

Колоректальный рак и инсулиноподобные факторы роста

А.А. Николаев, Е.С. Герштейн, Е.А. Короткова, В.В. Делекторская, Е.К. Дворова
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контакты: Елена Сергеевна Герштейн esgershtein@gmail.com

Иммуноферментными методами определено содержание инсулиноподобных факторов роста (ИФР) 1, 2 и ИФР-связывающих белков (ИФРСБ) 1 и 3 в сыворотке крови 74 первичных больных колоректальным раком (КРР) и 30 практически здоровых доноров. Продемонстрировано достоверное повышение уровня ИФР-1 и снижение уровня ИФРСБ-3 в сыворотке больных КРР по сравнению с контролем. Чувствительность ИФР-1 как потенциального диагностического маркера КРР при пороговом уровне 140 нг/мл составляет 80 %, специфичность — 75 %. Обнаружена достоверная отрицательная корреляция между возрастом обследованных и содержанием ИФР-1, однако у больных КРР она была значительно слабее, чем в контроле. Взаимосвязи с основными показателями распространенности КРР не выявлено.

Ключевые слова: ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1, ИФРСБ-3, рак толстой кишки

Colorectal cancer and insulin-like growth factors

A.A. Nikolayev, E.S. Gerstein, E.A. Korotkova, V.V. Delektorskaya, E.K. Dvorova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Insulin-like growth factors (IGF) 1 and 2 and IGF binding proteins (IGFBP) 1 and 3 levels were measured by ELISA techniques in blood serum of 74 primary colorectal cancer (CRC) patients and 30 control practically healthy persons. Significant increase of IGF-1 level and decrease of IGFBP-3 level were demonstrated in patients' serum as compared to control group. Sensitivity of IGF-1 as a prospective diagnostic CRC marker comprised 80 % with 75 % specificity using 140 ng/ml as cut-off level. Significant negative association was found between both patients and donors' age and serum IGF-1 levels, but in CRC patients it was much weaker than in control group. No associations were found between serum IGF 1 and 2 levels and main criteria of colorectal cancer progression.

Key words: IGF-1, IGF-2, IGFBP-1, IGFBP-3, colorectal cancer

Введение

Разработка новых подходов к лечению колоректального рака (КРР) — одна из важнейших проблем онкологии, привлекающая пристальное внимание клиницистов. Однако, несмотря на успехи, достигнутые в клинической диагностике и совершенствовании хирургических и комплексных методов лечения, смертность от этого заболевания остается довольно высокой. Многие исследователи связывают дальнейший прогресс в повышении эффективности лечения КРР не только с рациональным использованием существующих методов лечения, но и с разработкой принципиально новых патогенетических методов терапии, основанных на современных достижениях в изучении биохимии и молекулярной биологии опухолей.

Сигнальная система инсулиноподобных факторов роста играет значительную роль в возникновении и прогрессии различных злокачественных опухолей [1]. Она включает инсулиноподобные факторы роста 1 и 2 типа (ИФР-1 и ИФР-2) — митогенные пептиды, высокоомологичные друг другу и инсулину, синтезирующиеся в печени и некоторых других тканях под влиянием гормона роста гипофиза и воздействующие на периферические ткани, распространяясь по организму с кровью (центральный или эндокринный механизм

действия), их трансмембранные клеточные рецепторы и связывающие белки крови (ИФРСБ). ИФР-1 и ИФР-2 синтезируются также клетками различных опухолей и являются ауто/паракринными медиаторами, опосредующими рост, метастазирование и антиапоптотические ответы злокачественных клеток. ИФР, рецепторы ИФР и ИФРСБ образуют сложно регулирующую сеть взаимодействий как между собой, так и с другими биологическими регуляторами роста и выживаемости клеток. В настоящее время известно шесть ИФРСБ, а также семейство гомологичных связывающих белков, которые обладают значительно меньшим сродством к ИФР-лигандам. ИФРСБ модулируют биологическую доступность и активность ИФР несколькими способами: они осуществляют перенос ИФР из периферической крови к тканям-мишеням (ИФРСБ-1, 2 и 4), поддерживают резервный уровень ИФР в крови (это преимущественно функция ИФРСБ-3), потенцируют или ингибируют эффекты ИФР, а также опосредуют некоторые ИФР-независимые биологические эффекты. Расщепление ИФРСБ специфическими протеазами модулирует уровни свободных ИФР и ИФРСБ, а значит, и эффекты ИФР в тканях.

Результаты экспериментальных и предварительных клинических исследований свидетельствуют

о том, что в клетках КРР присутствуют все компоненты, необходимые для реализации аутокринного механизма действия ИФР-1 и ИФР-2 [2–8]. Показано, что белки семейства ИФР стимулируют не только пролиферативную, но и инвазивную и ангиогенную активность клеток, а ИФРСБ, напротив, оказывают подавляющее действие на эти процессы [9]. Уровни и соотношение различных компонентов системы ИФР в периферической крови неразрывно связаны с факторами питания, которые, в свою очередь, играют ключевую роль в этиологии КРР [10–12]. Так, высокий уровень ИФР-1 считается фактором повышенного риска развития этого заболевания [13, 14], роль других компонентов ИФР-сигнальной системы менее ясна.

Еще одной причиной для исследования роли ИФР-сигнальной системы при КРР является возможность использования специфических («таргетных») ингибиторов для подавления ее активности. Существует несколько подходов к решению этого вопроса: снижение уровня и/или биологической активности циркулирующих факторов роста, блокирование функции рецепторов и активация АМР-киназы, блокирующей нижележащие эффекты рецепторов ИФР [15]. В экспериментальных исследованиях уже продемонстрирована возможность торможения роста КРР с помощью моноклональных антител к ИФР-рецепторам [16] и низкомолекулярных ингибиторов их активности [17–19]. Предпринимаются также попытки использовать в качестве терапевтических агентов, ингибирующих активность ИФР-сигнальной системы, рекомбинантные ИФРСБ [20, 21].

Цель исследования – сравнительная оценка содержания ИФР-1 и ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови больных КРР и практически здоровых людей, а также анализ взаимосвязи изученных показателей с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания.

Материалы и методы

Обследовано 74 больных с впервые выявленным КРР (39 мужчин и 35 женщин) в возрасте от 20 до 85 лет (медиана – 62 года), проходивших обследование и лечение в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН

в период с 2011 по 2012 г. Рак прямой кишки был диагностирован у 45 больных, рак ободочной кишки – у 12, рак анального канала – у 9. У 18 больных была I, у 24 больных – II, у 20 – III и у 12 – IV стадия заболевания. Все больные с I–III стадиями были оперированы в радикальном объеме. Больным с IV стадией были выполнены преимущественно циторедуктивные операции. В группу контроля вошли 30 практически здоровых людей (17 мужчин и 13 женщин) в возрасте от 29 до 84 лет (медиана – 61 год).

Концентрацию ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа производства компании Mediagnost (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом универсальном ридере для микропланшет ELx800 (Bio-Tek Instruments Inc., США). Содержание всех исследованных белков в сыворотке крови выражали в нг/мл.

Данные обрабатывали с помощью программы Statistica 7.0. В связи с тем, что распределение большинства исследованных показателей отличалось от нормального, при сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические методы: критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса, тест корреляции рангов Спирмена (R). Различия и корреляции считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В табл. 1 представлены статистические показатели концентрации исследованных маркеров в сыворотке крови общей группы больных КРР и группы контроля.

Обнаружено высоко достоверное увеличение медианного уровня ИФР-1 и снижение уровня ИФРСБ-3 у больных КРР по сравнению с контролем. Однако только у 35 (47 %) из 74 больных КРР уровни ИФР-1 превышали верхний 95 % доверительный интервал (ДИ) контроля, равный 181 нг/мл ($p = 0,002$), т. е. чувствительность этого теста при данном пороговом значении была невысокой. Однако если снизить специфичность до 75 % (пороговый уровень – 140 нг/мл), то диагностическая чув-

Таблица 1. Содержание ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови больных КРР и контрольной группы

Группы	Медиана, квартили, нг/мл			
	ИФР-1	ИФР-2	ИФРСБ-1	ИФРСБ-3
КРР	167 136–227	830 665–958	2,7 1,4–4,3	2341 2035–3245
Контроль	127 108–150	720 550–930	2,4 0,8–6,6	3670 3010–4860
5–95 % контроля	84,2–180	490–1205	0–12,5	256–11384
<i>p</i>	0,00004	0,1	0,6	0,000009

ствительность ИФР-1 в общей группе повышается до 80 %.

Как в группе контроля, так и у больных КРР обнаружена достоверная отрицательная корреляция между возрастом обследованных и содержанием ИФР-1, однако связь с возрастом у больных КРР была значительно слабее, чем в контроле ($R = -0,29$; $p = 0,014$ и $R = -0,76$; $p = 0,0001$ соответственно).

В контрольной группе выявлена также прямая зависимость между уровнями ИФР-2 и ИФРСБ-3 ($R = 0,82$; $p = 0,0001$) и обратная – между уровнями ИФР-1 и ИФРСБ-1 ($R = -0,4$; $p = 0,03$) в сыворотке крови, которые отсутствовали в группе больных КРР. Таким образом, можно предположить, что у больных КРР нарушен баланс между ИФР и связывающими их белками крови, что свидетельствует об изменении биодоступности данных факторов роста.

В табл. 2 представлено содержание исследованных маркеров в контрольной группе и у больных КРР в зависимости от пола.

В группе контроля уровни ИФР-2, ИФРСБ-1

Таблица 2. Содержание ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови практически здоровых людей и больных КРР в зависимости от пола

Группы	Медиана, квартили, нг/мл			
	ИФР-1	ИФР-2	ИФРСБ-1	ИФРСБ-3
Контроль				
Мужчины (n = 39)	128 108–150	675 525–785	1,4 0,3–2,5	3150 2965–3550
Женщины (n = 35)	125 109–150	930 670–1140	4,6 2,3–9,1	4860 4180–5630
Больные КРР				
Мужчины (n = 39)	179 140–228	815 697–927	2,1 1,4–4,2	2166 1957–2716
Женщины (n = 35)	161 131–230	829 697–978	3,2 1,3–5,4	2958 2212–3703

и ИФРСБ-3 были достоверно выше в сыворотке крови женщин по сравнению с мужчинами (во всех случаях $p < 0,01$). У больных КРР аналогичные достоверные различия отмечены только для ИФРСБ-3 ($p = 0,003$). При этом, если в общей группе пациентов уровни ИФР-2 не отличались от контроля, то у пациентов мужского пола этот показатель достоверно превышал показатели мужчин контрольной группы ($p = 0,007$). Различия, выявленные для ИФР-1 и ИФРСБ-3 при анализе общей группы пациентов, сохранялись как у мужчин, так и у женщин. В целом нарушения в балансе сывороточных ИФР/ИФРСБ при КРР более выражены у мужчин, чем у женщин.

При анализе взаимосвязи содержания ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови с основными показателями распространенности рака толстой кишки, а также с гистологическим строением, степенью дифференцировки (аденокарцином) и локализацией опухоли

Таблица 3. Содержание ИФР-1, ИФР-2, ИФРСБ-1 и ИФРСБ-3 в сыворотке крови больных КРР с учетом основных клинко-морфологических факторов

Группы	Медиана, пределы колебания, нг/мл			
	ИФР-1	ИФР-2	ИФРСБ-1	ИФРСБ-3
Стадия				
I (n = 18)	182 69–282	701 534–3121	3,4 0,2–6,5	2535 3,3–5704
II (n = 24)	163 64,3–637	799 478–2044	2,1 0,8–11,3	2216 1887–3910
III (n = 20)	208 66,5–541	829 459–1676	3,0 0,7–10,7	2320 1748–9097
IV (n = 12)	152 71,4–408	954 463–2946	4,6 0,6–47,2	2777 1502–24700
Критерий Т				
T1 (n = 7)	211 146–282	793 664–959	4,2 0,2–6,5	3800 3,3–5403
T2 (n = 14)	149 69–249	694 459–3121	2,2 0,7–6,5	2094 1678–5703
T3 (n = 36)	167 64,3–637	837 459–2946	2,7 0,6–18,9	2314 1806–24700
T4 (n = 17)	176 109–541	824 463–1027	3,1 0,7–47,2	2780 1502–2193
Критерий N				
N0 (n = 46)	172 64,3–637	781 463–3122	2,0 0,2–11,3	2309 3,3–9976
N1 (n = 22)	179 66,5–491	841 459–2946	3,4 0,6–47,2	2627 1748–24700
N2 (n = 6)	190 113–541	976 773–1019	2,3 0,7–10,7	2409 1832–2780
Критерий М				
M0 (n = 62)	178 64,3–637	806 459–3122	2,7 1,5–12,1	2308 3,3–9096
M1 (n = 12)	152 71,4–408	954 463–2946	4,6 0,6–47,2	2777 1501–24700
Локализация				
Прямая кишка (n = 45)	164 69–541	778 463–2946	2,1 0,6–10,7	2305 550–24700
Сигмовидная кишка (n = 12)	234 132–637	963 459–3122	3,0 1,4–47,2	2334 1748–4771
Анальный отдел (n = 9)	181 108–282	842 573–2228	3,2 0,2–5,4	2625 3,3–4551
Прочие (n = 8)	105 64,3–230	792 477–987	5,4 0,8–18,9	2708 1978–9976
Гистологический вариант строения опухоли				
Аденокарцинома (n = 65)	168 64,3–637	811 459–3121	2,8 0,6–47,2	2340 550–24700
Плоскоклеточный рак (n = 9)	181 108–282	842 573–2228	3,2 1,3–4,2	2624 3,3–4551
Степень дифференцировки аденокарцином				
Высокая (n = 14)	185 86,4–491	696 565–1028	5,0 0,8–47,2	2684 550–5403
Умеренная (n = 35)	164 71,4–637	839 459–3121	3,1 0,6–18,9	2482 1806–24700
Низкая (n = 16)	199 64,3–317	818 477–1677	3,4 0,8–11,3	2042 1748–3615

статистически достоверных различий не выявлено (табл. 3). Можно отметить тенденцию к повышению уровня ИФР-2 с увеличением стадии заболевания, а также с увеличением степени поражения лимфатических узлов (индекс N). В то же время уровни всех маркеров, кроме ИФР-2, были наиболее высокими при индексе T1 — отсутствии инвазии в окружающие ткани. При сопоставлении с показателем отдаленного метастазирования (M) обнаружено недостоверное увеличение уровней всех исследованных маркеров в сыворотке крови больных КРР при наличии отдаленных метастазов.

Заключение

Таким образом, в сыворотке крови больных КРР достоверно повышено содержание ИФР-1 и снижено содержание ИФРСБ-3. Чувствительность ИФР-1 как потенциального диагностического маркера КРР составляет 80 % при 75 % специфичности (пороговый

уровень — 140 нг/мл). У пациентов мужского пола обнаружено также достоверное повышение уровня ИФР-2 в сыворотке крови по сравнению с контролем. Как в группе контроля, так и у больных КРР обнаружена достоверная отрицательная корреляция между возрастом обследованных и содержанием ИФР-1, однако связь с возрастом у больных КРР была значительно слабее, чем в контроле. Кроме того, у больных КРР отсутствовала корреляционная взаимосвязь между уровнями ИФР и ИФРСБ, отмеченная в контрольной группе, что свидетельствует о нарушении биодоступности ИФР. Кроме того, нами не обнаружено достоверной взаимосвязи уровней ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови больных КРР с основными показателями распространенности процесса, а также с гистологическим строением и локализацией опухоли.

Исследование поддержано РФФИ, грант 12-03-00401.

ЛИТЕРАТУРА

1. Костылева О.И., Герштейн Е.С., Дигаева М.А. и др. Инсулиноподобные факторы роста, их рецепторы и связывающие белки как патогенетические факторы и потенциальные мишени терапии в онкологии. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2009;6:3—8.
2. Durai R., Yang W., Gupta S. et al. The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. *Int J Colorectal Dis* 2005;20(3):203—20.
3. Koda M., Reszec J., Sulkowska M. et al. Expression of the insulin-like growth factor-I receptor and proapoptotic Bax and Bak proteins in human colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci* 2004;1030:377—83.
4. Fu P., Thompson J.A., Leeding K.S., Bach L.A. Insulin-like growth factors induce apoptosis as well as proliferation in LIM 1215 colon cancer cells. *J Cell Biochem* 2007;100(1):58—68.
5. Yavari K., Taghikhani M., Maragheh M.G. et al. Knockdown of IGF-1R by RNAi inhibits SW480 colon cancer cells growth in vitro. *Arch Med Res* 2009;40(4):235—40.
6. Davies M., Gupta S., Goldspink G., Winslet M. The insulin-like growth factor system and colorectal cancer: clinical and experimental evidence. *Int J Colorectal Dis* 2006;21(3):201—8.
7. Vrieling A., Voskuil D.W., Bosma A. et al. Expression of insulin-like growth factor system components in colorectal tissue and its relation with serum IGF levels. *Growth Horm IGF Res* 2009;19(2):126—35.
8. Sztéfko K., Hodorowicz-Zaniewska D., Popiela T., Richter P. IGF-I, IGF-II, IGFBP2, IGFBP3 and acid-labile subunit (ALS) in colorectal cancer patients before surgery and during one year follow up in relation to age. *Adv Med Sci* 2009;54(1):51—8.
9. Bustin S.A., Dorudi S., Phillips S.M. et al. Local expression of insulin-like growth factor-I affects angiogenesis in colorectal cancer. *Tumour Biol* 2002;23(3):130—8.
10. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr* 2001;131(Suppl 11):3109—20.
11. Jenab M., Riboli E., Cleveland R.J. et al. Serum C-peptide, IGFBP-1 and IGFBP-2 and risk of colon and rectal cancers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2007;121(2):368—76.
12. Park J.H. Inhibition of colon cancer cell growth by dietary components: role of the insulin-like growth factor (IGF) system. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17(Suppl 1):257—60.
13. Nomura A.M., Stemmermann G.N., Lee J., Pollak M.N. Serum insulin-like growth factor I and subsequent risk of colorectal cancer among Japanese-American men. *Am J Epidemiol* 2003;158(5):424—31.
14. Rinaldi S., Cleveland R., Norat T. et al. Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer* 2010;126(7):1702—15.
15. Bruchim I., Werner H. Targeting IGF-1 signaling pathways in gynecologic malignancies. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17(3):307—20.
16. Mitsiades C.S., Mitsiades N.S., McMullan C.J. et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 2004;5(3):221—30.
17. Perer E.S., Madan A.K., Shurin A. et al. Insulin-like growth factor I receptor antagonism augments response to chemoradiation therapy in colon cancer cells. *J Surg Res* 2000;94(1):1—5.
18. Maloney E.K., McLaughlin J.L., Dagdigian N.E. et al. An anti-insulin-like growth factor I receptor antibody that is a potent inhibitor of cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2003;63(16):5073—83.
19. Vanamala J., Reddivari L., Radhakrishnan S., Tarver C. Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *BMC Cancer* 2010;10:238.
20. Leng S.L., Leeding K.S., Whitehead R.H., Bach L.A. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 inhibits IGF-II-induced but not basal proliferation and adhesion of LIM 1215 colon cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001;174(1—2):121—7.
21. Alami N., Page V., Yu Q. et al. Recombinant human insulin-like growth factor-binding protein 3 inhibits tumor growth and targets the Akt pathway in lung and colon cancer models. *Growth Horm IGF Res* 2008;18(6):487—96.