基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1825-03

PLGF 及其受体 VEGFR-1 在侵袭性垂体腺瘤中的表达

张 毅,霍 钢,冯清林,杨 刚,唐茂源,贺学农
(重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨胎盘生长因子(Placenta growth factor,PLGF)及其受体血管内皮生长因子受体-1(Vascular endothelial growth factor receptor-1,VEGFR-1)在侵袭性和非侵袭性垂体腺瘤中的表达及与垂体腺瘤侵袭发生发展的相关性。方法:收集 57 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 PLGF 和 VEGFR-1 蛋白的表达,RT-PCR 法检测 PLGF 和 VEGFR-1 mRNA 的表达,分析侵袭组和非侵袭组 PLGF 和 VEGFR-1 表达水平的差异。结果:57 例垂体瘤患者中,30 例为侵袭性垂体腺瘤,27 例为非侵袭性垂体腺瘤。侵袭性垂体腺瘤组 PLGF 和 VEGFR-1 的蛋白和 mRNA 表达均较非侵袭性腺瘤组增高。结论:垂体腺瘤的侵袭性与 PLGF 和 VEGFR-1 蛋白及 mRNA 的高表达密切相关,二者可能参与侵袭性垂体腺瘤的发生及发展过程。

【关键词】胎盘生长因子;血管内皮生长因子受体;垂体腺瘤
【中国图书分类法分类号】R739.41 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-14

Expressions of PLGF and VEGFR-1 in invasive pituitary adenoma

ZHANG Yi, et al
(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the expressions of PLGF (Placenta growth factor) and VEGFR-1 (Vascular endothelial growth factor receptor-1) in pituitary adenoma and their relationship with the invasiveness of the adenoma. *Methods*: 57 specimens of pituitary adenoma were classified into invasive and non-invasive group according to the comprehensive evaluation of invasive pituitary adenoma. The protein expressions of PLGF and VEGFR-1 were detected by immunohistochemical analysis and their mRNA expressions were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the invasive and non-invasive pituitary adenomas. *Results*: 30 specimens of pituitary adenoma were invasive and 27 were non-invasive. The protein expressions of PLGF and VEGFR-1 were significantly higher in invasive pituitary adenomas than in non-invasive ones. Their mRNA expressions were higher in invasive pituitary adenomas too. *Conclusion*: The expressions of PLGF and VEGFR-1 are higher in invasive pituitary adenomas, which may relate to their invasiveness.

【Key words】PLGF; VEGFR-1; Pituitary adenoma

垂体腺瘤属良性肿瘤,但部分呈侵袭性生长,通过手术难以彻底切除,同时术后也有较高的复发率,此类垂体腺瘤统称为侵袭性垂体腺瘤。目前,侵袭性垂体腺瘤发生、发展的机制仍不清楚,它可能是一由多种机制共同参与、多种因素共同作用的复杂的生物学过程[1]。新生血管的生成在肿瘤的发生发展中起着重要的作用,也是今年来研究的热点。已公认血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)家族及其受体在促进血管生成方面起着重要作用,其与肿瘤的相关性已被大量研究所证实,而 VEGF 家族成员胎盘生长因子(Placenta growth factor,PLGF)及其受体血管内皮生长因子-1(Vascular endothelial growth factor receptor-1,VEGFR-1)在促进血管生成方面的作用是近年来研究的重点。本研究从新生血管生成的角度出发,探讨 PLGF 和 VEGFR-1 的表达与垂体腺瘤侵袭性之间的关系。

作者介绍:张 毅(1965-),男,副主任医师,硕士,研究方向:鞍区疾病。
通讯作者:霍 钢,男,主任医师,E-mail:xiaomin198171@tom.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂 PCR 仪;离心机(sigma);凝胶成像仪;LEICA 显微镜;兔抗人 PLGF 和 VEGFR-1 多克隆抗体购自 bioworld 公司;SP 试剂盒及 DAB 显色剂购自北京中杉公司购自北京中杉金桥生物有限公司;Trizol 试剂、RT-PCR 试剂盒(TKALA 公司);PLGF、VEGFR-1 引物由上海生工生物有限公司设计并合成。

1.1.2 标本采集 临床资料。垂体腺瘤标本来自 2009 年 4 月至 2009 年 12 月重庆医科大学神经外科 57 例垂体腺瘤患者组织标本。其中男 25 例,女 32 例,年龄 16~65 岁,平均 41.6 岁。侵袭性垂体腺瘤的判断标准:①采用 Wilson 改良的 Hardy 分类法[3],将Ⅲ~Ⅳ级或 C、D、E 期的肿瘤归为侵袭性腺瘤;②术前 CT 及 MRI 可见海绵窦、鞍旁及下丘脑等邻近结构的破坏;③术中所取鞍底骨质或邻近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,肿瘤突入蝶窦腔或侵入鞍旁的血管神经。符合其中之一者即可确定为侵袭性垂体腺瘤。57 例标本中,30 例为侵袭性,27 例为非侵袭性垂体腺瘤,均为病理学确诊病例。手术时取所需组织用生理盐水洗净积血,一部分置入 4%多聚甲醛溶液内固定,另一部分新鲜肿瘤组织,放入经焦碳酸二乙酯水处理过的冻存管中,置入液氮备用。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测(SP 法) 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:PLGF 以细胞质或细胞膜呈清晰黄色或棕黄色为阳性,VEGFR-1 以细胞质或细胞膜呈黄色或棕黄色为阳性。在高倍(×400)视野下计算 200 个肿瘤细胞(共计 5 个视野,取其平均值),计算免疫反应阳性的细胞百分比。根据半定量免疫组织化学 PLGF 和 VEGFR-1 反应阳性细胞显色强度及范围进行评价:①阴性(-):无阳性细胞染色。②弱阳性(+):阳性细胞小于 50%或显色浅。③强阳性(++)阳性细胞大于 50%或显色深。

1.2.2 逆转录-聚合酶链反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)分析 按 Trizol 试剂说明书步骤提取总 RNA,-80℃保存备用。PLGF、VEGFR-1、β-actin 上下游引物均由上海生工生物工程有限公司设计并合成。PLGF 上游引物序列:5'-GCTGTTCCCT TGC TTCCTGC-3';下游引物序列:5'- CCCTTGGGTC TCCTCCTT TCC -3',产物长度 423 bp。VEGFR-1 上游引物序列:5'-CT TTGTCTTT CGCCACTTCTC-3',下游引物序列:5'-CATTCG TTCCAACA CTTACCG -3',产物长度 434 bp;β-actin 上游引物序列:5'-TGACGTGGAC ATCCGCAAAG-3',下游引物序列:5'-CTG GAAGGTG GACAGCGAGG-3',产物长度 200 bp。RT 扩增条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s;PCR 扩增条件:94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 1 min,循环 30 次,72℃延伸 5 min。分别取 5 μl 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳(含 0.2 goldview);紫外灯下拍照,采用 Quanity-one 图像分析软件比较电泳条带光密度值,获得该样本 PLGF 和 VEGFR-1 mRNA 的相对表达水平量。

1.3 统计学分析

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据处理在 SPSS 17.0 统计软件包上完成。结果采用 t 检验、χ^2 检验进行统计学处理。$P<0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组化结果

PLGF 和 VEGFR-1 表达于垂体腺瘤细胞膜和细胞浆,免疫组化染色可见其胞膜和胞浆被染成黄色或棕黄色,如图 1。侵袭性垂体腺瘤组组织中 PLGF 阳性表达率分别76.73%,非侵袭性垂体腺瘤组组织中其阳性表达率为 40.74%(表 1),2 组阳性比较差异具有统计学意义($P<0.05$);侵袭性垂体腺瘤组组织中 VEGFR-1 阳性表达率分别为 86.67%,非侵袭性垂体腺瘤组组织中其阳性表达率分别为 48.15%(表 1),2 组阳性比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 RT-PCR 结果

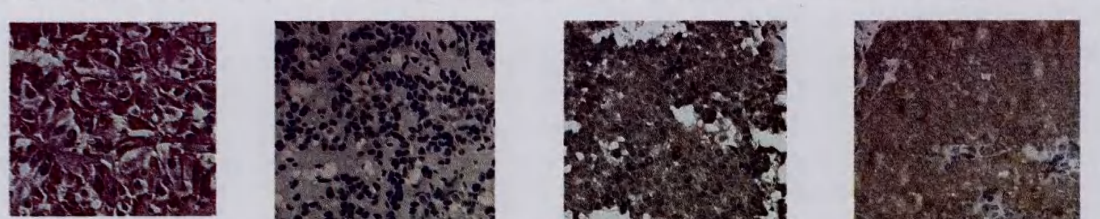
侵袭性垂体腺瘤组组织 PLGF 的 mRNA 表达量(0.582 ± 0.166)明显高于非侵袭性垂体腺瘤组(0.342 ± 0.147),差异具有统计学意义($P<0.01$),如图 2;侵袭性垂体腺瘤中VEGFR-1 的 mRNA 表达(0.660 ± 0.212)明显高于非侵袭性垂体腺瘤组(0.371 ± 0.134),差异具有统计学意义($t=6.073$,$P<0.01$),见图 3。

3 讨 论

在对肿瘤的发生、转移、复发等机制的研究中,人们逐渐

表 1 垂体腺瘤组织中 PLGF 和 VEGFR-1 的蛋白阳性表达

分组	总例数	PLGF	VEGFR-1
侵袭组	30	23(76.73%)	26(86.67%)
非侵袭组	27	11(40.74%)	13(48.15%)

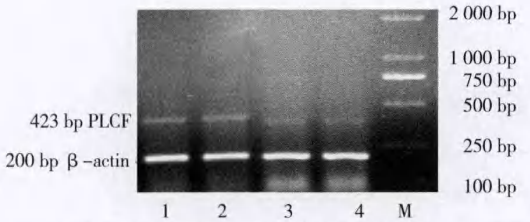


A. 侵袭性垂体腺瘤组织 HE 染色 (×400)　B. 垂体腺瘤免疫组化阴性对照(-)(×400)　C. 侵袭性垂体腺瘤 VEGFR-1 免疫组化表达阳性(+)(×400)　D. 侵袭性垂体腺瘤 PLGF 免疫组化表达强阳性(+)(×400)

图 1 免疫组化检测垂体腺瘤组织 PLGF 和 VEGFR-1 的表达

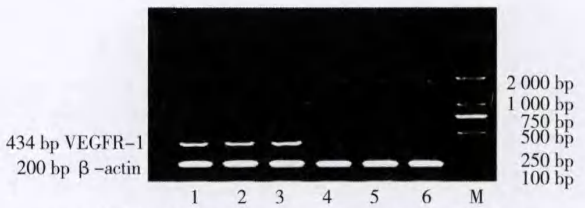
表 2 垂体腺瘤组织中 PLGF 及 VEGFR-1 mRNA 的表达

组别	例数	PLGF 表达量(μg/μl)	VEGFR-1 表达量(μg/μl)
侵袭性垂体腺瘤	30	0.582 ± 0.166	0.660 ± 0.212
非侵袭性垂体腺瘤	27	0.342 ± 0.147	0.371 ± 0.134



1、2 为侵袭性垂体腺瘤;3、4为非侵袭性垂体腺瘤;M为 marker

图 2 PLGF mRNA 在垂体腺瘤中的表达



1、2、3 为袭性垂体腺瘤;4、5、6为非侵袭性垂体腺瘤;M 为 marker

图 3 VEGFR-1 mRNA 在垂体腺瘤中的表达

认识到新生血管的生成在恶性肿瘤的生长和发展过程中起到了重要的作用。VEGF 是目前已知的诱导血管生成作用最强的调节因子,和肿瘤的发生、发展有着密切的关系。PLGF 属于 VEGF 家族,是该家族中重要的成员之一。PLGF 可能参与肿瘤新生血管的生长调控,诱导新生血管增殖,血管的增殖又为肿瘤的侵袭与转移提供了条件,从而形成了恶性循环。其基因定位于 14q24~q31,由 7 个外显子组成,根据编码基因mRNA 不同的剪接方式,有 4 种异构体即:PLGF-1(PLGF131)、PLGF-2(PLGF152)、PLGF-3(PLGF203)、PLGF-4(PLGF224)[2]。其分子特异性的受体是 VEGFR-1(即 Flt-1),PLGF 与 Flt-1 受体结合并激活受体发生磷酸化,通过酪氨酸蛋白激酶激活途径将信号传入胞内,发挥生物学效应[3]。PLGF 通过 SDF-1/CXC11 动员单核细胞和巨噬细胞参与血管的新生,而激活的炎性细胞可以分泌 PLGF 及其他促血管生成因子[4]。PLGF 可能由以下几个机制促进血管新生[5]:①PLGF 与 VEGFR-1 结合可以通过激活 p38MAPK 直接促进血管内皮细胞尤其是微血管内皮细胞的增殖,具有诱导血管内皮细胞增殖、迁移和激活的作用;②PLGF 可以从 VEGFR-1 置换出 VEGF-A,促进更多 VEGF-A 与 VEGFR-2 结合而发挥作用;③PLGF 能增强低浓度 VEGF-A 对血管内皮细胞的生物学作用;④PLGF和 Flt-1 结合以后,能够诱导单核细胞产生组织因子,促进单核细胞和巨噬细胞的趋化性聚集和活化,而单核细胞和巨噬细胞的趋化性聚集和活化在血管形成中起重要作用;⑤PLGF和 Flt-1 结合,对骨髓中的造血祖细胞动员、归巢、分化起着一定的作用。PLGF 不但能直接激活 VEGFR-1 阳性的平滑肌细胞和成纤维细胞募集,也能通过活化内皮细胞释放生长因子间接影响平滑肌细胞增殖和迁移。通过动员平滑肌细胞到只由血管内皮细胞组成的"裸"血管周围,形成稳定、成熟的血管[6]。

研究表明许多疾病和一些肿瘤都过度表达 VEGFR-1,如非小细胞性肺癌、肺腺癌、前列腺癌、乳腺癌、大肠癌、肝细胞癌、胶质母细胞瘤、多发性骨髓瘤;PLGF 在皮肤癌、乳腺癌、前列腺癌中高表达[7-9]。通过 RNA 酶抑制 PLGF 的蛋白和 mRNA 的表达后,肺癌细胞的转移和粘附能力能显著降低[10]。然而 PLGF 及其受体 VEGFR-1 在侵袭性垂体腺瘤中的表达情况,在垂体腺瘤的侵袭性发生、发展中的作用机制和在肿瘤治疗方面能否发挥作用等仍然不清,目前国内外也无相关资料报道。

本研究通过采用 RT-PCR 和免疫组织化学相结合的方法检测 PLGF 及其受体 VEGFR-1 在侵袭性垂体腺瘤中的表达情况,对其进行定性和半定量检测。PLGF 及其受体VEGFR-1 蛋白在侵袭性垂体腺瘤组中的表达量明显高于非侵袭性垂体腺瘤组;RT-PCR 检测结果也提示侵袭性垂体腺瘤组中 PLGF 及其受体 VEGFR-1 基因的 mRNA 表达量也明显高于非侵袭性垂体腺瘤组。这些结果均提示 PLGF 及其受体 VEGFR-1 在侵袭性垂体腺瘤中的表达较非侵袭性垂体腺瘤增高,因此 PLGF 及其受体 VEGFR-1 可能在侵袭性垂体腺瘤的发生和发展过程中起着重要作用,可能成为临床治疗的新靶点。但二者之间的具体作用机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 田家坤, 霍 钢, 易 勇,等. VEGF 和 MMP-2 在垂体腺瘤中的表达及其相互关系的研究[J]. 重庆医科大学学报,2005,30(6):824-827.

[2] Ribatti D. The discovery of placental growth factor and its role in angiogenesis:a historical review[J]. Angiogenesis, 2008,11(3):215-221.

[3] Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1(Flt-1)[J].Int J Biochem Cell Biol,2001,33(4):409-420.

[4] Marcellini M,De Luca N,Riccioni T,et al. Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor[J]. Am J Pathol,2006,169(2):643-654.

[5] Zhao B, Cai J, Boulton M, et al. Expression of placenta growth factor is regulated by both VEGF and hyperglycaemia via VEGFR-2[J].Microvasc Res,2004,68(3):239-246.

[6] Autiero M,Luttun A,Tjwa M,et al. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1:novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularizat-ion and inhibition of angiogenic and Inflammatory disorders[J].J Thromb Haemost,2003,1(7):1356-1370.

[7] Chen C N,Hsieh F J,Cheng Y M,et al.The significance of placenta growth f actor angiogenesis and clinical out come of human gastic cancer [J]. Cancer Lett,2004,213(1):73-82.

[8] Woo I S,Park M J,Byun J H,et al.Expression of placental growth factor gene in lung cancer [J] .Tumor Biol,2004,25(122):1-6.

[9] Wei S C,Tsao P N,Yu S C,et al. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer[J].Gut,2005,54:666-672.

[10] Chen J F,Ye L,Zhang L J,et al. Placenta growth factor,PLGF, Influences the motility of lung cancer cells, the role of rho associated kinase,Rock1[J].Journal of Cellular Biochemistry,2008,105: 313-320.

(责任编辑:冉明会)