

肝细胞癌中胰岛素样生长因子1受体的表达及意义*

余梦懿¹, 成元华^{1**}, 申九妹², 孙博³

(1. 贵州医科大学 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 厦门市中医院 病理科, 福建 厦门 361009; 3. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)在肝细胞癌(HCC)中的表达及意义。方法: 采用免疫组织化学 EnVision 两步法检测 HCC 病例癌组织及配对癌旁组织中 IGF-1R 的蛋白表达, 分析 IGF-1R 表达水平与 HCC 患者临床病理特征及微血管密度(MVD)的关系, 同时随访观察不同 IGF-1R 表达水平或 MVD 计数 HCC 患者的复发、转移及死亡率。结果: HCC 癌组织中 IGF-1R 蛋白表达水平高于癌旁组织, 差异有统计学意义($P < 0.05$); IGF-1R 高表达的 HCC 中, 有血管浸润、病理分级 III ~ IV 级、临床 TNM II ~ III 期患者人数多于 IGF-1R 低表达人数($P < 0.05$); 癌组织中 MVD 值明显高于癌旁组织, 差异有统计学意义($P < 0.001$); 经 Spearman 等级相关分析显示 IGF-1R 蛋白表达水平与 MVD 计数呈正相关, IGF-1R 高表达及 MVD 计数较高的 HCC 患者复发、转移及死亡率也较高($P < 0.05$)。结论: IGF-1R 可促进 HCC 的复发、转移, 与促进肿瘤血管新生有关。

[关键词] 癌, 肝细胞; 胰岛素样生长因子1受体; 免疫组织化学; 微血管密度; 基因表达

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)02-0150-05

The Significance of Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Expression in Hepatocellular Carcinoma

YU Mengyi¹, CHENG Yuanhua¹, SHEN Jiumei², SUN Bo³

(1. Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Pathology, Traditional Chinese Medicine Hospital, Xiamen 361009, Fujian, China; 3. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) and the relationship between IGF-1R and the clinicopathologic features in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** Immunohistochemical Envision method was utilized to detect the expression of IGF-1R. MVD was marked by antibody CD34 and counted. The follow-up data of the cases of HCC was analyzed by Kaplan-Merier method for survival with log-rank test. **Result:** (1) The IGF-1R protein showed a higher expression in HCC than in the tumor-adjacent tissues, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). (2) The difference of the number of IGF-1R protein overexpression in histological grade and TNM stage was significant ($P < 0.05$), moreover, the vascular infiltration group was significantly more than group without vascular invasion ($P < 0.05$). But there was no significant difference between different tumor size, different gender, age, alcohol intake history, HBsAg, AFP, tumor number and with or without liver cirrhosis ($P > 0.05$). (3) The value of MVD was higher in HCC than that in tumor-adjacent tissues ($P < 0.05$). (4) By Spearman rank correlation analysis, the level of MVD was positively correlated with IGF-1R protein expression. (5) By survival analysis of the 38 cases of HCC with follow-up data, the difference in terms of the rate of recurrence, metastasis and survival rate between the group of the high and low expression of IGF-1R protein was significant ($P < 0.05$).

* [基金项目] 贵州省科学技术基金[黔科合 J 字 KLG(2013)27 号]; 贵州省科技计划项目[黔科合 SY 字(2011)3062 号]; 贵州省科学技术基金[黔科合 J 字(2009)2187 号]; 贵阳市科学技术计划项目[(2009)筑科农合同字第 3-020 号]

** 通信作者 E-mail: chengyuanhua@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2016-02-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160223.1833.004.html>

Conclusion: IGF-1R protein may promote the occurrence and development of HCC, and promote the neovascularization in HCC. The expression of IGF-1R can be used as a marker to evaluate the prognosis of HCC.

[Key words] carcinoma, hepatocellular; insulin-like growth factor 1 receptor; immunohistochemistry; vessel density; gene expression

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种常见的恶性肿瘤,全球每年新发病例约 748 300 例,死亡 695 900 例,我国发病和死亡患者数量约占全球 50%^[1-2]。有研究发现,HCC 发生的分子机制与胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGFs) 系统信号通路异常相关^[3]。IGFs 是一种多功能细胞增殖调控因子,在胚胎发育、中枢神经系统发育及肿瘤细胞增殖等方面具有重要的生物学功能。胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R) 在多种肿瘤中呈高表达,与肿瘤的发生、发展、侵袭和转移密切相关^[4]。本研究应用免疫组化染色法检测 51 例 HCC 患者癌组织及癌旁组织中 IGF-1R 蛋白表达情况并计数两组中的微血管密度 (microvessel density, MVD),探讨 IGF-1R 的表达与 HCC 临床病理特征之间的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

51 例 HCC 病例癌组织及相应的癌旁组织为厦门市中医院病理科 2011 年 6 月~2013 年 8 月的石蜡包埋标本,所有切片均由两位高年资病理医师复查诊断;癌旁组织取自距肿瘤边缘 2 cm 处的肝组织。采用国际抗癌联盟 (UICC) 第六版制定的 TNM 分期标准, I 期 9 例、II 期 13 例、III 期 29 例及 IV 期 0 例。病理分级根据经典的 Edmondson-Steiner's 分级系统, I 级 6 例、II 级 25 例、III 级 18 例和 IV 级 2 例。

1.2 方法

所有标本均经 4% 中性甲醛固定,石蜡包埋,4 μm 厚切片,HE 染色。免疫组织化学染色采用 EnVision 两步法,一抗包括 IGF-1R (美国 Ventana 公司,克隆号 G11,即用型)、CD34 (福州迈新生物技术开发有限公司,克隆号 QBEnd/10,即用型,用于标记微血管),每次实验均设立相应的阳性对照,PBS 液代替一抗作为空白对照。实验步骤按试剂盒说明书进行。

1.3 观察指标

观察 51 例 HCC 癌组织及癌旁组织 IGF-1R 阳性细胞、计数 MVD 值并随访。IGF-1R 定位于细胞质,为棕黄色颗粒。每张切片于显微镜下随机观察 10 个高倍视野,计算阳性细胞的百分率,取其平均值。根据阳性细胞占视野细胞总数的百分率及其染色强度综合评分进行判断。(1) 阳性细胞 < 5% 记 0 分,5 ~ 25% 记 1 分,26 ~ 50% 记 2 分, > 50% 记 3 分。(2) 按细胞染色强弱:不着色记 0 分,黄色记 1 分,棕黄色记 2 分,黄褐色记 3 分。两种评分相加,0 ~ 1 分为阴性,2 分为弱阳性,3 ~ 4 分为阳性,5 ~ 6 分为强阳性。2 分以上视为阳性表达,2 ~ 4 分归为低表达,5 ~ 6 分归为高表达^[5]。MVD 用抗体 CD34 标记的血管内皮细胞参照参考文献[6]进行计数,在光镜低倍视野下扫视整张切片寻找 3 个染色阳性的血管高密度集中的区域作为“热点”,然后在光镜 200 倍视野下计数微血管的数目,平均值即为该病例的 MVD 值。全部病例 MVD 值均以中位数分为低计数组与高计数组。并对患者的复发、转移及生存率进行随访,平均随访时间 29 个月。

1.4 统计学分析

数据应用 SPSS19.0 软件分析处理。计量资料采用 *t* 检验,分类资料进行 χ^2 检验,等级相关分析采用 Spearman 等级相关分析,单因素生存分析采用 Kaplan-Meier 法,差异的显著性采用 log-rank 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF-1R 蛋白表达

在 51 例 HCC 中,癌组织 IGF-1R 蛋白高表达 34 例,低表达 17 例;在癌旁组织中 IGF-1R 蛋白高表达 20 例,低表达 31 例。IGF-1R 高表达率在癌组织 (34/51, 66.7%) 较癌旁组织 (20/51, 39.2%) 高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 1A、B; IGF-1R 蛋白表达在有无血管浸润、病理学分级及 TNM 分期组间比较,差异有统计学意义 (P

<0.05);而在不同年龄、性别、饮酒史、HBsAg、AFP、肿瘤数目、肿瘤大小及是否合并肝硬化组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$);见表1。

表1 HCC 中 IGF-1R 蛋白表达与临床病理特征的关系

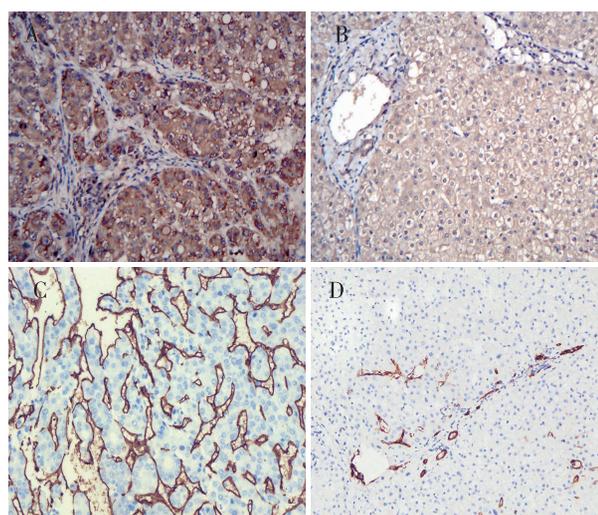
Tab.1 The correlation between the expression of IGF-1R protein and the clinicopathologic features in HCC

临床指标	n	IGF-1R 表达(n)		P
		低	高	
年龄(岁)				
≤48	27	10	17	0.554
>48	24	7	17	
性别				
男	45	15	30	0.647
女	6	2	4	
饮酒史				
有	28	8	20	0.427
无	23	9	14	
HBsAg				
+	46	16	30	0.862
-	5	1	4	
AFP(μg/L)				
≤7.02	10	4	6	0.888
>7.02	41	13	28	
肝硬化				
有	31	13	18	0.105
无	20	4	16	
肿瘤直径(cm)				
≤5	45	13	32	0.167
>5	6	4	2	
肿瘤数目				
单个	45	16	29	0.647
多个	6	1	5	
血管浸润				
有	29	4	25	0.001 ⁽¹⁾
无	22	13	9	
病理分级				
I + II	20	10	10	0.043 ⁽¹⁾
III + IV	31	7	24	
TNM 分期				
I	9	7	2	0.006 ⁽¹⁾
II + III	42	10	32	

注:⁽¹⁾ $P<0.05$

2.2 MVD 计数

51 例 HCC 病例中,以 CD34 标记的 MVD 在癌组织中计数为(231.57 ± 110.65)明显高于配对癌旁组织(146.08 ± 64.68),差异有统计学意义($P<0.001$),见图 1C、D。MVD 水平在有无血管浸润、不同病理分级及 TNM 分期组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),在不同年龄、性别、饮酒史、HBsAg、AFP、肿瘤数目、不同肿瘤大小及是否合并肝硬化组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。



A 为 HCC 中 IGF-1R 强阳性表达(+++),B 为癌旁组织中 IGF-1R 弱阳性表达(+),C 为癌组织中 CD34 标记的微血管,D 为癌旁组织中 CD34 标记的微血管

图1 HCC 组织及癌旁组织中 IGF-1R 蛋白的表达和 CD34 标记的微血管(EnVision 法,×200)

Fig.1 The microvessel marked by CD34 in HCC(EnVision, ×200)

2.3 MVD 与 IGF-1R 表达的 Spearman 等级相关分析

在 51 例 HCC 中,MVD 高计数组 26 例,低计数组 25 例;在 26 例 MVD 高计数的癌组织中 IGF-1R 蛋白呈高表达 22 例,低表达 14 例,经 Spearman 等级相关分析,显示 MVV 与 IGF-1R 表达呈正相关($r=0.362, P=0.006$)。

2.4 随访情况

51 例 HCC 中 38 例获访,随访率 74.5%,随访时间 16~42 个月,平均随访时间 29 个月,其中 19 例复发,17 例转移,13 例死亡,无肿瘤复发者 19 例。单因素生存分析结果显示,IGF-1R 蛋白高、低表达组间比较,复发率、转移率及生存率差异均有统计学意义($P<0.05$)。MVD 高计数组与低计数

组比较,复发率、转移率及生存率差异有统计学意义($P < 0.05$);见表 2。

表 2 不同 IGF-1R 蛋白表达水平及 MVD 计数的 HCC 患者复发率、转移率及死亡率

Tab.2 The correlation between the expression of IGF-1R protein, the value of MVD and the follow-up data in HCC

项目	IGF-1R		MVD	
	低	高	低	高
获访(<i>n</i>)	16	22	19	19
随访时间(月)	16~40	16~42	18~42	16~42
复发	4	15 ⁽¹⁾	5	14 ⁽²⁾
转移	3	14 ⁽¹⁾	6	11 ⁽²⁾
死亡	3	10 ⁽¹⁾	3	10 ⁽²⁾

与同指标低组比较⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$

3 讨论

HCC 病程进展快且预后很差^[7]。肝脏是合成和分泌 IGFs 的主要器官^[8]。研究显示,IGF-1R 蛋白是酪氨酸激酶蛋白,可以激活下游一系列细胞增殖和抗凋亡信号通路,诱导其分裂增殖,细胞的过度分裂增殖将大大增加肿瘤发生的概率,其表达的高低,在一定程度上决定了细胞的致癌性或肿瘤细胞的转移性,HCC 患者机体由于对 IGF-1R 的抑制作用减弱或消失,使得 IGF-1R 过表达,造成肿瘤的发生^[9]。Ohshima-Hosoyama 等^[10]通过抑制小鼠髓母细胞瘤模型的 IGFs 途径,抑制了肿瘤生长。有研究认为,IGF-1R 能以 IGF-1 和 IGF-2 作为主要的下游分子,通过不同途径上调胰腺癌细胞中 VEGF 的表达,在促进肿瘤血管新生中起到重要作用^[11]。成莉等^[12]发现 IGF-1R 表达阳性的宫颈癌组织内 MVD 明显高于 IGF-1R 表达阴性者,提示 IGF-1R 可以促进肿瘤血管形成。还有研究显示 IGF-1R 不仅具有上调金属基质蛋白酶及尿激酶型纤溶酶原活化因子的表达,促使细胞外基质降解,促进肿瘤细胞转移的作用;也能通过促进肿瘤细胞内钙黏蛋白、层黏连蛋白、纤黏连蛋白等黏附分子的形成,增加其对内皮及基底膜的黏附性,来促进肿瘤细胞转移^[13]。

本次研究发现,在 51 例 HCC 病例的癌组织中 IGF-1R 蛋白表达高于相应的癌旁组织,提示 IGF-1R 的高表达可能与 HCC 的发生有关,且与肿瘤的分期、分级、转移、复发及生存率相关。牛坚等^[14]

应用免疫组化染色法检测了 36 例原发性肝癌组织中 IGF-1R 的表达,结果显示原发性肝癌组织中 IGF-1R 蛋白的阳性表达率显著高于正常肝组织。本次研究发现,IGF-1R 高表达患者发生血管浸润人数(25 例)多于低表达患者(4 例),病理分级 III + IV 级人数(24 例)多于低表达患者(7 例),TNM 临床分期 II + III 期人数(32 例)多于低表达患者(10 例),提示 IGF-1R 表达水平与 HCC 的生物学行为有关,其在 HCC 的发病、转移、复发机制中的作用值得探讨。

阻断肿瘤血管形成目前已成为临床肿瘤治疗研究的热点,如何选择有效的治疗靶点以阻断肿瘤新生血管形成还有待解决。本实验显示 HCC 中 IGF-1R 的蛋白表达强度与 MVD 水平呈正相关,但其因果关系值得探讨。推测抑制 HCC 中 IGF-1R 的高表达能抑制肿瘤血管新生,IGF-1R 有望成为阻断 HCC 发生、发展过程中血管生成的有效靶点,这还需要进一步研究。

4 参考文献

- [1] Forner A, Gilibert M, Bruix J, et al. Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014(9): 525 - 535.
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011(2): 69 - 90.
- [3] Kaseb AO, Morris JS, Hassan MM, et al. Clinical and prognostic implications of plasma insulin-like growth factor-1 and vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2011(29): 3892 - 3899.
- [4] Tsuta K, Mimae T, Nitta H, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor protein expression and gene copy number alterations in non-small cell lung carcinomas [J]. *Hum Pathol*, 2013(6): 975 - 982.
- [5] Hsu HH, Cheng LH, Ho TJ, et al. Apicidin-resistant HA22T hepatocellular carcinoma cells massively promote pro-survival capability via IGF-IR/PI3K/Akt signaling pathway activation [J]. *Tumour Biol*, 2014(1): 303 - 313.
- [6] Wang WQ, Liu L, Xu HX, et al. The combination of HTATIP2 expression and microvessel density predicts converse survival of hepatocellular carcinoma with or without sorafenib [J]. *Oncotarget*, 2014(11): 3895 - 3906.
- [7] Suh SJ, Yim HJ. Current status of molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma [J]. *Korean J Gastroen-*

- terol, 2013(3):136-146.
- [8] Iadevaia S, Lu Y, Morales FC, et al. Identification of optimal drug combinations targeting cellular networks; integrating phospho-proteomics and computational network analysis[J]. *Cancer Res*, 2010(17):6704-6714.
- [9] Yao WF, Liu JW, Sheng GL, et al. Blockade of IGF-IR exerts anticancer effects in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2011(4):719-722.
- [10] Ohshima-Hosoyama S, Hosoyama T, Nelon LD, et al. IGF-1 receptor inhibition by picropodophyllin in medulloblastoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010(4):727-732.
- [11] Ge YY, Shi Q, Zheng ZY, et al. MicroRNA-100 promotes the autophagy of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the expression of mTOR and IGF-1R[J]. *Oncotarget*, 2014(15):6218-6228.
- [12] 成莉, 邢辉. 宫颈癌 IGF-IR 的表达及与肿瘤血管生成、癌细胞增殖关系[J]. *浙江临床医学*, 2013(10):1461-1463.
- [13] Christopoulos PF, Msaouel P, Koutsilieris M. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2015(1):43-43.
- [14] 牛坚, 赵何伟, 郑苏文, 等. CD90 和胰岛素样生长因子 1 受体在原发性肝癌中的表达[J]. *中华普通外科杂志*, 2012(2):131-135.
- (2015-11-12 收稿, 2015-12-31 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华

(上接第 149 页)

- [13] Seebach C, Skripitz P, Andreassen TT, et al. Intermittent parathyroid hormone (1-34) enhance mechanical strength and density of new bone after distraction osteogenesis in rats[J]. *Orthop Res*, 2004(3):472-478.
- [14] Chan HL, McCauley LK. Parathyroid hormone applications in the craniofacial skeleton[J]. *J Dent Res*, 2013(1):18-25.
- [15] Cheung A, Seeman E. Teriparatide therapy for alendronate-associated osteonecrosis of the jaw[J]. *N Engl J Med*, 2010(25):2473-2474.
- [16] Valderrama P, Jung RE, Thoma DS, et al. Evaluation of parathyroid hormone bound to a synthetic matrix for guided bone regeneration around dental implants; a histomorphometric study in dogs[J]. *J Periodontol*, 2010(5):737-747.
- [17] Bashutski JD, Eber RM, Kinney JS, et al. Teriparatide and osseous regeneration in the oral cavity[J]. *N Engl J Med*, 2010(25):2396-2405.
- [18] Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34) [J]. *J Bone Miner Res*, 2002(11):2038-2047.
- [19] Aslan D, Andersen MD, Gede LB, et al. Mechanisms for the bone anabolic effect of parathyroid hormone treatment in humans[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2012(1):14-22.
- [20] Tang ZL, Zhang WJ, Wang DX, et al. An experimental study addressing the promotion of mandibular defect repair through the intermittent subcutaneous injection of parathyroid hormone[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2014(2):419-430.
- (2015-12-09 收稿, 2016-01-30 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华