

# 垂体肿瘤转化基因和碱性成纤维细胞生长因子在胶质瘤中的表达及意义\*

戴如飞<sup>1</sup>, 蔡军<sup>1</sup>, 闫志海<sup>1</sup>, 阎超<sup>1</sup>, 刘宁<sup>2</sup>, 骆慧<sup>2</sup>

(1. 徐州医学院第二附属医院神经外科, 江苏 徐州 221006; 2. 南京医科大学第一附属医院神经外科, 江苏 南京 210029)

**摘要:**目的 探讨垂体瘤转化基因 (PTTG)和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)在胶质瘤中表达及二者相互关系。方法 40例星形细胞胶质瘤患者手术标本,病理学分级为Ⅰ级 8例、Ⅱ级 10例、Ⅲ级 13例、Ⅳ级 9例。逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)检测 PTTG mRNA及 bFGF mRNA的表达,免疫组化检测二者蛋白表达。结果 PTTG mRNA、bFGF mRNA及蛋白表达均随着肿瘤病理级别的增高而增加 ( $P < 0.05$ 或  $P < 0.01$ ); PTTG蛋白表达与 bFGF蛋白表达呈显著正相关 ( $r = 0.523, P < 0.05$ )。结论 PTTG和 bFGF与胶质瘤的生物学行为有密切关系,二者共同促进胶质瘤的发生发展。

**关键词:**胶质瘤; 垂体肿瘤转化基因; 碱性成纤维细胞生长因子

**中图分类号:** R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2007)10-0674-04

## The expression of pituitary tumor transforming gene and basic fibroblast growth factor and their relationship in glioma

DAI Ru-fei<sup>1</sup>, CAI Jun<sup>1</sup>, YAN Zhi-hai<sup>1</sup>, YAN Chao<sup>1</sup>, LIU Ning<sup>2</sup>, LUO Hui<sup>2</sup>

(1. Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221006, China; 2. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029)

**Abstract** Objective To investigate the expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in gliomas and detect the relationship between them. Methods Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of PTTG mRNA and bFGF mRNA in the specimens from 40 patients with glioma including 8 cases of grade I, 10 grade II, 13 grade III and 9 grade IV. The proteins expressed by PTTG and bFGF were detected by immunohistochemistry using streptavidin-peroxidase (SP) method. Results The expressions of PTTG mRNA and bFGF mRNA were both correlated to the pathological grade of glioma ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The expression of PTTG protein was positively correlated with that of bFGF protein ( $r = 0.523, P < 0.05$ ). Conclusion The abnormal expression of PTTG mRNA and bFGF mRNA play important roles in the biobehaviors of glioma.

**Key words:** glioma; pituitary tumor transforming gene; basic fibroblast growth factor

胶质瘤是颅内常见的恶性肿瘤,预后差,目前仍是神经外科的难题之一。已经证实胶质瘤的发生是多基因、多步骤的过程。新近发现的垂体瘤转化基因 (pituitary tumor transforming gene PTTG)在细胞增殖、转化、肿瘤发生发展中起着重要作用。血管新生是肿瘤生长和转移过程中一个关键限速步骤,碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor bFGF)是发动肿瘤血管新生的主要活化因子之一。本研究检测胶质瘤标本中 PTTG 和 bFGF表达情况,以探讨两者与胶质瘤生物学特征及其相互关系。

### 1 资料和方法

1.1 临床资料 徐州医学院第二附属医院及南京医科大学第一附属医院神经外科切除的胶质瘤标本 40例;患者中男 28例,女 12例;年龄 13~67岁,平均 36.2岁;按 2000年 WHO 制定的中枢神经系统肿瘤分类标准,病理学分级为Ⅰ级 8例、Ⅱ级 10例、Ⅲ级 13例、Ⅳ级 9例。所有标本均经病理学检查证实。

1.2 主要试剂 Trizol、dNTPs、DNAase I、TapDNA聚合酶、Oligo(dT)15、AVM 逆转录酶 (Promega公司),

\* 基金项目:江苏省高校自然科学基金计划 (05KJD320238)

bFGF、PTTG 鼠抗人单克隆抗体 (Santa Cruz 公司), SP、DAB 试剂盒 (北京中山生物工程公司)。

1.3 逆转录、聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法 用 Trizol 法提取细胞总 RNA, GeneQuant 核酸定量仪分光光度仪测定浓度和纯度,  $D_{260/280} = 1.6 \sim 2.0$ , 逆转录合成 cDNA。合成 cDNA 的总反应体系为  $25 \mu\text{l}$  包括  $0.5 \mu\text{g}$  Oligo(dT)15、 $2 \mu\text{g}$  mRNA、 $10 \text{U}$  AVM 逆转录酶。PCR 反应引物 (上海生物工程公司) 设计如下: PTTG 引物, 上游  $5' - \text{CTAAGGATGGGCTGAAGCTG} - 3'$ , 下游  $5' - \text{CAAACAGGTG-GCAATTC} - 3'$ , 扩增长度  $496 \text{ bp}$ ; bFGF 引物, 上游  $5' - \text{CAAGCGGCTGTACTGCAA} - 3'$ , 下游  $5' - \text{CCCAGGTCCTGTTTGGA} - 3'$ , 扩增长度为  $340 \text{ bp}$ ;  $\beta_2\text{M}$  引物, 上游  $5' - \text{GTAAGCAGCATCATGCA} - 3'$ , 下游  $5' - \text{TGGAGGAACCTGGTCA} - 3'$ , 扩增长度  $300 \text{ bp}$ 。PCR 反应体系包括: 逆转录混合液  $4 \mu\text{l}$  TapDNA 聚合酶  $0.8 \mu\text{l}$  3 种引物 ( $50 \mu\text{mol/L}$ ) 各  $1 \mu\text{l}$  PCR 循环条件: 变性  $95^\circ\text{C}$   $5 \text{ min}$ ,  $94^\circ\text{C}$   $1 \text{ min}$ ,  $56^\circ\text{C}$   $1 \text{ min}$ ,  $72^\circ\text{C}$   $1 \text{ min}$ , 35 个循环, 延伸  $72^\circ\text{C}$   $10 \text{ min}$ 。1% 琼脂糖凝胶电泳, 将凝胶在图像分析系统分析, 计算 PTTG、bFGF 的 D 值 (未见阳性扩增带记为 0), 以  $\beta_2\text{M}$  的 D 值为参照, 计算比值。

1.4 免疫组化方法及结果判定 免疫组化采用链霉素抗生素-过氧化物酶 (SP) 法,  $5 \mu\text{m}$  连续切片, 加入一抗前用微波处理以促使抗原暴露。PTTG 单抗、bFGF 单抗工作浓度均为  $1:100$ , DAB 显色。PBS 代替一抗作阴性对照。以肿瘤细胞核或细胞质中出现黄色或棕黄色为阳性表达, 阳性染色细胞条件为细胞结构清晰、阳性颗粒定位好、着色与背景对比清晰。高倍镜下观察 500 个细胞的阳性细胞数, 根据阳性细胞所占的比例进行表达判定:  $<10\%$  为阴性 (-),  $\geq 10\%$  为阳性 (+)。

1.5 统计学处理 采用华西医科大学研制的 PEMS 统计软件处理。实验所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 单因素方差分析总体有差异后进一步 LSD 两两比较各组间差异; 半定量资料差异采用趋势性卡方检验和 Spearman 相关分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PTTG mRNA、bFGF mRNA 表达与胶质瘤病理级别的关系 RT-PCR 结果显示, 38 例胶质瘤标本可见 PTTG mRNA 阳性扩增带 (图 1), 1 例 I 级、1 例 II 级未见扩增, 其表达随着肿瘤病理级别的增高而显著增加; 单因素方差分析表明 4 组 (病理分级)

总体间差异有统计学意义 ( $F = 33.282, P < 0.01$ ), LSD 两两比较各组间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。bFGF mRNA 结果显示, 38 例胶质瘤标本阳性扩增 (图 2), 1 例 I 级、1 例 II 级标本未见扩增带, 其表达随着肿瘤病理级别的增高而显著增加; 单因素方差分析表明 4 组总体间差异有统计学意义 ( $F = 28.774, P < 0.01$ ), LSD 两两比较各组间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。

表 1 PTTG mRNA、bFGF mRNA 的表达 (D 比值)

病理分级	n	PTTG mRNA*	bFGF mRNA*
I 级	8	$0.907 \pm 0.065$	$0.891 \pm 0.056$
II 级	10	$1.109 \pm 0.083$	$1.019 \pm 0.124$
III 级	13	$1.312 \pm 0.089$	$1.141 \pm 0.071$
IV 级	9	$1.499 \pm 0.215$	$1.271 \pm 0.076$

组间两两比较: \*  $P$  均  $< 0.01$

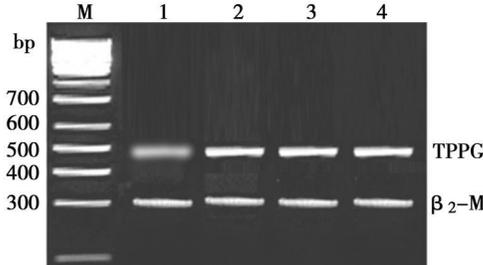


图 1 RT-PCR 检测 PTTG mRNA 表达结果 M: PCR Marker 1~4, 分别为 I~IV 级胶质瘤

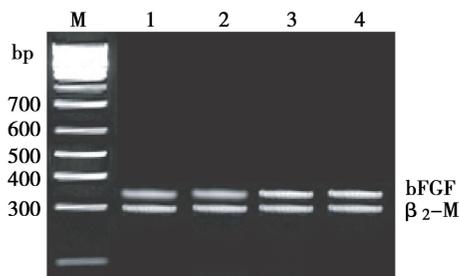


图 2 RT-PCR 检测 bFGF mRNA 表达结果 M: PCR Marker 1~4, 分别为 I~IV 级胶质瘤

2.2 PTTG、bFGF 蛋白表达与胶质瘤病理级别的关系 PTTG 蛋白阳性表达主要定位于肿瘤细胞的胞质, 弥漫性全细胞分布, 少量定位于细胞核 (图 3), 本组 40 例中, 阴性表达 13 例, 阳性表达 27 例, PTTG 蛋白表达随着肿瘤病理级别的增高而增加, 各组间差异有显著性 ( $\chi^2 = 9.538, P < 0.05$ ) (表 2)。bFGF 的表达以肿瘤细胞胞质着色为主, 阳性细胞呈簇状分布于血管周围 (图 4), 本组 40 例中, 阴性表达 16 例, 阳性表达 24 例, bFGF 蛋白表达随着肿瘤病理级别的增高而增加, 各组间差异有显著性 ( $\chi^2 = 8.091, P < 0.05$ ) (表 2)。

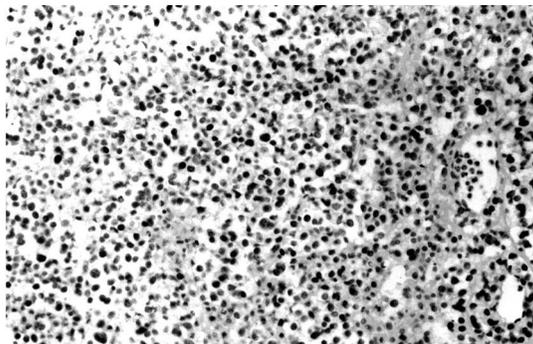


图 3 胶质瘤 PTTG 蛋白免疫组化 (SP 染色, ×200)

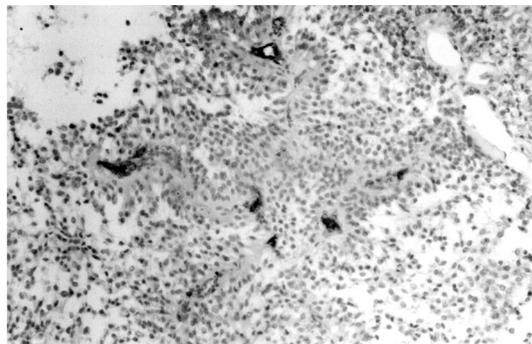


图 4 胶质瘤 bFGF 蛋白免疫组化 (SP 染色, ×200)

### 2.3 PTTG、bFGF 蛋白在胶质瘤中表达的相关性

40 例胶质瘤标本: PTTG 阴性表达 13 例中, bFGF 阴性 10 例, 阳性 3 例; PTTG 阳性表达 27 例中, bF-

GF 阳性表达 21 例, 阴性表达 6 例。Spearm an 等级相关分析显示: PTTG 与 bFGF 蛋白表达之间呈正相关 ( $r=0.523, P<0.01$ )。

表 2 PTTG、bFGF 蛋白免疫组化检测结果

病理分级	n	PTTG			bFGF		
		阴性(例)	阳性(例)	阳性率(%)	阴性(例)	阳性(例)	阳性率(%)
I 级	8	5	3	37.5	6	2	25.0
II 级	10	5	5	50.0	5	5	50.0
III 级	13	3	10	76.9	4	9	69.2
IV 级	9	0	9	100	1	8	88.9

### 3 讨论

肿瘤新生血管的形成在肿瘤的生长、侵袭、转移中起到重要的作用, 没有血管就没有肿瘤的观点已得到众多的支持。目前, 已经鉴定出来的众多促进肿瘤血管生成的生长因子, 主要有血管内皮生长因子 (VEGF)、表皮生长因子 (EGF)、血小板源性生长因子 (PD ECGF)、FGF 等, 其中 FGF 是一种具有广泛生物活性的肽类物质, 通过自分泌或旁分泌的形式促进细胞分裂增殖并强烈刺激肿瘤的血管生成。FGF 家族目前已发现有 9 名成员, 分别命名为 FGF-1~9。依据其等电点的不同, FGF-1 和 FGF-2 也分别称为酸性 FGF (aFGF) 和碱性 FGF (bFGF)。

bFGF 对新生血管形成过程中的各个环节均有促进作用, 可趋化血管内膜的各类细胞, 并诱导这些细胞表达胶原酶、蛋白水解酶等, 这些酶类可以促使血管内皮降解和刺激内膜各类细胞的增殖, 诱导血管内皮细胞长入胶原基质形成管腔, 促进新生血管生长。无论是在体内还是体外培养的血管内皮细胞, 都可在 bFGF 的诱导下形成新的小血管。体外培养的内皮细胞中给予 bFGF 可以发现 VEGF 的表达增加。本研究结果显示 bFGF mRNA 及其蛋白的

表达均随着胶质瘤病理级别的增加而显著增加, 其蛋白表达主要分布于血管周围, 表明 bFGF 参与促进胶质瘤的血管生成, 从而加速肿瘤细胞的增殖, 参与肿瘤细胞的分化, 并向更高病理级别发展, 在胶质瘤的发生、发展中起着重要的作用。

PTTG 定位于染色体 5q33, 含有 5 个外显子和 4 个内含子, 编码一个含 202 个氨基酸残基、相对分子质量为  $22 \times 10^3$  的蛋白质。在大多数正常人体组织如结肠、胰腺、卵巢、大脑等, PTTG 只有弱表达甚至检测不到, 但在多种增生活跃的组织, 如胚胎肝、脾脏、睾丸等存在 PTTG 的表达, 在肿瘤细胞中如肺癌、膀胱癌、肝癌、垂体瘤、白血病、甲状腺癌等中高表达, 因此 PTTG 是一种强劲的细胞转化基因, 对细胞的转化增殖和肿瘤的形成有重要的研究价值。体外实验证实, 过度表达 PTTG 的 3T3 细胞能形成明显的细胞群落, 而只转染载体的 3T3 细胞和 3T3 亲代细胞则不形成。将过度表达 PTTG 的 3T3 细胞接种于裸鼠皮下, 3 周内可形成肿瘤。PTTG 在多种肿瘤和肿瘤细胞系中过度表达, 其促进肿瘤发生的机制可能有以下几个方面: 抑制姊妹染色单体的分离, 使高表达 PTTG 的组织或细胞出现成瘤倾向; 编码一种蛋白封闭 P53 蛋白同 DNA 的连接位点, 从而抑

制其转录活性和诱导凋亡的能力;诱导细胞转化;对 bFGF 参与肿瘤血管生成的促进作用;通过反式激活作用,促进 c-myc 和 bFGF 等其他原癌基因的表达。众多研究发现, PTTG 与肿瘤的侵袭性、恶性程度、细胞分化程度及预后密切相关<sup>[1~4]</sup>。本研究运用 RT-PCR 及免疫组化技术检测 PTTG mRNA 及其蛋白在胶质瘤中的表达发现,肿瘤的病理级别越高,其表达越强,随着肿瘤病理级别的增高, PTTG mRNA 及其蛋白相应地增加,各组间差异有统计学意义,表明 PTTG 能够促进胶质瘤细胞向更高恶性程度发展。

关于 PTTG 促进肿瘤新生血管生成,国内外的研究均表明与 bFGF 的关系最为密切。PTTG 促肿瘤新生血管生成作用可能是通过 bFGF 实现的。Kakar 等<sup>[5]</sup>研究表明,肺癌细胞中 PTTG 的表达显著增高,应用 RNA 干扰技术可以显著抑制肿瘤细胞的生长, bFGF 的表达水平显著下降,其血管生成也相应地显著下降; McCabe 等<sup>[6]</sup>的结果也表明 PTTG 可以促进垂体瘤中 FGF-2 (bFGF) 表达,促进血管生成并增加肿瘤的侵袭性; Tfelt-Hansen 等<sup>[7]</sup>发现 PTTG 的过度表达可显著上调 FGF-2 的表达,并促进肿瘤的血管形成。本实验发现 PTTG 和 bFGF 的表达呈显著正相关,表明二者在肿瘤细胞的生成和发展中起协同作用。我们认为 PTTG 可以通过提高 bFGF 的表达促进肿瘤新生血管的形成而促进肿瘤的生长及向恶性转化。

本实验初步证实了 PTTG 和 bFGF 在胶质瘤中的表达情况及二者的相关性。临床上对手术标本同时进行二者的检测,有助于判断肿瘤恶性程度和预后。

#### 参考文献:

- [1] Mu YM, Oba K, Yanase T, et al Human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) inhibits human lung cancer A549 cell growth through activation of p21 (WAF1/CIP1) [J]. *Endocr J* 2003, 50 (6): 771-781.
- [2] 蔡瑜, 赵卫国, 沈建康, 等. 垂体瘤转化基因、FGF-2 在垂体大腺瘤中的表达及其临床意义 [J]. *中国临床神经科学*, 2005, 13(2): 148-151.
- [3] 王成海, 冯振卿. 乳腺癌组织中 PTTG 与 PTEN 的检测及临床病理意义 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2005, 25 (1): 20-21.
- [4] 杨竹林, 苗雄鹰, 钟德珩, 等. 胰腺癌和慢性胰腺炎组织中垂体肿瘤转化基因 mRNA 和脆性组氨酸三联体表达研究 [J]. *中华消化杂志*, 2006, 26(6): 423-424.
- [5] Kakar SS, Malik MT. Suppression of lung cancer with siRNA targeting PTTG [J]. *Int J Oncol* 2006, 29(2): 387-395.
- [6] McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, et al Expression of pituitary tumor 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.
- [7] Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis [J]. *Clin Med Res* 2006, 42(2): 130-137.

收稿日期: 2007-08-10 修回日期: 2007-09-28

本文编辑: 孙立杰

## 肺癌组织 E-cadherin 表达的免疫组织化学研究\*

王红兵<sup>1</sup>, 苗慧<sup>2</sup>, 蔡晓敏<sup>3</sup>, 吴秀英<sup>3</sup>, 胡西旦<sup>3</sup>, 迪力努<sup>3</sup>, 陈春玲<sup>3</sup>

(1. 徐州医学院附属医院肿瘤科, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医学院 2004 级肿瘤学专业研究生, 江苏 徐州 221002; 3. 新疆伊犁州新华医院内科, 新疆 伊宁 835000)

**摘要:**目的 检测 E-cadherin 在肺癌组织、癌旁组织及正常肺组织中的表达, 并探讨其在肺癌发生发展中的作用。方法 采用免疫组化 SP 法对 22 例肺癌组织、相应的癌旁组织和 9 例肺部良性病变旁正常肺组织中 E-cadherin 的表达状况进行检测。结果 22 例肺癌组织中 E-cadherin 蛋白表达减弱或缺失率 59.1% (13/22), 明显高于相应癌旁组织中蛋白表达减弱或缺失率 27.3% (6/22); 9 例正常肺组织中 E-cadherin 均正常表达。结论 E-cadherin 表达减弱或缺失是肺癌发生中的常见分子事件, 可能参与了肺癌的发生发展过程。

**关键词:** 肺癌; E-cadherin; 免疫组织化学

**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2007)10-0677-04

### A study on E-cadherin protein expression in lung cancer

\* 基金项目: 新疆伊犁哈萨克自治州科技攻关和重点科技项目 (YZ200601025); 徐州医学院附属医院课题 (2006022)