

转录因子 E2F-1 与垂体肿瘤转化基因(PTTG) 在大鼠 PRL 瘤中的表达

程海梅¹, 徐 春¹, 杨雪梅¹, 刘晓军²

(1. 武警总医院内分泌科, 北京 100039; 2. 武警总医院药剂科, 北京 100039)

【摘要】 目的 通过检测垂体肿瘤转化基因(PTTG) 与腺病毒 E2 启动子结合因子 1(E2F-1) 在大鼠催乳素(PRL) 瘤中的表达来探讨两者在 PRL 瘤发生发展过程中的作用。方法 40 只大鼠随机分为两组: 实验组(E 组, n = 20): 皮下植入 17 β -雌二醇的方法诱发大鼠 PRL 瘤; 对照组(C 组, n = 20): 皮下植入空白硅胶管。雌激素诱导 10 周后处死大鼠, 心脏穿刺取血, 4% 多聚甲醛体内灌流取出脑垂体, 称重, ELISA 方法检测两组大鼠血清 PRL 水平, 垂体组织行病理组织学观察, 免疫组化 SP 方法检测两组大鼠垂体组织中 PTTG 蛋白质、E2F-1 蛋白质的表达。结果 雌二醇作用 10 周后, 据垂体重量、垂体组织学变化和血清 PRL 水平证实 PRL 瘤诱导成功。PRL 瘤组中, PTTG 蛋白质、E2F-1 蛋白质均明显高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 且 PTTG 蛋白质和 E2F-1 蛋白质的表达呈明显正相关($\gamma = 0.764, P < 0.01$)。结论 PTTG 与 E2F-1 在大鼠 PRL 瘤中共同过度表达, 参与了大鼠 PRL 瘤的发生发展。

【关键词】 PTTG; E2F-1; Wistar 大鼠; PRL 瘤; 免疫组化

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011) 09-0006-04
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.09.002

Expression of Transcription Factor E2F-1 and Pituitary Tumor Transforming Gene(PTTG) in Rat Prolactinoma

CHENG Hai-mei¹, XU Chun¹, YANG Xue-mei¹, LIU Xiao-jun²

(1. Department of Endocrinology, General Hospital of Chinese People's Armed police Forces, Beijing 100039, China;
2. Department of Pharmacy, General Hospital of Chinese People's Armed police Forces, Beijing 100039, China)

【Abstract】 Objective To detect the expression of adenovirus E2 promoter binding factor 1 (E2F-1) and Pituitary tumor transforming gene (PTTG) in rat prolactinoma and to explore their role in the development of prolactinoma. **Methods** 40 male Wistar(120 ~ 150g) rats were randomly divided into two groups: experimental group (E group, n = 20): 17 β -estradiol stuffed in silicone tube was subcutaneously implanted to induce rat prolactinoma model; the control group (C group, n = 20) blank silicone tube was subcutaneously implanted. After 10 weeks, all the rats were executed, blood was taken by cardiac puncture, 4% paraformaldehyde was intracardially perfused and pituitary tissues were harvested, weighed. Serum PRL levels were detected by ELISA method; Pituitary tissue histopathological changes were observed; both expression of PTTG protein and E2F-1 protein were detected by immunohistochemistry SP method. **Results** Prolactinoma models were induced successfully as reflected by pituitary weight, pituitary pathological change and serum PRL level. The expression of PTTG protein and E2F-1 protein in prolactinoma group was obviously higher than those in control group ($P <$

[基金项目]首都医学科研发展基金项目(2003-III-21); 武警总医院科研基金项目(WZ200517)。

[作者简介]程海梅(1985 -), 女, 硕士, 研究方向: 垂体腺瘤的发生机制, Email: chenghm85@ gmail. com。

[通讯作者]徐春, 博士, 副主任医师, Email: wjxuchun@ sohu. com。

0.01) and PTTG protein expression was positively correlated with E2F-1 protein ($\gamma = 0.764, P < 0.01$)。 **Conclusion** PTTG and E2F-1 were co-overexpressed in prolactinoma, indicating their role in the development of prolactinoma.

【Key words】 PTTG; E2F-1; Wistar rat; Prolactinoma; Immunohistochemistry

催乳素瘤(PRL 瘤)是最常见的功能性垂体腺瘤,可引起闭经、泌乳、不孕(育)、高泌乳素血症等内分泌紊乱,垂体增大可压迫邻近组织出现视力减退、视野缺损、颅内高压等表现,因其生长隐匿常不能早期发现,严重危害人类健康。PRL 瘤主要是单克隆细胞起源,对于其确切的发病机制,目前还不是很统一。垂体肿瘤转化基因(PTTG)是第一个在大多数垂体腺瘤中表达的肿瘤转化基因,PTTG 过度表达促进垂体腺瘤形成的机制目前仍无圆满的解释。细胞周期调节失控导致细胞增殖是肿瘤发生的重要原因,腺病毒 E2 启动子结合因子 1(E2F-1)是调控细胞周期的关键因子之一,其通过调控一系列靶基因的表达来促进细胞周期的进程。有研究发现,PTTG 启动子上存在 E2F-1 的特异结合序列,PTTG 的高表达是否与 E2F-1 有关,E2F-1 在 PRL 瘤形成过程中究竟起到什么作用,本研究采用免疫组化方法检测转录因子 E2F-1 蛋白质和 PTTG 蛋白质在雌激素诱发的大鼠 PRL 瘤中的表达情况,探讨两者在 PRL 瘤发生发展中的作用及两者之间是否有关。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂

成年雄性 Wistar 大鼠(体重 120 ~ 150 g,由军事医学科学院实验动物中心提供,编号:SCXK(军)2007-004);17 β -雌二醇(由 Sigma 公司提供);血清催乳素检测试剂盒(购自福建迈新生物技术开发公司);兔抗鼠 PTTG 多克隆抗体(工作浓度 1:200 ~ 500),兔抗鼠 E2F-1 多克隆抗体(工作浓度 1:200 ~ 500)浓缩型 DAB 显色液以及 SP 染色试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠 PRL 瘤模型的制备:40 只成年大鼠(120 ~ 150 g)随机分为 2 组:正常对照组(C 组, $n = 20$ 只)皮下植入空白硅胶管;PRL 瘤组(P 组, $n = 20$ 只)皮下植入含有 17 β -雌二醇(约 20 mg)的硅胶管;用药 10 周后,用水合氯醛麻醉大鼠,心脏穿刺取血,4% 多聚甲醛心脏灌流体内固定,取出垂体,称重后放于 4% 多聚甲醛内固定。

1.2.2 垂体组织的病理学观察:标本经多聚甲醛固

定后,常规脱水,石蜡包埋,切片厚约 3 μm ,苏木素-伊红染色,封片进行显微镜观察。

1.2.3 ELISA 法测定血清 PRL 水平:心脏穿刺取血 1 mL,室温自然凝固,离心(3000 rpm,15 min)后取血清,放入 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。待标本收集完用 ELISA 测定大鼠血清催乳素水平。

1.2.4 免疫组化 SP 法检测 PTTG 蛋白质、E2F-1 蛋白质的表达:垂体经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、3 μm 连续切片。免疫组化染色操作步骤按说明书进行。采用已知阳性片为阳性对照,PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

PTTG 蛋白质和 E2F-1 蛋白质阳性表达均为胞浆和胞核内棕黄色颗粒。本实验结果判定标准参照 Fromowitz^[1] 综合计分法:随机选择 5 个高倍镜视野(200 \times),按阳性细胞所占比例及细胞染色强度进行分级:阳性细胞数 < 5% 为 0 分,6 ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分,> 75% 为 4 分;染色强度评分:无显色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;两项积分相加:0 ~ 1 分为阴性, ≥ 2 分为阳性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,大鼠体重、垂体重量、PRL 瘤以 $X \pm S$ 表示,两组间差异用 t 检验,免疫组化结果分析采用卡方检验,相关性分析应用 Spearman 相关性检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 两组大鼠体重、垂体重量、血清 PRL 水平的比较

用药 10 周后,实验组大鼠与对照组比较,平均体重明显降低($P < 0.01$);垂体重量明显增加($P < 0.01$);血清 PRL 水平明显升高($P < 0.01$)(表 1)。

2.2 两组大鼠垂体组织病理学的比较

HE 染色下,对照组垂体细胞排列规则,呈圆形,胞浆少,胞核大小一致,以嗜酸性粒细胞为主(封 2 图 1)。实验组细胞排列紊乱,细胞数目明显增加,细胞呈圆形或多角形,胞体增大,胞浆带增宽,细胞分化差,核大小不一致,可见大核细胞,细

表 1 两组大鼠体重、垂体重量、血清 PRL 水平比较
Tab. 1 Comparison of body weight, pituitary weight, serum PRL levels

	E 组 Experimental group	C 组 Control group	t 值 t value	P 值 P value
大鼠体重 Body weight(g)	211. 7	357. 3	-20. 44	<0. 01
垂体重量 Pituitary weight(mg)	40. 72	15. 10	14. 93	<0. 01
血清 PRL 水平 Serum PRL levels(ng/mL)	462. 64	74. 41	30. 40	<0. 01

表 2 两组大鼠垂体中 PTTG 蛋白质、E2F-1 蛋白质表达情况
Tab. 2 Comparison of PTTG, E2F-1 protein expression between the two groups

	PTTG 蛋白(例) PTTG protein		合计 Total	E2F-1 蛋白(例) E2F1 protein		合计 Total
	E 组 Experiment group	C 组 Control group		E 组 Experiment group	C 组 Control group	
阳性 Positive	14	2	16	16	4	20
阴性 Negative	6	18	24	4	16	20
合计 Total	20	20	40	20	20	40
	$X^2 = 12. 6$	$P < 0. 01$		$X^2 = 12. 6$	$P < 0. 01$	

注: 实验组大鼠垂体 PTTG 蛋白质表达明显高于对照组 ($P < 0. 01$); 实验组大鼠垂体 E2F-1 蛋白质表达明显高于对照组 ($P < 0. 01$)

Note: PTTG protein expression was higher in pituitary of experimental rats ($P < 0. 01$); E2F-1 protein expression was higher in pituitary of experimental rats ($P < 0. 01$)

胞增生明显,以嗜酸性粒细胞为主(封 2 图 2)。

2.3 PTTG 蛋白质在两组大鼠垂体的表达

PTTG 蛋白质在实验组呈高表达 70% (14/20), 阳性颗粒主要出现在胞浆,部分位于细胞核,呈棕黄色或黄褐色颗粒(封 2 图 4),显著高于对照组 10% (2/20),对照组着色细胞数目少,细胞染色浅,与背景颜色难以区分(封 2 图 3),两组差别具有统计学意义 ($P < 0. 05$) (表 2)。

2.4 E2F-1 蛋白质在两组大鼠垂体的表达

E2F-1 蛋白质在实验组呈高表达 80% (16/20),阳性颗粒胞浆和胞核中弥漫分布,染色较深(封 2 图 6),显著高于对照组 20% (4/20),且对照组阳性颗粒主要位于胞浆,染色较浅(封 2 图 5),两组差别具有统计学意义 ($P < 0. 05$) ,见表 2。

2.5 PTTG 蛋白质和 E2F-1 蛋白质在大鼠 PRL 瘤中表达的相关性

PRL 瘤组 14 例 PTTG 蛋白质阳性的标本中 E2F-1 蛋白阳性者 13 例,阴性 1 例;6 例 PTTG 蛋白阴性的标本中 E2F-1 蛋白质阳性者 3 例,阴性 3 例,两者表达一致率为 70%,统计学分析 PTTG 表达与 E2F-1 表达呈显著正相关 ($\gamma = 0. 764, P < 0. 051$)。

3 讨论

雌激素是垂体催乳素 (PRL) 细胞增生和 PRL 基因表达的强有力的刺激因子,雌激素长期作用引起垂体 PRL 细胞增生、PRL 分泌增加,最终形成

PRL 瘤。由于垂体的特殊性,正常垂体难以获得,建立稳定、可靠的大鼠垂体腺瘤模型对研究腺瘤的发病机制和寻找有效的治疗措施具有重要意义。有研究显示,长期给予大鼠雌激素,可诱发大鼠 PRL 瘤。大鼠垂体腺瘤动物模型的成功与否可以从三个方面进行判断:(1)一般认为大鼠垂体重量超过 50 mg 即可判断为腺瘤^[5],也有观点认为大于 30 mg 即可判定建模成功^[6];(2)血浆 PRL 浓度显著增高;(3)组织病理学检查。本实验选用 Wistar 大鼠,用皮下植入含有雌激素的硅胶管,结合上述指标分析,10 周后垂体瘤模型成功率达 100%。

垂体肿瘤转化基因 (pituitary tumor transforming gene, PTTG) 是 Pei^[4] 等用 mRNA 差异显示技术从大鼠垂体瘤细胞中分离出的新型原癌基因,体外研究它能诱导 NIH3T3 成纤维细胞的转化,在体内能诱发裸鼠实体肿瘤的形成,是一种强有力的肿瘤转化基因。PTTG 通过促进细胞转化、诱导血管形成、抑制姊妹染色单体分离、反式激活 c-myc 等癌基因的途径参与肿瘤的形成。肿瘤细胞中 PTTG cDNA 的序列分析未发现突变,PTTG mRNA 表达水平却明显升高,说明其致癌作用主要依赖于其表达水平的高低^[5]。Donangelo^[6] 等发现,PTTG 失活的小鼠表现出垂体增生不良,而 PTTG 过表达导致垂体局灶性增生说明 PTTG 含量与垂体增生和肿瘤的形成直接相关。本实验研究发现,大鼠 PRL 瘤中 PTTG 蛋白质表达明显增高,正常垂体组织中无明显表达,说明 PTTG 在 PRL 瘤的发生发展过程中起重要作用。

E2F-1 作为转录因子家族的一员,对于调节细胞由 G1 期进入 S 期起着至关重要的作用。在 G0 和 G1 早期,E2F-1 与低磷酸化的 pRb 结合,E2F-1 转录活性受抑制;G1 中后期,pRb 被 cyclin D/cdk4/6 和 cyclin E/cdk2 磷酸化后,E2F-1 与 Rb 分离,E2F-1 被游离后与其靶基因结合,激活它们的转录^[7]。

很多参与 DNA 复制和细胞周期调控的基因启动子区存在 E2F-1 DNA 结合位点,E2F-1 与其结合后,促使细胞由 G1 期进入 S 期,继而推动细胞周期进程,导致细胞增殖和肿瘤的形成。迄今为止发现,E2F-1 可以参与 1000 多种基因的调控^[8]。Zhou^[9]等发现,PTTG 启动子上也存在 E2F-1 的特异结合序列,E2F-1 与 PTTG 启动子结合后,激活 PTTG 的转录。研究还发现,E2F-1 和 PTTG 在 Rb + / - 鼠垂体组织和人垂体肿瘤中成一致高表达。体外 H1299 细胞转染表达 E2F-1 的质粒后,PTTG mRNA 表达水平明显升高;将 Rb siRNA 转染 H1299 细胞后,Rb 被抑制,E2F-1 表达水平升高,同时 PTTG 表达量也明显上调,这些提示 PTTG 的表达可能受 E2F-1 的调控。本实验研究发现,PTTG 蛋白质和 E2F-1 蛋白质在雌激素诱导的大鼠 PRL 瘤中呈一致高表达,进一步证实了两者之间的关系。

Yamasaki^[10]等研究则发现,E2F-1 缺失的 Rb1 (+ / -) 小鼠垂体肿瘤的发生率减少,提示 E2F-1 可能在垂体腺瘤的发生中起到一定作用。本实验发现:E2F-1 蛋白在大鼠 PRL 瘤中的表达明显高于正常垂体组织,并且 E2F-1 蛋白质与 PTTG 蛋白质表达呈明显正相关,说明 E2F-1 在 PRL 瘤的发生发展中起着促进作用,作者推测可能是通过调控 PTTG 的表达来实现。

基于 E2F-1 在肿瘤中的异常表达及其对细胞周期和细胞凋亡的调控,出现了很多针对 E2F-1 作为靶点设计的肿瘤基因治疗试验,并取得了初步成效^[11-13]。明确了 E2F-1 在垂体肿瘤形成过程中的作用,有利于从分子水平开展对垂体肿瘤基因治疗的研究。

综上,用皮下植入雌激素的方法能成功诱导 Wistar 大鼠 PRL 瘤的发生,PTTG 蛋白质与 E2F-1 蛋

白质在雌激素诱发的大鼠 PRL 瘤中呈一致高表达,两者共同参与了大鼠 PRL 瘤的发生发展,这对以后垂体肿瘤的治疗提供了更多的契机。

参考文献:

- [1] Fromowitz FB, et al. Ras p21 expression in the progression of breast cancer [J]. Hum Pathol, 1987, 18(12): 1268 - 1275.
- [2] Clifton KH, Meyer RK, Mechanism of anterior pituitary tumor induction by estrogen [J]. Anat Rec. 1956; 125(1): 65 - 68.
- [3] 薛毅琰,段国升,张灿元. 雌酮诱发大白鼠垂体腺瘤的动物模型 [J]. 中华实验外科杂志, 1992, 9: 1 - 36.
- [4] Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor transforming gene (PTTG) [J]. Mol Endocrinol, 1997; 11(4): 433 - 441.
- [5] Kanakis D, Kirches E, Mawrin C, et al. Promoter mutations are no major cause of PTTG overexpression in pituitary adenomas [J]. Clin Endocrinol (Oxf) 2003, 58(2): 151 - 155.
- [6] Ines Donangelo. Pituitary tumor transforming gene overexpression facilitates pituitary tumor development [J]. Endocrinology, 2006, 147(10): 4781 - 4791.
- [7] Harbour J W, Dean D C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms [J]. Genes Dev, 2000, 14(19): 2393 - 2409.
- [8] Fikret Sahin, Todd L. Sladek. E2F-1 has dual roles depending on the cell cycle [J]. Biol. Sci. 2010; 6(2): 116 - 128.
- [9] Cuiqi Zhou, Kolja W, Serguei B, et al. E2F-1 induces pituitary tumor transforming gene(PTTG1) expression in human pituitary tumors [J]. Molecular Endocrinology, 2009, 23(12): 2000 - 2012.
- [10] Yamasaki L, Bronson R, Williams, et al. Loss of E2F-1 reduced tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1 (+ / -) mice [J]. Nat. Genet, 1998, 18: 360 - 364.
- [11] Gomez-Gutierrez JG, Garcia-Garcia A, Hao H, et al. Adenovirus-mediated expression of truncated E2F-1 suppresses tumor growth in vitro and in vivo [J]. Cancer, 2010; 116(18): 4420 - 32.
- [12] Yan LH, Li L, Xie YB, et al. Effects of E2F-1 overexpression on apoptosis of gastric cancer cells and expressions of apoptosis-related genes [J]. Ai Zheng. 2009; 28(11): 1176 - 80.
- [13] Xie Y, Yin Y, Li L, et al. Short interfering RNA directed against the E2F-1 gene suppressing gastric cancer progression in vitro. Oncol [J]. 2009; 21(5): 1345 - 53.

(修回日期)2011-06-04

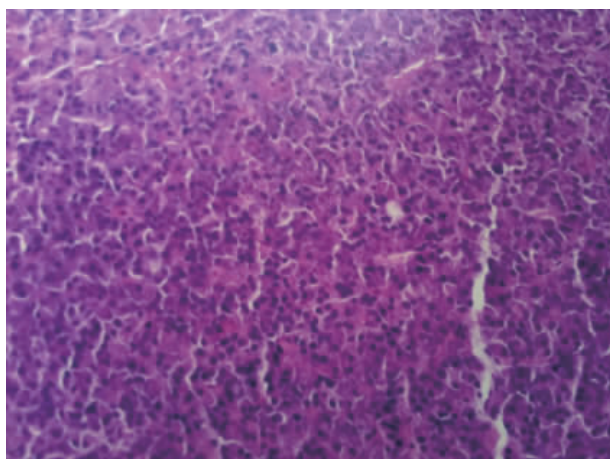


图 1 对照组大鼠垂体组织病理
Fig. 1 Pituitary pathology in control rats

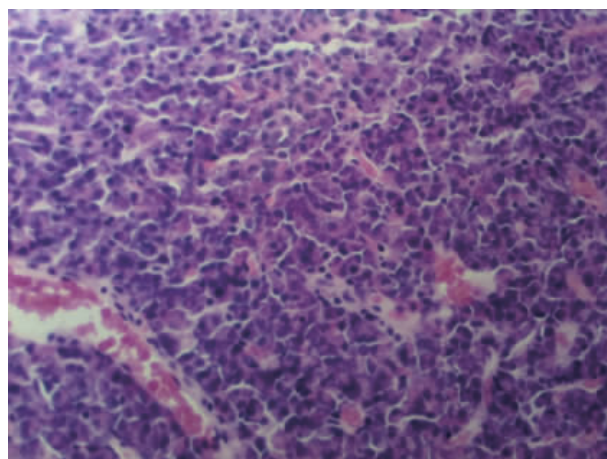


图 2 实验组大鼠垂体组织病理
Fig. 2 Pituitary pathology in experiment rats

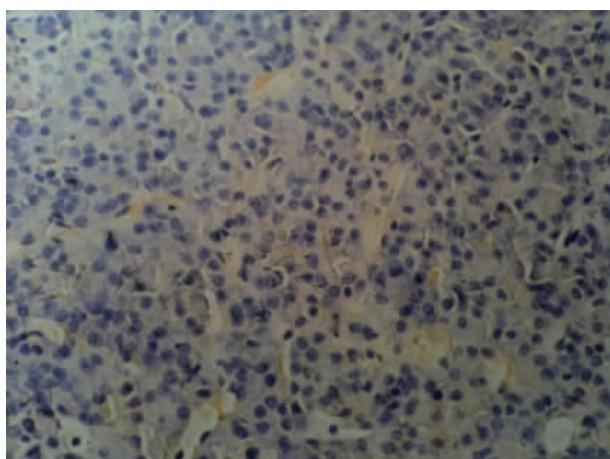


图 3 对照组大鼠垂体 PTTG 蛋白免疫组化
Fig. 3 PTTG protein immunohistochemistry in control rats pituitary

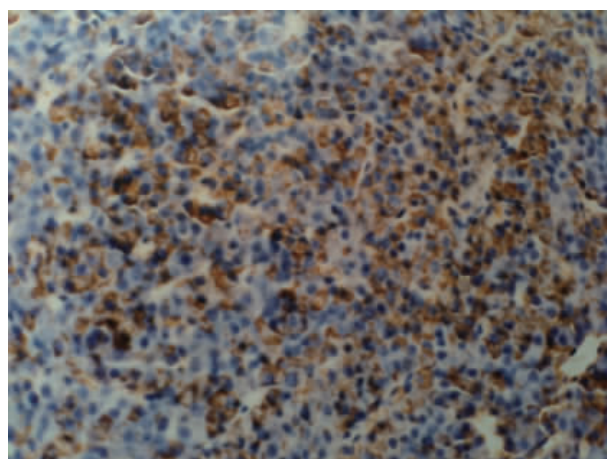


图 4 实验组大鼠垂体 PTTG 蛋白免疫组化
Fig. 4 PTTG protein immunohistochemistry in experimental rats pituitary

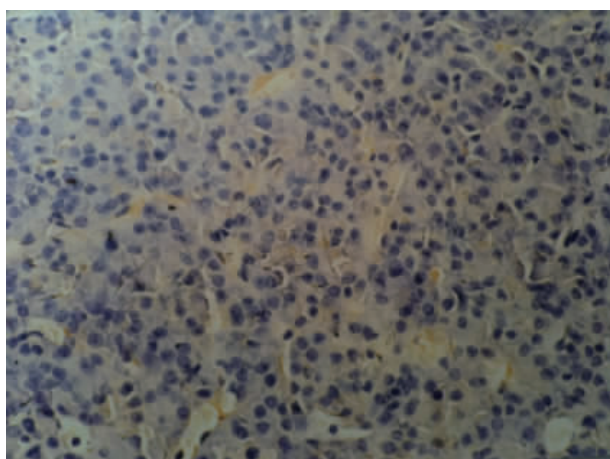


图 5 对照组大鼠垂体 E2F-1 蛋白免疫组化
Fig. 5 E2F-1 protein immunohistochemistry in control rats pituitary

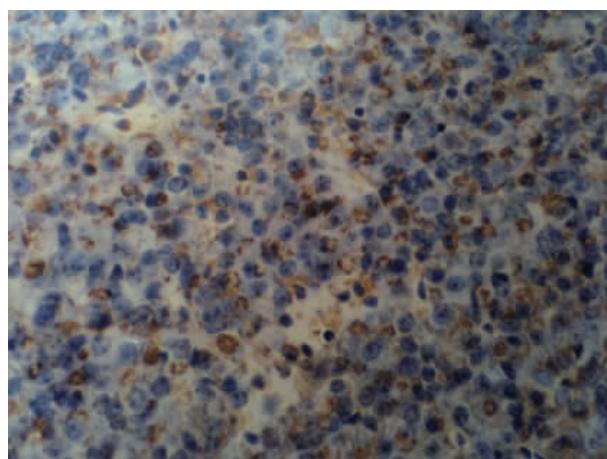


图 6 实验组大鼠垂体 E2F-1 蛋白免疫组化
Fig. 6 E2F-1 protein immunohistochemistry in experimental rats pituitary