

胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)在乳腺癌组织中的表达及其
临床意义初探

耿怀成¹ 王冰蝉² 陈薇薇¹ 胡成如¹

(¹ 南京军区南京总医院肿瘤内科 江苏 南京 210002 ² 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:检测分析胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)在乳腺癌组织中的表达状况及其临床意义。方法:应用半定量 RT-PCR 方法分析 84 例乳腺癌和癌旁正常乳腺组织中 IGF-1R 基因 mRNA 的表达水平,并分析其表达与患者临床病理特征及预后之间的关系。结果:乳腺癌组织中 IGF-1R 基因 mRNA 表达水平显著高于癌旁乳腺组织,二者具有统计学差别($P<0.001$)。乳腺癌组织中 IGF-1R 基因 mRNA 表达水平与肿瘤组织分化程度及乳腺癌患者的 TNM 分期和淋巴结转移情况显著相关(P 值分别是 0.005、0.025 和 0.041)。另外,高表达 IGF-1R 的乳腺癌患者的五年总体生存率(38.3%)显著高于低表达 IGF-1R 的患者(49.7%; $P=0.009$)。多因素 COX 模型分析结果表明,IGF-1R 基因 mRNA 表达水平是乳腺癌患者的一个独立预后分子($HR=2.78$, 95%CI: 1.94-3.94, $P=0.041$)。结论:IGF-1R 基因表达水平上调在乳腺癌发展过程中起着重要的作用。IGF-1R 基因 mRNA 表达水平有望成为临床乳腺癌患者预后判断的一个重要分子标志物。

关键词 乳腺癌 胰岛素样生长因子-1受体 RT-PCR 预后

中图分类号 Q95-3 R737.9 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)19-3625-04

Expression of Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor mRNA in Human
Breast Cancer Tissues and Its Clinical Significance

GENG Huai-cheng¹, WANG Bing-chen², CHEN Wei-wei¹, HU Cheng-ru¹

(¹ Department of Oncology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China;

² Department of Surgical Oncology, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of IGF-1R mRNA in human breast cancer tissues and its prognostic roles. **Methods:** Semi-quantitative RT-PCR assay was employed to detect the expression of IGF-1R mRNA in 82 breast cancer and corresponding normal breast epithelial tissues. Additionally, the correlation of IGF-1R mRNA expression with clinicopathological factors of breast cancer patients was investigated and its correlation with prognosis of breast cancer patients was also investigated. **Results:** The level of IGF-1R mRNA expression was significantly higher than that in corresponding normal breast epithelial tissues ($P<0.001$). High level of IGF-1R mRNA expression was significantly correlated with tumor differentiation, TNM stage and lymph node metastasis of breast cancer patients ($P=0.005$, 0.025 and 0.041, respectively). The 5-year overall survival rate of breast cancer patients with high IGF-1R mRNA (38.3%) was significantly shorter than that in those patients with low IGF-1R mRNA (49.7%; $P=0.009$). Multivariate analysis of COX model showed that IGF-1R mRNA expression was an independent prognostic factor for breast cancer patients ($HR=2.78$, 95%CI: 1.94-3.94, $P=0.041$). **Conclusion:** The upregulation of IGF-1R mRNA might play important roles in progression of breast cancer and the status of IGF-1R mRNA expression has potential of being an important biomarker for breast cancer patients.

Key words: Breast cancer; Insulin-like growth factor-I receptor; RT-PCR; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R737.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)19-3625-04

前言

近年来,世界乳腺癌发病率呈上升趋势,年增长率约达到2%,尤其是在城市中乳腺癌已成为女性最常见的恶性肿瘤^[1]。尽管过去几十年中在乳腺癌的早期诊断和临床治疗方法上取得了很大进展,但是乳腺癌患者的预后,尤其是进展或转移性乳腺癌患者,仍不甚理想^[2]。因此,研究乳腺癌发生、发展的分子机制将有助于探索乳腺癌早期诊断及临床治疗预后评估的分

子标志物。

胰岛素样生长因子-I受体 (insulin-like growth factor-I receptor, IGF-1R) 是一种跨膜的酪氨酸激酶受体,它能够促进细胞增殖、分化,改变细胞的大小以及抑制细胞凋亡。在病理状态下,当它与胰岛素样生长因子结合后,可诱导细胞向恶性表型转化并促进肿瘤细胞分裂增殖^[3]。IGF-1R 基因在多种人类肿瘤细胞和组织中呈高表达水平,同时 IGF-1R 表达水平的升高还和多种肿瘤的放、化疗抗性表型的形成密切相关^[4,5]。虽然针对 IGF-1R 基因在乳腺癌中的功能研究国外已有相关文献报道,但是该分子在乳腺癌中表达的临床应用价值还不完全清楚,尤其是其预后意义分析还未见有相关报道。本研究拟采用半定量

作者简介:耿怀成,男(1967-),副主任医师,主要研究方向:肿瘤的早期诊断及综合治疗。E-mail: ghc_nj@yahoo.com.cn
(收稿日期:2011-04-10 接受日期:2011-04-30)

RT-PCR 方法检测乳腺癌组织及相应癌旁组织中 IGF-1R 基因 mRNA 的表达状况 ,并分析其与乳腺癌病人临床病理因素及其预后之间的关系。

1 材料与方法

1.1 乳腺癌组织标本来源

分别收集 2003 年 5 月 -2005 年 7 月安徽省人民医院普通外科首次入院外科手术治疗患者的乳腺癌组织标本 82 例及配对的癌旁正常乳腺组织标本 82 例。患者年龄 41~70 岁 ,平均年龄为(56.3± 6.2)岁。随访时间 10~76 个月 ,平均(64± 5.2)个月。所有患者手术前未经任何放、化学及生物治疗 ,经病理诊断证实均为浸润型乳腺癌。入组的所有患者均签写了知情同意书。根据 1997 年 UICC (Union Internation Centre of Cancer) 乳腺癌 T(原发癌瘤)N(局部淋巴结)M(远处转移)分期标准诊断为 Ⅰ期 3 例 Ⅱ期 38 例 , Ⅲ期 25 例 ,Ⅳ期 16 例 ;淋巴结转移阳性 35 例 ,阴性 47 例。

1.2 主要试剂及设备

TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。Taq DNA 聚合酶及逆转录试剂盒为大连 TaKaRa 生物公司产品。PCR 引物由上海生工生物技术有限公司合成。紫外分光光度计购自上海精密仪器仪表有限公司。Eppendorf PCR 仪购自艾本德中国有限公司。

1.3 RNA 提取

按 Invitrogen 公司的 Trizol 操作说明提取 100mg 乳腺癌及癌旁组织中组织中的总 RNA ,甲醛变性凝胶电泳分析其完整性 ,紫外分光光度计测定其纯度 ,并根据 A260nm 计算 z 总 RNA 的浓度。

1.4 RT-PCR 检测 IGF-1R 基因 mRNA 的表达

使用 TaKaRa 公司提供的反转录试剂盒分别将上述提取的总 RNA 逆转录成 cDNA。PCR 引物序列为 IGF-1R (Gen-Bank NM_000875) :上游引物 5'-TCTATCTTGGTTTCCAC-3' ,下游引物 5'-GGGAGCGAGCCGTCTG-3' ,扩增产物为 640bp ;内参 GAPDH :上游引物 5'-GAAGGTGAAGTCTCGGAGTC-3' ;下游引物 5'-GAAGATGGTGATGGGATTT-3' ,扩增产物 226 bp。PCR 反应体系为 :94℃ 5 min ,94℃ 30s ,55℃ (IGF-1R)或 56℃ (GAPDH) 30s ;72℃ 1min (循环 30 次) ;72℃ 10min ,最后保存于 4℃。

1.5 PCR 产物灰度值测定

取 10μL PCR 扩增产物加入 1.5%琼脂糖凝胶中 ,以 100V 电压电泳 10min ,溴化乙锭染色 ,分别在凝胶成像分析下进行灰度值测定 ,并计算 IGF-1R mRNA/GAPDH mRNA 的比值。

1.6 统计学分析

计量资料采用 t 检验 ,计数资料采用 R× C 列联表的 Fisher's 精确概率法检验 ,采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。采用 Kaplan-Meier 方法绘制患者的生存曲线 ,采用 Log-rank 检验进行单因素分析和不同分期生存率比较 ,多因素分析采用 COX 分析模型。

2 结果

2.1 IGF-1R 基因 mRNA 在乳腺癌组织和癌旁正常乳腺组织中的表达分析

RT-PCR 方法检测 82 例乳腺癌组织及配对的癌旁乳腺组织中 IGF-1R 基因 mRNA 表达水平 ,电泳结果如图 1A 所示。以 IGF-1R 与 GAPDH 基因的 RT-PCR 产物条带的比值表示 IGF-1R 基因 mRNA 的表达水平。以 GAPDH 作为内参照 ,分别计算 IGF-1R mRNA 与 GAPDH mRNA 的比值。如图 1B 所示 :乳腺癌组织和癌旁乳腺组织中该比值的平均值分别是 0.77± 0.21 和 0.13± 0.08 ,二者具有显著统计学差异(P<0.001)。因此推断 IGF-1R 基因表达水平的升高可能在乳腺癌的发展过程中发挥着重要的作用。

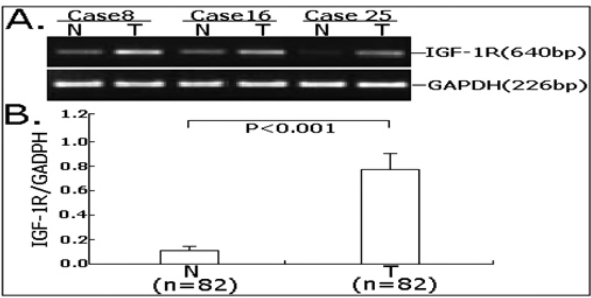


图 1 半定量 RT-PCR 检测 82 例乳腺癌和配对癌旁组织中 IGF-1R 基因 mRNA 的表达 ,GAPDH 基因作为内参照。N :正常乳腺组织 ;T :乳腺癌组织

Fig.1 Semi-quantitative RT-PCR detection of IGF-1R mRNA expression in 82 breast cancer and corresponding normal breast epithelial tissues, and GAPDH was used as an internal control.N: normal breast epithelial tissues; T: breast cancer tissues

2.2 IGF-1R 基因 mRNA 的表达水平与乳腺癌患者临床病理参数之间的关系

以乳腺癌组织 IGF-1R/FAPDH 平均值(0.77± 0.21)作为分界值 ,高于该值的为高 IGF-1R 表达组(n=48)而低于该值的为低 IGF-1R 表达组(n=34)。统计学分析 IGF-1R 表达情况与乳腺癌患者临床病理参数之间的关系 ,分析结果如表 1。IGF-1R 表达水平与乳腺癌患者的组织分化程度、TNM 分期及淋巴结转移状况密切相关 (P=0.005 ,0.025 和 0.041) ,但是与患者的年龄、肿瘤直径大小、肿瘤类型及雌激素受体表达状况均无显著相关性(P 值均大于 0.05)。

2.3 IGF-1R 基因 mRNA 的表达水平与乳腺癌患者预后之间的关系

利用 Kaplan-Meier 生存分析法绘制的生存曲线表明 : IGF-1R 高表达患者的 5 年总体生存率(38.3%)也显著低于低表达患者(49.7%) ,二者差异同样具有显著统计学差异(P=0.009 ;图 2)。单因素及多因素预后分析结果见表 2。单因素预后分析显示 IGF-1R 高表达的乳腺癌患者死亡风险显著高于低表达患者(P=0.003)。多因素预后分析中控制了年龄、肿瘤直径大小 ,组织类型等因素后 ,二者死亡风险仍具有显著统计学差异 (HR=2.78 ,95%CI: 1.94-3.94 ,P=0.041)。该结果表明 IGF-1R 基因 mRNA 表达水平是乳腺癌患者的一个独立的预后因素。

表 1 IGF-1R 基因 mRNA 表达水平与临床病理因素之间的关系
Table 1 Correlation of IGF-1R mRNA expression with clinicopathological factors of breast cancer patients

Clinicopathological factors	IGF-1R mRNA expression		P-value
	High (n=48)	Low (n=34)	
Age (year)			0.354
≤ 55	15	14	
>55	33	20	
Tumor diameter (cm)			0.974
≤ 5.0	21	15	
>5.0	27	19	
Pathological type			0.343
Invasive ductal cancer	29	24	
Others	19	10	
Tumor differentiation			0.005
Well/Moderate	16	22	
Poor	32	12	
Lymph node metastasis			0.041
No	23	24	
Yes	25	10	
TNM stage			0.025
0/I	19	22	
II/III	29	12	
Estrogen receptor			0.794
Negative	17	13	
Positive	31	21	

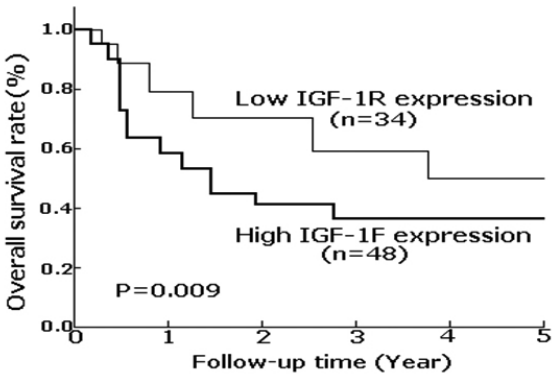


图 2 Kaplan-Meier 法分析 IGF-1R 基因 mRNA 表达水平与乳腺癌患者总体生存率之间的关系
Fig.2 Kaplan-Meier analysis of IGF-1R mRNA expression and overall survival rate of breast cancer patients

3 讨论

乳腺癌是危害妇女健康的主要恶性肿瘤之一,其病因尚未完全清楚。乳腺癌的发生发展是一个由多种病因引起、多阶段的发生发展过程,分子机制涉及多种癌基因的激活和抑癌基因的失活^[6]。已知与乳腺癌发生相关的基因包括 C-erbB-2 癌基因、C-myc 癌基因、p53 抑癌基因、brcA1 和 brcA2 抑癌基因等^[7-12]。胰岛素样生长因子系统(IGFs)是一个庞大的家族,主要包括 IGF-1 和 IGF-2 两类多肽类生长因子,以及其相应受体 IGF-1R、IGF-2R 和至少 6 种胰岛素样生长因子结合蛋白(IGF-BP)^[13-15]。IGF-1R 属于跨膜酪氨酸蛋白激酶受体家族,被配基激活后,经过一系列信号转导,导致细胞内转录的激活和调节蛋白的合成,而发挥促细胞增殖的有丝分裂原作用,能保护细胞免于凋亡^[16]。大量研究证实 IGF-1R 基因表达过度时,可以促使细胞向恶性表型转化和阻止细胞发生凋亡,从而诱导多种肿瘤

表 2 影响乳腺癌患者术后生存的多因素和单因素 Cox 回归分析
Table 2 Univariate and multivariate analysis of prognostic factors of breast cancer patients using a Cox regression model

Clinicopathological factors	Category	Univariate	Multivariate	
		P-value	P-value	HR (95%CI)
Age	>55 / ≤ 55	0.210	0.117	0.77 (0.55-1.32)
Tumor diameter (cm)	>5.0 / ≤ 5.0	0.402	0.451	1.65 (0.87-2.56)
Tumor type	IDC / Others	0.155	0.186	1.70 (0.96-2.89)
Tumor differentiation	Well+Moderate/Poor	0.092	0.077	2.12 (0.79-2.65)
TNM stage	III +II / 0+I	0.012	0.014	1.78 (1.18-2.32)
Lymph node metastasis	No / Yes	0.034	0.003	1.60 (1.12-1.87)
Estrogen receptor	Negative/positive	0.105	0.342	0.98 (0.56-1.04)
IGF-1R expression	High / Low	0.003	0.041	2.78 (1.94-3.94)

Note: HR: hazard ratio; 95% CI: 95% confidence interval. IDC: invasive ductal cancer

的发生^[17-20]。然而,IGF-1R 基因在乳腺癌组织中的表达状况及其临床意义鲜有报道。
本研究运用 RT-PCR 方法分析了 84 例乳腺癌组织和相对应癌旁乳腺组织中 IGF-1R 基因 mRNA 的表达水平,结果发现乳腺癌组织中 IGF-1R 的平均表达水平显著高于癌旁乳腺组织中的表达水平(P<0.001),说明 IGF-1R 基因表达水平的上调在

乳腺癌发生发展过程中可能发挥着重要的作用。接着我们分析了乳腺癌组织中 IGF-1R 基因表达水平升高的临床病理意义。虽然 IGF-1R 表达水平的升高与乳腺癌患者的年龄、肿瘤直径大小、组织学类型及雌激素受体状态均无关(P 值均大于 0.05),但是其表达水平的改变与患者肿瘤组织的组织分化程度、淋巴结转移转况及 TNM 分期具有显著负相关(P 值均小于 0.05)。IGF-1R 高表达水平的乳腺癌组织分化程度越差,淋巴结发生的几率越高,TNM 分期越差。同时为了进一步分析 IGF-1R 表达水平与患者预后之间的关系,本研究把研究对象分成 IGF-1R 高表达组和低表达组,两组的 5 年总体生存率呈显著统计学差异,IGF-1R 高表达组的总生存率显著低于低表达组(P=0.009)。同时,单因素和多因素的 COX 模式预后分析结果表明除了 TNM 分期和淋巴结转移状态,高 IGF-1R 表达水平是乳腺癌患者一个独立的预后指标(P=0.041)。因此可以认为 IGF-1R 在乳腺癌组织中表达水平的升高诱导了乳腺癌细胞的增长,同时促进了肿瘤细胞的浸润和淋巴结转移,因此在乳腺癌的进展和转移过程中起着重要的作用,但其过度表达究竟发生在乳腺癌变过程的哪一个环节?以及 IGF-1R 介导的信号通路活化受到哪些因素的调控还有待于进一步的研究和探讨。

本研究结果提示 IGF-1R 表达的检测将有助于乳腺癌患者的淋巴结转移和预后的判断。同时检测其表达水平对发现早期乳腺癌具有重要的意义,对于其可靠性及诊断价值应进行进一步探索。由于本课题入组的样本量偏小,还需要通过临床大样本进行深入的验证其预后价值。

参考文献(References)

- [1] Jemal A,Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006 [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56: 106-130
- [2] Barrett SV. Breast cancer [J]. J R Coll Physicians Edinb, 2010, 40: 335-339
- [3] Gualberto A, Pollak M. Clinical development of inhibitors of the insulin-like growth factor receptor in oncology [J]. Curr Drug Targets, 2009, 10: 923-936
- [4] Grothey A, Voigt W, Sch?ber C, et al. The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1999, 125: 166-173
- [5] Jameel JK, Rao VS, Cawkwell L, et al. Radioresistance in carcinoma

of the breast [J]. Breast, 2004, 13: 452-460

- [6] Bombonati A, Sgoi DC. The molecular pathology of breast cancer progression [J]. J Pathol, 2011, 223: 307-317
- [7] Kesisis G, Kontovinis LF, Gennatas K, et al. Biological markers in breast cancer prognosis and treatment [J]. J BUON, 2010, 15: 447-454
- [8] Chen Y, Olopade OI. MYC in breast tumor progression [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2008, 8: 1689-1698
- [9] Golubovskaya VM, Cance W. Focal adhesion kinase and p53 signal transduction pathways in cancer [J]. Front Biosci, 2010, 15: 901-912
- [10] Da Silva L, Lakhani SR. Pathology of hereditary breast cancer [J]. Mod Pathol, 2010, 23: S46-51
- [11] Rastelli F, Biancanelli S, Falzetta A, et al. Triple-negative breast cancer: current state of the art [J]. Tumori, 2010, 96: 875-888
- [12] Simpson PT, Reis-fiho JS, Gale T, et al. Molecular evolution of breast cancer [J]. J Pathol, 2005, 205: 248-254
- [13] Vigeri R, Squitrito S, Sciacca L. Insulin and its analogs: actions via insulin and IGF receptors [J]. Acta Diabetol, 2010, 47: 271-278
- [14] Belfiore A, Frasca F, Pandini G, et al. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease [J]. Endocr Rev, 2009, 30: 586-623
- [15] Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8: 915-928
- [16] Maki RG. Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 8: 4985-4995
- [17] López-Calderero I, Sánchez Chá vez E, García-Carbonero R. The insulin-like growth factor pathway as a target for cancer therapy [J]. Clin Transl Oncol, 2010, 12: 326-338
- [18] van der Veeke J, Oliveira S, Schiffelers RM, Storm G, van Bergen En Henegouwen PM, Roovers RC. Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2009, 9: 748-760
- [19] Leroith D, Roberts CT JR. The insulin-like growth factor system and cancer [J]. Cancer Lett, 2003, 195: 127-137
- [20] Werner H, Bruchim I. The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene [J]. Arch Physiol Biochem, 2009, 115: 58-71