

高迁移率蛋白 A2 在垂体腺瘤中的表达及意义

王冀伟 丁亚楠 王秋霞 单小松 刘海鹏 袁宇 赵强

【摘要】 目的 研究高迁移率蛋白 A2(HMGA2)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** 采用免疫组织化学法及 RT-PCR 法检测 55 例垂体腺瘤组织中 HMGA2 蛋白的表达。依据 Wilson 改良 Hardy 分类系统分级分期标准分组:侵袭性垂体腺瘤组 18 例,非侵袭性垂体腺瘤组 37 例。依据内分泌学检查分为:无功能性垂体腺瘤 5 例,功能性垂体腺瘤 50 例。**结果** HMGA2 在无功能垂体腺瘤中无表达,在功能性垂体腺瘤中表达率 82%,差异有统计学意义。在侵袭性组表达阳性率 32.43%,与侵袭性垂体腺瘤(100%)相比,差异有统计学意义。侵袭组 HMGA2 mRNA 的表达水平较非侵袭组表达水平显著增高(0.891 ± 0.172 vs. 0.372 ± 0.181),功能性垂体腺瘤较非功能性垂体腺瘤 HMGA2 mRNA 的表达水平显著增高(0.564 ± 0.196 vs. 0),差异有统计学意义。**结论** HMGA2 的高表达在功能性垂体腺瘤的发生及垂体腺瘤的侵袭性中发挥重要的作用。

【关键词】 垂体肿瘤; 腺瘤; HMGA2 蛋白; 肿瘤浸润

Expression and significance of high mobility group A2 in pituitary adenomas WANG Ji-wei, DING Ya-nan, WANG Qiu-xia, SHAN Xiao-song, LIU Hai-peng, YUAN Yu, ZHAO Qiang. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China
Corresponding author: WANG Ji-wei, Email: wjw03122@21cn.com

【Abstract】 Objective To study the relationship of the expressions of HMGA 2 in pituitary adenomas and the relationships of the HMGA2 expressions with the invasiveness of pituitary adenomas was analyzed respectively. **Methods** The expressions of HMGA2 was determined by immunohistochemical technique and RT-PCR in 55 samples of pituitary adenomas. **Results** HMGA2 expressed in functional pituitary adenomas but not expressed in non-functional pituitary adenomas, expression in the invasive group was significantly higher than that of non-invasive group. **Conclusions** The high expression of HMGA2 plays an important role in the occurrence of functional pituitary adenomas and invasive in pituitary adenomas.

【Key words】 Pituitary neoplasms; Adenoma; HMGA2 protein; Meoplasm invasiveness

垂体腺瘤是常见的良性肿瘤,虽为良性,但由于常合并严重的临床症状而需要治疗,部分垂体腺瘤侵袭性生长,难以完全切除,容易复发。目前垂体腺瘤的发病机制尚不完全清楚。本研究采用免疫组化及 RT-PCR 技术检测高迁移率蛋白 A2 (high-mobility group A2, HMGA2) 在垂体腺瘤中的表达。探讨 HMGA2 表达在垂体腺瘤的发生、发展及侵袭性中的作用和作为预测生物学行为标志物的价值,并进一步预测其在垂体腺瘤预后和治疗中的相关作用,为垂体腺瘤的治疗提供新的思路。

资料与方法

1. 研究对象:选取 2007 至 2010 年在河北大学附属医院神经外科行垂体腺瘤切除的标本共 55 例,本研究所有标本均为首次发现,未接受放化疗,MR 扫描均为大腺瘤(直径 > 1 cm)且有完整临床资料。依据内分泌学检查:其中无功能性垂体腺瘤 5 例,泌乳素垂体腺瘤 40 例,生长激素垂体腺瘤 10 例。并依据 Wilson 改良 Hardy 分类系统分级分期标准分组:侵袭性垂体腺瘤组 18 例,非侵袭性垂体腺瘤组 37 例。肿瘤侵袭性的判定标准^[1]:(1) Hardy-Knosp 分级分期^[2], III 级或以上及 C-E 期认为是侵袭性垂体腺瘤;(2) 鞍底硬膜和邻近骨质经病理证实有肿瘤细胞;(3) 影像学检查见肿瘤包绕双侧颈内动脉。凡符合上述 3 项中的任何一项者均归为侵袭性组,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.01.079

作者单位:071000 保定,河北大学附属医院神经外科(王冀伟、丁亚楠、单小松、刘海鹏、袁宇);保定市第一中心医院呼吸内科(王秋霞);保定市第一医院神经外科(赵强)

通讯作者:王冀伟,Email:wjw03122@21cn.com

余为阴性对照组。

手术室内取新鲜离体标本,每块标本保持无菌分成两个部分保存:(1)整个过程严格防止 RNA 酶污染,放入液氮罐中保存,用于进行 RT-PCR 分析。(2)制备成冰冻切片或石蜡切片,用于免疫组化分析。所有标本均经病理结果确认。

2. 免疫组化:鼠抗人 HMGA2 单克隆抗体为美国公司产品,SP 试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色剂、抗原修复液均由北京中山技术公司提供。取新鲜标本经甲醛固定,常规石蜡包埋。4 μm 厚度连续切片 2 张,实验步骤参照 SP 试剂盒说明书进行。一抗浓度 HMGA2 为 1:50。HMGA2 以细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性。按照 Remmele-Seore 标准,以阳性细胞占肿瘤细胞总数的百分率划分为三个等级:肿瘤细胞核着色 < 10% 为(-), 10% ~ 50% 为(+), > 50% 为(++)(图 1,2)。

3. RT-PCR:Trizol 法提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,反应条件为 45 $^{\circ}\text{C}$ 45 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min。HMGA2 基因 PCR 扩增,引物序列参照文献设计^[3],由上海生工生物技术有限公司合成。HMGA2 正向引物 5'-CGAAAGGTGCTGGCAGCTCCGG-3', 反向引物 5'-CCATTTCCTAGGTCTGCCTCTTG-3'。以 GAPDH 为内参照扩增,正向引物:5'-ACATGTTTCAATATGATTCC-3', 反向引物:5'-TGGACTC-CACGACGTACTCA-3'。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。PCR 扩增产物均经 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,紫外透射仪观察结果并照相,与 DNA 标准品比较,在相对应位置出现扩增条带而无杂带者为阳性表达,在相对应位置未出现扩增条带也无杂带者为阴性表达。以 Kodak-ID 软件分析各条带的灰度值,以 HMGA2 条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值作为 HMGA2 mRNA 的相对表达水平,进行半定量分析,PCR 产物送至上海生物工程公司进行纯化与序列分析。

4. 统计学处理:实验结果采用 SPSS 13.0 软件包。数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行成组 t 检验、卡方检验统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 免疫组化结果(表 1,2;图 1,2):HMGA2 在

垂体腺瘤组织中主要为细胞核着色,呈棕黄色或黄褐色,胞质中也有少量表达,以胞核表达为阳性计算。在 5 例无功能垂体腺瘤中不表达,40 例泌乳素垂体腺瘤中 32 例阳性表达,其中 15 例强阳性表达。10 例生长激素类垂体腺瘤 9 例阳性表达,5 例强阳性表达。功能性垂体腺瘤 HMGA2 阳性表达率为 82%,与无功能垂体腺瘤相比,差异有统计学意义。侵袭性生长的 18 例垂体腺瘤,均强阳性表达。非侵袭性垂体腺瘤中 12 例阳性表达,阳性率 32.43%,与侵袭性垂体腺瘤(100%)相比,差异有统计学意义。

表 1 不同功能性垂体腺瘤组织中 HMGA2 的表达

组别	例数	- (例)	+ (例)	++ (例)	阳性率(%)
无功能性垂体腺瘤	5	5	0	0	0
功能性垂体腺瘤	50	9	21	20	82 ^a
泌乳素垂体腺瘤	40	8	17	15	
生长激素垂体腺瘤	10	1	4	5	

注:与无功能性垂体腺瘤中比较,^a $P < 0.05$

表 2 侵袭性和非侵袭性垂体腺瘤组织中 HMGA2 的表达

组别	例数	- (例)	+ (例)	++ (例)	阳性率(%)
侵袭性垂体腺瘤	18	0	0	18	100 ^a
非侵袭性垂体腺瘤	37	25	11	1	32.43

注:与非侵袭性垂体腺瘤中比较,^a $P < 0.05$

表 3 侵袭和功能性垂体腺瘤组织中 HMGA2 mRNA 的表达

组别	例数	HMGA2 mRNA ($\bar{x} \pm s$)	表达率(%)
侵袭性垂体腺瘤	18	0.891 \pm 0.172 ^a	18(100)
非侵袭性垂体腺瘤	37	0.372 \pm 0.181	15(40.5)
功能性垂体腺瘤	50	0.564 \pm 0.196	24(48.0)
无功能性垂体腺瘤	5	0	0

注:与非侵袭性垂体腺瘤中比较, $t = 16.432$,^a $P < 0.01$

2. RT-PCR 结果(表 3,图 3):非功能性垂体腺瘤组织中无一例扩增出 HMGA2 基因片段,功能性垂体腺瘤组织中 24 例(48%) 在 437 bp 处出现清晰的扩增条带。18 例侵袭性垂体腺瘤组织全部出现 HMGA2 扩增条带,15 例非侵袭性垂体腺瘤(40.5%) 中出现 HMGA2 扩增条带。所有标本均在 299 bp 处出现 GAPDH 扩增条带。RT-PCR 产物的序列分析:测序结果与 Gene-bank 中所报告的 HMGA2 的成熟肽序列完全一致。侵袭组 HMGA2 mRNA 的表达水平较非侵袭组表达水平显著增高,功能性垂体腺瘤较非功能性垂体腺瘤 HMGA2 mRNA 的表达水平显著增

高,差异有统计学意义。

讨 论

垂体腺瘤在组织学上是一种颅内良性肿瘤,目前垂体腺瘤的分类一般按功能分类,分为功能性及非功能性垂体瘤。泌乳素腺瘤是最常见的功能性垂体腺瘤,约占垂体腺瘤的40%~50%。但在生物学行为上又可分为侵袭性生长和膨胀性生长两类^[4]。约30%~40%呈侵袭性发展,可侵入海绵窦、蝶窦等鞍周结构,给垂体腺瘤临床治疗带来很多困难。垂体腺瘤的发病机制特别是侵袭性的发病机制仍不清楚,因此探讨其发病机制在垂体腺瘤的治疗中尤其重要,目前通过分子生物学手段寻找一个切实可行的治疗靶点成为一个研究方向。

HMGA2是细胞核内一组富含电荷的非组蛋白小分子的染色体结合蛋白,其编码基因位于12号染色体的q15区,长10 kb。它不具有直接的转录调节活性,但可通过和DNA上的AT富集区调节基因的表达,和(或)直接与一些转录因子相互作用,调节一系列正常的生理活动,包括细胞的生长、增殖、分化和死亡。HMGA2蛋白通常仅在胚胎时期表达,正常成熟的组织中几乎检测不出,对哺乳动物的生长和发育起着重要的作用。但大量研究显示,在多种肿瘤中检测出HMGA2基因的再表达如:乳腺癌^[5]、肉瘤^[6]、胰腺癌^[7]、口腔鳞状细胞癌^[8]和非小细胞肺癌^[9]等恶性转化组织中,均有HMGA2的异常表达现象,其表达量与肿瘤的恶性程度、转移呈正相关,其表达增强与预后不良有关^[10],因此HMGA2被认为是肿瘤标志物之一。

HMGA2参与肿瘤转化大多数机制是以HMGA2蛋白下调或上调那些在控制增殖和侵袭中有重要作用的基因的表达为基础的^[11]。HMGA2基因可以通过抑制视网膜母细胞瘤蛋白(pRB)、激活转录刺激因子E2F1的活性从而推动细胞周期的进程,促进肿瘤细胞的异常增殖,参与垂体腺瘤发生、发展^[12]。Tessari等^[13]认为HMGA2和转录调节抑制因子P120密切相关,可以干涉其集合到cyclinA启动子。异常的表达HMGA2可以导致激活cyclinA启动子并且诱导内生的cyclinA基因。同时通过染色体的免疫沉淀反应显示只是当基因被转录激活的时候HMGA2基因才和cyclinA启动子相关。这些数据证实了cyclinA基因作为HMGA2的细胞内靶基因,而且首次揭示了HMGA2和细胞周期调控

相关联的机制。由此可见,HMGA2的生物学行为极似癌基因,其重排和扩增与肿瘤的发生关系密切。而且,在垂体腺瘤形成中HMGA2介导的E2F1活化的这种关键作用被杂交HMGA2过表达和E2F1敲除的老鼠肿瘤的形成受到抑制所证实^[12]。De Martino等^[14]研究发现,HMGA2基因也通过上调细胞周期蛋白CCNB2基因启动子活性促进CCNB2蛋白过度表达参与垂体腺瘤形成,正常垂体组织未发现CCNB2蛋白表达,然而在研究的12例垂体腺瘤中均检测到CCNB2蛋白,垂体腺瘤中HMGA2与CCNB2表达正相关^[15]。HMGA2促进上皮细胞间质化,上皮-间质转化(EMT)是一种常见的生理病理现象,是胚胎发展和上皮细胞去分化到一种成纤维样的状态,重新获得侵袭、迁移和或以一种失控的形式增殖的晚期上皮性肿瘤中一种普遍的特征^[16]。EMT参与大多数恶性肿瘤的侵袭转移过程,EMT的发生涉及众多信号分子和复杂的信号转导途径,以与EMT发生相关的转录因子的研究成为此领域的核心,这些转录因子具有多种功能,在诱导EMT发生中起着关键作用^[17]。最近的研究发现,HMGA2可能参与了EMT过程。Miyazawa等^[8]发现,在侵袭性越强的肿瘤中,HMGA2的表达水平越高。抑制HMGA2表达可以抑制增殖(发生G1期停滞)、促进凋亡、肿瘤细胞上皮性转化、E-cadherin表达、细胞间连接恢复等^[18-19]。

Qian等^[20]对垂体腺瘤进行免疫组化研究,发现HMGA2蛋白的表达明显高于正常组织,高表达的HMGA2蛋白的量与分级、大小、肿瘤的浸润成正相关,在垂体腺瘤的形成及进展中起到了重要的作用。Finelli等^[3]在转基因鼠PRL腺瘤动物模型中发现一种野生型HMGA2基因的过度表达,该基因定位于12q14~15染色体上,并采用细胞培养法、FISH探针分析法、蛋白质印迹法、RNA萃取和逆转录PCR技术及免疫组化等多种方法对11例人垂体腺瘤样本(其中9例PRL腺瘤,2例非功能垂体腺瘤)进行分析,发现在正常垂体组织中HMGA2不表达,在2例非功能性腺瘤中亦不表达,而在9例PRL腺瘤中有7例出现HMGA2特异性mRNA转录产物,3例侵袭性PRL腺瘤出现HMGA2基因表达,表明HMGA2基因表达与PRL腺瘤,特别是侵袭性巨大泌乳素腺瘤(IGPs)的发生和侵袭性生物学行为有关。

本实验结果进一步明确了HMGA2基因表达规

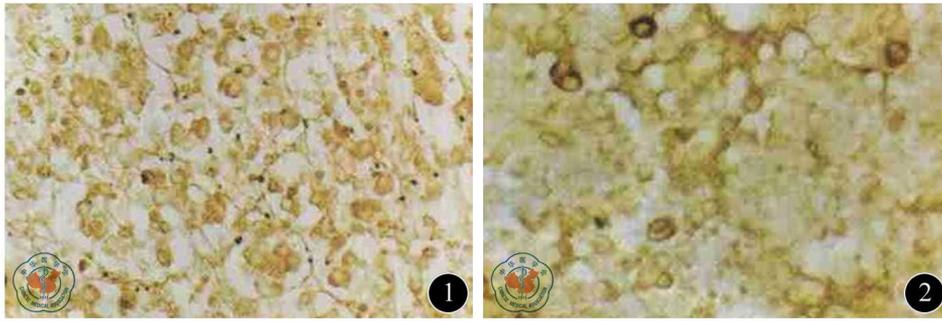
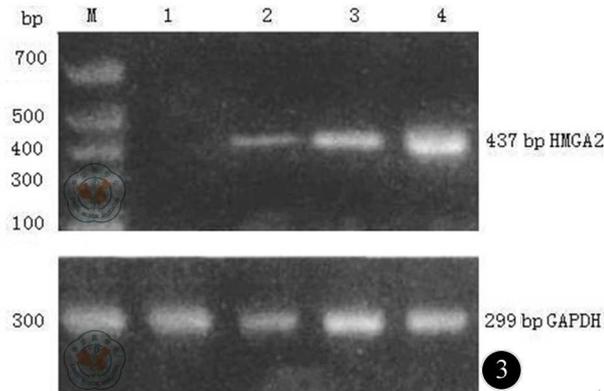


图1 HMGA2在侵袭性垂体瘤中的表达(SP法×200) 图2 HMGA2在非侵袭性垂体瘤中的表达(SP法×200)



M: marker; 1: 无功能性垂体腺瘤; 2: 非侵袭性垂体腺瘤; 3: 功能性垂体腺瘤; 4: 侵袭性垂体腺瘤

图3 垂体腺瘤组织中HMGA2 mRNA RT-PCR产物电泳结果

律,证实了HMGA2过度表达与功能性垂体腺瘤进程有关, HMGA2在无功能性垂体腺瘤中不表达,在功能性垂体腺瘤存在着过表达的现象,尤其是在侵袭性垂体腺瘤中HMGA2强表达,提示HMGA2基因在无功能性垂体腺瘤中处于相对静止的无功能状态,不参与细胞生长调节;而当受到局部某种因素刺激时, HMGA2基因就可能被激活,从而引起HMGA2蛋白的高表达。这可能的机制是HMGA2通过抑制核苷酸切除修复途径引起基因不稳定,促进肿瘤发生,激活转录刺激因子E2F1的活性及激活cyclinA启动子从而推动细胞周期的进程,又参与TGF-β信号转导途径,导致EMT,促进肿瘤的侵袭与转移,进而特异性的刺激垂体腺瘤细胞的分裂增生,表明HMGA2的生物学行为极似癌基因,其蛋白的异常表达与肿瘤的发生密切相关。提示HMGA2可能在功能性垂体腺瘤的发生、发展中扮演重要角色,特别是在垂体腺瘤的侵袭性中起重要作用。

参 考 文 献

[1] Knosp E, Steiner E, Kitz K, et al. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: A magnetic resonance imaging clas-

sification compared with surgical findings. *Neurosurgery*, 1993, 33:610.

[2] 周良辅. 现代神经外科学. 上海: 复旦大学出版社, 2011: 523-546.

[3] Finelli P, Pierantoni GM, Giardino D, et al. The High Mobility Group A2 Gene is amplified and overexpressed in human prolactinomas. *Cancer Res*, 2002, 62:2398-2405.

[4] 王忠诚. 王忠诚神经外科学. 2版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2005: 620-648.

[5] Rogalla P, Drechsler K, Kazmierczak B, et al. Expression of HMGIC, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade. *Mol Carcinog*, 1997, 19:153-156.

[6] Berner JM, Meza-Zepeda LA, Kools PF, et al. HMGIC, the gene for an architectural transcription factor, is amplified and rearranged in a subset of human sarcomas. *Oncogene*, 1997, 14:2935-2941.

[7] Abe N, Watanabe T, Suzuki Y, et al. An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *Br J Cancer*, 2003, 89:2104-2109.

[8] Miyazawa J, Mitoro A, Kawashiri S, et al. Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Cancer Res*, 2004, 64:2024-2029.

[9] Meyer B, Loeschke S, Schultze A, et al. HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog*, 2007, 46:503-511.

[10] Motoyama K, Inoue H, Nakamura Y, et al. Clinical significance of

high mobility group A2 in human gastric Cancer and its relationship to let-7 microRNA family. Clin Cancer Res, 2008, 14: 2334-2340.

[11] Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. Nat Rev Cancer, 2007, 7: 899-910.

[12] Fedele M, Visone R, De Martino I, et al. HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity. Cancer Cell, 2006, 9: 459-471.

[13] Tessari MA, Gostissa M, Altamura S, et al. Transcriptional Activation of the CyclinA gene by the Architectural Transcription Factor HMGA2. Molecular and Cellular Biology, 2003, 23: 9104-1916.

[14] De Martion I, Visone R, Wierinckx A, et al. HMGA proteins up-regulate CCNB2 gene in mouse and human pituitary adenomas. Cancer Res, 2009, 69: 1844-1850.

[15] Fedel M, Palmieri D, Fusco A. HMGA2: A pituitary tumor subtype-specific oncogene? Mol Cell Endocrinol, 2010, 326: 19-24.

[16] Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epitheli-

al-mesenehymal transition during tumor progression. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17: 548-558.

[17] 丁洪基, 杨兴季, 刘长光. 肿瘤的去分化与转分化[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5: 2644-2648.

[18] Malek A, Bakhidze E, Noske A, et al. HMGA2 gene is a promising target for ovarian cancer silencing therapy. Int J Cancer, 2008, 123: 348-356.

[19] Watanabe S, Ueda Y, Akaboshi S, et al. HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. Am J Pathol, 2009, 174: 854-868.

[20] Qian ZR, Asa SL, Siomi H, et al. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. Mod Pathol, 2009, 22: 431-441.

(收稿日期: 2011-08-22)

(本文编辑: 郝锐)

王冀伟, 丁亚楠, 王秋霞, 等. 高迁移率蛋白 A2 在垂体腺瘤中的表达及意义[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6(1): 94-98.

