

IGF-2 在结直肠癌组织中的表达及临床意义

金银 姜亦珍 桂琦

【摘要】目的 探讨胰岛素样生长因子 2(IGF-2)在结直肠癌组织中的表达及临床意义。**方法** 选取 79 例病理学检查确诊为结直肠癌的患者,获取其肿瘤组织标本,采用 qRT-PCR、免疫组化染色分别检测结直肠癌组织中 IGF-2 mRNA 及蛋白表达。**结果** 结直肠癌组织中 IGF-2 mRNA、蛋白表达与 TMN 分期有关,即分期越高,mRNA 及蛋白表达越强,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);结直肠癌组织中 IGF-2 mRNA、蛋白表达与患者年龄、性别、BMI、肿瘤部位均无关,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。**结论** IGF-2 可能参与结直肠癌的发生、发展。

【关键词】 结直肠癌 胰岛素样生长因子-2 基因 蛋白

Expression of IGF-2 in colorectal cancer and its clinical significance JIN Yin, JIANG Yizhen, GUI Qi. Department of Clinical Laboratory, Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China

【Abstract】Objective To explore the expression and clinical significance of insulin-like growth factor 2(IGF-2) in patients with colorectal cancer. **Methods** Seventy-nine patients with colorectal cancer admitted in Huzhou Central Hospital from January 2017 to May 2018 were recruited. The tumor tissue samples of colorectal cancer patients were obtained, and the expression of IGF-2 mRNA and protein in tumor tissues were detected by qRT-PCR and immunohistochemical staining, respectively. **Results** The expression of IGF-2 mRNA and protein in colorectal cancer was correlated with TMN staging(all $P < 0.05$), but not correlated with patients' age, gender, BMI and tumor site(all $P > 0.05$). **Conclusion** IGF-2 may be involved in the occurrence and development of colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal cancer Insulin-like growth factor-2 Gene Protein

结直肠癌是癌症相关死亡的第三大原因^[1]。而胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)与肿瘤发生、发展及转移的关系密切,近年来引起国内外广泛关注。目前有研究提到 IGF-2 可作为多种肿瘤的预后分子标志物^[2]。本文对 IGF-2 在结直肠癌组织中的表达及临床意义进行分析,现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取本院 2017 年 1 月至 2018 年 5 月确诊为结直肠癌的 79 例患者,其中男 50 例,女 29 例;年龄 33~81(64.36±8.95)岁;直肠癌 58 例,结肠癌 21 例;伴有淋巴结转移 30 例,伴有远处转移 13 例,无淋巴结及远处转移 36 例;TNM 分期: I 期 23 例, II 期 20 例, III

期 17 例, IV 期 19 例。入选标准:(1)经病理学检查确诊为结直肠癌;(2)未行手术、放化疗;(3)病理类型为腺癌。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤;(2)合并严重心肺疾病;(3)合并克罗恩病、溃疡性结肠炎等其他肠道疾病。本研究经医院医学伦理委员会审批通过,所有患者或其家属签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 组织标本获取 将术中获取的结直肠癌组织切成 0.5cm 左右的小块,置于-80℃冰箱保存。

1.2.2 结直肠癌组织中 IGF-2 mRNA 表达的检测 采用 qRT-PCR 法。将结直肠癌组织标本 56℃液化 1h,提取总 RNA;取 5μl 总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,以检测其完整性。逆转录按照 BIOMIGA 公司逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,-80℃保存备用。按照美国 BIOMIGA 公司的 SYBR Green I 说明书配制 qRT-PCR 反应体系,取 cDNA 进行 qRT-PCR。反应条件:95℃预变性 10min;95℃ 15s,60℃ 1min,共 40 个循环。每个样品设置 3 个复孔。以 GAPDH 作为内参基因,引物由上海生工生物

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.10.2019-78

作者单位:313000 湖州市中心医院检验科(金银、桂琦),肿瘤科(姜亦珍)

通信作者:金银,E-mail:190271503@qq.com

工程技术服务有限公司合成。GAPDH 引物：正向 5'-GAAAAGAAGGACCCAGAA-3', 反向 5'-TGCTGTGT-GTTGTGTGTGTC-3'。IGF-2 引物：正向 5'-CTTG-GACTTTGAGTCAAATTGG-3', 反向 5'-GGTCGTGCCAA TTACATTTCA-3'。2^{-ΔΔCt} 表示样品中目的基因相对表达量, 其中 ΔCt=样本 Ct 均值-内参 Ct 均值, ΔΔCt=ΔCt-(随机阴性对照样品 Ct 均值-该样品内参 Ct 均值)。

1.2.3 结直肠癌组织中 IGF-2 蛋白表达的检测 采用免疫组化染色法。对结直肠癌组织标本进行固定、浸泡、浸蜡、包埋、切片、脱蜡处理, 并将其浸泡于 3% 双氧水中 20min。PBS 冲洗组织切片 3 次以上(>15min), 再将 700ml 柠檬酸缓冲液(pH6.0)放入烧杯加热; 当柠檬酸缓冲液沸腾后, 将组织切片置入烧杯内; 15min 后将组织切片取出, 在常温下冷却 5min, PBS(pH 7.4)冲洗 3 次以上(>15 min)。对组织切片进行一抗处理, 并置于 4℃ 冰箱孵育; 第 2 天取出组织切片, PBS(pH 7.4)再次冲洗。对组织切片进行二抗处理, 然后常温孵育 10min, 使用 PBS(pH 7.4)进行冲洗。使用二氨基联苯胺显色溶液对组织切片进行显色处理, 再用清水进行冲洗; 用苏木精对组织切片进行衬染, 透明脱水树脂进行封固; 染色完成后, 在光学显微镜下观察组织切片。IGF-2 蛋白表达结果的判定^[9]: 染色强度无色为 0 分, 黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 阳性细胞所占比例 ≤1% 为 0 分, >1%~10% 为 1 分, >10%~50% 为 2 分, >50%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分; 染色强度分值与阳性细胞所占比例分值的乘积 <3 分为阴性, 3~4 分为弱阳性, 5 分为中等阳性, ≥6 分为强阳性。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两独立样本 *t* 检验或单因素方差分析; 等级资料的比较采用 Mann-Whitney *U* 检验或 Kruskal-Wallis *H* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌组织中 IGF-2 mRNA 表达与患者临床特征的关系 结直肠癌中 IGF-2 mRNA 表达与 TMN 分期有关, 即分期越高, mRNA 相对表达量越高, 差异有统计学意义(P<0.05); 结直肠癌中 IGF-2 mRNA 表达与患者年龄、性别、BMI、肿瘤部位均无关, 差异均无统计学意义(均 P>0.05), 见表 1。

2.2 结直肠癌组织中 IGF-2 蛋白表达与临床特征的关系 结直肠癌组织中 IGF-2 蛋白表达与 TMN 分期有关, 即分期越高, 蛋白表达越强, 差异有统计学意义(P<

表 1 结直肠癌组织中 IGF-2 mRNA 表达与患者临床特征的关系

临床特征	n	mRNA 相对表达量	t/F 值	P 值
年龄				
≥60 岁	60	3.13 ± 1.39		
<60 岁	19	3.25 ± 1.50	-0.32	>0.05
性别				
男	50	3.07 ± 1.46		
女	29	3.30 ± 1.33	-0.69	>0.05
BMI				
>21kg/m ²	48	3.04 ± 1.49		
21~18.5kg/m ²	29	3.22 ± 1.23	2.25	>0.05
>18.5kg/m ²	2	5.14 ± 0.01		
肿瘤部位				
结肠	21	3.64 ± 1.34		
直肠	58	2.98 ± 1.40	-1.86	>0.05
TNM 分期				
I 期	23	1.95 ± 0.69		
II 期	20	2.81 ± 0.84		
III 期	17	3.56 ± 1.23	26.65	<0.05
IV 期	19	4.63 ± 1.22		

0.05); 结直肠癌组织中 IGF-2 蛋白表达与患者年龄、性别、BMI、肿瘤部位均无关, 差异均无统计学意义(均 P>0.05), 见表 2。

表 2 结直肠癌组织中 IGF-2 蛋白表达与患者临床特征的关系(例)

临床特征	n	阴性	弱阳性	中等阳性	强阳性	u/H 值	P 值
年龄							
≥60 岁	60	8	22	17	13	0.14	>0.05
<60 岁	19	4	7	3	5		
性别							
男	50	8	21	9	12	0.27	>0.05
女	29	4	8	11	6		
BMI							
>21kg/m ²	48	9	18	10	11		
21~18.5kg/m ²	29	3	11	10	5	0.84	>0.05
>18.5kg/m ²	2	0	0	0	2		
肿瘤部位							
结肠	21	1	7	6	7	0.69	>0.05
直肠	58	11	22	14	11		
TNM 分期							
I 期	23	10	10	3	0		
II 期	20	0	15	3	2	2.37	<0.05
III 期	17	2	1	11	3		
IV 期	19	0	3	3	13		

3 讨论

目前关于结直肠癌的病因不明, 其相关危险因素有吸烟、饮酒、高脂肪低纤维饮食、加工红肉或酒精的微生物

物代谢物介导的肠道菌群改变等^[3-5]。结直肠癌是一种可能涉及到多个步骤、多个阶段及多个基因共同参与的细胞遗传学疾病;在细胞发生癌变过程中,逐渐发生基因突变和癌变^[6-7]。近年来研究发现,胰岛素、IGF 参与肿瘤的发生、发展和转移^[8-11]。IGF 是一类多肽激素,具有与胰岛素类似的功能和结构^[12]。IGF-2 是 IGF 家族中调节生长发育的多肽生长因子之一,在发育过程中通过表观遗传、转录和翻译机制微妙地控制其表达^[13]。它是一种 7.5KDa 的有丝分裂肽激素,主要由肝脏产生,也可自分泌或由旁分泌的组织分泌^[14];它也是胎儿发育的主要生长因子,其 mRNA 表达在肾、肝组织中均有下调,而通常在癌组织中过表达^[14]。

体外实验表明,IGF-2 mRNA 一般由乳腺癌成纤维细胞表达,外源性 IGF-2 可支持人乳腺癌细胞在无血清、无雌激素培养基中旺盛生长^[12]。原位杂交研究表明,在乳腺癌中 IGF-2 mRNA 完全由恶性肿瘤间质表达,与 IGF-2 蛋白染色密切相关^[12];该研究还表明,IGF-2 蛋白在大多数肿瘤的上皮和间质中表达,IGF-2 在乳腺癌中的表达与乳腺癌生长与分化的 2 个重要调控因子有关^[12]。IGF-2 过表达发生在多数肉瘤中,常伴 IGF-2 位点印迹丢失;约 50% 的子宫平滑肌瘤 IGF-2 高表达,对于肿瘤上皮间室 IGF-2 表达水平高于本研究队列中值的患者,其疾病进展或死亡风险约增加 1 倍^[15]。在上皮性卵巢癌和其他癌症中,胎儿 IGF-2 启动子的重新激活和 IGF-2 过表达与预后恶化有关^[15]。

本研究结果显示,不同年龄、性别、BMI、肿瘤部位的结直肠癌患者肿瘤组织中 IGF-2 mRNA 及蛋白表达比较,差异均无统计学意义;但是 TMN 分期越高,结直肠癌患者肿瘤组织中 IGF-2 mRNA 及蛋白表达越强。实验表明,IGF-1、IGF-1R、IGF-2R、IGF-2 的表达涉及某些肿瘤的分化和转移,提示分期越高,相对表达量越高。Liu 等^[16]研究表明,miRNA-30a 通过下调 IGF-1R 抑制结直肠癌转移。IGF-2 具有促进细胞有丝分裂、刺激细胞增殖及 DNA 复制和转录、刺激组织器官生长和分化等作用,IGF-2 的促细胞增殖作用不仅体现在正常细胞,也可以通过旁分泌或自分泌方式促进肿瘤细胞的增殖^[17]。张德芳^[18]研究表明,IGF-2 及 IGF 结合蛋白的表达可能与结肠癌患者的肿瘤分期、临床上常规肿瘤标志物存在一定的联系。高表达的 miR-483-5p 能通过上调 IGF-2 基因 p3 mRNA 转录,以促进肝癌细胞的发生、发展^[19]。

综上所述,本研究认为 IGF-2 可能参与结直肠癌的发生、发展,可为作为预测结直肠癌的一项参考指标。

4 参考文献

- [1] Aguirre-Portolés C, Fernández LP, Molina ARD. Precision Nutrition for Targeting Lipid Metabolism in Colorectal Cancer[J]. *Nutrients*, 2017,9(10):1076.DOI:10.3390/nu9101076.
- [2] Saad AA, El-Sikaily A, Kamel MA, et al. Relationship between Metal Pollution and Gene Expression of Insulin-like Growth Factor II [J]. *Health Pollut*, 2018,8(18):180608.DOI:10.5696/2156-9614-8.18.180608.
- [3] Svensson T, Yamaji T, Budhathoki S, et al. Alcohol consumption, genetic variants in the alcohol and folate metabolic pathways and colorectal cancer risk: the JPHC Study[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:36607. DOI:10.1038/srep36607.
- [4] Tuan J, Chen YX. Dietary and Lifestyle Factors Associated with Colorectal Cancer Risk and Interactions with Microbiota: Fiber, Red or Processed Meat and Alcoholic Drinks[J]. *Gastrointest Tumors*, 2016, 3(1):17-24.DOI:10.1159/000442831.
- [5] Yang C, Wang X, Huang CH, et al. Passive Smoking and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of Observational Studies[J]. *Asia Pac J Public Health*, 2016, 28(5):394-403.DOI:10.1177/1010539516650724.
- [6] Schuebel KE, Chen W, Cope L, et al. Comparing the DNA Methylome with Gene Mutations in Human Colorectal Cancer[J]. *Plos Genetics*, 2016,3(9):1709-1723. DOI:10.1371/journal.pgen.0030157.
- [7] Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2017, 35(10):1086-1095. DOI:10.1200/JCO.2016.71.0012.
- [8] 周阳贞, 曹庭家. 胰岛素样生长因子结合蛋白-2 与胰腺癌临床病理因素及诊疗价值分析[J]. *实用癌症杂志*, 2019, 34(1):42-45, 54. DOI:10.3969/j.issn.1001-5930.2019.01.011.
- [9] 吴永梅, 李文娟, 罗韶, 等. 胰岛素样生长因子和胰岛素抵抗指数测定在大肠癌癌前病变诊疗中的价值[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2018, 25(8):82-85.DOI:10.13455/j.cnki.cjcor.2018.08.21.
- [10] 徐昭宇. 膀胱癌患者血清 IGF-1、IGFBP-3 水平及其临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(23):105-109.DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2018.23.022.
- [11] 张娟, 曹婷婷. 食管癌患者血清血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子-1 表达及其与临床病理特征的关系[J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22(7):1152-1155.
- [12] Giani C, Campani D, Rasmussen A, et al. Insulin-like growth factor 2(IGF-2) immunohistochemistry in breast cancer: relationship with the most important morphological and biochemical prognostic parameters[J]. *International Journal of Biological Markers*, 2016, 17(2):90.DOI:10.1016/S0889-8588(01)00013-2.
- [13] Junguo C, Qingchun M, Haiyan H. The Roles of Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA-Binding Protein 2 in Cancer and Cancer Stem Cells[J]. *Stem Cells International*, 2018, 2018:1-15.

(下转第 1012 页)

和突触结构来影响神经系统的发育,从而导致运动、学习等功能障碍^[8-9],而对运动神经元生长发育的影响尚未见报道。研究发现,丙泊酚的神经毒性在啮齿类动物出生后 7~14d 最为敏感。而在神经干细胞的分化、迁移及增殖期间,丙泊酚是否能通过影响轴突的生长来影响神经元的发育尚未见报道,探讨这一问题具有重要意义。本研究表明,丙泊酚处理影响斑马鱼胚胎运动神经元发育,表现为运动神经元未分化细胞增多,轴突不能投射到相应的肌肉。在本研究中,斑马鱼胚胎暴露于 5 μ g/ml 的丙泊酚中,胚胎整体发育与 DMSO 组及空白对照组相比无统计学差异;5 μ g/ml 丙泊酚处理导致斑马鱼胚胎运动神经元发育畸形的比例明显增加($P<0.01$)。因此,5 μ g/ml 丙泊酚暴露对斑马鱼胚胎的整体发育影响与对照组相比无统计学差异,由于正常状况下也有少部分胚胎出现重度缺失和轻度缺失的情况,因此笔者推测丙泊酚的作用可能是延迟运动神经元突起的生长。

综上所述,斑马鱼胚胎早期暴露于丙泊酚会引起运动神经元发育的缺陷。这表明丙泊酚作为常用的婴幼儿临床手术麻醉药是存在影响婴幼儿神经系统发育风险的。但运动神经元的发育是一个复杂且精密的过程,丙泊酚影响运动神经元发育的机制还有待深入的探索。

4 参考文献

- [1] Sprung J, Flick RP, Katusic SK, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder after early exposure to procedures requiring general anesthesia[J]. Mayo Clinic proceedings, 2012, 87:120-129. DOI: 10.1016/j.mayocp.2011.11.008.
- [2] Ing C, DiMaggio C, Whitehouse A, et al. Long-term differences in language and cognitive function after childhood exposure to anesthesia[J]. Pediatrics, 2012, 130:476-485, DOI:10.1542/peds.2011-3822.
- [3] Gong J, Wang X, Zhu C. Insm1a Regulates Motor Neuron Development in Zebrafish[J]. Frontiers in molecular neuroscience, 2017, 10:274. DOI:10.3389/fnmol.2017.00274.
- [4] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496:498-503. DOI:10.1038/nature12111.
- [5] Sprague J, Doerry E, Douglas S, et al. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research[J]. Nucleic acids research, 2001, 29:87-90.
- [6] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel S, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 1995, 203:253-310. DOI:10.1002/aja.1002030302.
- [7] Marsh B, White M, Morton N, et al. Pharmacokinetic model driven infusion of propofol in children[J]. Br J Anaesth, 1991, 67:41-48.
- [8] Creeley C, Dikranian K, Dissen G, et al. Propofol-induced apoptosis of neurones and oligodendrocytes in fetal and neonatal rhesus macaque brain[J]. Br J Anaesth, 2013, 110(Suppl 1): 29-38. DOI:10.1093/bja/aet173.
- [9] Yu D, Jiang Y, Gao J, et al. Repeated exposure to propofol potentiates neuroapoptosis and long-term behavioral deficits in neonatal rats[J]. Neuroscience letters, 2013, 534:41-46. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.033.
- (收稿日期:2018-09-28)
(本文编辑:严玮雯)
- (上接第 1009 页)
DOI:10.1155/2018/4217259.
- [14] Li T, Wang J, Liu P, et al. Insulin-like growth factor 2 axis supports the serum-independent growth of malignant rhabdoid tumor and is activated by microenvironment stress[J]. Oncotarget, 2017, 8(29):47269-47283. DOI:10.18632/oncotarget.17617.
- [15] Van Arsdale R, Arend RC, Cossio MJ, et al. Insulin-like growth factor 2: a poor prognostic biomarker linked to racial disparity in women with uterine carcinosarcoma[J]. Cancer Medicine, 2018, 7(3):616-625. DOI:10.1002/cam4.1335.
- [16] Liu YC, Park YR, Kim SL, et al. MicroRNA-30a Inhibits Colorectal Cancer Metastasis Through Down-Regulation of Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor[J]. Digestive Diseases & Sciences, 2017, 62(11):1-10. DOI:10.1007/s10620-017-4763-z.
- [17] 吴卓群, 马宏生, 吉亚楠. IGF-2 促进上皮性卵巢癌侵袭转移作用机制的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2017, 49(11):1297-1300. DOI: 10.16096/J.cnki.nmgjxzz.2017.49.11.007.
- [18] 张德芳. IGF-2 及 IGFBP-2 与结肠癌进展的相关性分析[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(8):74-76.
- [19] 马彦, 朱翠萍, 胡建军, 等. MiR-483-5p 通过上调 IGF-2 基因转录促进肝癌细胞生长、迁移与侵袭[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(4): 577-584. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2018.04.001.
- (收稿日期:2019-03-15)
(本文编辑:陈丹)