

垂体生长激素腺瘤和胚胎垂体细胞的体外分泌效应*

白祥军 雷霆 刘睽 薛德麟

华中科技大学同济医学院附属同济医院脑外科, 武汉 430030

摘要 为观察垂体生长激素(GH)腺瘤细胞的体外分泌效应,选择8例垂体GH腺瘤和4例胚胎垂体,采用单层细胞培养技术,在给予生长激素释放激素(GHRH)、生长激素释放肽-2(GHRP-2)后,发现胚胎垂体细胞具有明显的分泌效应,肿瘤细胞(gsp癌基因阳性和阴性)的分泌则表现各异;而生长抑素(SMS)对二类细胞均具有明显的抑制效应。结果表明:肿瘤细胞与正常垂体细胞的激素分泌途径存在差异,下丘脑对肿瘤细胞激素分泌不再有调控作用。

关键词 垂体肿瘤; 生长激素; gsp癌基因

中图法分类号 R736.4, Q343.1, Q575.11

The Secreting Response of Growth-hormone-secreting Pituitary Adenomas and Embryo Pituitary Cells in vitro

Bai Xiangjun, Lei Ting, Liu Kui *et al*

Department of Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030

Abstract To investigate the secreting response of growth hormone (GH)-secreting pituitary adenomas *in vitro*, 8 case of GH-secreting pituitary adenomas and 4 case of embryo pituitary were selected to determine the response to GH releasing hormone (GHRH), GH releasing peptide-2 (GHRP-2) and somatostatin (SMS). The results showed that the embryo pituitary cells had significant secreting response, but a mixed response to GHRH and GHRP-2 was found in both gsp-positive and gsp-negative pituitary tumors. Both pituitary tumor and embryo pituitary showed obviously inhibitive response to SMS. It was demonstrated that there was a difference in the hormone secreting between tumor cells and normal pituitary cells. The hormone secreting of tumor cells were not regulated by hypothalamus.

Key words pituitary tumor; growth hormone; gsp oncogene

gsp癌基因是垂体生长激素(GH)腺瘤发生的重要原因并在中国人垂体GH腺瘤中证实^[1],而垂体GH腺瘤在发生gsp癌基因突变后GH的分泌是否仍受下丘脑调控?我们采用单层细胞培养技术,观察了生长激素释放激素(GHRH)、生长激素释放肽-2(GHRP-2)和生长抑素(SMS)对垂体GH腺瘤细胞和胚胎垂体细胞的体外GH分泌效应。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选择1997年~1999年我院神经外科收治的垂

体GH腺瘤患者8例,所有患者依据临床表现,血清基础GH水平,影像学检查和术后病检诊断为垂体GH腺瘤。8例患者肿瘤组织经PCR-DNA直接序列分析^[1]有4例gsp癌基因为阳性,4例为阴性。胚胎垂体4例,胎龄为5~6.5月,均为水囊引产,无胚胎发育异常。

1.2 垂体肿瘤细胞的培养

手术切除的新鲜肿瘤组织立即置入PBS缓冲液中洗涤2次,在PBS中用手术刀切碎,1500 r/min离心1 min,转入含0.2 g/L链霉素,10⁵ U/L青霉素,10% FCS(胎牛血清)和1 g/L胶原酶的MEM培养基中,于37℃恒温摇床上消化0.5~2 h,至肿瘤细胞离散为止。离散细胞再用含10% FCS的

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39670736)

白祥军,男,1963年生,医学博士,副教授

MEM 培养基洗涤 1 次, 再混入培养基中。每例肿瘤实验时均将肿瘤细胞等分至 12 支玻璃培养管内, 然后在 37 培养 18~24 h, 使细胞平衡并得以贴壁。贴壁后的细胞用培养基洗涤 1 次, 继续培养 4 h, 收集培养基, 测加药前的 GH 浓度。然后在培养管中加入含不同浓度 GHRH (2×10^{-9} mol/L), GHRP-2 (10^{-7} mol/L), SMS (生长抑素八肽 10^{-7} mol/L), 于 4 h 后收集培养基, 测加药后的 GH 浓度。(上述药物浓度均为最大药物效应浓度^[21])。

胚胎垂体细胞的培养同肿瘤细胞培养方法, 消化时间较垂体肿瘤组织要短, 最长不超过 30 min。

1.3 GH 浓度的检测

采用放射免疫法检测, 药盒由卫生部上海生物制品研究所生产。取待测样品 100 μ l, 加抗 hGH 血清 100 μ l, 再加入 ¹²⁵IhGH 100 μ l 后充分摇匀, 置室温 (20) 17~24 h, 加第二抗体 100 μ l, 充分摇匀, 37 温育 1 h, 加聚乙二醇 200 μ l, 充分摇匀, 放于 4 15~20 min, 3500 r/min 离心 20 min, 去上清液, β -闪烁计数仪检测。

2 结果

4 例胚胎垂体细胞对 GHRH 和 GHRP-2 表现出明显的分泌效应, GHRP-2 作用较 GHRH 作用强, 二者联合应用, 分泌作用更强; SMS 有明显的抑制作用, GHRH 和 GHRP-2 的兴奋作用可以被 SMS 所阻断 (图 1)。

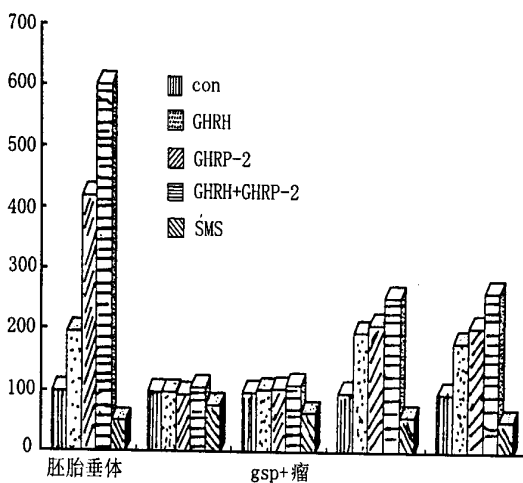


图 1 胚胎垂体和 gsp 阳性瘤细胞分泌效应 (μ g/L)

8 例垂体肿瘤细胞中, gsp 癌基因阴性瘤细胞有 3 例对 GHRH 和 GHRP-2 表现出明显的分泌效应, 1 例无反应, 对 SMS 均有明显的抑制效应; gsp 癌基因阳性瘤细胞对 GHRH 和 GHRP-2 及二者合并应用, 2 例表现出无反应, 2 例表现出明显分泌效应,

对 SMS 仍表现出明显的抑制效应 (图 2)。

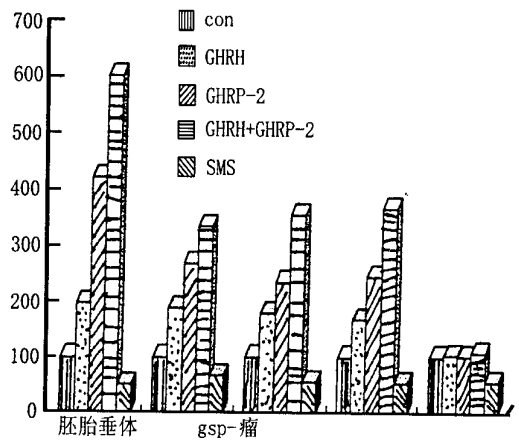


图 2 胚胎垂体和 gsp 阴性瘤细胞分泌效应 (μ g/L)

3 讨论

正常垂体 GH 的分泌主要是受下丘脑分泌的 GHRH 和 SMS 的调控, GHRH 主要通过腺苷酸环化酶-蛋白激酶 A 系统刺激 GH 的分泌。4 例胚胎垂体对 GHRH 和 GHRP-2 都表现出兴奋效应, GHRP-2 作用较 GHRH 强, 二者合并应用作用更强, 推测 GHRP-2 不仅对蛋白激酶 A 系统起作用, 而且影响到蛋白激酶 C 系统^[2], SMS 对正常胚胎垂体细胞产生明显的抑制效应, GHRH 和 GHRP-2 的作用可以被 SMS 阻断。这些结果更进一步证明正常垂体细胞对下丘脑分泌的 GHRH 和 SMS 均有较强的敏感性和依赖性。

正常情况下, GHRH 主要是通过刺激性鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 (G_s) 偶联激活腺苷酸环化酶 (AC) 而发挥生物学效应, GHRH 与细胞膜受体相结合, 使 G_s 的 α 亚单位从 G_s 蛋白复合体上解离, α 亚单位上结合的 GDP ($G_s \alpha$ -GDP 为无活性状态) 被 GTP 取代, 成为活性状态 ($G_s \alpha$ -GTP), 从而激活 AC, 导致细胞内 cAMP 浓度的升高, 激活蛋白激酶 A (PKA), 致 GH 分泌; 由于 $G_s \alpha$ -GTP 具有内在的 GTP 酶活性, 很快使 GTP 水解为 GDP 而返回非活性状态, 相应的 AC 也返回至正常。分泌 GH 的垂体腺瘤细胞, 编码 $G_s \alpha$ 的基因存在突变, 称为 gsp 癌基因^[1,3], 由于 gsp 癌基因干扰了正常 GHRH-受体- G_s 蛋白-AC 通路, 消除了 $G_s \alpha$ -GTP 内在的 GTP 酶活性, 使得 AC 处于持续激活状态, 因此, 理论上具有 gsp 癌基因突变的垂体腺瘤细胞 GH 的分泌不受外界因素的影响, 对 GHRH 和 GHRP-2 只能产生极小的效应, 表现为 GH 分泌减弱或无反应; 相反, 在没有 gsp 癌基因突变的垂体 GH 腺瘤细胞, 其

AC 处于正常活性状态, 因而对 GHRH 和 GHRP-2 应表现出与正常垂体 GH 细胞一样的强烈 GH 分泌效应。

在本研究中, 细胞培养却发现令人惊讶的结果, gsp 癌基因阴性组对 GHRH 和 GHRP-2 表现出明显的分泌效应, 但也有 1 例无反应; gsp 癌基因阳性组 2 例对 GHRH、GHRP-2 无反应, 对二者合并应用也只有很弱的反应, 另 2 例却有较强的分泌反应; 无论 gsp 癌基因阳性或阴性患者, 对 GHRH 或 GHRP-2 或二者合并应用所产生的分泌作用, 远不如正常垂体细胞那样敏感, 出现此现象的机理尚不清楚, 但此结果表明, 垂体 GH 腺瘤细胞与正常垂体细胞的分泌效应存在差异性, 瘤细胞不再与正常垂体细胞一样对下丘脑激素具有依赖性, 瘤细胞可能为自主分泌性瘤, 但单纯以 gsp 癌基因突变所造成的腺苷酸环化酶信号传导系统的异常来解释上述现象是不够的, 产生这一结果的可能为: 瘤细胞除了 gsp 癌基因所至的 cAMP-PKA 信号传导系统的异常外, 还存在其它信号传导系统的异常^[4,5]。瘤细胞表面 GHRH 受体的敏感性降低, 对刺激反应减弱^[6]。瘤细胞还存在其它癌基因突变所致的促进 GH 分泌的异常。近年来, 越来越多的研究表明: 另外一种新发现的细胞内信号传导系统^[5,6], 生长激素释放剂/受体-PIP2-IP3-蛋白激酶 C 系统在正常垂体和垂体 GH 腺瘤 GH 分泌调节中起着十分重要作

用, 对这一问题的深入研究将有助于进一步揭示垂体腺瘤的发病机理。

参 考 文 献

- 1 白祥军, 雷 霆, 刘 睎等. gsp 癌基因在国人肢端肥大症垂体肿瘤中的表达. 中华实验外科杂志, 2000, 17 (1): 18
- 2 Lei T, Adams E F, Buchfelder M *et al*. Relationship between protein kinase C and adenylyl cyclase activity in the regulation of growth hormone secretion by human pituitary somatotrophinomas. *Neurosurgery*, 1996, 39: 569
- 3 Landis C A, Masters S B, Spada A *et al*. GTPase inhibiting mutations activate the α chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumors. *Nature*, 1980, 340: 692
- 4 Adams E F, Lei T, Buchfelder M *et al*. Biochemical characteristics of human pituitary. *Endocrinol Metab*, 1995, 80: 2077
- 5 Bresson-Bepoldin L, Odessa M F, Dufy-Barbe L. GHRP-6 stimulates calcium increase and growth hormone release in human somatotrophs *in vitro*. *Endocrine J*, 1994, 2: 793
- 6 Howard A D, Feighner S D, Cully D F *et al*. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 1996, 273: 974

(2000-04-20 收稿)

(上接第 563 页)

3 讨论

18 名健康志愿者随机交叉, 多次服用武汉春天药业有限公司生产的吲哚美辛缓释胶囊, 并与法国 Ethypham 公司生产的同类产品比较, 采用 HPLC 检测, 外标法定量测定其血药浓度。结果表明: 多次给药达稳态条件下, 武汉春天药业有限公司的吲哚美辛缓释胶囊对参比制剂的相对生物利用度为 (103.20 ± 21.90) %, 其生物利用度符合要求。证明了国产的吲哚美辛缓释胶囊剂型中药物被吸收入

血液的速度和程度与进口制剂无显著差异, 可以替代进口制剂。多次服用两种缓释胶囊达稳态时的 AUC^{ss}、C_{max} 值, 经统计学处理, 表明两种制剂具有内在质量的一致性。

参 考 文 献

- 1 顾世芬, 陈 汇, 代宗顺等. 口服单剂量吲哚美辛缓释胶囊的人体相对生物利用度研究. *中国药师*, 1999, 2 (2): 61

(2001-04-02 收稿)

