

# 无功能垂体腺瘤与正常垂体中 microRNAs 的差异表达

肖伟伟<sup>1</sup>, 毛志钢<sup>2</sup>, 周 静<sup>1</sup>, 罗 斌<sup>3</sup>, 王海军<sup>2</sup>, 朱永红<sup>1\*</sup>

(中山大学 1.中山医学院组织学与胚胎学教研室, 2.附属第一医院神经外科, 3.中山医学院法医学系, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】检测微小分子 RNA (microRNA, miRNA) 在无功能垂体腺瘤 (NFA) 和正常垂体 (NP) 组织中的差异表达, 探讨微小分子 RNA 在垂体腺瘤发生发展过程中的作用。【方法】收集 6 例 NFA 和 6 例 NP, 应用 miRCURY™ LNA 基因芯片技术分析差异表达的 miRNA, 并应用荧光定量 PCR 对部分差异表达的 miRNA 进行验证。【结果】与正常标本相比, 肿瘤标本中 miR-124、-141、-200c、-223、-297、-299-5p、-32、-340、-378、-491-3p、-519d、-525-5p、-550、-551a、-574-5p、-583、-662、-768-3p、-885-5p、-890 等 20 个 miRNAs 显著上调 (上调到 >2.0 倍), miR-125b-1、-132、-17、-192、-193a-3p、-193a-5p、-21、-302c、-30b、-31、-376b、-490-5p、-542-3p、-567、-622、-637、-654-3p、-658 等 18 个 miRNAs 明显下调 (下调到 0.5 倍以下)。一些差异表达的 miRNA 参与细胞的增殖和凋亡过程, 提示它们的变化可能与垂体腺瘤的发生发展有关。【结论】miRNAs 表达的变化可能参与无功能垂体腺瘤的发生, 而 miRNAs 靶基因的确立可以为无功能垂体腺瘤的发生机制提供新的理论依据。

**关键词:** microRNA; 无功能垂体腺瘤; 垂体; 基因芯片; 差异表达; Bcl-2

**中图分类号:** R73 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)01-00026-05

## Differential Expression of MicroRNAs in Nonfunctioning Pituitary Adenoma and Normal Pituitary

XIAO Wei-wei<sup>1</sup>, MAO Zhi-gang<sup>2</sup>, ZHOU Jing<sup>1</sup>, LUO Bin<sup>3</sup>, WANG Hai-jun<sup>2</sup>, ZHU Yong-hong<sup>1\*</sup>

(1. Department of Histology and Embryology, Zhongshan School of Medicine; 2. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital; 3. Faculty of Forensic Medicine, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 The purpose of this study was to identify different expression of miRNAs between nonfunctioning pituitary adenoma (NFA) and normal pituitary (NP), and investigate the role of miRNA in development and progression of pituitary adenomas. 【Methods】 Six NFA and 6 NP were collected. The miRNAs in NFA and NP were analyzed by miRCURY™ LNA array and some differentially expressed miRNAs were confirmed by quantitative real-time PCR. 【Results】 Compared with NP, 20 microRNAs were significantly increased (fold change to more than 2.0): miR-124, -141, -200c, -223, -297, -299-5p, -32, -340, -378, -491-3p, -519d, -525-5p, -550, -551a, -574-5p, -583, -662, -768-3p, -885-5p, and -890; Eighteen microRNAs including miR-125b-1, -132, -17, -192, -193a-3p, -193a-5p, -21, -302c, -30b, -31, -376b, -490-5p, -542-3p, -567, -622, -637, -654-3p, and -658 decreased significantly (fold change to less than 0.5) in NFAs. Several miRNAs identified in our study are involved in cell proliferation and apoptosis indicated their changes are associated with tumor development and progression. 【Conclusion】 Our results demonstrated that altered miRNAs expression may be involved in NFAs transformation and the establishment of target genes of miRNAs may elucidate molecular mechanisms involved in the pathogenesis of pituitary adenomas.

**Key words:** microRNA; nonfunctioning pituitary adenoma; pituitary gland; microarray; differential expression; Bcl-2

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2011, 32(1): 26-30]

MicroRNAs (miRNAs) 是一类单链非编码小分子 RNA, 它们通过与靶基因 mRNA 3' UTR 区域完

全或不完全互补配对抑制或断裂靶标 mRNAs 而调节基因的表达<sup>[1]</sup>。近年大量的研究发现 miRNAs

收稿日期: 2010-04-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30971538); 广东省自然科学基金 (9151140004000001); 广东省科技计划项目 (2007B031504002)

作者简介: 肖伟伟, 在读硕士生; \* 通信作者: 朱永红, 副教授, 硕士生导师, E-mail: zhuyongh@mail.sysu.edu.cn

不仅参与细胞的生长、分化、凋亡以及细胞代谢<sup>[2-3]</sup>,也可以调节原癌基因和抑癌基因的表达<sup>[4]</sup>,提示 miRNAs 在肿瘤发生发展中起着重要的作用,并有研究表明人类乳腺癌、结肠癌、肺癌、甲状腺癌以及恶性血液系统疾病中均有 miRNA 表达的变化<sup>[5]</sup>。然而 miRNAs 和垂体瘤发生相关的报道有限<sup>[6-8]</sup>。因此,我们用基因芯片检测了无功能腺瘤和正常垂体中 miRNAs 的表达,并确定了 38 个差异表达的 miRNAs,并进一步对它们可能的功能进行了探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病人资料

该研究选取的 6 例无功能垂体腺瘤(nonfunctioning pituitary adenoma, NFA)患者均为在中山大学附属第一医院神经外科入院治疗的病人,所有病例均经影像学检查、手术和病理确诊。患者年龄 38 ~ 60 岁,平均 43.8 岁。肿瘤最小体积 1.8 cm × 1.9 cm × 3.0 cm,最大体积 4.5 cm × 2.5 cm × 3.8 cm。6 例正常垂体(normal pituitary, NP)标本均来自于意外死亡 6 h 内的非垂体内分泌疾病死亡的尸解标本,由中山大学法医鉴定中心提供。

### 1.2 标本采集与保存

经蝶骨手术入路取得的新鲜标本经无菌生理盐水快速清洗后,立即置于 5 倍于肿瘤体积的 RNA Later 试剂中(Ambion 公司),4 °C 过夜,次日吸掉多余的 RNA Later 液体,并置入 - 80 °C 冰箱中保存。正常垂体组织经尸解取出后也立即置于 RNA Later 试剂中,其余操作同肿瘤标本。

### 1.3 miRNA 水平的检测与数据分析

垂体肿瘤标本分为两份,一份用于病理检查包括 HE 染色和免疫组化检查,另一份用于检测 miRNA 水平。标本在提取 RNA 之前一直存放于 - 80 °C。取适量(50 ~ 100 mg)保存的组织样品,使用 Biopulverizer™(biospec, Bartlesville, USA)冰冻粉碎机粉碎组织,加入 1 mL RNA 抽提试剂 Trizol (Invitrogen),然后使用 Mini-Bead-Beater-16 (biospec)制成组织匀浆。按照操作手册用 RNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, CA)提取标本总 RNA。最后用 NanoDrop ND-1000 (NanoDrop)测定 RNA 在分光光度计 260、280 和 230 nm 的吸收值,计算浓度并评估纯度。所提取的 RNA 的吸光度比值

$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  应该大于 1.8 并接近 2.0 (适合范围为 1.8 ~ 2.1)。确定 RNA 浓度和纯度后,即用 miRCURY™ Hy3™/Hy5™ Power 标记试剂盒(Exiqon, Denmark)对标本总 RNA 进行荧光标记。经 Hy3™/Hy5™-标记的 RNA 在标准条件下与 miRCURY™ LNA Array (Exiqon, Denmark)芯片进行杂交。最新版本的芯片(v.10.0)包括对照探针、错配探针以及超过 1 200 个的捕获探针,这些探针包含了 The Wellcome Trust Sanger Institute miRBase 10.0 数据库预测的所有的人类、小鼠及大鼠的 miRNA 序列。使用 GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片的荧光强度,将实验结果转换成数字型数据保存,使用 GenePix Pro 6.0 软件(Axon Instruments, Union City, CA)对原始数据进行分析运算。每个标本均与 miRCURY LNA™ Array 芯片杂交 3 次确保实验的准确性。应用 Student-*t* 检验来确定肿瘤标本和正常组织中差异表达的 miRNAs。最后对 miRNA 数据进行非监督聚类分析和相关性分析。miRNAs 上调到 > 2 倍或下调到 0.5 倍以下才被认为有组间差异。

### 1.4 荧光定量 PCR(qRT-PCR)

用 TRIzol 试剂提取垂体瘤标本中的总 RNA,经 DNase I 处理后用 applied biosystems 9700 Thermocycler (Applied Biosystems) 逆转录成 cDNA。总体积为 20 μL 的逆转录反应体系包括 1 μg 纯化的总 RNA,2 μL dNTP (2.5 mmol/μL),2 μL RT Buffer(Epicentre),1 μL RT Prime(1 μmol/L),2 μL M-MLV 以及 0.3 μL RNase inhibitor。将上述各物质混匀后依次经过 16 °C 30 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min 得到 cDNA。所有逆转录反应均重复 3 次。qRT-PCR 过程按照标准的 TaqMan PCR kit 操作步骤在 applied biosystems 7700 sequence detection system (Applied Biosystems) 系统上进行扩增。总体积为 25 μL 的 PCR 反应体系包括 2 μL 逆转录得到的 cDNA,1 × TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)。扩增反应在 96 孔板中进行,95 °C 5 min,随后 95 °C 10 s,60 °C 20 s,72 °C 20 s 反应 40 个循环。应用 Sequence Detection System 1.9.1 software (Applied Biosystems) 进行数据分析。qRT-PCR 引物参照文献[9],先设计一段茎环序列再加上一段与待测 microRNA 3'端互补的 6 ~ 9 个碱基,具体见表 1,其中 U6 作为内源性对照对目的基因表达量进行标化。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Sequence of primers for qRT-PCR

Gene name	RT primer
U6	5'CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT3'
miR-124	5'GTCGTATCCAGTGCCTGTGCTGGAGTCCG CAATTGCACTGGATACGACGGCATT3'
miR-223	5'GTCGTATCCAGTGCCTGTGCTGGAGTCCG CAATTGCACTGGATACGACGGGGTAT3'
miR-525-5p	5'GTCGTATCCAGTGCCTGTGCTGGAGTCCG CAATTGCACTGGATACGACAGAAAG3'

## 2 结果

### 2.1 临床影像学检查

6 例手术病人术前均经过临床影像学检查,图 1 所示为其中一位无功能垂体腺瘤病人的 MRI 图片,可见垂体肿瘤侵犯两侧海绵窦,向上压迫视交叉,向下突破鞍底侵入蝶窦。

### 2.2 病理检查

所有无功能垂体腺瘤的诊断均经 HE 染色(图 1)和免疫组化确诊。HE 图片显示垂体瘤细胞排列成片块或巢状,瘤细胞间血管丰富(图 2a)。正常垂体(前叶)细胞相对较少,可见嗜酸性细胞、嗜碱性细胞以及间质细胞等(图 2b)。

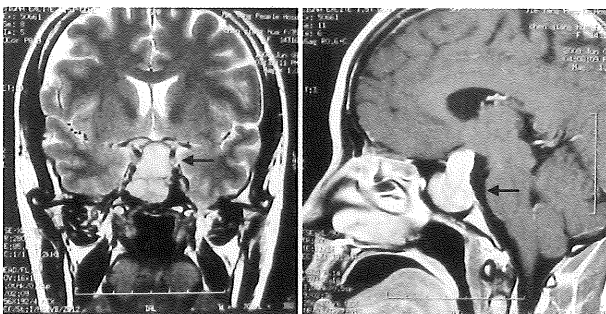


图 1 无功能垂体腺瘤 MRI 图片

Fig.1 MRI of nonfunctioning pituitary adenoma

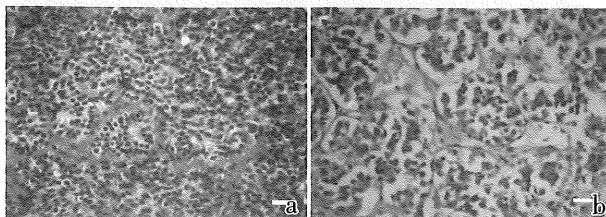


图 2 无功能垂体腺瘤(a)和正常垂体(b)HE 染色

Fig.2 HE staining of nonfunctioning pituitary adenoma (a) and normal pituitary tissue (b)

bar = 20  $\mu$ m

### 2.3 基因芯片及 qRT-PCR

基因芯片结果显示无功能垂体腺瘤与正常垂体相比,共有 38 个 miRNAs 存在差异性表达,其中 20 个上调,另外 18 个下调(表 2,图 3)。为了验证基因芯片结果的准确性我们应用 qRT-PCR 的方法检测了基因芯片显示的 3 个差异表达的 microRNAs 的水平,qRT-PCR 验证的 miR-124,miR-223 和 miR-525-5p 的结果和基因芯片所得结果相一致(表 3,图 4)。

表 2 miRNAs 的差异表达:无功能垂体腺瘤(NFAs)VS 正常垂体(NP)

Table 2 miRNAs differentially expressed in nonfunctioning pituitary adenomas (NFAs) vs. normal pituitaries (NP)

Up regulated			down regulated		
Name	NFAs/NP	P value	Name	NFAs/NP	P value
miR-124	4.590	0.043	miR-125b-1	0.132	0.035
miR-141	2.766	0.010	miR-132	0.381	0.028
miR-200c	4.898	0.018	miR-17	0.440	0.039
miR-223	11.987	0.014	miR-192	0.255	0.027
miR-297	2.620	0.024	miR-193a-3p	0.212	0.035
miR-299-5p	2.164	0.039	miR-193a-5p	0.203	0.027
miR-32	10.496	0.015	miR-21	0.427	0.031
miR-340	3.405	0.032	miR-302c	0.138	0.039
miR-378	3.270	0.020	miR-30b	0.262	0.050
miR-491-3p	3.184	0.032	miR-31	0.116	0.038
miR-519d	3.194	0.047	miR-376b	0.379	0.050
miR-525-5p	3.393	0.038	miR-490-5p	0.197	0.039
miR-550	2.238	0.049	miR-542-3p	0.276	0.047
miR-551a	4.114	0.029	miR-567	0.490	0.058
miR-574-5p	5.709	0.047	miR-622	0.436	0.049
miR-583	2.165	0.046	miR-637	0.223	0.044
miR-662	2.842	0.029	miR-654-3p	0.444	0.052
miR-768-3p	5.585	0.034	miR-658	0.428	0.048
miR-885-5p	3.679	0.045			
miR-890	2.410	0.049			

## 3 讨论

microRNA 是一类新近发现并引起研究者极大兴趣的微小分子 RNA,大量研究发现 miRNA 在动物、植物及病毒中广泛存在,并且参与了细胞分化、增殖、凋亡、代谢、肿瘤发生及转移等多项生命活动<sup>[2-3,10]</sup>。该实验将 miRNA 与垂体腺瘤结合起来进行研究,探讨了无功能垂体腺瘤与正常垂体中

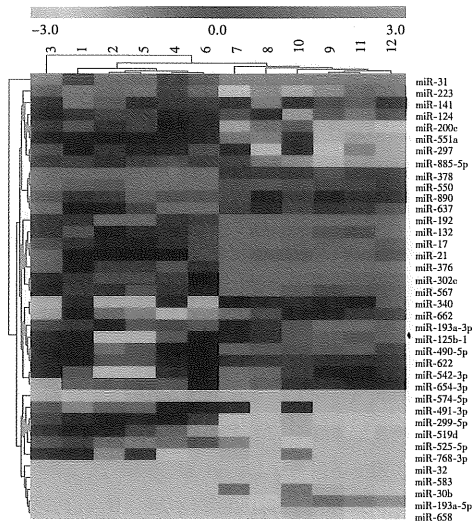


图 3 miRNAs 的差异表达:无功能垂体腺瘤(NFA) VS 正常垂体(NP)

Fig.3 miRNAs differentially expressed in nonfunctioning pituitary adenoma (NFA) vs. normal pituitaries (NP)

1-6 are NP, 7-12 are NFA, red color means up-regulated, green means down-regulated.

表 3 qRT-PCR 验证的部分基因芯片数据

Table 3 Some microarray data validation by qRT-PCR

Name	Different miRNA		U6	
	Microarray	qRT-PCR	Microarray	qRT-PCR
miR-124	0.54	0.39	1	1
miR-223	2.78	1.42	1	1
miR-525-5p	5.14	4.05	1	1

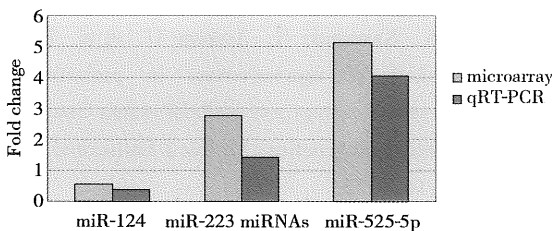


图 4 microarray 与 qRT-PCR 结果比较

Fig.4 Comparison of microarray analysis and qRT-PCR results

miRNA 的表达变化, 以期为进一步探讨垂体腺瘤发病机制及治疗方案提供理论依据。国内外关于 miRNA 与垂体腺瘤的研究相对较少, Bottoni 等<sup>[6]</sup>发现 miR-15a 与 miR-16-1 在垂体 GH 瘤和 PRL 瘤中的表达低于正常垂体, 并且 miR-15a 和 miR-16-1 的表达水平与肿瘤的大小呈负相关, 而与抗肿瘤细胞因子 p43 呈正相关。Qian 等<sup>[7]</sup>发现 let-7 的缺失可以导致 HMGA2 的上调从而影响垂体瘤

的发生和发展。同一年 Amara 等<sup>[8]</sup>的研究发现一些 miRNAs 参与 ACTH 垂体腺瘤的发生, 这些结果均提示 miRNA 表达的下调参与垂体瘤的发生。我们应用基因芯片技术发现与正常垂体组织相比, 在无功能垂体腺瘤中有包括 miR-124、miR-223、miR-525-5p 等在内的 20 个 miRNAs 显著上调, 包括 miR-21、miR-30b、miR-125b-1 等在内的 18 个 miRNAs 明显下调。

生物信息学预测发现 Bcl-2 原癌基因是 miR-21、miR-30b、miR-125 的预测靶基因, 我们发现在无功能垂体腺瘤中三者均呈现为下调表达。已有研究发现大约 1/3 的垂体腺瘤中表达 Bcl-2 癌蛋白, 而在正常垂体中没有 Bcl-2 的表达<sup>[11]</sup>, 垂体腺瘤的细胞凋亡率与 Bcl-2 的表达水平呈负相关<sup>[12]</sup>, 这些结果均提示 Bcl-2 在调节垂体腺瘤的凋亡过程中起着重要的作用。研究表明 mir21 为原癌基因, 其可通过调节 Bcl-2 而调节肿瘤发生<sup>[13]</sup>。miR-21 在乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肝癌、胰腺癌等多种肿瘤细胞系及肿瘤组织中是增高的<sup>[14]</sup>, 但是我们的数据显示在无功能垂体腺瘤中 miR-21 是下调的, Amaral 等<sup>[8]</sup>的发现和我们的比较一致, 他们发现 miR-21 在 ACTH 垂体腺瘤中是下调的, Amaral 认为这种现象提示 miR-21 在 ACTH 垂体腺瘤中是作为一个抑癌基因起作用的, 而非大家普遍认为的原癌基因。Li 等<sup>[15]</sup>发现 miR-21 在恶性度较高的前列腺癌细胞 PC-3 和 DU-145 中过表达, 而在恶性度较低的 LNCaP 细胞中几乎不表达。在不同类型的肿瘤细胞中 miR-21 的表达呈现不同的趋势, 这可能和肿瘤恶性程度和增殖速度以及不同的靶基因之间的相互作用有关。目前关于 miR-30b 或 miR-125 与 Bcl-2 的关系的研究较少, 关于两者在垂体瘤中的作用也有待进一步的研究。

我们用 qRT-PCR 法验证了其中 3 个上调的 miRNA: miR-124、miR-223 和 miR-525-5p 的表达, 所得结果和 microarray 结果一致(表 3, 图 4)。根据 miRBase 靶基因预测数据库我们发现, PTTG1IP (pituitary tumor-transforming gene 1 interacting protein, PTTG1IP) 为 miR-124 的其中一个靶基因, 而该蛋白可以与 PTTG 结合, 刺激成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达<sup>[16]</sup>, 参与 PTTG 功能的调节, 从而参与垂体瘤的复发、侵袭以及血管发生<sup>[17-18]</sup>。miR-223 与 miR-525-5p 有一个共同的靶基因即胰岛素样生长因子

1受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R), IGF1R 介导的胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1) 能激活 MAPK 和 PI3K/AKT 信号通路,促进细胞增殖并抑制凋亡<sup>[19]</sup>。但是 IGF-1R 在影响垂体腺瘤发生过程<sup>[20-21]</sup>中是否有 miRNA 的参与目前尚不清楚,这也给我们指明了研究方向。

结果提示,无功能垂体腺瘤中差异表达的 miRNAs 可能参与垂体腺瘤的发生发展。差异表达的 miRNAs 中部分与细胞的生长与凋亡有关,某些 miRNAs 的预测靶基因还是信号通路的重要组成部分,而这些差异表达的 miRNAs 及其靶基因共同组成的复杂的调节网络可能在垂体腺瘤的发生发展中起着非常重要的作用。以上结果为研究垂体腺瘤的发病机制提供了新的思路。但是在垂体瘤中 miRNAs 是通过哪些靶基因调节肿瘤发生发展的,又是通过何种信号通路实现的,这些问题尚有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Esquela KA, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]. *Nature*, 2006, 6(4): 259-269.
- [3] Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease [J]. *Dev Cell*, 2006, 11(4): 441-450.
- [4] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. *Dev Biol*, 2007, 302(1): 1-12.
- [5] Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7713-7722.
- [6] Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, et al. miR-15a and miR-16-1 downregulation in pituitary adenomas [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 204(1): 280-285.
- [7] Qian ZR, Asa SL, Siomi H, et al. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas [J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(3): 431-441.
- [8] Amaral FC, Torres N, Saggioro F, et al. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(1): 320-323.
- [9] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- [10] Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, et al. MicroRNA expression and function in cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(12): 580-587.
- [11] Wang DG, Johnston CF, Atkinson AB, et al. Expression of bcl-2 oncoprotein in pituitary tumours: Comparison with c-myc [J]. *J Clin Pathol*, 1996, 49(10): 795-797.
- [12] Sambaziotis D, Kapranos N, Kontogeorgos G. Correlation of bcl-2 and bax with apoptosis in human pituitary adenomas [J]. *Pituitary*, 2003, 6(3): 127-133.
- [13] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth [J]. *Oncogene*, 2007, 26(19): 2799-2803.
- [14] Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes [J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(4): 918-25.
- [15] Li T, Li D, Sha JJ. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383(3): 280-285.
- [16] McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, et al. Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, 58(2): 141-150.
- [17] Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, et al. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2008, 15(3): 721-743.
- [18] Gürlek A, Karavitaki N, Ansorge O, et al. What are the markers of aggressiveness in prolactinomas? Changes in cell biology, extracellular matrix components, angiogenesis and genetics [J]. *Eur J Endocrinol*, 2007, 156(2): 143-153.
- [19] Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation [J]. *Mol Pathol*, 2001, 54(3): 133-137.
- [20] Otsuka F, Tamiya T, Yamauchi T, et al. Quantitative analysis growth-related factors in human pituitary adenomas. Lowered insulin-like growth factor-I and its receptor mRNA in growth hormone-producing adenomas [J]. *Regul Pept*, 1999, 83(1): 31-38.
- [21] Ilvesmäki V, Kahri AI, Miettinen PJ, et al. Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 77(3): 852-858.