

. 实验研究 .

人脑垂体生长激素腺瘤 PKCδ、ERK1/2、gsp 癌基因的表达关联性分析

陈 曦 陈 娟 谢蕊繁 徐 钰 胡 航 李 然 叶 飞 雷 霆

【摘要】目的 研究人脑垂体生长激素腺瘤组织中蛋白激酶 Cδ亚型(PKCδ)、细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)、Gs 蛋白 2 亚基因点突变(gsp 癌基因)的个体表达的关联性。方法 收集 54 例垂体生长激素腺瘤组织,行免疫组化检测 PKCδ、ERK1/2 蛋白的表达差异;通过 PCR 法检测 gsp 突变情况。结果 54 例标本中,gsp 癌基因(+)11 例,gsp 癌基因(-)43 例;PKCδ 表达阳性率为 50%,ERK1/2 表达阳性率为 51.9%。11 例 gsp 癌基因(+)标本 PKCδ 表达阳性率(45.5%)与 gsp 癌基因(-)标本表达阳性率(51.2%)无统计学差异($P>0.05$);gsp 癌基因(+)标本 ERK1/2 表达阳性率(36.4%)与 gsp 癌基因(-)标本表达阳性率(55.8%)无统计学差异($P>0.05$);PKCδ(+)标本 ERK1/2 表达阳性率(74.1%)明显高于 PKCδ(-)标本表达阳性率(29.6%, $P<0.05$)。结论 人脑垂体生长激素腺瘤内 PKCδ 与 ERK1/2 的表达呈正相关,而 PKCδ 及 ERK1/2 的表达与 gsp 突变无明显相关性。

【关键词】 垂体生长激素腺瘤;gsp 癌基因;PKCδ;ERK1/2

【文章编号】 1009-153X(2015)04-0225-03 【文献标志码】 A 【中国图书资料分类号】 R 739.41; Q 786

Expressions gsp oncogene, PKCδ and ERK1/2 in human somatotrophinomas and relationship among them

CHEN Xi, CHEN Juan, XIE Rui-fan, XU Yu, HU Hang, LI Ran, YE Fei, LEI Ting. Department of Neurosurgery, Tongji Hospital, Tongji Medical School, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of gsp oncogene, PKCδ and ERK1/2 in human somatotrophinomas (HSTs) and relationship among them. Methods The expressions of PKCδ and ERK1/2 were detected by immunohistochemical technique in 54 samples of HSTs, in which the expression of DNA of gsp oncogene was determined by polymerase chain reaction (PCR). Results The expression of gsp oncogene was positive in 11 and negative in 43 of 54 samples of HSTs. The positive rates of PKCδ and ERK1/2 expressions were 50% (27/54) and 51.85% (28/54) respectively in 54 samples of HSTs. The positive rates of PKCδ and ERK1/2 expressions were 45.45% (5/11) and 36.36% (4/11) respectively in 11 samples of HSTs with the positive expression of gsp oncogene. The positive rates of PKCδ and ERK1/2 expression were 51.16% (22/43) and 55.81% (24/43) respectively in 43 samples of HSTs with the negative expression of gsp oncogene. The positive rate of ERK1/2 expression was 74.07% (20/27) in 27 samples of HSTs with the positive expression of PKCδ, and the positive rate of ERK1/2 was 29.63% (8/27) in 27 samples of HSTs with the negative expression of PKCδ. The positively rate of ERK1/2 expression was significantly higher in HSTs with positive PKCδ than that in HSTs with negative PKCδ ($P<0.05$). Conclusion The expression of PKCδ is positively related to the expression of ERK1/2, and the expressions of PKCδ and ERK1/2 are insignificantly related to the expression of gsp oncogene in HSTs.

【Key words】 Somatotrophinoma; Gsp oncogene; PKCδ; ERK1/2; Expression

垂体生长激素(growth hormone, GH)腺瘤可分泌过量的 GH 导致成人肢端肥大症及儿童巨人症^[1]。约 40% GH 腺瘤存在 Gs 蛋白α亚基因点突变,即 gsp 癌基因,通过上调环磷腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)表达增加 GH 分泌,是调

控垂体 GH 腺瘤发生、发展的重要因素,并影响蛋白激酶(protein kinase, PK)A 或 PKC,调控 PKA-PKC 信号传导系统间“交叉通讯”作用^[1, 2]。PKC δ 亚型(PKC δ isoform, PKCδ)及细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)均为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,参与细胞内多种信号传导过程,具有重要的生理作用^[3, 4]。本研究选取垂体 GH 腺瘤术中标本,采用免疫组化检测 PKCδ 及 ERK1/2 表达,并检测 gsp 癌基因突变,探讨三者相关性。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2011 年 3 月至 2013 年 6 月手术

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.04.011
基金项目:卫生部国家临床重点专科建设项目;国家自然科学基金(81270865)
作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经外科(陈 曦、陈 娟、谢蕊繁、徐 钰、胡 航、李 然、叶 飞、雷 霆)
通讯作者:雷 霆, E-mail:lei@tjh.tjmu.edu.cn

切除的垂体 GH 腺瘤标本 54 例,其中男 17 例,女 37 例;年龄 21~61 岁,平均 42.2 岁;GH 腺瘤 42 例, GH 及泌乳素混合腺瘤 12 例。

1.2 免疫组化染色 取术中切除的肿瘤组织行常规石蜡包埋及切片。将石蜡切片置于 60℃ 恒温箱中烘烤 2 h 后予以脱蜡和水化,加入 0.01 mol/L 枸橼酸行抗原热修复 2 min, 3% H₂O₂ 避光 37℃ 恒温孵育 15 min 后用 0.3% Triton-PBS 冰上破膜 5 min, 山羊血清 37℃ 封闭 45 min, 分别添加 PKC δ 抗体(1:100; 英国 Abcam 公司)及 ERK1/2 抗体(1:200; 美国 Cell Signaling 公司), 4℃ 孵育过夜。辣根过氧化物酶标记二抗反应液(武汉谷歌生物科技有限公司)室温孵育 60 min 后, 滴加新鲜配制的联苯二胺显色液并水洗终止, 苏木素复染 3 min 后转入 1% 盐酸酒精分化并以淡氨水返蓝, 梯度脱水透明后以中性树脂封片, 显微镜下观察。参照许良中等^[5]方法, 根据染色强度及阳性细胞百分比两项指标判定结果。染色强度评分: 0 分为无色, 1 分为淡黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色。阳性细胞百分比评分: 0 分为阴性, 阳性细胞 $\leq 10\%$ 为 1 分, 11%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积 >3 分判定为免疫组化反应阳性。

1.3 DNA 提取及 PCR 扩增 取冻存的肿瘤组织均匀研磨, 采用 DNA 提取试剂盒(美国 Axygen Biosciences 公司)按操作流程提取标本基因组 DNA 并测定浓度。根据 Genebank 提供的 Gs 蛋白 α 亚基正常基因组序列, 交由上海生工生物工程有限公司设计并合成 PCR 引物(上游: 5'-CCACCAGAGGACTCTGAGCCCTCTT-3', 下游: 5'-AGCGTGAGCAGCGACCCTGATCCT-3', 大小为 425 bp)。配置 50 μ l PCR 反应体系行循环扩增, 条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 60 s, 60℃ 复性 60 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行初步鉴定, 随后交由上海生工生物工程有限公司纯化和测序。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 gsp 癌基因测序结果 54 例肿瘤标本中 11 例(20.4%) gsp 癌基因阳性, 其中 9 例突变位点位于 201 号密码子, CGT 突变为 TGT, 精氨酸变为半胱氨酸; 1 例位于 201 号密码子, CGT 突变为 CAT, 精氨酸变为组氨酸; 1 例位于 227 号密码子, CAG 突变为 CTG, 谷氨酰胺变为亮氨酸。

2.2 PKC δ 表达结果 54 例标本中, PKC δ 表达阳性 27 例(图 1、2), 阳性率为 50.0%。 gsp 癌基因阳性标本 PKC δ 表达阳性率(45.5%, 5/11)与 gsp 癌基因阴性标本(51.2%, 22/43)无统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 ERK1/2 表达结果 54 例标本中, ERK1/2 表达阳性 28 例(图 3、4), 阳性率为 51.9%。 gsp 癌基因阳性标本 ERK1/2 表达阳性率(36.4%, 4/11)与 gsp 癌基因阴性标本(55.8%, 24/43)无统计学差异($P > 0.05$)。

2.4 ERK1/2 与 PKC δ 相关性 PKC δ 阳性标本 ERK1/2 表达阳性率(74.1%, 20/27)与 PKC δ 阴性标本(29.6%, 8/27)有统计学差异($P < 0.05$)。

3 讨论

垂体 GH 腺瘤 gsp 癌基因的阳性率约为 40%^[2]。正常情况下, 垂体细胞经 G 蛋白偶联受体-cAMP-PKA 途径分泌 GH, 受 GH 释放激素和生长抑素的双重调控。 gsp 癌基因引起 Gs 蛋白 α 亚基氨基酸序列发生改变以及 Gs 蛋白 α 亚基内在三磷酸鸟苷酶活性下降, 导致腺苷酸环化酶处于持续激活状态从而产生过量 cAMP, 增加 GH 分泌^[6]。近年来, 研究发现 GH 释放剂-PKC 通路可与 cAMP-PKA 具有交叉作用, 进而促进 GH 分泌, 且在 gsp 癌基因(+)腺瘤中尤为明显, 提示 gsp 癌基因可能通过增加 cAMP 影响 PKA-PKC 信号传导系统间“交叉通讯”作用^[7,8]。Tian 等^[9]在大鼠垂体瘤细胞中证实 GHRP-6

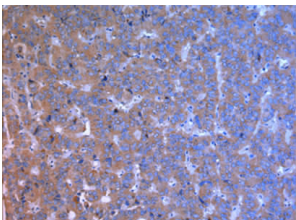


图 1 PKC δ 阳性表达垂体 GH 腺瘤免疫组化染色图 (×200)

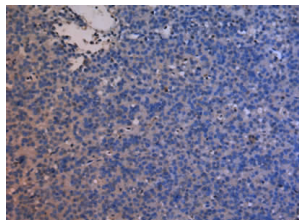


图 2 PKC δ 阴性表达垂体 GH 腺瘤免疫组化染色图 (×200)

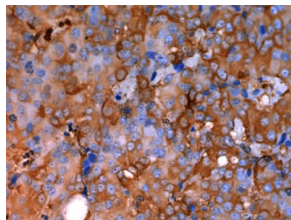


图 3 ERK1/2 阳性表达垂体 GH 腺瘤免疫组化染色图 (×400)

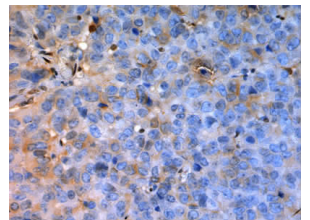


图 4 ERK1/2 阴性表达垂体 GH 腺瘤免疫组化染色图 (×400)

(一种 GH 释放剂)诱导细胞 GH 分泌过程中磷酸化 PKCδ 具有重要作用,提示 PKCδ 可能通过 GH 释放剂-PKC 通路促进 GH 分泌。本研究发现人垂体 GH 腺瘤 PKCδ 及 ERK1/2 的表达与 gsp 癌基因无明显相关性,提示 gsp 癌基因可能并不影响 PKCδ 及 ERK1/2 介导的信号传导通路,但仍需进一步研究。

ERK1/2 调节细胞的增殖、分化及转化等,是控制细胞增殖的关键分子^[3,4]。PKC 是一类磷脂依赖性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 G 蛋白偶联受体系统中的效应物及胞内信号传递的重要介质。根据其对于 Ca²⁺ 及二酰基甘油的依赖性,分为经典 PKCs、新型 PKCs 及不典型 PKCs 三类^[10]。PKCδ 是由一条分子量为 78 KDa 的多肽链所组成的新型 PKCs,其发挥的功能在不同组织细胞、反应底物及作用环境下差异显著^[11]。Leverrier 等^[12]发现激活的 PKCδ 通过诱导线粒体中细胞色素 C 的释放以及激活 Caspase 反应促进细胞凋亡,而 PKCδ 本身也是 Caspase 作用底物,激活后的 Caspase 能进一步活化 PKCδ 从而形成正反馈调节,加快细胞凋亡的进程。然而值得一提的是,PKCδ 亦被证实具有促进细胞增殖的作用。徐同江等^[4]发现 PKCδ 通过 Raf-1(C-Raf)参与介导了大鼠垂体瘤 GH3 细胞系中 Ghrelin 诱导 ERK1/2 活化这一过程,并且可能在 raf-1 水平与受体酪氨酸激酶-ERK1/2 信号通路产生“交叉通讯”作用从而增强 GH3 细胞增殖能力。Garavello 等^[13]亦证实 PKCδ 通过 14-3-3 及 Raf-1 介导了小鼠胚胎干细胞 E14TG2a 细胞系中 ERK1/2 活化过程,从而促进 E14TG2a 细胞系增殖。此外, Park 等^[14]发现 PKCδ 通过 KIT(一种受体酪氨酸激酶)的持续活化介导了人结直肠癌 DLD-1 细胞系中 ERK1/2 活化过程,从而促进 DLD-1 细胞系增殖。这些研究提示 PKCδ 可能通过某些途径参与介导 ERK1/2 信号传导通路活化过程。但上述作用机制是否同样存在于人垂体 GH 腺瘤细胞尚无报道。本研究发现 PKCδ 不仅表达于人垂体 GH 腺瘤组织,并且与 ERK1/2 的表达呈明显的正相关,进一步提示 PKCδ 可能通过上述类似的机制参与了人垂体 GH 腺瘤中 ERK1/2 信号传导通路的活化以及促增殖过程,但 PKCδ 对细胞凋亡的正反馈调节作用是否同时存在尚不得而知。

【参考文献】

[1] 雷 霆,张华楸,舒 凯,等.垂体生长激素腺瘤的诊断与治疗[J].中国现代神经疾病杂志,2005,5:4-7.

[2] 雷 霆,薛德麟,Adams EF,等. Gsp 癌基因在人垂体生长激素腺瘤的表达及与 GHRH 对生长激素分泌效应比较[J]. 同济医科大学学报(医学版),1997,26:10-13.

[3] Suojun Z, Feng W, Dongsheng G, *et al.* Targeting Raf/MEK/ERK pathway in pituitary adenomas [J]. Eur J Cancer 2012, 48: 389-395.

[4] 徐同江,叶 飞,李 俊. PKCδ 在 GH3 细胞 ghrelin/pERK1/2 信号通路中的作用及其机制[J]. 中华实验外科杂志,2010,27:1404-1407.

[5] 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应的结果判断标准[J]. 中国癌症杂志,1996,6:229-231.

[6] Adams EF, Lei T, Buchfelder M, *et al.* Biochemical characteristics of human pituitary somatotropinomas with and without gsp mutations: in vitro cell culture studies [J]. J Clin Endocr Metab, 1995, 80:2077-2081.

[7] Lei T, Adams EF, Buchfelder M, *et al.* Relationship between protein kinase C and adenylyl cyclase activity in the regulation of growth hormone secretion by human pituitary somatotrophinomas [J]. Neurosurgery, 1996, 39: 569-575.

[8] Xu T, Ye F, Wang B, *et al.* Elevation of growth hormone secretagogue receptor type 1a mRNA expression in human growth hormone-secreting pituitary adenoma harboring G protein alpha subunit mutation [J]. Neuroendocrinol Lett, 2010, 31: 147-154.

[9] Tian CL, Ye F, Xu TJ, *et al.* GHRP-6 induces CREB phosphorylation and growth hormone secretion via a protein kinase C σ-dependent pathway in GH3 cells [J]. J Hua-zhong Uniw Technol [Med Sci], 2010, 30: 183-187.

[10] Zhang HM, Su Q. PKC in developmental hypothyroid rat brain [J]. Neurol Sci, 2014, 6: 535-540.

[11] Zhao M, Xia L, Chen GQ. Protein kinase C delta in apoptosis: a brief overview [J]. Arch Immunol Ther Ex, 2012, 60: 361-372.

[12] Leverrier S, Vallentin A, Joubert D. Positive feedback of protein kinase C proteolytic activation during apoptosis [J]. Biochem J, 2002, 368: 905-913.

[13] Garavello NM, Pena DA, Bonatto JM, *et al.* Activation of protein kinase C delta by ψσ RACK peptide promotes embryonic stem cell proliferation through ERK 1/2 [J]. J Proteomics, 2013, 94: 497-512.

[14] Park M, Kim WK, Song M, *et al.* Protein kinase C-delta-mediated recycling of active KIT in colon cancer [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19: 4961-4971.

(2014-08-04 收稿, 2015-01-15 修回)