

• 基础实验研究论著 •

促甲状腺激素 TSH 受体基因突变同侵袭性垂体瘤的相关性研究

杜立平

(内蒙古医科大学第一附属医院核医学科, 内蒙古呼和浩特 010059)

摘要:目的 研究 TSH 受体基因突变同垂体瘤侵袭性的相关性。方法 选择 24 例垂体瘤患者作为研究对象, 其中 13 例侵袭性垂体瘤, 11 例非侵袭性垂体瘤, 另外选择 10 例正常甲状腺作为对照组。使用苯酚-氯仿-异戊醇法提取基因组 DNA, 并对基因片段进行聚合酶链反应及 DNA 序列分析。结果 13 例侵袭性瘤中有 5 例出现变异个体, 对其中 3 例行 DNA 序列检测, 其中 1 例发现密码子的点突变, 2 例为碱基插入突变。而非侵袭性垂体瘤组和正常甲状腺组中无突变。3 组突变率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 侵袭性垂体瘤中 TSH 受体基因的突变率要高于非侵袭性垂体瘤, 说明 TSH 受体基因的突变同垂体瘤的侵袭性存在一定相关性。将 TSH 受体基因可能作为临床诊断判断疗效的新靶点。

关键词:促甲状腺激素; 受体, 促甲状腺素; 垂体肿瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0921-02

Thyroid hormone TSH receptor gene mutation with invasive pituitary tumor correlation

Du Liping

(Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010059, China)

Abstract: Objective To study the TSH receptor gene mutation with pituitary tumor invasive correlation. Methods 24 cases of pituitary tumor patients as the research object, which was divided into two groups, 13 cases of invasive pituitary tumor, 11 cases of noninvasive pituitary tumor, in addition to choose 10 cases of normal thyroid hormone is compared. Using phenol-chloroform-isoamyl alcohol method extracting genome DNA, and the gene fragments polymerase chain reaction restriction fragment length analysis and DNA sequence analysis. Results 13 cases of invasive tumor in 5 cases with individual variation, the three routine DNA sequence detection, including 1 case found codon point mutation, 2 cases of base insertion mutation. And noninvasive pituitary tumor group no mutation. The chi-square test, two group of mutation rate difference has significant difference. Conclusion in invasive pituitary tumor TSH receptor gene mutation rate than noninvasive pituitary tumor, explain TSH receptor gene mutation with pituitary tumor invasive has some correlations. TSH receptor gene could be used for clinical diagnosis of judging curative effect of the new targets.

Key words: thyrotropin; receptors, thyrotropin; pituitary neoplasms

促甲状腺激素受体是种配体依赖性转录因子^[1-4]。曾报道促甲状腺激素受体异常会导致肿瘤的发生^[5-6]。较少见对垂体瘤报道, 为探讨 TSH 受体基因突变与垂体瘤发生及其侵袭性的相关性, 选取本院 2009 年 12 月至 2012 年 1 月收治的垂体瘤标本进行基因突变检测, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 24 例垂体瘤患者作为研究对象, 将其分为两组, 13 例侵袭性垂体瘤组, 11 例非侵袭性垂体瘤组, 另外选择 10 例正常促甲状腺激素组织作为对照组。侵袭性垂体瘤组平均年龄 (35.5 ± 12.4) 岁; 非侵袭性垂体瘤组平均年龄 (34.5 ± 18.3) 岁。对照组男性 6 例, 女性 4 例, 平均年龄 (36.5 ± 14.2) 岁。所有患者均无其他恶性肿瘤, 组间具有可比性, $P > 0.05$ 。患者的影像学资料见图 1 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

1.2 仪器与试剂 DNA 提取试剂盒选自深圳市生物技术公司, PCR 引物、DNA 分子量标记物选自大连宝生物工程公司; RNA 酶选自上海卢峰科技有限公司; TaqDNA 聚合酶选自北京诺赛基因研究有限公司; PCR 试剂盒选自北京华大中生科

技术有限公司; PCR 全自动分析仪为 ABI 公司生产的 GeneAmp PCRsystem 9700。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及组织 DNA 的提取 将手术切除的肿瘤组织放入液氮罐, 每个标本称 0.015 g 于 400 μg/mL 的蛋白酶 K 中行溶解消化, 3~6 h 后, 提取上清液并常规进行酚-氯仿-异戊醇提取基因组 DNA。

1.3.2 PCR 测定^[7-9] 使用 S 引物进行扩增后再将相应反应成分混合, 于 94 °C 下预变性 5 min, 分别在 94、52、72 °C 下预变性 50 s, 总共循环 38 次, 完成后再延伸 7 min, 提取 0.5~1.0 μL 的扩增产物作为模板进行 P 引物扩增, 过程同上, 共循环 35 次, 完成后再延伸 7 min。上述操作结束后使用 2% 的琼脂糖电泳观察 PCR 产物扩增结果, 若相应位置有清晰的扩增带则可行下一步单链构象多态性电泳分析。

1.3.3 单链构象多态性电泳分析 主要采用 10% 的甘油聚丙烯酰胺凝胶电泳 4~6 h, 温度设定 8 °C。在电泳过程中以正常甲状腺组织扩增产物作为对照, 倘若电泳肿瘤标本与正常组织相比, 出现条带增多或减少, 位置改变则为变异。每份标本至

少 2 次以上 PCR 扩增及 SSCP 分析。

1.3.4 扩增后产物使用 DNA 试剂盒进行纯化回收,将混合物离心,扩增产物转移到 1.5 mL 的 EP 管中,加醋酸钠/乙醇均匀震荡后将标本置于冰上 10 min。4 ℃ 下离心 30 min,弃上清。加乙醇 50 μL 洗涤 2 次。4 ℃ 下离心 5 min,弃上清及管壁液珠,干燥 10~15 min。待上机。测序后计算机判读碱基序列。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计学软件。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

垂体瘤患者的微血管密度范围与非侵袭性垂体瘤的微血管密度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。13 例侵袭性瘤中有 5 例出现变异个体(5/13),对其中 3 例行 DNA 序列检测,其中 1 例发现密码子的点突变,其为核苷酸发生 A-C 转换。ACC 转变为 CCC,相应的氨基酸由原来的苏氨酸变为脯氨酸。2 例为碱基插入突变,具体为在 1972 与 1973 位核苷酸间插入了腺嘌呤核苷酸,使得该位后的氨基酸发生移码突变。而非侵袭性垂体瘤组和正常甲状腺组中无突变。3 组突变率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

侵袭性垂体瘤在临床上较为权威的分级标准是 Knosp 分级方法,但需要将影像学、手术及鞍底硬膜病检相结合进行诊断。国外研究报道^[10]365 例垂体瘤患者中有 35% 侵犯硬脑膜及周围骨质,在免疫组化检测,电镜检测组织形态学方面较难发现侵袭性。但有报道证明它的发生发展可能同 TSH 受体细胞基因有关。

本研究结果说明侵袭性垂体瘤存在甲状腺素受体体细胞的突变,且突变率为 38.4%。TSH 和其受体相结合主要通过腺苷酸环化酶-CAMP 级联反应将信号传导至胞浆内第二信使,而控制腺垂体细胞分化、腺体功能活动生长。依赖 TSH 的调节级联反应系统功能的强弱都将显著影响细胞的增殖及生理活动。有报道垂体瘤中^[11-12],cAMP 调节级联反应同恶性程度具有一定相关性,小鼠模型试验中,发现 TSH 受体突变可以导致腺苷酸环化酶活性的上升,从而引发垂体瘤。在另一大鼠试验中,促甲状腺激素受体基因于第 14 氨基酸发生移码突变的大鼠模型随着年龄的发展会产生同人类垂体腺瘤相似的垂体腺癌,因此可以通过对大鼠体内某个调节促甲状腺激素的癌基因作为机制来探讨与肿瘤的相关性。

本文通过研究侵袭性垂体瘤,非侵袭性垂体瘤及正常甲状

腺组织中促甲状腺激素 TSH 受体的基因,推测垂体瘤的侵袭性甚至于侵袭程度与该突变有明显的相关性。但其还需要临床进行更大样本量的研究。

总之,对于促甲状腺激素 TSH 受体基因突变导致的蛋白改变机制可以为分子水平上治疗垂体瘤开拓新的途径,将其治疗方法更加综合,具有一定的临床价值及研究意义。

参考文献

- [1] 吴健民. 对肿瘤标志物的再认识[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(1): 11-13.
- [2] 连小兰. 评析《甲状腺疾病诊断治疗中实验室检测项目的应用建议》[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(6): 509-510.
- [3] 李玉妹, 单忠艳, 关海霞, 等. 甲状腺过氧化物酶抗体和甲状腺球蛋白抗体阳性临界值的确定及其临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(9): 780-783.
- [4] 费成英. 血清 TT3、FT3、TT4、FT4 以及 TSH 检测意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 121-122.
- [5] 陈宏毅. FT3、FT4、TSH 与 T3、T4 联检评价甲状腺功能及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(4): 318-319.
- [6] 陈茶, 黄彬, 丁海明, 等. 不同检测系统促甲状腺激素测定结果的偏倚评价[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3): 193-195.
- [7] 章晓鹰, 张珏. 某型号免疫化学发光仪 TSH 生物检测下限与功能灵敏度的验证[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(9): 1115-1116.
- [8] 尹志军, 隋洪, 黄雪珍, 等. 电化学发光免疫分析仪检测 TSH 的性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(21): 2521-2523.
- [9] 陈茜. 三碘甲状腺原氨酸、甲状腺素和促甲状腺素在精神分裂症患者血清中的表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(19): 2273-2274.
- [10] Bakhshandeh M, Hashemi B, Mahdavi SR, et al. Evaluation of thyroid disorders during head-and-neck radiotherapy by using functional analysis and ultrasonography[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012, 83(1): 198-203.
- [11] Harbeck B. TSH radioreceptor assay[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2012, 137(3): 96.
- [12] Saini V, Yadav A, Arora MK, et al. Correlation of creatinine with TSH levels in overt hypothyroidism - a requirement for monitoring of renal function in hypothyroid patients? [J]. Clin Biochem, 2012, 45(3): 212-214.

(收稿日期: 2012-12-06)

统计学资料类型

统计学资料共有 3 种类型: 计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。