

肝癌细胞下调 IGF-1 活性因子对 Ras 癌基因诱导小鼠肝肿瘤影响分析

刘洪琪, 李宪忠

(潍坊学院医院医务部, 山东潍坊 261061)

[摘要] **目的** 分析肝癌细胞下调胰岛素生长因子(IGF-1)活性因子对 Ras 癌基因诱导小鼠肝肿瘤的影响。**方法** 选取 3、5、9 月龄 Ras 癌基因诱导雄性小鼠各 10 只,同时选取非转基因 3、5、9 月龄雄性小鼠各 10 只,提取 9 月龄 Ras 癌基因诱导雄性小鼠肿瘤组织、肿瘤周围组织样品为实验组,同时提取 9 月龄非转基因小鼠肝组织样品作为对照组,提取两组样品总 RNA 和蛋白质,选用蛋白质印迹法对其细胞外信号调节激酶(ERK)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)蛋白表达进行检测;选用荧光定量 PCR 法对 IGF-1、GHR、IGFBP3 的 mRNA 表达水平进行检测;选用酶联免疫法对小鼠血清 IGF-1 水平进行检测;对 3、5、9 月龄 Ras 癌基因诱导雄性小鼠及非转基因小鼠外周血中 B 淋巴细胞、活性 B 淋巴细胞比例进行检测。**结果** Ras 癌基因小鼠诱导肿瘤组织 ERK、PI3K、AKT 平均蛋白表达水平与肿瘤周围组织比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);Ras 癌基因诱导小鼠肿瘤组织、肿瘤周围组织 ERK、PI3K、AKT 蛋白平均表达水平与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);Ras 癌基因诱导小鼠肿瘤组织 IGF-1、GHR、IGFBP3 的 mRNA 平均表达水平(0.27 ± 0.05)、(0.23 ± 0.02)、(19.48 ± 2.54)与肿瘤周围组织(1.25 ± 0.07)、(0.89 ± 0.17)、(3.25 ± 0.56)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);肿瘤周围组织 IGF-1、GHR、IGFBP3 的 mRNA 平均表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);3 月龄 Ras 癌基因诱导小鼠血清 IGF-1 水平(61.72 ± 9.24) $\mu\text{g/mL}$ 与非转基因小鼠(58.89 ± 8.16) $\mu\text{g/mL}$ 比较差异无统计学意义($P > 0.05$);月龄 5、9 个月 Ras 癌基因诱导小鼠血清 IGF-1 水平(51.28 ± 5.27)、(40.28 ± 6.28) $\mu\text{g/mL}$ 均低于非转基因小鼠(55.32 ± 7.91)、(49.52 ± 6.94) $\mu\text{g/mL}$,差异有统计学意义($P < 0.05$);3、5、9 月龄 Ras 癌基因诱导小鼠 B 淋巴细胞比例均低于非转基因小鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$);3、5 月龄 Ras 癌基因诱导小鼠活性 B 淋巴细胞比例与非转基因小鼠比较差异无统计学意义($P > 0.05$);9 月龄 Ras 癌基因诱导小鼠活性 B 淋巴细胞($\text{CD}19^+ \text{CD}69^+$ 、 $\text{CD}19^+ \text{CD}25^+$)比例(0.77 ± 0.13)、(1.42 ± 0.17)低于非转基因小鼠(0.87 ± 0.14)、(2.39 ± 0.22),差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** IGF-1 的表达的抑制,降低了 PI3K、AKT、GHR 的表达,提高了 ERK、IGFBP3 的表达,进而导致 Ras 癌基因通路的活化。

[关键词] 肝肿瘤;B 淋巴细胞;胰岛素生长因子;Ras 癌基因**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)21-2773-04

Effect of down-regulation of IGF-1 active factor on mouse liver cancer induced by Ras oncogene

LIU Hongqi, LI Xianzhong

(Medical Department, Hospital of Weifang University, Weifang, Shandong, 261061, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of the down-regulation of IGF-1 active factor on Ras oncogene induced mouse liver tumor. **Methods** Each 10 Ras oncogene induced male mice with 3-, 5-, 9-month old were selected, meanwhile each 10 male and female mice with 3-, 5-, 9-month old were selected. The tumor tissues and peritumoral tissues in the Ras oncogene induced male mice with 9-month old served as the experimental group, meanwhile the liver tissue samples extracted from non-transgenic mice with 9-month old served as the control group. The total RNA and protein were extracted from the two groups. The ERK, PI3K and AKP proteins were detected by using Western blot. The expression levels of IGF-1, GHR and IGFBP3 mRNA were detected by using the fluorescence quantitative PCR. The level of serum IGF-1 was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The proportions of peripheral blood B lymphocytes and active B lymphocytes in Ras oncogene induced male mice and non-transgenic mice with 3-, 5-, 9-month old were detected. **Results** The average expression levels of ERK, PI3K and AKT proteins had statistically significant difference between the tumor tissues and peritumoral tissues in Ras oncogene mice ($P < 0.05$), and the expression levels

of ERK, PI3K and AKT had statistically significant difference between the tumor tissues and peritumoral tissues in Ras oncogene mice with the control group ($P < 0.05$). The mean expression levels of IGF-1, GHR and IGFBP3 mRNA in tumor tissues of Ras oncogene induced mice were (0.27 ± 0.05 , 0.23 ± 0.02), (19.48 ± 2.54), which in peritumoral tissues were (1.25 ± 0.07), (0.89 ± 0.17) and (3.25 ± 0.56) respectively, the difference was statistically significant ($P > 0.05$). The IGF-1, GHR and IGFBP3 mRNA level had no statistical difference between peripheral tissues and control group ($P > 0.05$); the serum IGF level in Ras oncogene mice with 3-month old was (61.72 ± 9.24) $\mu\text{g/mL}$, which in the non-transgenic mice was (58.89 ± 8.16) $\mu\text{g/mL}$, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$); the serum IGF-1 levels in the Ras oncogene induced mice with 5-, 9-month old were (51.28 ± 5.27) $\mu\text{g/mL}$ and (40.28 ± 6.28) $\mu\text{g/mL}$, which were lower than (55.32 ± 7.91) $\mu\text{g/mL}$ and (49.52 ± 6.94) $\mu\text{g/mL}$, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The proportions of B lymphocytes in the Ras oncogene mice with 3-, 5-, 9-month old were lower than those in the non-transgenic mice, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the proportions of B lymphocytes had no statistical difference between the Ras oncogene mice with 3-5-month old and non-transgenic mice Ras carcinomas was ($P > 0.05$). The proportions of active B lymphocytes ($\text{CD19}^+ \text{CD69}^+$, $\text{CD19}^+ \text{CD25}^+$) in Ras oncogene mice with 9-month old was 0.77 ± 0.13 and 1.42 ± 0.17 , which were lower than 0.87 ± 0.14 and 2.39 ± 0.22 in the non-transgenic mice, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of IGF-1 expression reduces the expressions of PI3K, AKT and GHR, enhances the expressions of ERK and IGFBP3, and then leads to the activation of the Ras oncogene pathway.

[Key words] liver neoplasms; B-lymphocytes; insulin-like growth factors-1; Ras oncogene

肝癌是一种极为严重的恶性肿瘤,其发病率在同类疾病中高居第 5 位,病死率极高,据统计其死亡人数年均高达百万,对人们的生命造成了极大威胁,基于此探究肝癌发病机制已经成为医学研究者普遍关注的问题^[1-3]。机体免疫系统的破坏是恶性肿瘤产生的直接原因,免疫系统所产生的淋巴细胞能够对肿瘤细胞起到破坏作用,进而抑制其生长扩散,最终发挥免疫作用。胰岛素生长因子(insulin-like growth factors, IGF-1)是一种与肿瘤有紧密联系的具备较多生理功能的细胞因子,它来源于机体较多器官和组织细胞,其中肝脏所分泌的 IGF-1 占绝大部分^[4-7]。有研究证实,IGF-1 能够对 B 淋巴细胞的增殖和抗体的产生起到促进作用,但机制尚不明确;在肝癌患者发病过程中,临床表现的淋巴细胞水平降低及功能减弱等情况表明,IGF-1 的分泌与肝癌的发生也有一定联系^[8]。本实验通过研究肝癌细胞下调活性因子对 Ras 癌基因诱导小鼠肝肿瘤的影响,检测小鼠 IGF-1、外周血 B 淋巴细胞、活性 B 淋巴细胞及其他因子的水平,分析对肿瘤发生、发展的影响及机制,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 选取本院实验中心 3、5、9 月龄 Ras 癌基因诱导雄性小鼠各 10 只,同时选取非转基因 3、5、9 月龄雄性小鼠各 10 只,所选小鼠体质量平均 (28.52 ± 3.61)g,饲养环境:室温 $21 \sim 27^\circ\text{C}$;温差低于 4°C ;空气湿度 $35\% \sim 65\%$;每 12 小时变更昼夜状态,每小时空气更换不低于 10 次;保持空气流通,环

境干净,氨浓度不高于 14 mg/m^3 ;噪声不高于 60 分贝。实验动物许可证 SYXK(京)2015-0012。

1.2 药物及仪器 FIVP3000 型流式细胞仪,杭州思创医疗器械公司;SVP 生物化学分析仪,广州博泰医疗器械公司;E-5200 电泳仪,石家庄华康医疗器械公司;5%胎牛血清(批号:12091621),上海恒瑞医药股份有限公司;免疫发光试剂,批号:12090151,西安立邦制药有限公司;蛋白测定试剂盒(批号:20040772),江苏恒瑞医药股份有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 样本采集 解剖 Ras 转基因鼠取其肝肿瘤组织及周围组织,解剖非转基因鼠,取其肝组织作为对照组,将所取组织制作成 1 cm^3 组织块,置于低温、液氮环境下封存,提取两组样品总 RNA 和蛋白质,以便后期测量不同因子所用。

1.3.2 方法及指标 蛋白质印迹法对其细胞外信号调节激酶(ERK)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)蛋白表达进行检测;检测时针对不同组织采用多样本、多时间段测量,计算其平均水平。蛋白质印迹法:选取制作好的样品置于冰盒上,并调整不同样品盒浓度至相同,沸水处理 $4 \sim 6 \text{ min}$,对样品加孔处理并注入所用试剂,置于电泳槽中,通电电泳 $2 \sim 3 \text{ min}$,等待蛋白转膜完成后,抽取聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜),蛋白一面朝上置于 5%脱脂奶粉中,浸润均匀后取出,从一侧边缘添加入缓冲液 3 mL,匀速摇动至均匀,再使用辣根过氧化物(HRP)标记山羊抗兔二抗,室温培养,冲洗后使用发光试剂盒显影,在图像

处理软件辅助下,对显影条带光密度进行分析,统计蛋白表达数据。

PCR 对 IGF-1、GHR、IGFBP3 的 mRNA 表达水平进行检测;检测时针对不同组织采用多样本、多时间段测量,计算其平均水平。引物序列 IGFBP3 (F: CGA GTG ACC GAT TCC AAG TT); GHR (F: ATC CCA CAT CAC TGG CAA AC); IGF-1 (F: TGC CCA AGA CTC AGA AGT CC);PCR 反应条件:94 °C,5 min,循环 1 次;94~72 °C,1 min,循环 40 次。酶联免疫法对小鼠血清 IGF-1 水平进行检测。酶联免疫法:在酶标板上加入样品提取液,密封后常温培养 0.5 h,稀释、洗涤后进行加酶处理,再加入显色剂避光显色 8~10 min。加入终止液 15 min 后进行测定,空白处为 0,在 450 nm 波长下依次依序测量吸光度值(A 值)。以横坐标:标准物浓度,纵坐标:A 值绘制标准曲线,结合样品浓度及稀释倍数,通过计算得出样品实际浓度。

检测 Ras 癌基因诱导小鼠及非转基因小鼠外周血中 B 淋巴细胞、活性 B 淋巴细胞水平。流式检测:选取小鼠白细胞悬液平均置于 4 支离心管做离心处理,时间 3~4 min,倒出上清浑浊液体,在离心管中加入 B 淋巴细胞、活化 B 淋巴细胞检测试剂,混合均匀后 4 °C 下避光培育 0.5 h,用缓冲液洗涤细胞,滴入 5%胎牛血清磷酸盐缓冲液重悬细胞,过滤处理后置于流式细胞仪检测分析。

1.4 统计学处理 本实验采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织及对照组 ERK、PI3K、AKT 蛋白平均表达水平比较 Ras 癌基因诱导小鼠肿瘤组织 ERK、PI3K、AKT 蛋白平均表达水平与肿瘤周围组织比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);Ras 癌基因诱导小鼠肿瘤组织 ERK、PI3K、AKT 蛋白表达水平与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 ERK、PI3K、AKT 蛋白平均表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	ERK	PI3K	AKT
肿瘤组织	16.59 ± 2.51	0.89 ± 0.15	0.34 ± 0.07
肿瘤周围组织	5.65 ± 1.31 ^a	0.31 ± 0.08 ^a	0.19 ± 0.06 ^a
对照组	4.83 ± 1.12 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.03 ^a
<i>F</i>	3.157	3.671	3.256
<i>P</i>	0.034	0.029	0.028

^a: $P < 0.05$,与肿瘤组织比较

2.2 不同组织及对照组 IGF-1、GHR、IGFBP3 的 mRNA 平均表达水平比较 Ras 癌基因诱导小鼠肿瘤组织 IGF-1、GHR、IGFBP3 的 mRNA 表达水平与

肿瘤周围组织比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);Ras 癌基因诱导小鼠肿瘤组织 IGF-1、GHR、IGFBP3 的 mRNA 表达水平与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 IGF-1、GHR、IGFBP3 的 mRNA 平均表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	IGF-1 mRNA	GHR mRNA	IGFBP3 mRNA
肿瘤组织	0.27 ± 0.05	0.23 ± 0.02	19.48 ± 2.54
肿瘤周围组织	1.25 ± 0.07 ^a	0.89 ± 0.17 ^a	3.25 ± 0.56 ^a
对照组	1.32 ± 0.37 ^a	1.01 ± 0.24 ^a	3.59 ± 0.28 ^a
<i>F</i>	3.157	3.671	3.256
<i>P</i>	0.034	0.029	0.028

^a: $P < 0.05$,与肿瘤组织比较

2.3 不同月龄小鼠血清 IGF-1 水平比较 3 月龄 Ras 癌基因诱导小鼠血清 IGF-1 水平与非转基因小鼠比较无明显差异($P > 0.05$);5、9 月龄 Ras 癌基因诱导小鼠血清 IGF-1 水平均低于非转基因小鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 不同月龄小鼠血清 IGF-1 水平比较

月龄 (月)	小鼠血清 IGF-1 水平(μg/mL)		<i>t</i>	<i>P</i>
	Ras 癌基因诱导小鼠	非转基因小鼠		
3	61.72 ± 9.24	58.89 ± 8.16	1.259	0.521
5	51.28 ± 5.27	55.32 ± 7.91	3.614	0.016
9	40.28 ± 6.28	49.52 ± 6.94	3.752	0.027

表 4 小鼠 B 淋巴细胞、活性 B 淋巴细胞占淋巴细胞比例比较

月龄 (月)	亚型	淋巴细胞中的比例		<i>t</i>	<i>P</i>
		非转基因小鼠	Ras 癌基因诱导小鼠		
3	sIgM ⁺ CD23 ⁺	57.61 ± 2.85	51.62 ± 4.13	3.654	0.012
	sIgM ⁺ B220 ⁺	56.88 ± 1.83	50.84 ± 4.25	3.269	0.023
	CD19 ⁺ CD69 ⁺	0.56 ± 0.16	0.60 ± 0.29	1.257	0.318
	CD19 ⁺ CD25 ⁺	1.57 ± 0.15	1.56 ± 0.31	1.365	0.294
5	sIgM ⁺ CD23 ⁺	62.83 ± 3.37	48.31 ± 6.21	2.958	0.024
	sIgM ⁺ B220 ⁺	63.65 ± 3.63	47.56 ± 8.92	3.175	0.029
	CD19 ⁺ CD69 ⁺	0.59 ± 0.14	0.53 ± 0.12	1.268	0.285
	CD19 ⁺ CD25 ⁺	2.10 ± 0.13	2.21 ± 0.17	1.413	0.614
9	sIgM ⁺ CD23 ⁺	63.93 ± 5.12	36.05 ± 8.69	3.621	0.027
	sIgM ⁺ B220 ⁺	63.61 ± 3.82	36.20 ± 9.25	2.521	0.018
	CD19 ⁺ CD69 ⁺	0.87 ± 0.14	0.77 ± 0.13	3.364	0.018
	CD19 ⁺ CD25 ⁺	2.39 ± 0.22	1.42 ± 0.17	2.814	0.023

2.4 不同月龄小鼠 B 淋巴细胞、活性 B 淋巴细胞占淋巴细胞比例比较 3、5、9 月龄 Ras 癌基因诱导小鼠 B 淋巴细胞比例均低于非转基因小鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$);3、5 月龄 Ras 癌基因诱导小鼠活性 B

淋巴细胞比例与非转基因小鼠比较无明显差异($P > 0.05$);9 月龄 Ras 癌基因诱导小鼠活性 B 淋巴细胞比例低于非转基因小鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

3 讨论

IGF-1 是机体内生长激素刺激所产生的一种激素,它不仅在细胞分化与增殖、机体生长发育中有着重要作用,与肿瘤的发生也存在着紧密联系,其基因所包含的外显子能够转录、翻译相应产物^[9-11]。人体肾脏、脑、脾胃等组织都能够产生并分泌 IGF-1 因子,但 85% 以上的因子由肝脏合成分泌。

本研究表明,肝癌组织中 GHR mRNA、IGF-1 mRNA 平均表达水平较肝癌周围组织明显降低,表明 GHR、IGF-1 水平下降。由于 IGF-1 是 GHR 表达的靶基因,加上机体 IGF1 是肝脏细胞在生长激素刺激下表达分泌的,可以推断 Ras 癌基因诱导肝肿瘤发生是 GHR、IGF-1 水平下降所导致,这与文献^[12-13]的研究结果一致。肝癌组织中 IGFBP3 mRNA 平均表达水平升高,说明 IGF-1 在受到 GHR 调控的同时也受到 IGFBP3 的调节,IGFBP3 在机体蛋白类物质中占 85% 左右,它能够抑制 IGF-1 与相应受体的结合,因此 IGFBP3 能够抑制 IGF-1 的产生。Ras 癌基因诱导小鼠肿瘤组织 ERK、PI3K、AKT 蛋白平均表达水平较其他组织明显升高,这就表明在肝肿瘤细胞中 Ras 的活化刺激了 ERK 通路,由于 ERK 对 IGFBP3 的表达有抑制作用,而 IGFBP3 能够抑制 IGF-1 的产生,因此 ERK 通路的活化最终对 IGF-1 的表达起到抑制作用^[14]。IGF-1 在机体造血过程中发挥着重要作用,它通过对骨骼生长及骨密度的调控作用,最终调节造血细胞量,并直接影响多种造血细胞的发育。本研究结果显示,3、5、9 月龄 Ras 癌基因小鼠 B 淋巴细胞比例均低于非转基因小鼠,可能是因为 IGF-1 能够促进原 B 淋巴细胞分化最终成为前 B 淋巴细胞;同时 IGF-1 也是 B 淋巴细胞增殖的促进剂,IGF-1 能够促进骨髓、脾脏 B 淋巴细胞的增殖。有研究发现 IGF-1 对骨髓中 B 淋巴细胞发展有重要作用,且 IGFBP3 能够抑制 B 淋巴细胞的增殖。体液中,IGF-1 能够增强 B 淋巴细胞产生抗体,由此可见,IGF-1 在机体免疫原力形成方面有着重要作用,IGF-1 表达的降低致使其分泌量减少,同时也减弱了对 B 淋巴细胞的增殖及活性的促进,进而导致了肿瘤的发生、发展^[15]。

综上所述,IGF-1 的表达的抑制,降低了 PI3K、AKT、GHR 的表达,提高了 ERK、IGFBP3 的表达,进

而导致 Ras 癌基因通路的活化。

参考文献

- [1] 李学风,陈军,赵文,等. H-ras12V 促进肝肿瘤细胞脂肪变性机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2015,22(8):579-583.
- [2] 武艳霞,董建一,李慧玲,等. ras 癌基因诱导小鼠肝肿瘤发生及脂质代谢紊乱[J]. 肿瘤防治研究,2013,40(5):422-424.
- [3] STITT T N, DRUJAN D, CLARKE B A, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents short article expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors[J]. Mol Cell, 2004, 14(3):395-403.
- [4] MOLONEY A M, GRIFFIN R J, TIMMONS S A, et al. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling[J]. Neurobiol Aging, 2010, 31(2):224-243.
- [5] 薛亚梅,李坤,吕杰强,等. IGF-1 对肝癌细胞凋亡的抑制调控[J]. 生命科学,2013,19(1):68-72.
- [6] 段琼红,王志刚,朱桂宝,等. 血清 IGF-1、IGFBP-3 水平和肝癌关系的 Meta 分析[J]. 中华流行病学杂志,2012,26(2):132-134.
- [7] 殷志韬. 肝癌患者肿瘤组织中 VEGF-C、血清 IGF-1 水平检测及临床意义[J]. 山东医药,2011,51(3):101-102.
- [8] 张兵兵,王远亮,范开,等. IGF-1 基因产物的结构和功能多样化[J]. 生理科学进展,2012,39(3):209-213.
- [9] 聂鑫,王康伟,张敏,等. H-ras12V 转基因小鼠肝癌进展过程中外周血淋巴细胞比例及活性的变化[J]. 肿瘤,2016,36(1):20-27.
- [10] 郑智,方泽民,潘友民,等. B 细胞与肿瘤免疫的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2012,20(12):2652-2654.
- [11] 王志刚. 外周血 T 细胞亚群检测在恶性肿瘤中的价值[J]. 中外医疗,2012,31(5):19-20.
- [12] 张兵兵,王远亮,范开. IGF-1 基因产物的结构和功能多样化[J]. 生理科学进展,2010,39(3):523-529.
- [13] 张玮,彭菲. 胰岛素样生长因子-1 对小鼠 T、B 淋巴细胞分泌功能的影响[J]. 第四军医大学学报,2013,20(9):632-639.
- [14] 刘芳. IGF-1 的免疫调节作用[J]. 国际内分泌代谢杂志,2011(1):10-13.
- [15] 张敏,李慧玲,王福金,等. 甲状腺激素对 Ras 癌基因诱导的肝肿瘤抑制作用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2015,22(18):827-831.

(收稿日期:2017-11-18 修回日期:2018-02-15)