

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.036.html>

胶质瘤中 IGF-1 和 IGFBP-3 的表达及临床意义研究

叶 昀^{1,2}, 牛朝诗¹, 杨 洋¹, 李冬雪¹, 鲍得俊¹, 范 振¹

摘要 目的 检测胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 和胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (IGFBP-3) 在胶质瘤患者术前、术后外周血清中的含量及变化和胶质瘤组织局部的表达情况, 探讨发生发展的关系及其在辅助诊断、危险性预测和治疗中的临床意义。方法 运用化学发光法检测胶质瘤组和对照组患者术前、术后外周血清中 IGF-1、IGFBP-3 的水平; 正常脑组织(颅脑损伤手术时的脑组织) 和肿瘤组织行 IGF-1、IGFBP-3 免疫组化染色检查, 显微镜下观察免疫组化染色结果。结果 对照组血清中 IGF-1 及 IGFBP-3 术前及术后无明显变化, 差异无统计学意义; 而胶质瘤患者血清中 IGF-1 及 IGFBP-3 表达水平在术后较术前均明显下降 ($P < 0.05$)。无论术前术后, IGF-1 和 IGFBP-3 在不同级别胶质瘤患者的血清学表达与级别无显著相关性。胶质瘤组织中, IGF-1 表达水平显著提高 ($P < 0.05$), IGFBP-3 在胶质瘤中的表达亦高于对照组 ($P < 0.05$)。胶质瘤级别越高, 胶质瘤组织中 IGF-1 和 IGFBP-3 的表达越高, 与病理级别呈正相关 ($P < 0.01$)。结论 IGF-1 和 IGFBP-3 可能在促进胶质瘤的发生、发展有重要作用, 检测其水平变化对胶质瘤的诊断、判断预后具有重要意义。

关键词 胶质瘤; 胰岛素样生长因子-1; 胰岛素样生长因子结合蛋白-3

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0231-04

胶质瘤, 尤其是胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM), 目前仍然是死亡率最高的恶性肿瘤之一。GBM 的外科手术治疗、影像学诊断以及放疗化疗已取得一定的进展。但是, 由于胶质瘤有高度侵袭性, 手术治疗往往无法完全切除, 而且手术复发率高, 尤其是 GBM 患者仍预后极差^[1]。胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 是一类

多肽, 可参与脊椎动物细胞增殖分化、组织修复及生长发育, 有胰岛素样合成代谢作用, 包括 IGF-1、IGF-2 及其受体 IGF-1R、IGF-2R, 以及 6 种高结合蛋白 (IGFBPs) 和 IGFBP 蛋白酶。在胚胎期和胎儿期 IGF-2 发挥, 但在出生后, 其作用被 IGF-1 替代^[2]。IGFBPs 作为 IGF-1 在循环系统中的载体, 可以决定 IGFs 的生物利用度, IGFBP-3 在 IGFBPs 中占有主要作用。研究^[3]显示, IGF-1 血清学表达水平高的人群, 患恶性肿瘤的风险要远高于 IGF 低表达人群。在胶质瘤方面, IGF-1 和 IGFBP-3 的相关研究还较少。该研究通过分析 60 例各级别胶质瘤患者 IGF-1 和 IGFBP-3 的血清学表达、肿瘤组织中蛋白水平表达及其与病理级别的相关性, 探讨 IGF-1 和 IGFBP-3 作为胶质瘤预后指标的可能性, 也为进一步研究胶质瘤的分子靶向治疗提供了一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 IGF-1 测定试剂盒及 IGFBP-3 测定试剂盒均购于西门子医学诊断产品(上海)有限公司; IGF-1 兔抗人单克隆抗体 (bs-4588R)、IGFBP-3 抗体 (bs-1434R) 购于北京博奥森生物技术有限公司; 兔二步法检测试剂盒 (PV-6001) 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 病例资料 选取安徽医科大学附属省立医院神经外科 2014 年 5 月~2015 年 5 月间行手术切除的胶质瘤患者血液标本和肿瘤组织标本, 术后经病理检查确诊。其中女 26 例, 男 34 例; 年龄 6~63 岁, 中位年龄 36 岁。胶质瘤患者均为初发病例, 术前未进行任何抗肿瘤治疗。根据 WHO 2007 中枢神经系统肿瘤分类标准进行组织学分类及分级: I 级 6 例, II 级 9 例, III 级 15 例, IV 级 30 例。15 例正常血液标本取自三叉神经痛、面肌痉挛患者, 经检查排除恶性肿瘤、恶病质等疾病, 血液标本的采集均经过患者本人同意并签署知情同意书。6 例正常脑组织标本取自颅脑损伤行内减压术的患者, 术后病理检查为正常脑组织, 因入院时患者已昏迷, 由其法定代理人签署知情同意书, 并通过医院伦理委员会的批准。

2015-11-17 接收

基金项目: 安徽省重点实验室绩效考核补助项目 (编号: 1306c083028)

作者单位: ¹安徽医科大学附属省立医院神经外科、脑功能与脑疾病安徽省重点实验室、安徽省脑立体定向神经外科研究所, 合肥 230001

²舒城县人民医院神经外科, 舒城 231300

作者简介: 叶 昀, 男, 硕士研究生;

牛朝诗, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: niuchaoshi@163.com

1.3 方法

1.3.1 血清采集及检测 选取无菌干燥管,于清晨空腹抽取患者静脉血 4 ml,迅速置于冷冻离心机上,4 °C ,1 500 r/min 离心 10 min。然后选取上清液置于冰箱(-25 °C)冷冻保藏待检查。若血液标本溶血则需重新采血离心处理。按化学发光免疫分析法步骤测定 IGF-1、IGFBP-3 血清学中的含量。

1.3.2 标本取材和制备 60 例胶质瘤患者标本及 6 例正常脑组织标本均浸泡在甲醛液中,并立即包埋石蜡块,室温下保存待常规 HE 切片染色及免疫组化染色检查。

1.3.3 免疫组化染色 取胶质瘤和正常脑组织组织标本,常规石蜡切片,烤箱 70 °C 脱蜡 2 h 后,酒精梯度水化,置于柠檬酸中高温高压修复,分别加入 IGF-1 和 IGFBP-3 单克隆抗体 4 °C 过夜。第二天取出,加入二抗室温孵育 20 min,甩干,加入 DBA 显色、复染、脱水、封片、光镜下观察,以 PBS 代替一抗作用性对照,已知阳性切片作阳性对照。IGF-1 及 IGFBP-3 免疫组化结果判断标准:IGF-1 以胞质染色为棕褐色颗粒者为阳性反应细胞,IGFBP-3 以细胞核、胞质和(或)包膜内染色为棕褐色颗粒者为阳性反应细胞,400 倍显微镜下,每张玻片计数 500 个细胞,依据染色阳性细胞所占总细胞的百分比及染色强弱分类:① -:标本中无阳性反应细胞或阳性反应细胞 < 10%,染色淡;② +:阳性反应细胞占 10% ~ 25%,染色淡;③ ++:阳性反应细胞占 26% ~ 50%,染色清晰;④ +++:阳性反应细胞 > 50%,染色强。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,定量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验、单因素方差分析进行组间差异比较,定性资料采用秩和检验统计分析,等级资料两变量相关性采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 术前术后胶质瘤血清中 IGF-1 和 IGFBP-3 的表达 对照组血清中 IGF-1 及 IGFBP-3 术前及术后无明显变化,差异无统计学意义;而胶质瘤患者血清中 IGF-1 及 IGFBP-3 表达水平在术后较术前均明显下降,差异有统计学意义($t = 19.71, 17.61, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 血清中 IGF-1 和 IGFBP-3 术前术后的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	IGF-1		IGFBP-3	
	术前	术后	术前	术后
胶质瘤	184.30 ± 55.86	83.07 ± 26.40*	5.39 ± 1.13	3.19 ± 0.80*
对照	98.63 ± 22.41	97.53 ± 23.30	3.30 ± 0.95	3.33 ± 0.96

与同组术前比较: * $P < 0.05$

2.2 IGF-1 血清学表达水平与胶质瘤级别的相关性研究 无论术前术后,IGF-1 和 IGFBP-3 在不同级别胶质瘤患者的血清学表达与级别无显著相关性。见表 2。

2.3 胶质瘤组织中 IGF-1 和 IGFBP-3 的表达 与对照组相比,胶质瘤组织中 IGF-1 表达水平显著提高,差异有统计学差异($Z = -2.37, P < 0.05$)。IGFBP-3 在胶质瘤中的表达亦高于对照组($Z = -2.37, P < 0.05$)。见表 3、图 1。

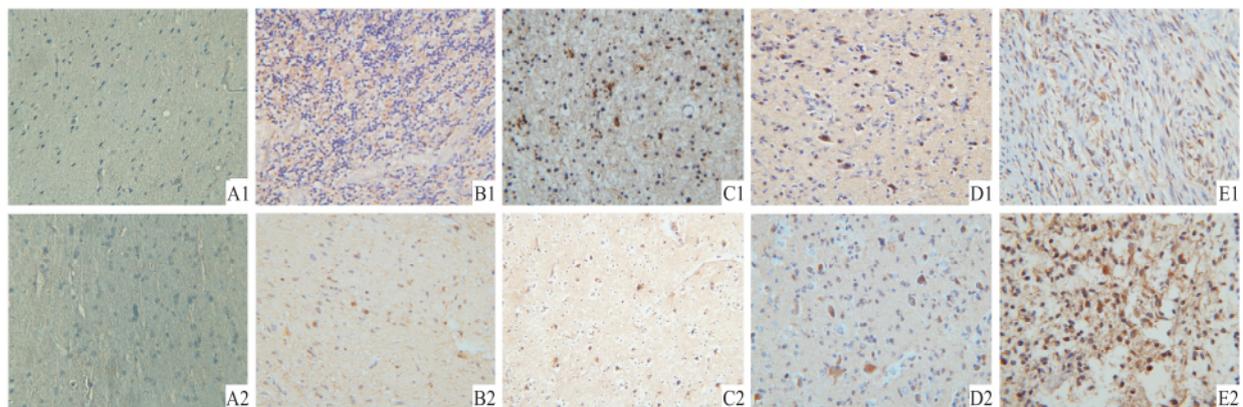


图 1 IGF-1、IGFBP-3 在正常脑组织和各级别胶质瘤组织中的表达免疫组化 ×400

1: IGF-1; 2: IGFBP-3; A: 正常脑组织中表达(-); B: 星形细胞瘤 I 级组织中表达(+); C: 星形细胞瘤 II 级组织中表达(++); D: 星形细胞瘤 III 级组织中表达(+++); E: 星形细胞瘤 IV 级组织中表达(++++)

表2 各级别胶质瘤血清中 IGF-1 和 IGFBP-3 术前术后的表达($\bar{x} \pm s$)

项目	I 级	II 级	III 级	IV 级	F 值	P 值
IGF-1(mg/L)						
术前	186.42 ± 57.12	189.47 ± 72.78	185.10 ± 58.22	181.93 ± 51.69	0.045	0.987
术后	85.28 ± 35.15	87.82 ± 20.20	81.22 ± 14.81	82.11 ± 31.22	0.143	0.934
IGFBP-3(μg/L)						
术前	5.02 ± 0.45	5.16 ± 1.20	5.45 ± 1.23	5.50 ± 1.17	0.438	0.727
术后	3.22 ± 0.36	3.26 ± 0.74	3.31 ± 0.81	3.11 ± 0.90	0.226	0.878

表3 IGF-1 及 IGFBP-3 在对照组和胶质瘤组组织中表达水平比较

组别	IGF-1 表达				阳性率	IGFBP-3 表达				阳性率
	-	+	++	+++		-	+	++	+++	
对照	6	0	0	0	0.000	6	0	0	0	0.000
胶质瘤	24	11	12	13	0.600	22	11	13	14	0.633

2.4 各级别胶质瘤组织中 IGF-1 和 IGFBP-3 的表达 胶质瘤级别越高,胶质瘤组织中 IGF-1 和 IGFBP-3 的表达水平越高,与病理级别呈正相关($r_s = 0.74, 0.68 P < 0.01$)。见表4。

表4 不同级别胶质瘤组组织中 IGF-1 及 IGFBP-3 表达水平的比较

星形细胞 胶质瘤	IGF-1 表达				阳性率	IGFBP-3 表达				阳性率
	-	+	++	+++		-	+	++	+++	
I 级	5	1	0	0	0.167	5	1	0	0	0.167
II 级	6	1	2	0	0.333	6	2	1	0	0.333
III 级	7	3	3	2	0.533	6	3	4	2	0.600
IV 级	6	6	7	11	0.800	5	5	8	12	0.833

3 讨论

大脑的形成和发展有许多特定环节,包括神经胚形成、神经发生、分化为神经元细胞和神经胶质细胞、迁移、树突和轴突生长、突触发生和髓鞘形成等,IGF-1 几乎在每个阶段都发挥着重要作用^[3-4]。研究^[5]显示,在人类肿瘤发生中,IGF-1 过度增多可发挥“致瘤”作用,可促进增殖及侵袭性,并有抗凋亡作用,主要通过 PI3K-AKT-mTOR 实现抗凋亡作用,而通过上调促血管生成因子完成促血管生成作用。目前研究表明,肺癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤的发病率与循环中 IGF-1 水平异常升高呈明显正相关。

目前国内外关于胶质瘤与 IGF-1 相关性的大样本报道较少,本研究表明 IGF-1 胶质瘤中高表达,在 III、IV 级胶质瘤中的表达显著高于 I、II 级胶质瘤,提示 IGF-1 作为癌基因可能参与胶质瘤的发生发展,IGF-1 血清学检测可能作为胶质瘤筛查指标,为

胶质瘤的临床诊断提供参考。

IGFBPs 家族包括 6 个成员(IGFBP1 ~ 6),通过结合并调控 IGFs 而发挥作用。研究^[6]报道,IGFBP-3 在许多肿瘤中发挥重要作用,GBM 血清学检测高表达 IGFBP-3 的胶质瘤手术患者生存期更长。miRNA 可参与调节 mRNA 的稳定性,影响 mRNA 翻译,为一类非编码小 RNA。近年来,人们越来越重视 miRNA 在肿瘤发生发展中起到的作用^[7-11]。miR-21 是胶质瘤重要的致癌基因,可靶向作用于转化因子 β、p53 以及线粒体凋亡肿瘤抑制通路中的多个组分,抑制胶质瘤细胞凋亡,增强胶质瘤细胞的侵袭和增殖能力^[11-12]。

研究^[1]显示,IGFBP-3 高表达可抑制 GBM 细胞增殖,并且提示预后更佳。而 IGFBP-3 正是 miR-21 的靶基因,通过对 GBM 细胞系的研究表明,miR-21 通过靶向抑制 IGFBP-3 表达,促进胶质瘤细胞的增殖、侵袭及致瘤性。一旦敲减 GBM 细胞中的 miR-21,则 IGFBP-3 表达升高,GBM 细胞的致瘤性受到抑制。提示 IGFBP-3 可能作为抑癌基因发挥作用。本研究显示 IGF-1 及 IGFBP-3 在胶质瘤患者手术前后的血清学检测存在差异,术后均显著下降;继续通过免疫组化,表明在胶质瘤组织中,IGF-1 及 IGFBP-3 均高表达,并且与病理级别呈正相关。

IGF-1 有作为胶质瘤治疗靶点的可能性,但 IGFBP-3 的抑癌作用及相关机制尚未完全清楚。进一步研究 IGF 家族的内在关系,尤其是 IGFBP-3 及 IGF-1 的对胶质瘤细胞发生发展的影响,可能对胶质瘤的基因靶向治疗提供新的思路。

参考文献

[1] Yang C H, Yue J, Pfeffer S R, et al. MicroRNA-21 promotes glioblastoma tumorigenesis by down-regulating insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP3) [J]. J Biol Chem, 2014, 289(36): 25079-87.
 [2] Moschos S J, Mantzoros C S. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications[J]. On-

- cology, 2002, 63(4): 317–32.
- [3] Sun L Y, D'Ercole A J. Insulin-like growth factor-1 stimulates histone H3 and H4 acetylation in the brain *in vivo* [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(11): 5480–90.
- [4] Lehtinen M K, Zappaterra M W, Chen X, et al. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells [J]. *Neuron* 2011, 69(5): 893–905.
- [5] Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-1 receptor autocrine loop in human pancreatic cancer [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(3): 1001–11.
- [6] Elstner A, Stockhammer F, Nguyen-Dobinsky T N, et al. Identification of diagnostic serum protein profiles of glioblastoma patients [J]. *J Neuro Oncol*, 2011, 102(1): 71–80.
- [7] Niu C S, Yang Y, Cheng C D. MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression [J]. *Int J Oncol* 2013, 42(5): 1533–40.
- [8] Wang R J, Li J W, Bao B H, et al. MicroRNA-873 (miRNA-873) inhibits glioblastoma tumorigenesis and metastasis by suppressing the expression of IGF2BP1 [J]. *J Biol Chem* 2015, 290(14): 8938–48.
- [9] Cancer Genome Atlas Research Network Brat D J, Verhaak R G, et al. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse low-grade gliomas [J]. *N Engl J Med* 2015, 372(26): 2481–98.
- [10] Cabrini G, Fabbri E, Lo Nigro C, et al. Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review) [J]. *Int J Oncol* 2015, 47(2): 417–28.
- [11] Costa P M, Cardoso A L, Custódia C, et al. MiRNA-21 silencing mediated by tumor-targeted nanoparticles combined with sunitinib: A new multimodal gene therapy approach for glioblastoma [J]. *J Control Release*, 2015, 207: 31–9.
- [12] Lin Y L, Han Z B, Xiong F Y, et al. Malignant transformation of 293 cells induced by ectopic expression of human Nanog [J]. *Mol Cell Biochem* 2011, 351(1–2): 109–16.

Research of expression and clinical significance of IGF-1 and IGFBP-3 in glioma

Ye Yun^{1,2}, Niu Chaoshi¹, Yang Yang¹, et al

(¹Dept of Neurosurgery Anhui Province Key Laboratory of Brain Function and Brain Disease, Anhui Provincial Stereotactic Neurosurgical Institute, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001; ²Dept of Neurosurgery, People's Hospital of Shuchen, Shuchen 231300)

Abstract Objective To explore the exact roles of IGF-1 and IGFBP-3 in the development of glioma and analyze their clinical significance in auxiliary diagnosis, risk prediction and therapy. **Methods** Chemiluminescence method was used to detect the contents and their change of IGF-1 and IGFBP-3 in serum of glioma group and control group pre and post operation. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of IGF-1 and IGFBP-3 in glioma tissues and normal brain tissues. **Results** Compared to pre operation, the post operation contents of IGF-1 and IGFBP-3 in glioma group significantly decreased ($P < 0.05$), while the data of the control group had no obvious difference. No matter pre or post operation, the expressions of IGF-1 and IGFBP-3 in serum were irrelevant to the pathologic gradation of glioma. The expressions of IGF-1 and IGFBP-3 significantly increased ($P < 0.05$) and were positively correlated with the pathologic gradation ($P < 0.01$). **Conclusion** IGF-1 and IGFBP-3 might promote the development of glioma and detect the contents and their changes have important value in the diagnosis and prognosis.

Key words glioma; insulin-like growth factor-1; insulin-like growth factor binding protein-3