中国现代普通外科进展
Chin J Curr Adv Gen Surg
2025年9月 第28卷 第9期 Sep. 2025 Vol. 28 No. 9

先天性巨结肠中IGF-Ⅱ/IGFBP6细胞因子的表达及意义

周玉[1] 牟亚汝[2] 丁奕名[1] 牛泽永[1] 辛鹏鸽[1] 王东明[1] 王健[1]

[1]山东大学齐鲁医院 小儿外科 （山东 济南 250012）
[2]山东第一医科大学附属省立医院 心内科 （山东 济南 250021）

【摘要】探讨胰岛素样生长因子Ⅱ（IGF-Ⅱ）和胰岛素样生长因子结合蛋白6（IGFBP6）在先天性巨结肠（HSCR）组织中的表达水平及临床意义。实时荧光定量PCR检测HSCR患者狭窄段肠管和扩张段肠管中IGF-Ⅱ、IGFBP6 mRNA的表达水平；Western blot法和免疫组织化学法检测HSCR患者狭窄段肠管和扩张段肠管中IGF-Ⅱ、IGFBP6蛋白的表达水平；分析狭窄段肠管和扩张段肠管IGFBP6、IGF-Ⅱ表达情况的差异。狭窄段肠管中IGF-Ⅱ mRNA表达水平（4.02±0.58）均高于扩张段肠管（0.97±0.14），差异有统计学意义（t=15.314，P=0.009）。狭窄段肠管中IGFBP6 mRNA表达水平（13.00±0.90）均高于扩张段肠管（0.98±0.14），差异亦有统计学意义（t=-41.204，P=0.001）。狭窄段肠管中IGFBP6和IGF-Ⅱ蛋白的表达量均高于扩张段（P<0.05），蛋白层面表达与mRNA表达趋势一致。HSCR患儿狭窄段肠管和扩张段肠管中IGF-Ⅱ、IGFBP6的差异性表达可能与HSCR的发生有关。

【关键词】先天性巨结肠•胰岛素样生长因子Ⅱ•胰岛素样生长因子结合蛋白6
【中图分类号】R726.1
【文献标识码】B DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2025.09.012
【文章编号】1009-9905（2025）09-0735-04

先天性巨结肠（Hirschsprung's disease, HSCR）是一种常见的儿童消化道畸形，以肠道神经节细胞缺乏引起的蠕动功能障碍为特征[1-2]。该病遗传机制复杂，涉及多个基因和环境因素的交互作用，目前已经确定了几种与巨结肠发生相关的基因，包括RET、SOX10、PHOX2B、HOX11L1和EDNRB[3]。胰岛素样生长因子（insulin-like growth factor, IGF）-Ⅱ是调节人体生长和胚胎发育的重要促生长因子，可促进细胞分裂，诱导细胞增殖和迁移[4-5]。胰岛素样生长因子结合蛋白（IGF-binding protein, IGFBP）是IGF的结合蛋白，IGFBP6的主要作用是抑制IGF-Ⅱ介导的细胞增殖、迁移和生存[6-7]。研究证实IGFBP6/IGF-Ⅱ信号通路在肠神经系统发育过程中发挥潜在作用[8-10]。国内外有关IGF-Ⅱ、IGFBP6在HSCR组织中的表达及意义的报道少见。本研究对IGF-Ⅱ、IGFBP6在HSCR组织中的表达情况进行分析，探讨IGFBP6、IGF-Ⅱ与HSCR发生是否存在关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2015年1月—2023年1月山东大学齐鲁医院小儿外科收治的28例HSCR患儿，男12例，女16例；年龄0.9~23个月，平均（8.22±6.27）个月。所有HSCR患儿均经病理学检查确诊。根据术中结肠形态区分为狭窄段组和扩张段组，取各组肠管全层组织，无菌剪取，部分放入无菌EP管中，液氮中速冻后置于-80 ℃冰箱中保存；部分放入4%甲醛溶液中固定。本研究经山东大学齐鲁医院伦理委员会批准[KYLL-202（ZM）-105）]。

1.2 RNA提取和qRT-PCR法检测IGF-Ⅱ和IGFBP6 mRNA表达水平 总RNA提取与测定：取两组肠段全层组织各50 mg，充分剪碎。参照美国

[基金项目] 山东省自然科学基金面上项目（ZR2022MH276、ZR2021MH334）
[通信作者] 王健，E-mail: wjdoctor2021@126.com

Invitrogen公司的TRIzol试剂按说明书操作从组织或细胞中分离总RNA。将提取后的RNA进行纯度和浓度测定，于-80 ℃保存备用。按照逆转录试剂盒说明书操作将RNA逆转录为cDNA，样本于-80 ℃保存。qRT-PCR反应条件：95 ℃变性30 s；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s扩增36个循环；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s。β-actin作为mRNA的内参对照。mRNA相对表达量以$2^{-\triangle\triangle CT}$法计算。相关基因引物序列见表1。

表1　各基因引物序列

基因	引物序列(5′-3′)
IGF-Ⅱ	
正向	5′-GACACCCTCCAGTTCGTCTG-3′
反向	5′-GGGGTAGCACAGTACGTCTC-3′
IGFBP6	
正向	5′-GTGAACCGCAGAGACCAACA-3′
反向	5′-GGCACGTAGAGTGTTTGAGC-3′
β-actin	
正向	5′-TCCTCTCCCAAGTCCACACA-3′
反向	5′-GCACGAAGGCTCATCATTCA-3′

1.3　蛋白质提取和Western blot法检测IGF-Ⅱ和IGFBP6蛋白表达水平　使用RIPA缓冲液(RIPA∶PMSF=100∶1，Boster，中国)从组织中提取总蛋白质。蛋白质浓度通过BCA法测定。将蛋白质在12.5% SDS-PAGE凝胶上分离，然后转移到聚偏二氟乙烯膜(Merck，USA)。在室温下用5%无脂牛奶封闭膜2 h。TBST洗涤5次后，将膜与一抗(抗IGF-Ⅱ 1∶2000，CQA2021，Cohesion，中国；抗IGFBP6 1∶1500，df8959，Affinity，中国)在4 ℃下孵育过夜。HRP标记的山羊抗兔IgG作为二抗[(H+L)1∶1000，A0277，Beyotime，中国]，在室温下再孵育2 h。在全自动化学发光图像分析系统(Tanon 4800，上海)下用ECL化学发光液(MA0186，Meilunbio，中国)进行HRP底物化学发光。使用ImageJ软件计算灰度值。用GraphPad Prism 8分析结果，以相对灰度值代表蛋白表达量；相对灰度值=IGF-Ⅱ IOD/β-actin IOD。

1.4　免疫组织化学法验证IGF-Ⅱ和IGFBP6的蛋白水平表达及定位　使用石蜡包埋的狭窄段及扩张段组织标本，切片机连续切片；使用二甲苯脱蜡、脱苯及梯度乙醇水化。枸橼酸盐缓冲液高压抗原修复，室温冷却，PBS洗涤3次，每次5 min。使用2% BSA孵育20 min封闭内源性过氧化氢酶，PBS洗涤3次，每次5 min。加入50 μL一抗(抗IGF-Ⅱ，CQA2021，Cohesion，中国；抗IGFBP6，df8959，Affinity，中国)，1∶50稀释，4 ℃孵育过夜。PBS洗涤3次，每次5 min，加入50 μL增强剂37 ℃孵育20 min。加入50 μL山羊抗兔IgG抗体(1∶500稀释)，室温孵育30 min，PBS洗涤3次，每次5 min。每张切片加入50 μL新鲜配制的DAB显色剂，苏木精复染1 min，硫酸酸化，温水浴(蓝化)3 min，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。在显微镜下观察切片，Image J软件分析IGF-Ⅱ和IGFBP6蛋白染色强度及范围。

1.5　统计学处理　采用SPSS25.0软件和Graphpad Prism 8软件。配对t检验比较IGF-Ⅱ和IGFBP6 mRNA和蛋白的表达差异，P<0.05表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　IGF-Ⅱ和IGFBP6 mRNA表达水平　狭窄段组与扩张段组中均有IGF-Ⅱ和IGFBP6 mRNA的表达，并且IGF-Ⅱ和IGFBP6 mRNA在狭窄段组的表达较扩张段组均有升高[IGF-Ⅱ mRNA：(4.02±0.58)比(0.97±0.14)，t=15.314，P=0.009；IGFBP6 mRNA：(13.00±0.90)比(0.98±0.14)，t=-41.204，P=0.001]。见图1。

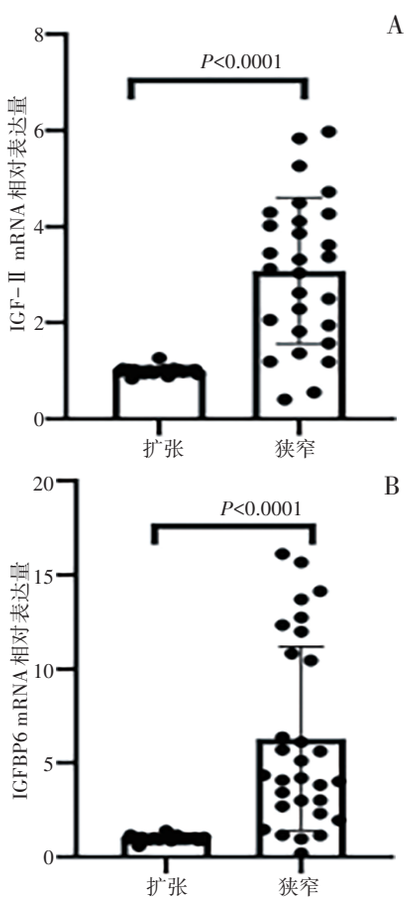


图1　qRT-PCR检测IGF-Ⅱ和IGFBP6 mRNA表达水平

A：qRT-PCR检测IGF-Ⅱ的mRNA相对表达量，结果提示在狭窄段肠段相对表达量高于扩张段肠段；B：qRT-PCR 检测IGFBP6的mRNA相对表达量，结果提示在狭窄段肠段相对表达量高于扩张段肠段。

2.2 IGF-Ⅱ和IGFBP6蛋白表达水平 Western blot结果显示，与扩张段中的表达相比，狭窄段中IGF-Ⅱ和IGFBP6蛋白的表达水平显著升高（$P<0.05$）。见图2。

2.3 免疫组织化学检测法IGF-Ⅱ和IGFBP6在组织中表达水平 HSCR狭窄段和扩张段中IGF-Ⅱ和IGFBP6的DAB染色显示，IGF-Ⅱ和IGFBP6在HSCR的狭窄段中表达显著高于扩张段。见图3、4。

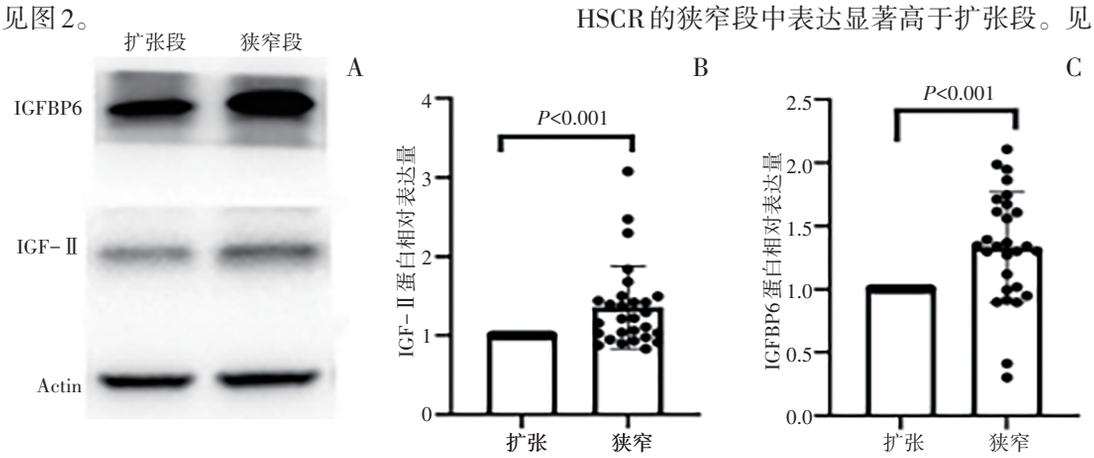


图2 Western blot检测IGF-Ⅱ和IGFBP6蛋白表达水平

A：Western blot检测IGF-Ⅱ和IGFBP6的蛋白相对表达量；B：Western-blot检测IGF-Ⅱ的蛋白相对表达量，结果提示在狭窄段肠段相对表达量高于扩张段肠段；C：Western-blot检测IGFBP6的蛋白相对表达量，结果提示在狭窄段肠段相对表达量高于扩张段肠段。

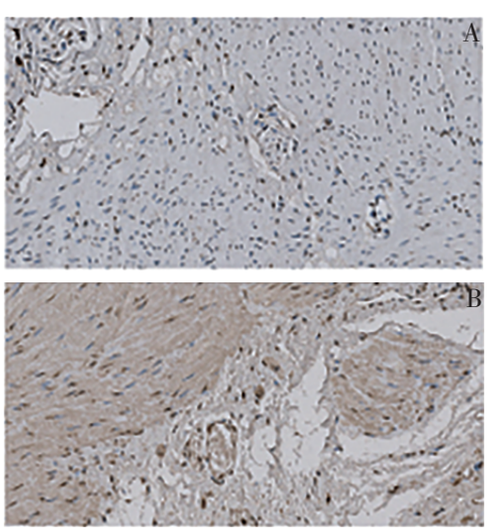


图3 免疫组织化学检测肠管中IGF-Ⅱ蛋白表达（×20）

A：扩张段肠管中IGF-Ⅱ的表达；B：狭窄段肠管中IGF-Ⅱ的表达

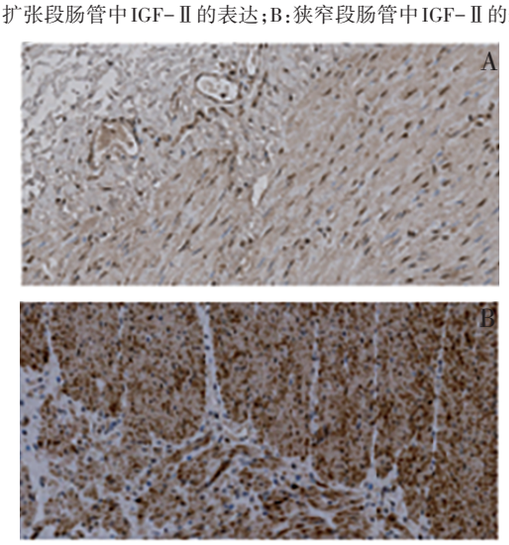


图4 免疫组织化学检测肠管中IGFBP6蛋白表达（×20）

A：扩张段肠管中IGFBP6的表达；B：狭窄段肠管中IGFBP6的表达

3 讨论

HSCR又称为希尔施普龙病，主要特征是远端肠管无神经节细胞。HSCR是一个多基因遗传病，目前有多个基因被证实与疾病的发生存在关联，包括RET、SOX10、GDNE、EDNRB、ECE1、NRG1等。但是目前发现的基因仅能解释大约50%的HSCR患儿，除了基因方面的因素还有肠道微环境、风险因素和表观遗传等都被认为可能与HSCR的发病存在关联。肠神经系统（enteric nervous system, ENS）提供肠道的内在神经支配，是周围神经系统神经化学最多样化的分支，由两层神经节和环绕胃肠道的纤维组成。ENS对生命至关重要，能够自主调节运动和分泌。

肠神经系统（Enteric nervous system, ENS）是一个复杂而活跃的胃肠道动力和感觉系统，由两个主要的内部相互联系的、有神经节的神经丛构成。ENS在结构和功能上是由类似于中枢神经系统（central nervous system, CNS）星形细胞的神经胶质所包裹的。ENS是由迷走、躯干、骶尾部神经嵴细胞衍生来的，它有同脊索一样多的神经元。在CNS中表达的神经递质同样在ENS中表达，对胃肠运动的兴奋、调节和抑制起重要作用。并且很多胃肠内分泌细胞分泌的胃肠肽也存在于CNS中，例如，促胃液素、缩胆囊素、促胃动素等。这些都说明ENS不是单纯的周围神经，而更像CNS一样发挥作用，可以决定肠道的行为[11]。这说明ENS与CNS之间有很大的相似性。在CNS中，神经细胞的稳态需要神经干细胞（neural stem cells, NSCs）的不断成熟、增殖、迁移和自我更新，从而保证CNS的正常发育、维持

CNS的正常功能，并对相应的损伤和疾病进行修复。研究证实，脑脊液中含有IGF-Ⅱ[12]，而脉络丛是IGF-Ⅱ的主要来源，此外软脑膜和内皮细胞也是表达IGF-Ⅱ的重要部分。IGFBP6也在CNS中表达，并受发育调节。它在非神经源性星形胶质细胞中的表达水平高于神经源性星形胶质细胞，并且抑制多能成体神经干/祖细胞的分化。IGFBP6对IGF-Ⅱ的水平进行调节[13-14]。而IGF-Ⅱ则通过与NSCs的IGF-1R相互作用启动相关的信号级联反应，通过下游的p-AKT信号通路完成NSCs的更新和迁移[15]，IGF-Ⅱ功能失调会导致诸如阿尔茨海默病的发生。因此，在CNS中，IGFBP/IGF对NSCs的成熟、增殖、迁移和自我更新起重要的调节作用[16-17]。

本研究收集HSCR各狭窄段和扩张段结肠组织标本，为了使目的基因表达含量更准确，采用Western blot、qRT-PCR这两种可互相论证的实验技术对目的基因在两组肠段进行检测，实验结果证实IGF-Ⅱ和IGFBP6在HSCR不同肠段之间的表达存在着明显差异。本研究又采用免疫组织化学染色方法观察IGF-Ⅱ和IGFBP6在各肠段部位的表达情况，发现IGF-Ⅱ和IGFBP6在扩张段肠管中呈弱阳性表达，而在狭窄段呈强阳性表达。

综上所述，IGF-Ⅱ和IGFBP6基因在人类ENS有表达，而且可能与ENS发育相关联；IGF-Ⅱ和IGFBP6基因的过度表达可能影响了ENS中神经嵴细胞的增殖或迁移，从而影响了HSCR病变肠段的蠕动功能。但是对于HSCR疾病发生的具体参与机制，还需进一步研究；对于IGF-Ⅱ和IGFBP6在HSCR各肠段中表达的研究也进一步论证HSCR的形成是多基因作用的结果，为HSCR的研究提供了新的思路和研究方向。

参 考 文 献

[1] Gariepy CE. Developmental disorders of the enteric nervous system: genetic and molecular bases[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2004, 39(1): 5-11. DOI: 10.1097/00005176-200407000-00003.

[2] 郗琦，李国翠，赵晓琼. 腹腔镜经肛改良Soave术治疗先天性巨结肠的效果[J]. 中国现代普通外科进展，2024，27(11)：906-908. DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2024.11.015.

[3] Xiao J, Hao LW, Wang J, et al. Comprehensive characterization of the genetic landscape of familial Hirschsprung's disease[J]. World J Pediatr, 2023, 19(7): 644-651. DOI: 10.1007/s12519-023-00686-x.

[4] SéLéNOU C, Brioude F, GIiabican E, et al. IGF2: Development, Genetic and Epigenetic Abnormalities[J]. Cells, 2022, 11(12): 1886. DOI: 10.3390/cells11121886.

[5] Li M, Rong X, Lu L, et al. IGF-2 mRNA binding protein 2 regulates primordial germ cell development in zebrafish [J]. Gen Comp Endocrinol, 2021, 313: 113875. DOI: 10.1016/j.ygcen.2021.113875.

[6] Wang S, Chi K, Wu D, et al. Insulin-like growth factor binding proteins in kidney disease[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 807119. DOI: 10.3389/fphar.2021.807119.

[7] Liso A, Venuto S, Coda ARD, et al. IGFBP-6: At the crossroads of immunity, tissue repair and fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8): 4358. DOI: 10.3390/ijms23084358.

[8] Micutkova L, Diener T, Li C, et al. Insulin-like growth factor binding protein-6 delays replicative senescence of human fibroblasts[J]. Mech Ageing Dev, 2011, 132(10): 468-479. DOI: 10.1016/j.mad.2011.07.005.

[9] Neumann GM, Bach LA. The N-terminal disulfide linkages of human insulin-like growth factor-binding protein-6 (hIGFBP-6) and hIGFBP-1 are different as determined by mass spectrometry[J]. J Biol Chem, 1999, 274(21): 14587-14594. DOI: 10.1074/jbc.274.21.14587.

[10] Jeon HJ, Park J, Shin JH, et al. Insulin-like growth factor binding protein-6 released from human mesenchymal stem cells confers neuronal protection through IGF-1R-mediated signaling[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(6): 1860-1868. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3173.

[11] Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, et al. Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts[J]. Neurology, 2011, 77(19): 1761-1767. DOI: 10.1212/WNL.0b013e318236ef60.

[12] Ihrie RA, Alvarez-buylla A. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain[J]. Neuron, 2011, 70(4): 674-686. DOI：10.1016/j.neuron.2011.05.004.

[13] Takahashi SI, Perks CM. Editorial: The role of the IGF/insulin-IGFBP axis in normal physiology and disease[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 892140. DOI: 10.3389/fendo.2022.892140.

[14] Baxter RC. Endocrine and cellular physiology and pathology of the insulin-like growth factor acid-labile subunit [J]. Nat Rev Endocrinol, 2024, 20(7): 414-425. DOI: 10.1038/s41574-024-00970-4.

[15] 刘源，侯楠，高俊. 胃癌及癌前病变患者肠道菌群变化及其与PI3K/AKT/mTOR信号通路相关性的研究[J]. 中国现代普通外科进展，2025，28(2)：119-124. DOI: 10.3969/j. issn. 1009-9905.2025.02.005.

[16] Bei Y, Huang Q, Shen J, et al. IGFBP6 regulates cell apoptosis and migration in glioma[J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(5): 889-898. DOI: 10.1007/s10571-016-0426-4.

[17] Memic F, KnoflachV, Morarach K, et al. Transcription and signaling regulators in developing neuronal subtypes of mouse and human enteric nervous system[J]. Gastroenterology, 2018, 154(3): 624-636. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.10.005.

（收稿日期：2025-01-13）