论著

文章编号:1000-5404(2011)19-2004-04

碱性成纤维细胞生长因子及其单克隆抗体对侵袭性垂体腺瘤裸鼠皮下移植瘤的作用

娄四龙[1],戴勤弼[1],毛德强[1],霍 钢[2],廖正步[2] (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所神经外科[1]; 400010 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[2])

[摘要] **目的** 探讨用碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及其不同浓度单克隆抗体(bFGF-Mab)的方法对裸鼠人侵袭性垂体腺瘤移植瘤血管生成和肿瘤生长的影响及可能机制。**方法** 建立50只人侵袭性垂体腺瘤裸鼠皮下移植瘤模型,按区组随机排列方法分成bFGF组,30、20、10 μg/ml 3个抗体浓度的bFGF-Mab组及生理盐水对照组,每组10只,分别给予不同处理后8周终止实验,每周测量肿瘤体积,绘制移植瘤体积曲线;对移植瘤组织用免疫组化法检测CD31的表达,以计算肿瘤组织微血管密度(microvessel density, MVD)。**结果** 与对照组、bFGF组比较,bFGF-Mab组对移植瘤的生长及肿瘤血管生成有明显抑制作用,以30 μg/ml组的抑瘤率(55.71%)最高($P<0.01$);bFGF-Mab各浓度组肿瘤组织中MVD均明显下降,30 μg/ml组(3.36±1.26)下降最明显($P<0.01$)。**结论** bFGF-Mab处理后对裸鼠侵袭性垂体腺瘤皮下移植瘤具有较强的体内抑瘤效应,可能是通过抑制细胞增殖活性及肿瘤血管生成而达到抑制垂体腺瘤的侵袭性生长的。

[关键词] 侵袭性垂体腺瘤;bFGF-Mab;抑瘤效应
[中图法分类号] R73-37; R736.4; R977 [文献标志码] A

Inhibitory effect of bFGF-Mab on subcutaneously transplanted invasive pituitary adenoma in nude mice

Lou Silong[1], Dai Qinbi[1], Mao Deqiang[1], Huo Gang[2], Liao Zhengbu[2] ([1]Department of Neurosurgery, Cancer Institute of Chongqing, Chongqing, 400030; [2]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) and its monoclonal antibody (bFGF-Mab) with different concentrations on angiogenesis and growth of subcutaneously transplanted human invasive pituitary adenoma in nude mice and the possible mechanism. **Methods** Fifty mouse models of subcutaneously transplanted human invasive pituitary adenoma were established and were randomly divided into 5 groups including a bFGF group, a bFGF-Mab 30 mg/ml group, a bFGF-Mab 20 mg/ml group, a bFGF-Mab 10 mg/ml group and a normal saline group (10 mice in each group). The mice were treated for 8 weeks. Tumor volumes were measured, and growth curves of transplanted tumors were drawn every week. Immunohistochemistry was applied to detect CD31 expression to calculate tumor microvessel density (MVD). **Results** As compared with the control group and the bFGF group, the growth and angiogenesis of transplanted tumor in each bFGF-MAb group were significantly inhibited ($P<0.01$); the inhibition rate was higher (55.71%) in the bFGF-Mab 30 mg/ml group than that in the other two bFGF-Mab groups. MVD expression in each bFGF-MAb group was all decreased; the decrease was significant in the bFGF-Mab 30 μg/ml group (3.36±1.26) as compared with other two bFGF-MAb groups ($P<0.01$). **Conclusion** bFGF-Mab has a strong inhibitory effect on the nude mice of subcutaneously transplanted human invasive pituitary adenoma through the inhibition of tumor proliferation, invasion and angiogenesis.

[**Key words**] invasive pituitary adenoma; basic fibroblast growth factor-monoclonal antibody; inhibition effect

Supported by the General Program of Science Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (2008-2-289). Corresponding author: Dai Qinbi, E-mail: qb-dai@163.com

侵袭性垂体腺瘤在临床上手术难以完全切除,治疗效果差,复发率高,是垂体腺瘤治疗的一大难题。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在肾癌、肺癌、白血病等多种恶性肿瘤细胞中过度表达,并能促进肿瘤新生血管生成,进而促进肿瘤生长、浸润和转移[1]。目前研究发现侵袭性垂体腺瘤中

[基金项目] 重庆市卫生局科研基金面上项目(2008-2-289)
[通信作者] 戴勤弼,E-mail: qb-dai@163.com

bFGF强烈表达,对垂体腺瘤侵袭能力具有十分重要的意义[2]。本研究通过bFGF及其不同浓度单克隆抗体(monoclonal antibody, Mab)对荷瘤裸鼠的皮下移植瘤抑瘤效应的观察,并探讨其可能的作用机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

与重庆医科大学病理教研室通过Transwell系统挑选出可用于实验室的高侵袭潜能的垂体腺瘤细胞株;雌性BALB/c(nu/nu)裸小鼠50只,5周龄,体质量(20±2)g,购于上海史莱克研究动物有限公司,由重庆医科大学实验动物中心在无特定病原菌(SPF)环境饲养;bFGF及其单克隆抗体(鼠单克隆IgG抗体)和兔抗鼠/人CD31抗体(工作浓度为1∶1 000)购自Santa Cruz公司;羊抗兔免疫组化试剂盒、DAB显色底物购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 侵袭性垂体腺瘤裸鼠皮下移植瘤模型的建立 取培养中的处于对数生长的高侵袭性的垂体腺瘤细胞采用0.25%胰酶消化,以无血清1640液洗涤,收集细胞并计数,调整活细胞浓度为5×10^7/ml,于每只裸鼠右前肢靠背部皮肤松软处接种0.2ml/只,每只裸鼠皮下接种1点。次日记为接种第1天,待所有荷瘤鼠肿瘤长径超过1 cm时随机分组开始进行处理。

1.2.2 研究分组及处理 将成功建立侵袭性垂体腺瘤裸鼠皮下移植瘤模型的50只裸鼠采用区组随机排列方法随机分成5组,每组10只,分为30、20、10 μg/ml 3个bFGF-Mab抗体浓度组:于每组瘤体周围皮下分3点注射1 ml bFGF-Mab,浓度依次为30、20、10 μg/ml,每3天注射1次;bFGF组:于瘤体周围皮下分3点注射1 ml bFGF(浓度为10 μg/ml);对照组:以等量生理盐水代替;期间均采用瘤周皮下注射给药的方式,同组间注射浓度相同、异组间浓度不同,实验干预后8周终止实验,每周日定时利用游标卡尺测量荷瘤的长径和短径,绘制荷瘤裸鼠皮下移植瘤体积曲线。

1.2.3 抑瘤效应检测 末次处理后24 h采用腹腔麻醉后脊椎脱臼法处死裸鼠,由于皮下移植瘤基本呈卵圆形,用游标卡尺测量瘤结节长径(mm),短径(mm),肿瘤体积采用如下公式计算:体积(mm^3)=长(mm)×宽(mm)×高(mm)×0.52。实验干预前1 d测定肿瘤的长、宽和高,以肿瘤最长径线为长,在长轴中点测定最宽径为宽其厚度为高,以后每周测定1次,此操作为盲法。按体积计算肿瘤体积抑瘤率(volume inhibition rate,VIR):VIR=(1−研究组平均肿瘤体积/对照组平均肿瘤体积)×100%。

1.2.4 免疫组化检测 完整取下的移植瘤组织称质量,以10%福尔马林固定,常规脱水,石蜡包埋后制作4 μm切片,常规脱蜡至水进行兔抗鼠/人CD31抗体标记的免疫组化染色,确定瘤体组织内血管内皮细胞呈棕黄色为阳性,首先在40倍视野下扫视整张石蜡切片,每张切片找出3个肿瘤组织内血管密度最高微血管密集区,在200倍视野下计数每个视野的微血管数量(参照Weidner[3]方法),以均值作为此切片的微血管密度(microvessel density,MVD)。

1.3 统计学处理

采用SPSS 11.5统计软件中的单因素方差分析法进行各研究组间均数的比较,所得数值以$\bar{x}\pm s$表示,用SNK法分别对各组间均数的两两比较进行检验。

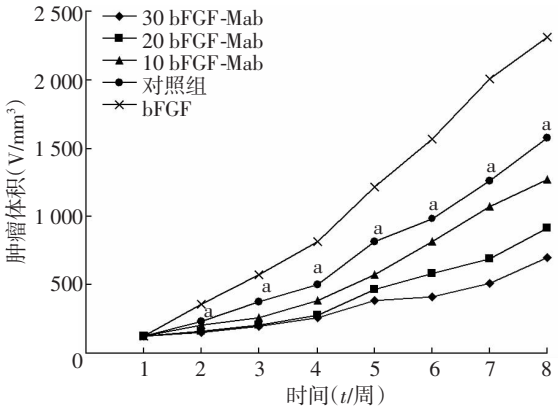
2 结果

2.1 荷瘤鼠人高侵袭性垂体腺瘤皮下移植瘤模型的建立情况

研究过程中50只侵袭性垂体腺瘤皮下移植瘤裸鼠均成活,各个高侵袭性垂体腺瘤细胞悬液接种点未出现红肿溃破及出血表现。接种后30 d,所有裸鼠接种点皮下出现直径大于1 cm的隆起肿块,边缘欠规则,肿块表面皮肤无明显破溃出血。在干预实验处理后8周,裸鼠移植瘤表面皮肤无破损,干预后的侵袭性垂体腺瘤皮下移植瘤从裸鼠上剥离下来肉眼观察呈卵圆形灰白结节,质地中,表面与周围组织易剥离。

2.2 实验处理后对侵袭性垂体腺瘤裸鼠皮下移植瘤生长的影响及抑瘤率

接种后各组小鼠成瘤率是100%,每7天测定肿瘤体积,结果给予bFGF-Mab组肿瘤体积相对于对照组均有不同程度的减小,以30 μg/ml组肿瘤体积最小;bFGF组肿瘤体积最大。30、20、10 μg/ml组移植瘤体积抑瘤率分别为55.71%、48.43%、19.13%;bFGF组相对于对照组肿瘤体积增加了47.04%。各实验组和对照组肿瘤体积的差异有统计学意义($P<0.05$),而30 μg/ml bFGF-Mab组对肿瘤生长的抑制作用更明显($P<0.01$),并且与bFGF-Mab有一定的浓度依赖性(图1)。



a:$P<0.05$,各实验组与对照组比较

图1 裸鼠皮下移植瘤处理后体积随时间变化曲线

2.3 侵袭性垂体腺瘤裸鼠皮下移植瘤内MVD的测定

对皮下移植瘤组织血管内皮细胞特异性抗原CD31的免疫组化染色显示,30 μg/ml组、20 μg/ml组、10 μg/ml组和对照组及bFGF组的MVD分别为(3.36±1.26)、(5.28±1.74)、(6.17±2.35)和(9.72±2.51)及(17.65±3.20),经单因素方差分析,各组间MVD的差异有统计学意义($F=7.59$,$P<0.01$)。可以看出bFGF-Mab能显著抑制侵袭性垂体腺瘤的血管生成,且其抑制作用也呈浓度依赖性,而bFGF能明显促进肿瘤血管生成(图2)。

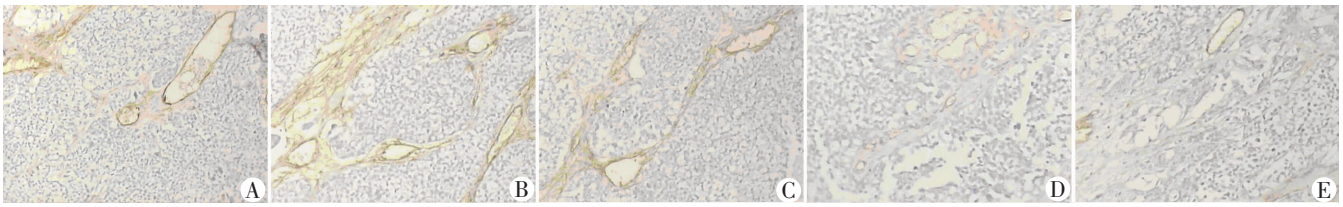


图2 30 μg/ml组(A)、bFGF组(B)、20 μg/ml组(C)、10 μg/ml组(D)、对照组(E)肿瘤组织中MVD免疫组化观察 (IHC×200)

3 讨论

侵袭性垂体腺瘤不同于非侵袭性垂体腺瘤的膨胀性生长方式,手术难以将肿瘤全部切除,垂体腺瘤侵袭海绵窦、挤压或包裹海绵窦内颈内动脉,增加了外科手术的死亡率和病残率,降低了手术的全切率和手术效果,术后往往需要辅助性的放射治疗和药物治疗,但仍有较高的复发。bFGF作为成纤维细胞生长因子家族中的一员,是一种较强的有丝分裂原,目前研究发现bFGF在侵袭性垂体腺瘤中高表达并与侵袭程度呈正相关[2],bFGF作为一种较强的有丝分裂原,通过与靶细胞上的受体结合后,受体二聚化,启动级联信号传递,调控基因表达,发挥促进细胞分裂增殖、细胞迁移和新生血管生成等作用[4]。近年研究发现,垂体腺瘤细胞自身产生bFGF的同时,可诱导血管内皮细胞产生bFGF,通过自分泌和旁分泌机制作用于肿瘤和内皮细胞,引起腺瘤细胞快速增殖以及肿瘤新生血管的发生,是垂体腺瘤侵袭性增高的基础。而bFGF-Mab不仅能逆转腺瘤细胞的恶性转化,而且可以有效降低腺瘤组织中的游离bFGF以及阻断bFGF细胞间的信息传递阻止腺瘤细胞的分裂增殖、侵袭及腺瘤新生血管生成的作用[4-5]。bFGF抗体药物因其靶向性、特异性好而毒性低已被许多学者用于不同肿瘤治疗的研究,本研究表明在不同浓度bFGF-Mab组与对照组相比,bFGF-Mab能明显抑制侵袭性垂体腺瘤裸鼠移植瘤的生长和血管生成,并呈一定浓度依赖性;bFGF对肿瘤增殖及肿瘤新生血管的形成起促进作用。

近年来随着分子生物靶向药物研究的发展,bFGF及其抗体已被许多学者用于许多恶性肿瘤治疗的研究,而对于垂体腺瘤侵袭性的发生和肿瘤血管生成方面的影响的研究却很少,我们通过动物实验研究发现每周2次连续8周在荷瘤鼠瘤体周围分3点注射1 ml的bFGF-Mab,浓度依次为30、20、10 μg/ml;以及周围分3点注射1 ml bFGF(浓度为10 μg/ml)与对照组比较发现30 μg/ml bFGF-Mab组裸鼠移植瘤抑瘤最明显,MVD也最少,分别为对照的55.71%和34.56%,bFGF-Mab的各不同浓度组和对照组在移植瘤生长和MVD上差异有统计学意义,表明bFGF-Mab能明显抑制垂体腺瘤的增殖和血管生成并呈浓度依赖,这一结果与在肺癌及卵巢癌的研究结果相似[6-7]。相反,10 μg/ml bFGF组与对照组比较,促进肿瘤生长及MVD的增加,分别增加了47.04%和81.52%,bFGF能明显促进垂体腺瘤的增殖和MVD形成。这些研究结果均表明bFGF在垂体腺瘤侵袭性生长中可能起着非常重要的作用,bFGF-Mab能明显抑制垂体腺瘤侵袭性生长和肿瘤血管发生。

高浓度的bFGF-Mab能明显抑制侵袭性垂体腺瘤裸鼠移植瘤细胞增殖和肿瘤微血管的生成,其可能抑制垂体腺瘤侵袭的机制可能是:①bFGF是目前所发现的体内具有强烈的刺激细胞增殖分化和促进表皮、内皮细胞再生,促进血管内皮细胞分裂,诱导其从基底膜中脱离,同时与基质金属蛋白酶、黏合素分子、血管内皮细胞生长因子和细胞外基质等多因子、多层次相互关联、相互制约肿瘤侵袭性,高浓度bFGF-Mab能降低肿瘤细胞外游离的bFGF的浓度还能与已经肿瘤细胞膜表面受体结合的bFGF-受体复合物结合,从而阻断bFGF在细胞间信息传递,抑制其肿瘤分裂增殖、新生血管生成形成的侵袭性[8-10]。②bFGF-Mab可以调节肿瘤血管新生的调节网络相互协同作用,从而提高肿瘤内新生血管的成熟度和减低其渗透性,这些是垂体腺瘤细胞发生侵袭的物质基础[11-13]。因此bFGF-Mab抑制侵袭性垂体腺瘤和细胞增殖和肿瘤微血管的生成过程可有效阻止腺瘤侵袭。本研究发现高浓度的bFGF-Mab可显著地抑制侵袭性垂体腺瘤裸鼠移植瘤生长和肿瘤微血管密度,这可能是bFGF-Mab有效抑制垂体腺瘤侵袭性的主要原因。

综上所述,本研究在裸鼠移植瘤模型上证实了bFGF-Mab对侵袭性垂体腺瘤的生长有较强的体内抑瘤效应,并且能实现与浓度有关的靶向治疗作用,使bFGF-Mab可能成为今后侵袭性垂体腺瘤生物治疗的一种新方法,显示出良好的临床应用前景。bFGF-Mab抗体药物可能成为今后侵袭性垂体腺瘤综合治疗中一种新的生物治疗手段。

参考文献:

[1] Ribatti D, Vacca A, Rusnati M, *et al*. The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor -2 and its role in haematological malignancies[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2007, 18(3/4): 327-334.

[2] 娄四龙, 霍钢, 郑履平, 等. PTTG、bFGF和P53的表达与垂体腺瘤侵袭性的关系[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(18): 1790-

1793.
[3] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 9 - 19.
[4] Presta M, Dell, Era P, Mitola S, *et al*. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis [J]Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(2): 159 - 178.
[5] 夏钰弘, 杨国仪, 洪建刚, 等. IGFBP-3、bFGF、Ki-67 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及意义[J]. 江苏医药, 2009, 35(1): 41 - 43.
[6] 向军俭, 李丹, 王宏, 等. bFGF 单克隆抗体抑制小鼠 Lewis 肺癌转移及血管新生[J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(6): 401 - 405.
[7] 林卫, 杨延林, 彭芝兰, 等. bFGF 单克隆抗体对卵巢癌移植瘤血管生成的抑制作用[J]. 现代妇产科进展, 2005, 14(4): 281 - 284.
[8] Zhao M, Gao F H, Wang J Y, *et al*. JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2011, 73(3): 366 - 374.
[9] Pardo O E, Wellbrock C, Khanzada U K, *et al*. FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKC-epsilon, B-Raf and S6K2[J]. EMBO J, 2006, 25(13): 3078 - 3088.
[10] Pardo O E, Latigo J, Jeffery R E, *et al*. The fibroblast growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks small cell lung cancer growth in vitro and in vivo[J]. Cancer Res, 2009, 69(22): 8645 - 8651.
[11] Kuhn H, Konrad J, Holtz S, *et al*. Enhanced expression of VEGF following bFGF inhibition in non small cell lung cancer cell lines[J]. Lung Cancer, 2006, 54(2): 149 - 153.
[12] Alessi P, Leali D, Camozzi M, *et al*. Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist[J]. Eur Cytokine Netw. 2009, 20(4): 225 - 234
[13] Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, *et al*. Enhancement of basic fibroblast growth factor-stimulated VEGF synthesis by Wnt3a in osteoblasts [J]. Int J Mol Med, 2011, 27(6): 859 - 864.

(**收稿**:2011-04-18;**修回**:2011-06-20)
(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2011)19-2007-01

个案与短篇

1 例 May-Hegglin 异常的漏诊与血细胞镜检

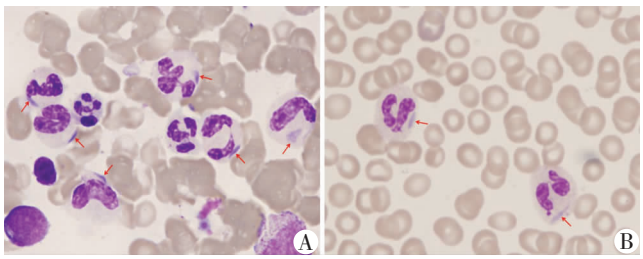
幸建英,刘 兰,向加林 (563003 贵州 遵义,遵义医学院附属医院检验中心)

[**关键词**] May-Hegglin 异常;漏诊;血细胞镜检
[**中图法分类号**] R558.04 [**文献标志码**] B

近年来血常规检验几乎完全依赖于血细胞分析仪,却忽略了血细胞的人工镜检技能,造成漏诊、误诊的事例,甚至引发医疗纠纷[1],笔者遇 1 例 May-Hegglin 异常(May-Hegglin anomaly, MHA)患者,多次因忽略细胞形态学检验而被漏诊,现报告如下。

1 临床资料

患者,女性 ,40 岁 ,2008 年 2 月因煤气中毒,收住当地市人民医院,几天后治疗好转出院,在此期间发现血小板减低,并患有子宫肌瘤;2009 年 4 月因子宫肌瘤,到当地职工医院复检,患者主诉:发现子宫肌瘤 1 年。阴道 B 超提示:子宫实性占位,右附件囊性包块。查血常规:血小板(21×10^9/L)。内科会诊:血小板减少,建议骨穿。因患者恐惧骨穿,放弃继续检查出院。2010 年 4 月 23 日,患者感觉双乳疼痛,就诊于我院门诊。查血常规:WBC 7.3×10^9/L,Hb 125g/L,PLT 22×10^9/L。于当月 27 日行骨髓穿刺检验提示:粒系中幼粒及以下各阶段粒细胞胞质中均可见形如杜勒氏小体样的蓝色斑块物(图 1A),该蓝色斑块物相对杜勒氏小体规则有形,每细胞中可见 1 ~ 3 条甚至多条,1 ~ 4 μm,呈棒状、丝状、新月形等。含异常蓝斑的粒细胞可达 90% 以上,并在少量的嗜酸、嗜碱粒细胞及单核细胞中也可见;巨核细胞数不少(约 32 个/片),分类见有成熟停滞现象,血小板偏少,体积偏大,细胞质蓝染,偶见巨大血小板。其他系未见明显异常;血涂片分类:多数中性粒细胞胞质中仍见蓝色斑块样物(图 1B),其形态与髓片相似,血小板少见。以此同时血涂片作中性粒细胞碱性磷酸酶染色其:阳性率为 3%,积分为 5 分。骨髓报告意见示:大量粒细胞中易见蓝色斑块样物,形态相对规则有别于杜勒氏样小体,建议临床抗炎治疗追踪观察排除有无感染、病毒包涵体及寄生虫的可能,并要求作染色体分析排除有无基因疾病的可能。



A:髓片;B:血涂片;↑:异常包涵体

图 1 May-Hegglin 异常患者中性粒细胞异常包涵体 (瑞氏染色 ×1 000)

由于实验及患者经济条件所限我们分时间段对患者及家族成员血涂片瑞氏染色光镜下观察细胞形态,并计数异常包涵体粒细胞,经对患者在 1 周、1、2、3 个月及半年血涂片染色细胞学镜检结果:含异常包涵体粒细胞的百分率分别为 90%、92%、95%、96%、94%,没有减轻或消除的迹象。患者母亲及患者的 2 个女儿都有血小板数量的减少及形态的改变,异常包涵体粒细胞的百分率分别为 92%、95%、98%。患者哥哥及侄子均未见明显异常(图 2)。

(下转 2011 页)

[**通信作者**] 幸建英,电话:(0852)8608425,E-mail: xjianying119@163.com