论著

文章编号:1000-5404(2007)18-1790-04

PTTG、bFGF 和 P53 的表达与垂体腺瘤侵袭性的关系

娄四龙[1,2],霍 钢[1],郑履平,戴勤弼[2] ([1]重庆医科大学附属第一院神经外科,重庆 400016;[2]重庆市肿瘤医院脑科,重庆 400030)

提 要: 目的 通过对垂体腺瘤中垂体瘤转化基因(pituitary tumor transforming gene,PTTG)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)和 P53 蛋白及 mRNA 表达的检测和相关性比较,探讨 PTTG、bFGF 和 P53 的表达与垂体腺瘤侵袭性之间的关系。**方法** 63 例垂体腺瘤手术标本按侵袭性垂体腺瘤综合判定方法分为侵袭组和非侵袭组,采用免疫组化检测 PTTG、bFGF 和 P53 蛋白的表达,RT-PCR 法检测 PTTG、bFGF 和 P53 mRNA 的表达,分析侵袭组和非侵袭组 PTTG、bFGF 和 P53 表达水平的差异和相关性。**结果** 63 例垂体瘤患者中,34 例为侵袭性垂体腺瘤,29 例为非侵袭性垂体腺瘤。侵袭性垂体腺瘤组的 PTTG、bFGF 和 P53 蛋白和 mRNA 表达均较非侵袭性腺瘤组增高。Pearson 相关分析显示:侵袭性腺瘤组中 PTTG 与 bFGF mRNA 的表达成正相关($r=0.81$,$P<0.01$);bFGF 与 P53 mRNA 表达呈正相关($r=0.62$,$P<0.01$);PTTG 与 P53 mRNA 表达呈正相关($r=0.69$,$P<0.01$)。**结论** 垂体腺瘤的侵袭性与 PTTG、bFGF 和 P53 蛋白及 mRNA 的高表达密切相关,三者在侵袭性垂体腺瘤的高表达常同时存在;PTTG、bFGF 和 P53 三者相互协同作用促进细胞增殖、肿瘤新生血管的生成,导致垂体腺瘤侵袭性增强;三者可以作为垂体腺瘤侵袭性的有效参考指标。

关键词: 垂体腺瘤;侵袭;PTTG;bFGF;P53

中图法分类号: R73-37;R730.23;R736.4 **文献标识码**: A

Relationship of PTTG, bFGF, P53 expressions with invasiveness of pituitary adenoma

LOU Si-long[1,2], HUO Gang[1], ZHENG Lu-ping[1], DAI Qin-bi[2] ([1]Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Neurosurgery, Chongqing Tumor Hospital, Chongqing 400030, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between mRNA and protein expressions of PTTG, bFGF, P53 with tumorigenesis and invasiveness of pituitary adenoma. Methods The protein expressions of PTTG, bFGF, P53 were detected by immunohistochemical analysis, and their mRNA expressions were by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in 63 specimens of pituitary adenoma that was classified into invasive and non-invasive according to Wilson's modified staging. Results Thirty-four specimens of pituitary adenoma were invasive and 29 non-invasive. The expressions of PTTG, bFGF, P53 were significantly higher in invasive pituitary adenoma than in non-invasive. The analysis of correlation showed that in invasive pituitary adenoma, the positive correlation exists between PTTG and bFGF mRNA ($r=0.81$, $P<0.01$), between bFGF and P53 mRNA ($r=0.62$, $P<0.01$), between PTTG and P53 mRNA ($r=0.69$, $P<0.01$). Conclusion High expressions of PTTG, bFGF, P53 in invasive pituitary adenoma lead to the tumor cell proliferation and upregulate tumor angiogenesis. High expressions of PTTG, bFGF, P53 may play important roles in the tumorigenesis and invasiveness of pituitary adenoma, and they can be useful markers in determining invasive behavior of pituitary adenoma.

Key words: pituitary adenomas; invasiveness; hPTTG; bFGF; P53

垂体腺瘤是鞍区常见的肿瘤,起源于脑垂体前叶单克隆细胞,属良性肿瘤,但部分呈侵袭性生长,手术难以完全切除,术后容易复发,此类侵袭性垂体腺瘤的诊治仍是目前临床上棘手的问题之一。目前,对于侵袭性垂体腺瘤发生、发展的机制仍不甚清楚,它可能是一个由多基因共同参与、多因素相互作用极其复杂的生物学过程。本研究从细胞增殖活性和肿瘤血管形成的角度出发,探讨 PTTG、bFGF 和 P53 的表达与垂体腺瘤侵袭性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

垂体腺瘤标本来自 2004 年 5 月至 2005 年 9 月,连续取材

作者简介:娄四龙(1972-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事颅内肿瘤方面的研究。电话:(023)66193270,E-mail: lsl4b@163.com.cn

收稿日期:2006-09-25;**修回日期**:2007-02-11

于重庆医科大学附属第一医院神经外科 63 例垂体腺瘤患者的组织标本。其中男性 26 例，女性 37 例，年龄 20～68 岁，平均 37 岁。侵袭性垂体腺瘤的判断标准：①本研究采用 Wilson 改良的 Hardy 分类法[1]将Ⅲ～Ⅳ级或 C、D、E 期的肿瘤归为侵袭性腺瘤；②术前影像学改变，CT 及 MR 可见海绵窦、鞍旁及下丘脑等邻近结构的破坏；③术中所取鞍底骨质、鞍底硬脑膜经病理学证实有肿瘤细胞侵犯；④术中见鞍底骨质及硬脑膜被侵袭破坏，肿瘤突入蝶窦腔或海绵窦内壁穿通，窦内结构被肿瘤包绕或肿瘤长入鞍周侵犯脑组织。结合上述判断标准，本组 63 例标本中，34 例为侵袭性，29 例为非侵袭性垂体腺瘤。

1.2　标本处理

手术时取所需组织，一部分置入 10% 甲醛溶液内固定、脱水和石蜡包埋，另一部分新鲜肿瘤组织，生理盐水洗净积血，立即放入经焦碳酸二乙酯（DEPC）水处过的冻存管中，置入液氮备用。

1.3　免疫组织化学染色检测 PTTG、bFGF 和 P53 蛋白的表达

一抗兔抗人 PTTG 多克隆抗体（北京中杉金桥生物技术有限公司），兔抗人 bFGF 单克隆抗体（福州迈新生物技术有限公司），小鼠抗人 P53 单克隆抗体（北京中杉金桥生物技术有限公司）。S-P 试剂盒及 DAB 显色剂购自武汉博士德生物技术有限公司，其他试剂由重庆医科大学组胚教研室提供。组织标本经石蜡包埋作 5 μm 连续切片，1 张作 HE 染色用于重新确认病理结果，免疫组化按试剂盒操作说明进行。阴性对照选择 PBS 代替一抗；阳性结果判断标准：以已知阳性组织切片作阳性对照。参照 Shimizu 方法，进行半定量分级，至少观察 10 个高倍视野，根据阳性反应的强度及阳性细胞比例打分。① 阳性反应强度：无着色为 0，轻度染色为 1，中度染色为 2，深度染色为 3。② 阳性细胞比例：无着色为 0，<1/3 为 1，1/3～2/3 为 2，>2/3 为 3。最高分为 6，根据两项之和 0～2 分为阴性，≥2 分为阳性，≥5 分为强阳性。

1.4　RT-PCR 法检测 PTTG、bFGF 和 P53 mRNA 的表达

经 Trizol（Invitrogen 公司）试剂提取细胞总 RNA，RNA 含量通过 752 型紫外分光光度计测定 260 nm 吸收值确定，按 $D(260)=40$ μg mRNA 计算 RNA 的产率，$D(260)$ 在 1.8～2.0 视为抽提的 RNA 纯度很高。RT-PCR 采用二步法，按操作手册进行。内参照 β-actin（产物大小 323 bp）及 PCR 引物皆由上海生工生物工程技术服务有限公司提供，引物的序列如：PTTG 反义链 5′- CTAAGGATGGGCTGATGCTG -3′，正义链 5′-CACCAAACAGGTGGCAATTC-3′；bFGF 反义链 5′-AAGAGCGACCCTCACATCAA-3′，正义链 5′-TCGTTTCAGTGCCACATACC-3′；P53 反义链 5′-TCCTC TCCAAAATGCCAGAG-3′，正义链 5′-TGAGGCGGTAGTAGGACAGG-3′；内参照 β-actin 反义链 5′-GCCATTCACCGATTCAGTCGTC-3′，正义链 5′-AGC-GCGTCCCGTCAAGTCAG-3′；预计 PTTG、bFGF 和 P53 mRNA 的扩增片段长度分别为 532、225 bp 和 551 bp；PCR 反应条件：①94 ℃ 预变性 5 min；②35 循环：94 ℃ 45 s，55 ℃ 45 s，72℃ 75 s；③72 ℃ 延伸 5 min。制备 1.5% 琼脂糖凝胶（含 0.5 μg/ml EB），分别取 5 μl PCR 产物进行电泳，紫外灯下拍照，采用图像分析软件 Scion Image（Beta4.02，Scion Corporation）比较电泳条带相对光密度值，获得 PTTG、bFGF 及 P53 mRNA 相对表达量。

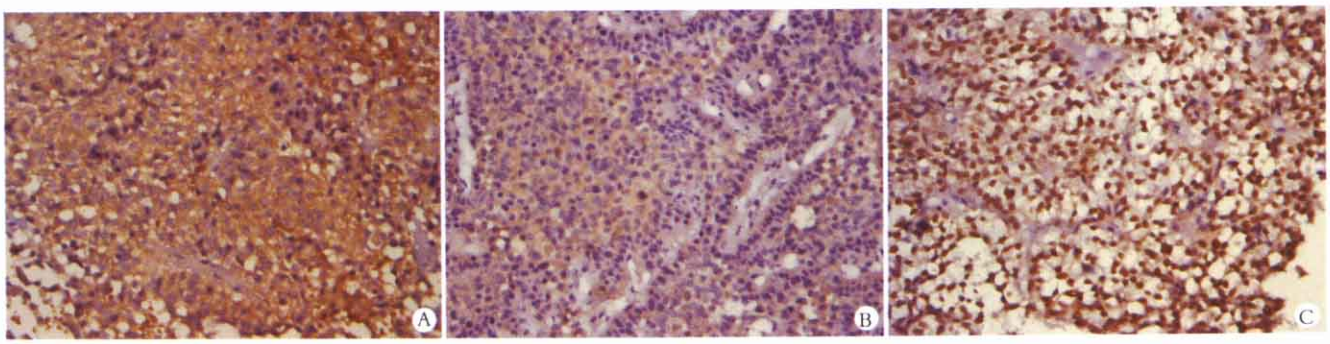
1.5　统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验、χ^2 检验和 Pearson 相关分析。

2　结果

2.1　免疫组化染色结果

免疫组化染色中 PTTG 和 bFGF 以细胞质或细胞膜呈棕黄色颗粒为阳性细胞（图 1A、B），P53 染色以细胞核为主（图 1C）。侵袭组与非侵袭组垂体腺瘤之间 PTTG、bFGF 和 P53 蛋白表达结果的比较有显著差异（$P<0.05$）。



A：PTTG 抗体免疫组化强阳性；B：bFGF 免疫组化强阳性；C：P53 免疫组化强阳性

图 1　免疫组化染色结果　（S-P×400）

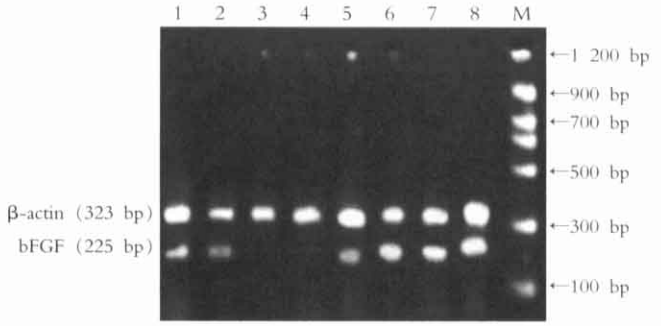
2.2　RT-PCR 结果

侵袭性垂体腺瘤组的 PTTG、bFGF 和 P53 mRNA 表达均较非侵袭性腺瘤组增高，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）（图 2～4）。Pearson 相关分析显示：侵袭性腺瘤组中 PTTG 与 bFGF mRNA 的表达成正相关（$r=0.81$，$P<0.01$）；侵袭性腺瘤组中 bFGF 与 P53 mRNA 表达呈正相关（$r=0.62$，$P<0.01$）；PTTG 与 P53 mRNA 表达呈正相关（$r=0.69$，$P<0.01$）。



1～10：标本；M：标准

图2 PTTG mRNA 在垂体腺瘤的表达



1～8：标本；M：标准

图3 bFGF mRNA 在垂体腺瘤的表达



1～10：标本；M：标准

图4 P53 mRNA 在垂体腺瘤的表达

3 讨论

垂体腺瘤组织学属良性肿瘤，但部分呈侵袭性生长，而细胞的高增殖性和肿瘤新生血管的形成是肿瘤侵袭性生长所必需的基础。本研究从细胞增殖活性和肿瘤新生血管的角度，探讨 PTTG、bFGF 和 P53 与垂体腺瘤发生及侵袭性之间的关系。

近年来，随着对第 1 个在垂体腺瘤高表达的人类垂体腺瘤转化基因（hPTTG）的成功分离，原癌基因 PTTG 与垂体腺瘤生物学特性之间关系的研究不断深入，发现 PTTG 参与细胞周期调控，其表达的增强可促进垂体腺瘤周期的进程，引起细胞过度增殖，同时，文献报道 PTTG 的 C-末端脯氨酸富集区含有 PXXP 花簇，通过 SH3（即 Src 同源结构域 3，SH3 与富含脯氨酸的序列结合介导对脂质二类信使的信号传递）介导的信号转导通路[2]，刺激碱性成纤维生长因子（bFGF）的表达，而 bFGF 是血管形成调控中关键的一步，bFGF 能促进表皮及内皮细胞再生，促进内皮细胞分裂，诱导其从基膜中分离出来，刺激内皮细胞向肿瘤组织趋化运动并形成管状结构，还可以提高组织中血纤维蛋白溶解酶原激活因子类（Pas）及诱导内皮细胞产生其他蛋白酶，促进新生血管形成；同时，bFGF 也诱导垂体细胞 hPTTG 的表达，刺激细胞增殖和分化[3]；并且 Rooprai 等[4]研究证实，bFGF 可以上调胶质瘤中的 MMP-9 的表达，对胶质瘤侵袭性起关键作用。本实验中侵袭性垂体腺瘤的 PTTG 和 bFGF 蛋白及 mRNA 表达水平均明显高于非侵袭组（$P<0.01$），提示 PTTG 和 bFGF 的表达与肿瘤血管形成和垂体腺瘤的侵袭性密切相关。除 bFGF 之外，目前抑癌基因 P53 特异地与 hPTTG 相互作用被认为是 hPTTG 诱导成瘤及侵袭的重要原因之一[5]，P53 的功能为转录因子，生物学功能为 G_1 期 DNA 损伤的检查点，分野生型和突变型两种，而在肿瘤组织中，P53 基因常发生突变，突变后的 P53 失去了正常野生型 P53 的生长抑制、血管生成抑制等作用，不能保证染色体正常数目的维持，且能够刺激细胞生长，促进肿瘤的发生[6]；其突变率见于大约 50% 的人类肿瘤组织中[7]。Heaney 等[5]研究发现，PTTG 的过表达引起 P53 依赖或非 P53 依赖的凋亡体系不能正常作用，PTTG 诱导的非整倍体细胞存活并分裂，促进了细胞发生肿瘤；并且对 PTTG 与 P53 的相互关系研究表明 PTTG 抑制了 P53 的功能而使其不能表达[8]。另外，新的研究发现野生型 P53 基因通过转录后水平抑制 bFGF 的表达，bFGF mRNA 翻译能力与野生型 P53 的表达呈负相关，说明 P53 在 bFGF 的表达调节中有重要作用[8]。本研究中侵袭性垂体腺瘤的 PTTG、bFGF 和 P53 蛋白及 mRNA 表达水平均明显高于非侵袭组（$P<0.01$），提示侵袭性垂体腺瘤中细胞增殖活性和诱导血管生成的活性程度高。

本研究从 PTTG 和 bFGF mRNA 的相关性来看，具有正相关（$r=0.81$，$P<0.01$），说明在侵袭性垂体腺瘤中 PTTG 与 bFGF 的高水平表达常同时存在，PTTG 高表达可以诱导肿瘤细胞产生和分泌 bFGF，而 bFGF 能促进有丝分裂和新生血管形成，bFGF 可促进垂体腺瘤细胞的生长、PRL 转录和分泌、血管形成和细胞增殖，对垂体腺瘤生长和侵袭来说是必需的。同时，bFGF 的表达反过来也诱导 PTTG 的表达，二者协同诱导了垂体腺瘤的形成和侵袭的发生[9]；hPTTG 与 P53 mRNA 的正相关性（$r=0.69$，$P<0.01$），说明它们在

侵袭性垂体腺瘤的高水平表达也常同时存在，提示在垂体腺瘤中，过量表达的PTTG与P53结合，导致细胞中DNA损伤的累积，同时损伤得不到修复，而过量表达的PTTG还抑制P53诱导的凋亡，一方面细胞DNA损伤增加，另一方面发生损伤的细胞得不到修复，而且还不能被清除，这都会加速垂体腺瘤的恶性转化过程[8,9]；P53与bFGF高表达及正相关性（$r=0.62$，$P<0.01$）结论与Riccioni等[10]在星形细胞胶质瘤研究以及Ueba等对人胶质瘤和肝癌细胞培养所得到的实验结果相符，提示bFGF参与垂体腺瘤中血管生成过程受P53的调控，并可能与P53突变后刺激血管生成抑制因子作用、细胞生长抑制或促进细胞凋亡作用的消失有一定的关系。

总之，在垂体腺瘤中PTTG、bFGF及P53三者的高表达与垂体腺瘤侵袭性密切相关，在垂体腺瘤侵袭发生、发展中具有协同作用，对垂体腺瘤临床生物学行为的评估具有十分重要的意义。PTTG、bFGF及P53三者可以作为判定垂体腺瘤侵袭倾向的有效参考指标，指导垂体腺瘤个体化的治疗方案，也为侵袭性垂体腺瘤的分子生物学治疗提供有效的靶基因参考。

参考文献：

[1] Wilson C B. A decade of pituitary microsurgery. The Herbert Olivecrona lecture[J]. J Neurosurg, 1984, 61(5): 814-833.
[2] 田 刚，许民辉，杨继乐，等. PTTG表达与垂体腺瘤侵袭性关系[J]. 第三军医大学学报，2003，25(17)：1567-1569.
[3] McCabe C J, Boelaert K, Tannahill L A, *et al*. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(9): 4238-4244.
[4] Rooprai H K, Rucklidge G J, Panou C, *et al*. The effects of exogenous growth factors on matrix metalloproteinase secretion by human brain tumour cells[J]. Br J Cancer, 2000, 82(1): 52-55.
[5] Heaney A P, Singson R, McCabe C J, *et al*. Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours[J]. Lancet, 2000, 355(9205): 716-719.
[6] Bargonetti J, Manfredi J J. Multiple roles of the tumor suppressor p53[J]. Curr Opin Oncol, 2002, 14(1): 86-91.
[7] Sherif Z A, Nakai S, Pirollo K F, *et al*. Downmodulation of bFGF-binding protein expression following restoration of p53 function[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(10): 771-782.
[8] Bernal J A, Luna R, Espina A, *et al*. Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis[J]. Nat Genet, 2002, 32(2): 306-311.
[9] Hamid T, Kakar S S. PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function[J]. Mol Cancer, 2004, 3: 18.
[10] Riccioni T, Cirielli C, Wang X, *et al*. Adenovirus-mediated wild-type p53 overexpression inhibits endothelial cell differentiation *in vitro* and angiogenesis *in vivo*[J]. Gene Ther, 1998, 5(6): 747-754.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2007)18-1793-01

个案与短篇

光学助视器在老年低视力及盲康复中的应用

刘 波，余琼武，汪 辉 （第三军医大学西南医院全军眼科中心，重庆 400038）

老年人盲和低视力的患病率分别为1.0%和3.7%，光学助视器是提高视力残疾患者视功能的重要手段。本研究分析32例老年视力残疾患者配戴光学助视器后视力改善情况，评价光学助视器在老年视力残疾中的作用，现报告如下。

1 资料与方法

2005年5月至2006年11月我院就诊的老年视力残疾32例，男性19例，女性13例，年龄60-90岁。盲9例，低视力20例（WHO盲及低视力分类标准[1]），视力0.3.3例。

据最佳矫正视力和屈光状态，选用西安市思达光电机械研究所的2-4倍的可调节双或单筒望远镜及物镜帽和+6~+30 D近用眼镜式助视器。

观察指标：配戴助视器后远视力≥0.05为脱盲，远视力≥0.3为脱残，远视力<0.3为无效，近视力≥0.5为有效。1个月后对验配成功者进行复查和对助视器使用情况调查问卷。

2 结果

32例视力残疾病因是：黄斑病变14例（43.8%），高度近视6例（18.8%），视神经萎缩4例（12.5%），青光眼4例（12.5%），其他病因4例（12.5%）。试戴远用助视器后9例盲中7例远视力提高到≥0.05，脱盲率为77.8%；20例低视力中12例远视力≥0.3，脱残率为60.0%，见表1。试戴近用助视器后19例近视力≥0.5，有效率为59.4%。最终20例（62.5%）接受了光学助视器。没有接受光学助视器的原因：25.0%（3例）不需要看书写字；16.6%（2例）为高度近视看书时不需助视器矫正，远用助视器矫正效果不理想；33.4%（4例）的患者认为他的残余视力可以满足日常生活且助视器不会带来多大方便；25.0%（3例）患者光学助视器未能提高视力。1个月后复查，接受光学助视器的20例中有11例（55.0%）在日常生活中使用它，在是否满足期望的调查中：非常满意6例（30.0%），部分满意11例（55.0%），不满意3例（15.0%）。

（下转1796页）

作者简介：刘 波（1979-），男，四川省生由市人，硕士研究生，技师，主要从事眼镜光学和双眼视觉方面的研究。电话：023-68754674，E-mail：liubo618@hotmail.com

收稿日期：2007-01-02；修回日期：2007-06-08