

HIF-1 α 在垂体腺瘤中的表达及与垂体腺瘤侵袭性的关系

王曙辰 李 辉 夏世斌 韩立强 赵忠尧 石 岭

(哈尔滨 242 医院神经外科 黑龙江 哈尔滨 150066)

摘要 目的:研究缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)在人垂体腺瘤中的表达,对 HIF-1 α 蛋白表达与肿瘤分级进行相关性分析,探讨其表达水平与垂体腺瘤侵袭性的关系。方法:集影像学检查、内分泌学检查及病理诊断的垂体腺瘤 60 例,分为侵袭组和非侵袭组,其中侵袭组 36 例,非侵袭组 24 例,对照组正常脑组织 5 例。免疫组织化学技术检测 HIF-1 α 蛋白的表达,结合临床资料进行统计学分析。分析垂体腺瘤 HIF-1 α 蛋白的表达水平并与对照组进行比较,比较侵袭组和非侵袭组垂体腺瘤之间 HIF-1 α 蛋白表达水平的差异。结果:HIF-1 α 蛋白在垂体腺瘤中的表达明显高于对照组,二者比较 $\chi^2_{0.05,1}=12.392$, $P<0.001$,有显著性差异;侵袭组 HIF-1 α 蛋白的表达较非侵袭组显著增高,二者比较 $\chi^2_{0.05,1}=24.658$, $P<0.001$,有显著性差异。结论:HIF-1 α 是垂体腺瘤侵袭过程中的重要调控因子,与垂体腺瘤的大小、分级以及侵袭性密切相关,其作用机制有待进一步研究,其表达程度可用作垂体腺瘤预后的评估指标,为垂体腺瘤术后的复发以及相应的辅助治疗提供判断依据。有可能为人们靶向肿瘤缺氧来开发新药物提供新的作用靶点。

关键词 垂体腺瘤 缺氧诱导因子 侵袭性

中图分类号:R739.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)24-4704-04

The Expression of HIF-1 α in Pituitary Adenomas and Relationship with Invasion of Pituitary Adenomas

WANG Shu-chen, LI Hui, XIA Shi-bin, HAN Li-qiang, ZHANG Zong-yao, SHI ling

(Department of Neurosurgery, the 242 Hospital of Harbin, Heilongjiang Harbin, 150066, China)

ABSREACT Objective: To study the protein expressions of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) in pituitary adenomas, and the correlation of protein expression HIF-1 α with the grade and volume of pituitary adenomas, and probe the relationship between proteins and invasion of pituitary adenomas. **Methods:** Sixty surgical samples of pituitary adenomas were diagnosed by examine of biology and endocrinology, divided into invasive and non-invasive pituitary adenomas groups and in 5 normal sham patients. Analysis of pituitary adenoma HIF-1 α protein expression level and compared with the control group, more invasive group and the attack group between pituitary adenoma HIF-1 α protein expression level of the differences. **Results:** The Protein expression of HIF-1 α in Pituitary adenomas group were significantly higher than sham group ($\chi^2_{0.05,1}=12.392$, $P<0.001$); HIF-1 α in invasive Pituitary adenomas group were significantly higher than non-invasive Pituitary adenomas group ($\chi^2_{0.05,1}=24.658$, $P<0.001$). **Conclusion:** Hypoxia-inducible -1 alpha may be an important regulatory factors in pituitary adenoma' invasive, and the size and grading with the invasive closely related, the mechanism of its action research further.

Key words: Pituitary adenoma; Hypoxia inducible factor 1 α ; Invasive

Chinese Library Classification(CLC): R739.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)24-4704-04

缺氧诱导因子(Hypoxia inducible factor, HIF)是一种随着细胞内氧浓度变化而调节基因表达的转录调控因子,由 α 和 β 两个亚基组成^[1,2], α 亚基是决定 HIF-1 活性的缺氧调控亚基,可特异性的作用于氧反应通路,决定了 HIF-1 活性。HIF-1 α 是缺氧条件下广泛存在也人和哺乳动物体内的转录因子,最先于 1992 年 Semenza 和 Wang 首先发现的,随后确立了 HIF-1 的结构,并证明了其 cDNA 的编码顺序。该因子参与低氧性反应的调节过程,是细胞低氧应答的一个关键环节^[3],并受细胞浆内多种蛋白质的精确调节,与之构成细胞内低氧应答系统, HIF-1 生理活性主要取决于 α 亚基的活性和表达^[4]。已经有研究表明^[5], HIF-1 α 在肺癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌等多种肿瘤组织中过度表达并调节其生物学行为,而组织内的基质细胞和邻近

的正常组织则未见 HIF-1 α 表达,说明 HIF-1 α 在促进肿瘤增长方面起着重要作用。垂体腺瘤是一常见的颅内良性肿瘤,占颅内肿瘤总数的 10%-15%^[6]。通常呈膨胀性生长,少部分(6%-10%)^[7]向周边浸润性生长,曾一度被称为“恶性垂体腺瘤”^[8]。由于侵袭性垂体腺瘤向周围组织侵犯,手术不易完全切除,而且术后容易复发,给临床治疗带来一定的困难,因此目前仍是临床治疗的难点和重点^[9]。因此深入研究 HIF-1 α 蛋白在垂体腺瘤中的表达情况及与垂体腺瘤的分级和侵袭性的关系将有助于深入理解垂体腺瘤产生侵袭性的可能机制^[10],为垂体腺瘤术后的复发以及相应的辅助治疗提供判断依据,并有可能为人们靶向肿瘤缺氧来开发新药物提供新的作用靶点。本研究将符合以下情况之一者确定为侵袭性垂体腺瘤:Hardy-Wilson 分级级及 级以上和 C-E 期 knosp 分级 3 级以上;术中见鞍区骨质破坏,海绵窦内壁穿通,窦内结构被肿瘤包绕^[11]。

1 资料与方法

作者简介:王曙辰(1968-),男,硕士,副主任医师,主要研究方向:垂体瘤的微创治疗,电话:0451-86598101, E-mail:wschen@163.com
(收稿日期:2012-02-12 接受日期:2012-03-09)

1.1 一般资料

收集 242 医院神经外科 2009 年 1 月 -2011 年 1 月经鼻 - 蝶窦手术垂体腺瘤病例标本 60 例,男 26 例,女 34 例,年龄 16-65 岁,平均 40.6 岁。对照组织 5 例,来自脑挫裂伤病人的正常脑组织。

1.2 影像学检查及内分泌免疫组化检查

术前均进行了影像学和内分泌学检查且术后病理证实为垂体腺瘤。内分泌免疫组化进行分类中泌乳素腺瘤 20 例,生长激素腺瘤 11 例,促肾上腺皮质激素腺瘤 5 例,多激素分泌型腺瘤 7 例,无激素分泌型腺瘤 12 例,其他类型 5 例。

1.2 方法

术中所取的病理标本进行免疫组化染色,免疫组化的判定标准:阳性表达为境界清楚,位于细胞核和 / 或细胞浆内的棕黄色或棕褐色颗粒。高倍镜下 (× 400) 随机选取 5 个视野,以 HIF- 1α 的表达阳性细胞率和染色强度的得分之和进行判断。阳性细胞 <10%记为阴性,不论其染色深浅,记 1 分。阳性细胞率 11%-50%记 2 分,51%-80%记 3 分,80%以上记 4 分。染色强

度呈弱染色(浅黄色)记 1 分,中等染色(棕黄色)记 2 分,强染色(黄褐色)记 3 分。上述两项积分相加,总分为 3 分者为弱阳性 (+),4 分者为中等阳性(++),6-7 分者为强阳性(+++)。不同类别的 HIF-1α 蛋白阳性表达率采用卡方检验及 Fisher's exact 检验,相关性采用 Spearman 秩相关系数。所有数据采用 SPSS11.5 统计软件处理,双侧检验 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF- 1α 蛋白在正常脑组织和垂体腺瘤组织中的表达

HIF- 1α 蛋白阳性着色主要定位分布于垂体腺瘤细胞胞浆、胞核中,以胞浆内表达量稍多,呈棕黄色颗粒状。垂体腺瘤组织中 HIF- 1α 蛋白的表达:阴性 9 例,弱阳性 12 例(+),中等阳性 28 例(++),强阳性 11 例(+++),阳性率为 85.00 %。5 例正常脑组织中 HIF- 1α 蛋白表达均为阴性,阳性率为 0.00%。两组 HIF- 1α 蛋白表达阳性率经 Fisher's exact 检验 $\chi^2_{0.05,1}=12.392$, P < 0.001,有显著性差异(见表一)。

表 1 对照组和垂体腺瘤组 HIF- 1α 蛋白表达阳性率的比较

Table 1 The positive comparison of HIF-1 α protein expression in the control group and pituitary adenomas group

组别 Groups	HIF- 1α 蛋白 HIF-1 α protein					合计 Total	阳性率 Positive rate	χ^2	P
	例数 Number	-	+	++	+++				
对照组 Control group	5	5	0	0	0	0	0.00%	12.39	0.001
垂体瘤组 Pituitary adenomas group	60	9	12	28	11	51	85.00%		

注 对照组和垂体腺瘤组比较 $\chi^2_{0.05,1}=12.392$, P < 0.001。

Note: The comparison In the control group and pituitary adenomas group, $\chi^2_{0.05,1}=12.392$, P < 0.001.

2.2 侵袭组和非侵袭组垂体腺瘤中 HIF- 1α 蛋白的表达

本研究 24 例非侵袭性垂体腺瘤中 HIF-1α 的阳性例数为 15 例,阳性率为 62.50%,36 例侵袭性垂体腺瘤中 HIF-1α 的阳

性例数为 35 例,阳性率为 97.20%。二者比较 $\chi^2_{0.05,1}=24.658$, P < 0.001 有显著性差异(见表二)。

表 2 侵袭组和非侵袭组垂体腺瘤中 HIF- 1α 蛋白的表达

Table 2 HIF-1 α protein expression in the invasive and non-invasive Pituitary

组别 Groups	HIF- 1α 蛋白 HIF-1 α protein					合计 Total	阳性率 Positive rate	χ^2	P
	例数 Number	-	+	++	+++				
非侵袭组 Non-invasive Pituitary adenomas group	24	9	11	4	0	15	62.50%	24.658	< 0.001
侵袭组 Invasive Pituitary adenomas group	36	1	7	19	9	35	97.20%		
合计 Total	60	10	18	23	9	50	83.30%		

注 侵袭组和非侵袭组垂体腺瘤比较 $\chi^2_{0.05,1}=24.658$, P < 0.001。

Note: The comparison in the invasive Pituitary adenomas group and non-invasive Pituitary adenomas group($\chi^2_{0.05,1}=24.658$, P < 0.001).

2.3 免疫组化结果

在下述图片资料中,境界清楚且位于细胞核和/或细胞浆内的棕黄色或棕褐色颗粒,为垂体腺瘤组织中 HIF-1 α 蛋白阳性着色后的表达。

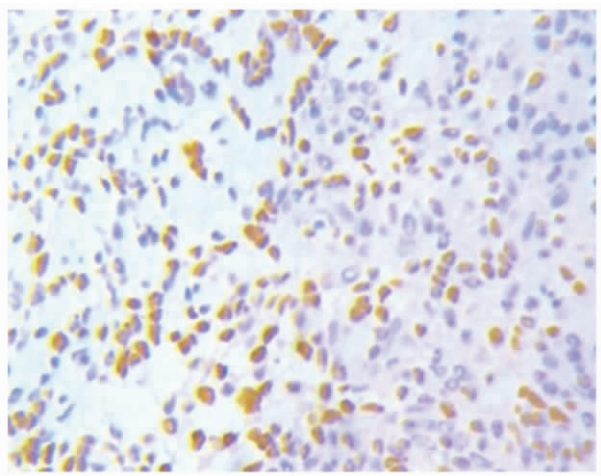


图1 HIF-1 α 在垂体腺瘤中的表达 免疫组化($\times 200$)

Fig.1 HIF-1 α protein expressed in pituitary adenoma organization($\times 200$)

HIF-1 α 蛋白在垂体腺瘤中有明显表达, HIF-1 α 蛋白的表达与垂体腺瘤的侵袭性成正相关, 可以作为判断垂体腺瘤侵袭性的指标(见下图)。

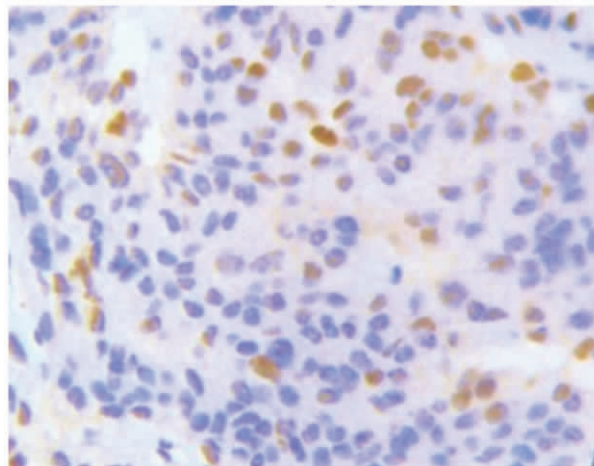


图2 HIF-1 α 在垂体腺瘤中的表达 免疫组化($\times 400$)

Fig.2 HIF-1 α protein expressed in pituitary adenoma organization($\times 400$)

3 讨论[A2]

肿瘤的发生、发展是多因素影响、多步骤作用、多基因和因子参与的复杂生物学过程。垂体腺瘤是一种常见的颅内肿瘤,人群发生率一般为 1/10 万,在颅内肿瘤中仅低于脑胶质细胞瘤和脑膜瘤,约占颅内肿瘤的 10-20%。垂体腺瘤属于良性肿瘤,但部分肿瘤具有侵袭性生长的趋势,这种侵袭性垂体腺瘤约占全部垂体腺瘤的 10-35%。由于侵袭性垂体腺瘤向周围组织侵犯,手术不易完全切除,术后易复发,给临床治疗带来一定的困难,因此目前仍是临床治疗的难点和重点。

对垂体瘤发病机理的研究曾提出了几种理论:下丘脑调节功能异常,基因突变至细胞性质改变等。直到 1990 年 Herman 等通过运用 x 染色体非活化性分析,证明垂体瘤是单克隆发生,可能是原始干细胞的基因突变导致细胞增殖引起的。随后的研究证明绝大多数垂体腺瘤均为单克隆发生^[12]。目前这一理论已被广泛接受,提示垂体腺瘤自发生之时可能已经决定了以后发展成侵袭性或非侵袭性垂体瘤。临床上,非侵袭性垂体瘤可以通过手术切除治愈,而侵袭性垂体瘤可以通过手术切除为主,放疗和化疗相结合的综合治疗方案治疗,达到提高患者的生存质量、延长患者的寿命的目的。因此,为临床上垂体腺瘤早期诊断、早期手术治疗提供了有力的理论依据。

侵袭性垂体腺瘤的发生率依照不同的研究方法而各不相同,根据病理结果大多为 6%-10%,而以外科术中所见为标准,发生率可达 40%^[13]。本组研究根据外科所见为标准,其发生率为 42.7%。文献报道具有侵袭性的垂体腺瘤通常是大腺瘤,并且以无功能性腺瘤居多^[14]。这是因为侵袭性肿瘤增殖率高、肿瘤生长快,特别是无功能腺瘤临床上无内分泌功能紊乱的症状,不易通过检测血中激素水平早期发现,只有当肿瘤侵及周围组织引起严重的头痛、视力下降、- 颅神经损伤症状时才就诊。

本组 60 例垂体腺瘤,术中发现侵袭性生长 36 例(36/60,60.0%),均为大腺瘤。垂体腺瘤侵袭性产生的影响因素很多,缺氧是垂体腺瘤侵袭性改变的一个重要因素,在缺氧环境下肿瘤细胞所产生的 HIF-1 α 在对垂体腺瘤的血管生成及由此而产生的侵袭性变化方面发挥了重要的调控作用^[15-17]。实体肿瘤的生长依赖足够的氧供应,垂体腺瘤也不例外。充足的血供能使实体肿瘤细胞不断增殖,维持其生存所必需的内稳态。但是当其生长到一定程度时,肿瘤细胞增殖的速度超过肿瘤血管生成的速度,细胞对氧和营养物质的消耗,可导致肿瘤微环境为低氧分压、低糖和酸性。这种情况激活肿瘤细胞产生 HIF-1 α ,从而诱导血管生成、促进糖酵解,加速葡萄糖的转运及氧化亚氮的合成,同时调节局部的 pH 并抑制细胞凋亡,增强肿瘤细胞适应低氧的微环境。同时,大量的研究证实 HIF-1 α 在人体和动物许多肿瘤中过表达,对肿瘤的生长、血管形成、转移和耐药性都有关系。HIF-1 α 作为调控细胞氧平衡和诱导缺氧基因表达的重要核蛋白,对肿瘤的发生和发展起重要作用。从我们的研究统计数据中也可以看出, HIF-1 α 在侵袭性垂体腺瘤存在过表达。因此深入研究 HIF-1 α 蛋白在垂体腺瘤中的表达情况及与垂体腺瘤的分级和侵袭性的关系将有助于深入理解垂体腺瘤产生侵袭性的可能机制,并为垂体腺瘤术后的复发以及相应的辅助治疗提供判断依据。

在垂体腺瘤的辅助诊断上,尽管有众多的研究者指出, MRI 要优于 CT^[18,19],然而很遗憾,由于鞍隔和海绵窦内侧壁在 CT 和 MRI 上(无论增强与否)都无法显影,故无论是 CT 还是 MRI^[20]都无法在术前精确判定是否侵袭。只有靠外科手术中的直接观察才能将压迫和浸润严格区分开来^[21]。垂体腺瘤肿瘤细胞的生长速度与肿瘤侵袭性的相关性已有许多研究报道,但结论多不一致,原因是没有一种稳定可靠的方法。近年来在对细胞周期的深入研究中发现了一些细胞周期特异表达的核抗原,并被成功地应用于细胞动力学研究,其中应用较多的是 PCNA

和 Ki-67 核抗原。通常情况下,肿瘤细胞的胞核多形性变意味着瘤组织趋向恶性进展,但对于侵袭性垂体腺瘤却不具有特征性改变,且核的多形性与侵袭性无相关性^[22]。腺瘤的侵袭性行为与细胞生长率、特别是与细胞的 DNA 指数、位于 S 期的细胞百分比有直接的关系^[23]。对有丝分裂的测定显示,瘤细胞进行有丝分裂的病例数在非侵袭性腺(3.9%)、侵袭性腺瘤(21.4%)和垂体癌(66.7%)中呈明显的进行性递增趋势,但有丝分裂指数在这些病例中却难以明确其真正的分界点。因此,它对于常规诊断和鉴别侵袭性腺瘤的能力尚具有局限性^[24]。但是, HIF-1 α 在我们所收集到的侵袭性垂体腺瘤中均呈过表达状态,这也提示我们可以从 HIF-1 α 的表达水平来判断垂体瘤的侵袭与否。

尽管我们的研究显示 HIF-1 α 的表达与垂体瘤的侵袭性有关,但是缺乏特异性,只能提供有限的预测信息。我们相信,随着对 HIF-1 α 调节及其下游促血管生成靶基因的进一步研究,其在肿瘤发生、发展及肿瘤血管生成过程中的作用亦会愈加明确,靶向抑制 HIF-1 α 活性或表达来治疗肿瘤已经在动物模型^[25-27]中取得了令人鼓舞的结果, HIF-1 α 有望成为抗肿瘤血管生成的新靶点。

参考文献(References)

- [1] Semenza GL. HIF-1: Mediator of Physiological and Pathophysiological Responses to Hypoxia[J]. Appl Physiol, 2000, 88(4):1474-1480
- [2] Pedersen MW, Holm S, Lund EL, et al. Coregulation of glucose uptake and vascular endothelial growth factor (VEGF) in two small-cell lung cancer (SCLC) Sublines in vivo and in vitro[J]. Neoplasia, 2001, 3(1): 80-87
- [3] Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor-1[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 59:515-5926
- [4] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy [J]. Nature review, 2003, 3:721-732
- [5] Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4:437-447
- [6] ELSTER A D. Modern imaging of the pituitary [J]. Radiology, 1993, 187(1):1
- [7] Knosp E, Steiner E, Kitz K, et al. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings [J]. Neurosurgery, 1993, 33(4): 610-617
- [8] Jefferson G. Extrasellar extensions of Pituitary adenomas. President's address[J]. Proc R Soc Med, 1940, 33:433-458
- [9] Wilson CB. Neurosurgical management of large and invasive Pituitary tumors. In: Tindall GT, Collins T, eds. Clinical management of Pituitary disorders. New York, NY: Raven, 1979, 335-342
- [10] Jefferson G. The invasive adenomas of the anterior Pituitary. The Sherrington Lectures, vol. 3. Liverpool: Univ Liverpool Press, 1955
- [11] Hardy J. Transphenoidal surgery of hypersecreting Pituitary tumors. In: Kohler PO, Ross GT, eds. Diagnosis and treatment of Pituitary tumors. Amsterdam: Excerpta Medica; New York: Elsevier, 1973: 179-194
- [12] Gao Heng, Hui Guo Zhen. The research progress of pituitary adenoma genetics[J]. Foreign medical neurology, neurosurgery pathol, 2001, 28(3): 165
- [13] Warren R. Selman, Edward R. Laws, JB, Bernd W. Scheithauer, et al. The occurrence of Dural invasion in Pituitary adenomas[J]. J Neurosurg, 1986; 64:402-407
- [14] Mortini P, Losa M, Barzaghi R, et al. Results of transsphenoidal surgery in a large series of patients with pituitary adenoma[J]. Neurosurgery, 2005, 56(6):1222-1233
- [15] Shi YH, Fang WG. Hypoxia-inducible factor-1 in tumor angiogenesis [J]. World Gastroenterol, 2004, 10(8):1082-1087
- [16] Pistolesi S, Boldrini L, Gisfredi S, et al. Angiogenesis in intracranial meningiomas: immunohistochemical and molecular study[J]. Neuro-pathol Appl Neurobiol, 2004, 30(2):118-125
- [17] Shun jiang Gu, Xiang Guo Xia. Hypoxia induced factor-1 and meningioma angiogenesis [J]. International journal neurology neurological surgery, 2005, (5): 438-441
- [18] Hawkes RC, Holland GN, Moor WS, et al. The application of NMR imaging to the Evaluation of Pituitary and juxtasellar tumors [J]. AJNR 1983, 4:221-222
- [19] Benjamin Kaufan, Bruce A. Kaufman, Baha'Uddin M. Arafah, et al. Large Pituitary Gland adenomas evaluated with Magnetic Resonance imaging[J]. Neurosurgery, 1987; 21: 540-546
- [20] Scotti G, Yu CY, Dillon WP, et al. MR imaging of cavernous sinus involvement by pituitary adenomas[J]. AJNP, 1988, 9:675-664
- [21] Knosp E, Steiner E, Kitz K, et al. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings [J]. Neurosurgery, 1993, 33: 610-617
- [22] Pegolo G, Buckwalter JG, Weiss MH, et al. Pituitary adenomas. Correlation of the cytologic appearance with biologic behavior [J]. Acta Cytol, 1995, 39(5):887-892
- [23] Mastrorandi L, Guiducci A, Buttaro FM, et al. Relationships among DNA Index, S-Phase, and invasive behavior in anterior pituitary adenomas. A cytometric study of 61 cases with Feulgen-positive DNA analysis[J]. Surg Neurol, 2001, 56(1):27-32
- [24] Thapar K, Yamada Y, Scheithauer B, et al. Assessment of Mitotic Activity in Pituitary Adenomas and Carcinomas [J]. Endocr Pathol, 1996, 7(3):215-221
- [25] Yeo E J, Chun Y S, Cho Y S, et al. Yc1: a potential anticancer drug targeting hypoxia inducible factor 1 [J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95: 516-525
- [26] Poula KI V, Mitsiades C S, McMullan C, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I in thyroid carcinomas [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88:5392-5398
- [27] Straight A M, Oakes KL, EY K, Moores R, et al. Aflidin reduces growth of anaplastic thyroid cancer xenografts and the expression of several angiogenic genes[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2006, 57:7-9