维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0824 - 04

VEGF 和 MMP - 2 在垂体腺瘤中的表达及其相互关系的研究

田加坤,霍 钢,易 勇,李九州

(重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶 - 2(MMP - 2)在垂体腺瘤中的表达及其与垂体腺瘤侵袭性的相关性。方法 用免疫组化 SP 法和 RT - PCR 方法对 55 例垂体腺瘤标本的 VEGF 及 MMP - 2 表达进行研究,分析其表达与侵袭性垂体腺瘤的关系及两者之间的相关性。结果 VEGF 在侵袭性垂体腺瘤中的强阳性及阳性表达率分别为 56.3% 和 100%,明显高于非侵袭性垂体腺瘤中的 17.4% 和 56.5%($P<0.05$),MMP - 2 在侵袭性垂体腺瘤中的强阳性及阳性表达率分别为 65.6% 和 93.8%,明显高于非侵袭性垂体腺瘤中的 13.0% 和 43.5%($P<0.01$)。侵袭性垂体腺瘤组中 VEGF mRNA 的表达明显高于非侵袭性垂体腺瘤组(0.768 ± 0.050,0.209 ± 0.032,$P<0.01$),侵袭性垂体腺瘤组中 MMP - 2 mRNA 的表达明显高于非侵袭性垂体腺瘤组(1.126 ± 0.081,0.425 ± 0.083,$P<0.01$)。侵袭性腺瘤组中 MMP - 2 与 VEGF 的表达成正相关($r=0.463$,$P<0.01$),非侵袭性腺瘤组中 MMP - 2 与 VEGF 的表达无明显相关性。结论 MMP - 2 及 VEGF 的高表达与垂体腺瘤的侵袭性密切相关。MMP - 2 与 VEGF 在肿瘤侵袭及新生血管形成过程中存在着内在联系。

【关键词】VEGF; MMP - 2; 垂体腺瘤; 侵袭; 血管形成

【中国图书分类法分类号】R739.41 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 05 - 08

Expressions and their Relationship of VEGF and MMP - 2 in Pituitary Adenomas

Tian Jiakun, et al

(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objective: To detect the expressions of VEGF and matrix metalloproteinase - 2 (MMP - 2) in invasive pituitary adenomas and noninvasive pituitary adenomas, and to evaluate the relationship between the expression of VEGF and pituitary adenomas. methods: The expressions of VEGF、MMP - 2 and MMP - 2 were examined by immunohistochemical method, and the expressions of VEGF and MMP - 2 mRNA were also examined by RT - PCR assay. The correlation between VEGF and MMP - 2 , and the correlation between expression of VEGF、MMP - 2 and invasiveness of pituitary adenomas were studied. Results: The intense expression and total expression rate of VEGF of pituitary adenomas patients with invasion (56.3% , 100% respectively) were significantly higher than those without (17.4% , 56.5% respectively, $P<0.05$), and the intense expression and total expression rate in MMP - 2 in pituitary adenomas patients with invasion (65.6% , 93.8% respectively) were also significantly higher than those without (13.0% , 43.5% respectively, $P<0.01$). Both mRNA expressions of VEGF and MMP - 2 were also observed significantly higher in invasive pituitary adenomas (0.768 ± 0.050, 1.126 ± 0.081 respectively) than those without invasion (0.209 ± 0.032, 0.425 ± 0.083 respectively, $P<0.01$). There was a positive correlation between VEGF and MMP - 2 mRNA expressions in invasive pituitary adenomas ($r=0.463$, $P<0.01$), and there was no correlation between them in noninvasive pituitary adenomas. Conclusions: VEGF and MMP - 2 might be associated with the aggressiveness and invasion in pituitary adenomas, and they might have close relationship in the invasiveness and angiogenesis of pituitary adenomas.

【Key words】VEGF; MMP - 2; Pituitary adenomas; Invasion; Angiogenesis

垂体腺瘤属于良性肿瘤,一般不发生转移,但大约有 30% 侵入到周围结构,其侵润性生长与其他肿瘤一样也是血管依赖性的,因此有效的阻断肿瘤的血供和抑制肿瘤新生血管的形成能抑制肿瘤的生长[1]。血管内皮生长因子是肿瘤组织中促血管生成的最主要的血管生成因子[2]。基质金属蛋白酶是一组蛋白水解酶,能破坏基底膜和结缔组织,在肿

作者介绍:田加坤(1976 -),男,住院医师,硕士,主要研究方向:侵袭性与垂体腺瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

瘤的侵袭过程中起着重要的作用。我们应用免疫组织化学和 RT - PCR 两种方法检测垂体腺瘤中 VEGF 和 MMP - 2 的表达，以探讨其表达与侵袭性垂体腺瘤的关系及两者之间的相关性，并进一步阐明 MMP - 2 在垂体腺瘤侵袭性行为中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

垂体腺瘤标本来自 2003 年 5 月至 2004 年 7 月，重庆医科大学神经外科 55 例垂体腺瘤患者的组织标本。其中男 29 例，女 26 例。平均年龄 43.8(14 ~ 70)岁。32 例为侵袭性，23 例为非侵袭性垂体腺瘤，均经手术治疗和病理检查确诊。

侵袭性垂体腺瘤的判断标准：(1) 结合 Wilson 改良的 Hardy[3] 分类法及 Knosp[4] 分级、分期标准，判断垂体腺瘤侵袭性。本研究中将 Wilson 改良的 Hardy 分类法 III ~ IV 级或 C、D、E 期和/或 Knosp2 级以上作为垂体腺瘤侵袭性的判断标准。(2)术前影像学改变，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、鞍底硬膜经病理学检查证实有肿瘤细胞侵犯，可确定该肿瘤为侵袭性。(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海绵窦及鞍旁。符合其中之一者即可确定为侵袭性腺瘤。

1.2 方法

组织标本收集及处理　手术时取所需组织，一部分置入 10% 甲醛溶液内固定，另一部分新鲜肿瘤组织，用生理盐水洗净，立即置入液氮备用。

1.2.1 免疫组织化学(SP 法)

主要试剂：MMP - 2 兔抗人多克隆抗体购自深圳晶美公司，VEGF 兔抗人多克隆抗体，SABC 试剂盒及 DAB 显色剂购自北京中山公司，其他试剂由重庆医科大学组胚教研室提供。

步骤：垂体腺瘤标本经 10% 甲醛固定，石蜡包埋作 5μm 组织连续切片。组织切片用二甲苯常规脱腊各 30 min，梯度乙醇水合各 5min，一张作 HE 染色(图 1)用于重新确认病理结果，其余切片作免疫组织化学染色。切片常规脱蜡至水后，H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶，微波修复抗原，正常山羊血清封闭，分别滴加 VEGF 及 MMP - 2 单抗，4℃ 过夜，滴加生物素化二抗及过氧化物酶标记的抗体，DAB 显色，苏木精复染，脱水透明封片。阴性对照选择 PBS 代替一抗(图 2)。

判断标准：VEGF 以细胞质呈棕黄色或黄色为阳性(图 3)，MMP - 2 以细胞质呈清晰棕黄色或棕色为阳性(图 4)。在 ×400 视野下计算 200 个肿瘤细胞，计算免疫反应阳性的细胞百分比。根据 VEGF 及 MMP - 2 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(RT - PCR)分析

逆转录 PCR(RT - PCR) Trizol (Invitrogen Life Technologies 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 260nm 和 280nm 的吸收值确定，按 OD260 = 40μgRNA 计算 RNA 的产率，OD260/280 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 - action(产物大小 323bp)及 PCR 引物皆由上海博亚生物技术有限公司提供。PCR 反应条件：① 94℃ 预变性 5min，②35 循环：94℃ 45s，55℃ 45s，72℃ 1min15s，③72℃ 延伸 5min。

制备 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5μg/ml EB)，分别取 5PCR 产物进行电泳，紫外灯下拍照，采用图像分析软件 Scion Image(Beta 4.02 版，Scion Corporation)比较电泳条带相对光密度值，获得 VEGF、MMP - 2 mRNA 相对表达量。

VEGF、MMP - 2 及 β - actin 引物序列(引物均经 Primer premier version 5.0 软件设计，oilgo6.65 软件验证)见表 1。

表 1　VEGF、MMP - 2 及 β - actin 引物序列

引物名称	引物序列	扩增片断长度
VEGF	Antisense 5′ - GAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC - 3′ Sense 5′ - CGATCGTTCTGTATCAGTCTTTCC - 3′	541bp
MMP - 2	Antisense 5′ - TTGGTGTAGGTGTAAATGGGTG - 3′ Sense 5′ - TGGCAAGTACGGCTTCTGTC - 3′	483bp
β - actin	Antisense 5′ - GCCATTCACCGATTCAGTCGTC - 3′ Sense 5′ - AGCGCGTCCCGTCAAGTCAG - 3′	323bp

PCR 产物的相对定量：PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，然后行光密度扫描，以 VEGF 或 MMP - 2 的光密度值与内参照 β - action 的光密度之比值作为相互间比较的参数。VEGF、MMP - 2 的 mRNA 扩增片断长度分别为 541bp、483bp。

1.3 统计学分析

测得数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，数据处理在统计软件 SPSS11.0 上完成。统计方法采用 t 检验、χ^2 检验和 Pearson 相关分析等进行统计学处理。$P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结　果

2.1 免疫组化显色：

在侵袭性和非侵袭性垂体腺瘤组织中 VEGF 的强阳性表达率分别为 56.3% 和 17.4%，阳性表达率分别为 100% 和 56.5%4，差异均具有显著性($P < 0.05$)。在侵袭性和非侵袭性垂体腺瘤组织中 MMP - 2 的强阳性表达率分别65.6% 和 13.0%，阳性表

维普资讯 http://www.cqvip.com

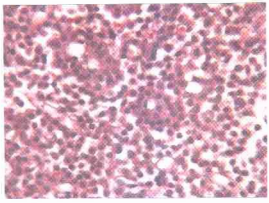


图 1　垂体腺瘤 HE 染色切片　×400

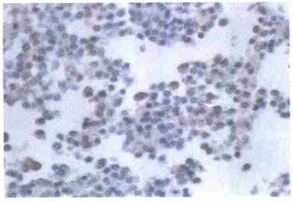


图 2　垂体腺瘤 PBS 免疫组化切片　×400



图 3　VEGF 免疫组织化学反应阳性细胞，垂体肿瘤细胞的胞浆呈黄色　×400

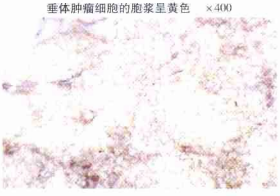


图 4　MMP－2 免疫组织化学反应阳性细胞，垂体腺瘤细胞的胞浆呈棕黄色　×400

达率分别为 93.8% 和 43.5%（表 2），差异均具有显著性（$P<0.01$），具有统计学意义。

表 2　侵袭性和非侵袭性垂体腺瘤中 VEGF 及 MMP－2 的表达

组别	例数	阴性	阳性	强阳性	表达率(%) 强阳性	表达率(%) 阳性
侵袭性腺瘤(MMP－2)	32	2	9	21	65.6	93.8
非侵袭性腺瘤(MMP－2)	23	13	7	3	13.0	43.5
侵袭性腺瘤(VEGF)	32	0	14	18	56.3	100.0
非侵袭性腺瘤(VEGF)	23	10	9	4	17.4	56.5

2.2　RT－PCR 结果显示：侵袭性垂体腺瘤组的 VEGF mRNA 表达较非侵袭性垂体腺瘤组增高（表 3、图 5），差异具有统计学意义（$t=3.67$，$P<0.01$）；侵袭性垂体腺瘤的 MMP－2 mRNA 表达也较非侵袭性垂体腺瘤组增高（表 3、图 5），差异亦具有统计学意义（$t=5.86$，$P<0.01$）。

表 3　侵袭性和非侵袭性垂体腺瘤中 VEGF、MMP－2 mRNA 表达的比较（光密度比值 $\bar{x}\pm s$）

分组	例数	VEGF	MMP－2
侵袭性腺瘤组	32	$0.768\pm0.050^{1)}$	$1.126\pm0.081^{1)}$
非侵袭性腺瘤组	23	0.209 ± 0.032	0.425 ± 0.083

注：1）：与非侵袭性腺瘤组比较，经 t 检验，$P<0.01$

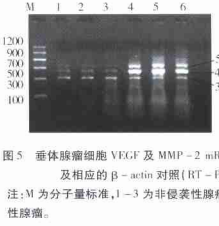


图 5　垂体腺瘤细胞 VEGF 及 MMP－2 mRNA 的阳性表达及相应的 β－actin 对照（RT－PCR）

注：M 为分子量标准，1－3 为非侵袭性腺瘤，4－6 为侵袭性腺瘤。

2.3　相关分析：侵袭性垂体腺瘤组中 VEGF 与 MMP－2 mRNA 的表达成正相关（$r=0.463$，$P<0.01$）。非侵袭性垂体腺瘤组中 VEGF 与 MMP－2 mRNA 的表达无明显相关性。

3　讨　论

肿瘤的生长、侵袭与转移，需要足够的营养支

维普资讯 http://www.cqvip.com

持,血管的生长在这一过程中起到十分重要的作用。肿瘤的生长依赖于血管的形成,新生血管形成也是肿瘤侵袭与转移的必要条件之一。垂体腺瘤为富含血管的肿瘤,临床研究中,刘运生等[5]发现侵袭性垂体腺瘤除原有的供血动脉增粗外,尚有更多的新生肿瘤血管供血。而垂体腺瘤属于颅底肿瘤之一,周围毗邻重要结构,手术难度相对较大,特别是侵袭性垂体腺瘤手术难以全切,术后易复发。因此探索垂体腺瘤多途径治疗具有现实的临床意义。有研究表明,有效的阻断肿瘤的血供和抑制肿瘤新生血管的形成能抑制肿瘤的生长[1]。VEGF 是 1983 年由 Senger 等[6]从腹水和瘤细胞培养介质中纯化得到的一种蛋白质,分子量为 34 ~ 46KD 的二聚体糖蛋白,为血小板源性生长因子超家族成员之一。VEGF 基因位于染色体 6p21.3,有 8 个外显子和 7 个内显子组成,全长 14kb。目前已知人体细胞中存在 4 种不同的 VEGF 氨基酸残基,在大多数情况下以 VEGF165 表达[7]。VEGF 通过与细胞膜上特异性受体结合而发挥多种生物学效应:特异性地促进内皮细胞(endothelial cell,EC)分裂增值;增加微血管,初级毛细血管后静脉和小静脉的通透性,促进血管内液体及血浆蛋白渗出;改变内皮细胞的基因表达方式,诱导其合成大量的蛋白水解酶。此外 VEGF 可改变内皮细胞的活化形式,上调尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type plasminogen activator,uPA)等的表达,刺激血管内皮的增生,这不仅可促进内皮细胞移动,促进新生血管的生成[8,9]。而且还有利于肿瘤细胞脱落进行血管或向周围扩散,为肿瘤侵袭转移创造条件。这可能也是本研究结果显示 VEGF 表达与垂体腺瘤侵袭性有关的最重要的理论基础,当然也不排除其他因素共同作用的结果。本实验结果显示侵袭性垂体腺瘤中 VEGFmRNA 的表达较非侵袭垂体腺瘤显著增高,表明垂体腺瘤的侵袭性在发生机制上与血管生成存在密切关系。

基质金属蛋白酶是一组结构和功能相关的锌离子依赖型内肽酶,在肿瘤侵袭转移过程中不仅降解细胞外基质,而且对肿瘤新生血管的形成也起到非常重要的作用[10,11]。MMP - 2 是其中的一种,它以无活性的前体形式产生,Liuweiping 等[12]采用两种方法对 54 例垂体腺瘤进行研究,结果发现侵袭性垂体腺瘤 MMP - 2 的表达明显高于非侵袭性垂体腺瘤,并认为 MMP - 2 的高表达与肿瘤的侵袭性密切相关,MMP - 2 可以作为肿瘤侵袭性一项有效的指标。近年有人报道[13,14],MMP - 2 与 VEGF 在肿瘤的发生发展过程中可能有协同作用,两者的共同表达可以作为血管发生的标志。本研究结果也证明了这两点,即侵袭性垂体腺瘤 MMP - 2 的表达明显高于非侵袭性垂体腺瘤、侵袭性垂体腺瘤中 MMP - 2 与 VEGF 表达呈正相关,具有一致性。MMP - 2 与 VEGF 多同时表达,强阳性表达之间无明显差异,说明 VEGF 可能促进 MMP - 2 的产生。本实验 VEGF 与 MMP - 2 的表达为肿瘤的生物学侵袭行为提供了补充材料,在侵袭性垂体腺瘤临床生物学行为的评估中具有十分重要的意义,有助于提醒临床医生注意肿瘤本身固有的生物学侵袭性,从而为指导侵袭性垂体腺瘤的临床治疗提供了一定的理论基础。

参 考 文 献

[1] Gasparini G. The rationale and future potential angiogenesia inhibitor in neoplasia [J]. Drugs, 1998;58:17 - 38.

[2] Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis [J]. Semin Cancer Biol, 1999;9:211 - 220.

[3] Wilson CB. A decade of pituitary microsurgery: The Herbert Olivercrona lecture [J]. J Nenurosury, 1984;61(5):814 - 833.

[4] Knosp E, Steiner E, Kitz K, et al. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings [J]. Neurosurgery, 1993;33(4):610 - 618.

[5] 刘运生,袁贤端,刘景平等. 大型,巨大型垂体腺瘤血运情况显微解剖初步研究[J]. 湖南医科大学学报,1998;23(6):552 - 557.

[6] Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secret a VPF that promotes accumulation of ascites fluid. Science, 1983;219: 983.

[7] Houck KA, Ferrara N, Winer J, et al. The vascular endothelial growth factor family: indentification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA [J]. Mol Endocrinol, 1991;5(12):1806 - 1814.

[8] Schmidl N, Westphal M, Hagel C, et al. Level of VEGF, HGF/SF and bFGF in human gliomas and their relation to angiogensis [J]. Int - J - Cancer, 1999;84(1):10.

[9] 孙志君,周 鑫,姚榛祥,等. VEGF 在乳腺癌组织的表达及其临床意义[J]. 重庆医科大学学报,2004;29(6):772 - 773,783.

[10] Bergers G, Brekken R, ScMahon G, et al. Matrix metallo -

(下转第 845 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

机制与 survivin 有一定关系。

本研究发现,子宫内膜异位症的异位内膜中 survivin 蛋白阳性表达率为 67.5%,明显高于正常在位子宫内膜的表达率 4.2%,两组之间的蛋白表达率差异有统计学意义。表明 survivin 基因在子宫内膜异位症高表达,提示 survivin 基因可能通过抑制异位内膜细胞的凋亡而使得异位内膜细胞的净生长率提高,使细胞过量蓄积,导致异位内膜细胞的增殖失控,促使子宫内膜异位症出现类似恶性肿瘤的侵袭性生长,因此 survivin 基因对子宫内膜异位症的发生、发展起着重要作用。

本研究发现子宫内膜异位症异位内膜在增生期的 survivin 阳性表达率为 68.0%,分泌期的阳性表达率为 66.7%,两组之间的蛋白表达率差异无统计学意义,表明异位内膜组织中 survivin 蛋白的表达不随着月经周期的变化而变化,即与月经周期无关。这一结果支持子宫内膜异位症存在"自主性",有相对非激素依赖的特点。

Konno 等[2]研究发现,survivin 在正常子宫内膜中有一定的低表达,在月经周期的分泌晚期 survivin 表达稍高,而在增生期未检测到 survivin 的表达。本研究发现,25 例正常在位子宫内膜组织中,14 例增生期在位子宫内膜 survivin 蛋白表达均为阴性,11 例分泌期在位子宫内膜只有 1 例表达阳性,其余 10 例均为阴性,这与 Konno 等[2]的报道一致。但 survivin 在正常月经周期中的变化以及在月经周期中的作用还需作进一步的研究说明。

随着对 survivin 基因结构和功能的了解日益清楚,以 survivin 为靶点进行基因治疗的研究已在一部分恶性肿瘤中展开。Mesri 等[3]用腺病毒介导的 survivin 显性负性突变体(survivin - T34A)转染乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、肺癌及大肠癌细胞系,发现这些肿瘤细胞均出现不同程度的自发性凋亡,而同样被转染的正常纤维母细胞、内皮细胞和平滑肌细胞却未受影响。Blanc - Brude 等[4]在乳腺癌模型中注入 survivin - T34A 后,发现该突变体不但能触发细胞凋亡,并能抑制肿瘤血管生成。以上研究均表明抑制 survivin 的功能能诱导恶性肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤生长,并且不影响正常细胞及组织的功能,而子宫内膜异位症具有类似恶性肿瘤的行为,结合 survivin 在异位内膜中高表达的特性,推测阻断 survivin 的表达可促进异位内膜细胞凋亡,因此可考虑对子宫内膜异位症患者补充靶向 survivin 的基因治疗,该治疗方法可能会为子宫内膜异位症的治疗带来新的生机。

参 考 文 献

[1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti - apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. Nat Med, 1997;3(8): 917 - 921.

[2] Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, et al. Expression of survivin and bcl - 2 in the normal human endometrium [J]. Mol Hum Reprod, 2000;6:529 - 534.

[3] Mesri M, Wall NR, Li J, et al. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus [J]. JClin Invest, 2001; 108(7):981 - 990.

[4] Blanc - Brude OP, Mesri M, Wall NR, et al. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor - associated angiogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2003;9(7): 2683 - 2692.

(上接第 827 页)

proteinase - 9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesia [J]. Nat Cell Biol, 2000(10):737 - 744.

[11] Seandel M, Noack - Kunnmann K, Zhu D, et al. Growth factor induced angiogenesis in vivo requirs specific cleavage of fibrilar type I collagen [J]. Blood, 2001;97(8): 2323 - 2332.

[12] Liu weiping, KUNISHIO Katsuzo, MATSUMOTO Yoshihito, et al. Matrix metalloproteinase 2 expression in invasive pituitary adenomas [J]. Chin J NeurosurgDis Res, 2003;2(1):7 - 11.

[13] Riedel F, Gotte K, Schwalb J, et al. Expression of 92 - kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Int J Oncol, 2000;17(6):1099 - 1105.

[14] Riedel F, Gotte K, Bergler W, et al. Inverse correlation of a poptotic and angiogenic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Oncol Rep, 2001;8(3): 471 - 476.