Renehan AG, Painter JE, Atkin WS, et al. High-risk colorectal adenomas and serum insulin-like growth factors [J]. *Br J Surg*, 2001, 88(1): 107-113.
- [15] Jenkins PJ. Acromegaly and colon cancer[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2000, 10 (Suppl A):S35-36.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:张毅,梁道明,李思齐,等.生长激素荷人结肠癌裸鼠 GH/IGF/IGFBP-3 轴的影响[J].中国普通外科杂志,2013,22(4):442-446. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.04.012
Cite this article as: ZHANG Y, LIANG DM, LI SQ et al. Impact of exogenous growth hormone on GH/IGF/IGFBP axis in colon cancer-bearing nude mice[J]. *Chin J Gen Surg*, 2013,22(4):442-446. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.04.012