

. 实验研究 .

垂体腺瘤 TGF-β₁ 和 CTGF 的表达及意义

王占福 邢德广 陈爱国 王义宝 王运杰

【摘要】目的 探讨垂体腺瘤转化生长因子-β₁(TGF-β₁)和结缔组织生长因子(CTGF)的表达及意义。方法 收集手术切除且病理学证实的垂体腺瘤标本 58 例,根据术前 MRI 检查和术中发现分为纤维化垂体腺瘤(19 例)和非纤维化垂体腺瘤(39 例)。采用逆转录聚合酶链式反应检测 TGF-β₁和 CTGF mRNA 表达水平。结果 与非纤维化垂体腺瘤相比,纤维化垂体腺瘤 TGF-β₁和 CTGF mRNA 表达水平均显著增高($P<0.05$)。结论 TGF-β₁和 CTGF 高表达可能垂体腺瘤纤维化有关。

【关键词】 垂体腺瘤;纤维化;转化生长因子β₁;结缔组织生长因子;基因表达

【文章编号】 1009-153X(2015)03-0155-03 【文献标志码】 A 【中国图书资料分类号】 R 739.41; Q 786

Preliminary study of expressions of TGF-β₁ and CTGF in fibrosis pituitary adenomas and their meanings

WANG Zhan-fu¹, XING De-guang², Chen Ai-guo³, WANG Yi-bao³, WANG Yun-jie³. 1. Department of Neurosurgery, The First People's Hospital of Shenyang City, Shenyang 110041, China; 2. Department of Neurosurgery, The Second Hospital, Shandong University, Ji'nan 250033, China; 3. Department of Neurosurgery, The First Hospital, Chinese Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 Objective To explore the expressions of transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁) and connective tissue growth factor (CTGF) in the pituitary adenomas, and their role of in the pathogenesis of pituitary adenomas fibrosis. Methods The mRNA expression levels of TGF-β₁ and CTGF were determined respectively by reverse transcription- polymerase chain reaction in 19 samples of fibrosis pituitary adenomas and 39 samples of non-fibrosis pituitary adenomas. Results The levels of TGF-β₁ mRNA expression in the fibrosis pituitary adenomas and non-fibrosis pituitary adenomas were 0.720±0.102 and 0.519±0.093 respectively. The levels of CTGF mRNA expression in the fibrosis adenomas and the non-fibrosis pituitary adenomas were 0.487±0.110 and 0.312±0.123 respectively. There were significantly differences in the levels of TGF-β₁ and CTGF mRNA expressions between both the groups ($P<0.05$). Conclusion That the levels of TGF-β₁ and CTGF mRNA expressions in the fibrosis pituitary adenomas is significantly higher than those in the non-fibrosis pituitary adenomas suggests that TGF-β₁ and CTGF may take part in the pathogenesis of the pituitary adenomas fibrosis.

【Key words】 Pituitary adenoma; Fibrosis; Transforming growth factor; Connective tissue growth factor; Expression

垂体腺瘤是颅内常见良性肿瘤之一,占颅内肿瘤的 10%~12%^[1]。约 10%的垂体腺瘤不能经鼻蝶窦入路手术满意切除,其主要原因是部分肿瘤纤维化,使肿瘤质地坚韧无法全切^[2]。目前,垂体腺瘤纤维化的机制尚不明确,但是转化生长因子-β₁ (transforming growth factor-β₁, TGF-β₁)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)在肝、肺、肾和心肌等器官的纤维化过程中起关键作用^[3,4]。本研究通过检测垂体腺瘤 TGF-β₁和 CTGF 的表达,探讨 TGF-β₁和 CTGF 在垂体腺瘤纤维化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 垂体腺瘤纤维化评估方法 ①术中发现^[5]:纤维化肿瘤组织质地较坚韧,吸引器吸除或刮匙刮除较困难,取瘤钳取瘤时有较强的牵拉感,有时需反复电凝或用锐器切割才能部分切除;非纤维化肿瘤组织质地柔软,肿瘤易于吸除或可用刮匙刮除。②术前 MRI 影像学特点^[6]:纤维化垂体腺瘤 T₁加权像呈等信号, T₂加权像多呈等或稍低信号,增强后呈略不均一强化;非纤维垂体腺瘤 T₁加权像呈低信号, T₂加权像多呈高信号,增强后强化较均匀。

1.2 总 RNA 的提取及逆转录 收集手术切除且病理学证实的垂体腺瘤标本 58 例,其中纤维化垂体腺瘤 19 例(纤维化组)和非纤维化垂体腺瘤 39 例(非纤维化组)。Trizol 法提取总 RNA,酶标仪检测总 RNA 浓度,要求 A260/A280 值为 1.8~2.0。按照反转录试剂盒说明,将 RNA 反转录为 cDNA,反应条件:25 ℃,

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.03.009
基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(2014021097)
作者单位:10041,沈阳市第一人民医院神经外科(王占福);250033 济南,山东大学第二医院神经外科(邢德广);110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院神经外科(陈爱国、王义宝、王运杰)
通讯作者:王运杰, E-mail: wangyunjie_cmu@sina.com

10 min;37℃,120 min;85℃,5 s;4℃,+∞。

1.3 PCR 检测 TGF-β₁ 和 CTGF mRNA 表达 以 β-actin 为内参,引物序列见表 1。TGF-β₁反应条件:94℃ 2 min,1 个循环;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,20 个循环;72℃ 8 min 后结束扩增反应。CTGF 应条件:95℃ 2 min,1 个循环;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,20 个循环;72℃ 10 min 后结束扩增反应。10 μl PCR 产物与 2 μl 缓冲液混合,行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统检测电泳条带光密度(optical density, OD)值。

1.4 统计学分析 应用 SPSS17.0 进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,*P* < 0.05 认为差异显著。

2 结果

纤维化组 TGF-β₁ 和 CTGF OD 值均较非纤维化组明显增高(*P* < 0.05),见图 1、2 及表 2。这提示纤维化垂体腺瘤 TGF-β₁ 和 CTGF mRNA 的表达水平显著高于非纤维化垂体腺瘤。

3 讨论

部分垂体腺瘤因纤维化致质地坚韧,致使肿瘤不能随着体积的缩小而陷入鞍内,经鼻蝶入路很难全切肿瘤。研究发现,垂体腺瘤质地与胶原含量密切相关,并且其已成为垂体腺瘤纤维化的衡量标准^[5]。胶原是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)最主要的成分,正常情况 ECM 处于产生和降解的动态平衡过程,病理情况下 ECM 产生增多或 ECM 降解减

少均使 ECM 过多堆积而导致组织器官纤维化,所以胶原的异常合成与沉积是组织器官纤维化的重要病理基础^[7]。TGF-β₁ 是 TGF-β 最主要的异构体且活性最强,是与胶原沉积关系最密切的细胞因子,亦被认为是最重要的致纤维化细胞因子^[8]。TGF-β₁ 主要通过以下环节导致胶原积聚^[9]:①促进成纤维细胞增生、改变其表型,合成和分泌大量胶原;②抑制胶原酶活性、增强降解酶抑制物,而减少胶原降解;③调控其它因子间接影响胶原代谢;④通过自分泌途径,提高自身 mRNA 表达。然而,纤维化垂体腺瘤胶原过度沉积的启动机制尚不清楚。

CTGF 是 TGF-β₁ 的下游靶分子,具有明显的有丝分裂原性和趋化性,在体内参与细胞增生分化、胚

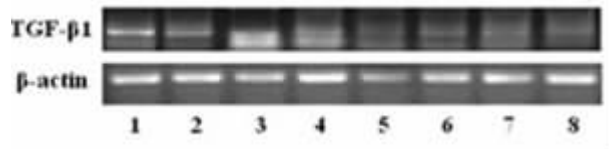


图 1 垂体腺瘤 TGF-β₁ mRNA 表达电泳图

1~4: 纤维化垂体腺瘤;5~8: 非纤维化垂体腺瘤;注: TGF-β₁: 转化生长因子-β₁;β-actin: β-肌动蛋白

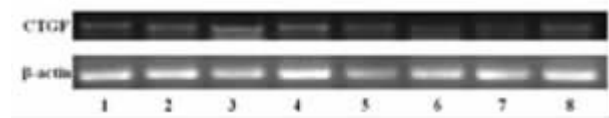


图 2 垂体腺瘤 CTGF mRNA 表达电泳图

1~4: 纤维化垂体腺瘤;5~8: 非纤维化垂体腺瘤;CTGF: 结缔组织生长因子;β-actin: β-肌动蛋白

表 1 引物序列信息

目标 mRNA		引物序列	引物大小(bp)
TGF-β ₁	上游	5'-ACCGGAGTTGTGCGGCAGTG-3'	290
	下游	5'-TGCCGCGACGCAGCAGTTCTT-3'	
CTGF	上游	5'-CACAAACAACCTCTTCCCCGCTGAG-3'	502
	下游	5'-AGCACCATCTTTGGCGGTGCA-3'	
β-actin	上游	5'-TCACCCACATGTGCCCATCTACGA-3'	295
	下游	5'-CAGCGGAACCGCTCATTTGCCAATGG-3'	

注: TGF-β₁: 转化生长因子-β₁; CTGF: 结缔组织生长因子; β-actin: β-肌动蛋白

表 2 不同类型垂体腺瘤 TGF-β₁ 和 CTGF mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)

垂体腺瘤组织	例数 (例)	mRNA 光密度值	
		TGF-β ₁	CTGF
纤维化垂体腺瘤	19	0.720±0.102*	0.487±0.110*
非纤维化垂体腺瘤	39	0.519±0.093	0.312±0.123

注: 与非纤维化垂体腺瘤相应值比较, * *P* < 0.05; TGF-β₁: 转化生长因子-β₁; CTGF: 结缔组织生长因子

胎发育、血管生成、创伤修复、瘢痕形成、动脉粥样硬化和肝肺肾纤维化等。研究表明,CTGF与多种组织器官纤维化有密切关系^[10],可能的分子机制如下:①与其他细胞因子(如整合素、Smads等)协同促进ECM(胶原蛋白I、纤维连接蛋白等)增多和血管平滑肌细胞增殖,引起器官纤维化;②下调抑癌基因或激活caspase-3等诱导细胞凋亡,引起组织损害和纤维化^[11]。已证实TGF- β_1 在对成纤维细胞和ECM的许多作用过程中都是通过CTGF介导完成的,应用反义CTGF技术或抗CTGF中和抗体可以阻断TGF- β_1 引起的促纤维化效应^[12]。此外,TGF- β_1 和CTGF均能单独促进纤维化,更重要的是CTGF可增强TGF- β_1 与细胞表面受体的结合力,使纤维化持续存在和慢性进展^[13]。

本研究发现,与非纤维化垂体腺瘤相比,纤维化垂体腺瘤TGF- β_1 和CTGF mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$),所以我们推测TGF- β_1 和CTGF在垂体腺瘤的纤维化过程中起着重要作用。目前,抗纤维化治疗已在某些纤维化疾病中取得成功,应用TGF- β_1 单克隆抗体及反义寡核苷酸可以有效地治疗纤维化疾病^[14]。CTGF作为TGF- β_1 下游介质对结缔组织细胞起作用,是一个更具特异性的靶点,深入研究CTGF发挥生物学活性的受体及其信号转导的分子机制,将有助于靶向CTGF系统的抗纤维化治疗的研究,以及开发有效的治疗脏器纤维化的药物。用CTGF反义寡核苷酸封闭mRNA,抑制基因表达或选择抑制CTGF的产生或激活,阻断CTGF的效应可能是控制纤维化发生发展的更特异、更有效的手段。如能用上述方法将使纤维化垂体腺瘤软化,则可为手术提供良好的条件,使患者获得最佳的预后。

【参考文献】

[1] 陈其钻,陈谦学. 垂体腺瘤治疗现状和进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2013, 18(6): 381-384.

[2] Rao KV, Gangadharan JL, Vazhayil V, *et al.* Arterial infarct following surgery for pituitary adenoma [J]. J Neurosci Rural Pract, 2014, 5(4): 434-436.

[3] Li L, Wu T, Huang J, *et al.* Expression of heat shock protein 47, transforming growth factor- β 1, and connective tissue growth factor in liver tissue of patients with Schistosoma japonicum-induced hepatic fibrosis [J]. Parasitology, 2015,

142(2): 341-351.

[4] Wang L, Chi YF, Yuan ZT, *et al.* Astragaloside IV inhibits renal tubulointerstitial fibrosis by blocking TGF- β /Smad signaling pathway in vivo and in vitro [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2014, 239(10): 1310-1324.

[5] Naganuma H, Satoh E, Nukui H, *et al.* Technical considerations of transphenoidal removal of fibrous pituitary adenomas and evaluation of collagen content and subtype in the adenomas [J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2002, 42(5): 202-213.

[6] 胡宜,刘云会. 质地硬韧垂体腺瘤的经蝶显微手术治疗[J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(10): 928-930.

[7] McCulloch LJ, Rawling TJ, Sjöholm K, *et al.* COL6A3 is regulated by leptin in human adipose tissue and reduced in obesity [J]. Endocrinology, 2014, 156(1): 134-146.

[8] Li Y, Foster W, Deasy BM, *et al.* Transforming growth factor β_1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis [J]. Am J Pathol, 2004, 164(3): 1007-1019.

[9] Leask A. Focal adhesion kinase: a key mediator of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts [J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013, 2(5): 247-249.

[10] Kubota S, Takigawa M. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions [J]. Clin Sci (Lond), 2015, 128(3): 181-196.

[11] Wang L, Chen Z, Wang Y, *et al.* TR1 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis through cyclin A and CTGF regulation in non-small cell lung cancer [J]. Tumour Biol, 2014, 35(1): 463-468.

[12] Kumar P, Smith T, Rahman K, *et al.* Adiponectin agonist ADP355 attenuates CCl4-induced liver fibrosis in mice [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110405.

[13] Pi L, Robinson PM, Jorgensen M, *et al.* Connective tissue growth factor and integrin α v β 6: a new pair of regulators critical for ductular reaction and biliary fibrosis [J]. Hepatology, 2014, 27425.

[14] Uchio K, Graham M, Dean NM, *et al.* Down-regulation of connective tissue growth factor and type I collagen mRNA expression by connective tissue growth factor antisense oligonucleotide during experimental liver fibrosis[J]. Wound Repair Regen, 2004, 12(1): 60-66.

(2014-10-24收稿, 2015-01-04修回)