

雌激素诱导泌乳素瘤动物模型的建立及稳定性的观察

宋冰冰, 陈沐, 黄涛祥, 雷霓, 王欣, 曹飞, 周丰琦, 朱永红*

(中山大学中山医学院组织学与胚胎学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】通过注射苯甲酸雌二醇建立大鼠泌乳素瘤动物模型,并鉴定肿瘤模型的稳定性。【方法】取 40 只雌性 Wistar 大鼠随机分成对照组(A 组)和用药组:注射苯甲酸雌二醇 8 周组(B 组)、注射苯甲酸雌二醇 12 周组(C 组)和撤除苯甲酸雌二醇 4 周组(D 组),每组 10 只。每隔 15 d 记录大鼠的体质量变化,并在相应的时间处死大鼠称量垂体质量并观察成瘤情况质量。取各组垂体进行 HE 染色和泌乳素免疫组化来鉴定泌乳素瘤。选取 1 只大鼠做标记,分别在注射苯甲酸雌二醇 8、12 周以及撤除苯甲酸雌二醇 4 周后做 MRI,通过动态观察垂体大小的变化来鉴定泌乳素瘤模型的稳定性。【结果】苯甲酸雌二醇诱导组大鼠体质量明显增长缓慢,并且在 2 周左右开始出现脱毛现象,B、C 和 D 组致瘤率分别为 70%、100% 和 100%。苯甲酸雌二醇诱导组 HE 染色细胞排列紊乱,出现核深染细胞,血管丰富。免疫组化鉴定为泌乳素瘤,泌乳素阳性表达细胞明显多于对照组。MRI 显示随着苯甲酸雌二醇诱导时间的增长,垂体体积逐渐增加,且在撤除苯甲酸雌二醇后垂体体积并未缩小,证明泌乳素瘤模型的稳定性。【结论】腹腔注射苯甲酸雌二醇诱导大鼠泌乳素瘤不仅诱导率高,而且具有很好的稳定性。

关键词: 垂体;苯甲酸雌二醇;泌乳素瘤;MRI

中图分类号:R73 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2014)02-0224-06

Establishment of Prolactinoma Model Induced by Estrogen and Identification of Model Stability

SONG Bing-bing, CHEN Mu, HUANG Tao-xiang, LEI Ni, WANG Xin, CAO Fei, ZHOU Feng-qi, ZHU Yong-hong*
(Department of Histology and Embryology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To establish the rat prolactinomas model and to identify its stability. 【Methods】Forty female Wistar rats were randomly divided into control group (group A, $n = 10$), and experimental groups which were given injection of estradiol benzoate regularly for 8 weeks (group B, $n = 10$), for 12 weeks (group C, $n = 10$) and withdrawal for 4 weeks after 12 weeks injection of estradiol benzoate (group D, $n = 10$). The change of body weight was recorded every 15 days and the rats were executed on the corresponding time to measure the pituitary weight as well as the morphology of tumor. The rat prolactinomas were identified by HE staining and prolactin (PRL) immunohistochemistry staining. We chose a rat for magnetic resonance imaging (MRI) when injected with estradiol benzoate at 8, 12 weeks and at 4 weeks after withdrawal of estradiol benzoate to identify the model stability. 【Results】The body weights of the rats injected with estradiol benzoate increased slower than the control group accompanied with the depilation phenomenon after two weeks. Group B, group C, and group D emerging rate of tumor were 70%, 100%, and 100%, respectively. The pituitary cells of the rats injected with estradiol benzoate showed hyperchromatic nucleus, disordered cell arrangement and a mass of vessels. The induced tumors were identified as prolactinomas by PRL immunohistochemistry staining since the number of the PRL positive cells in the estradiol benzoate treated groups was significantly higher than in the control group. The results of pituitary MRI showed that the pituitary volume increased gradually with the extension of estradiol benzoate induction time. No shrinkage of pituitary was observed after 4 weeks withdrawl of estradiol benzoate. 【Conclusion】Intraperitoneal injection of estradiol benzoate could induce rat prolactinoma with high induction rate and stability.

Key words: pituitary; estradiol benzoate; prolactinoma; MRI

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(2): 224-229]

收稿日期:2013-12-13

基金项目:广东省科技厅产学研引导项目(2011B090400219);教育部博士点-新教师类(20110171120067)

作者简介:宋冰冰,在读硕士研究生,研究方向:垂体瘤的发病机制与治疗研究,E-mail:hd_sbb@163.com; *通信作者:朱永红,教授,博士生导师,E-mail:zhuyongh@mail.sysu.edu.cn

垂体是人体最重要的内分泌腺,青壮年容易发生垂体瘤^[1]。由于肿瘤对周围神经的压迫以及激素分泌紊乱,给患者带来很大的痛苦。泌乳素瘤作为一种重要的垂体瘤类型,典型的临床表现包括闭经、溢乳、不孕和高泌乳素血症等^[2-3]。目前泌乳素瘤的发病机制尚未明了,可以通过建立大鼠泌乳素瘤模型来探讨发病机制和药效研究。研究发现:长时间雌激素处理可以导致垂体增生和诱导产生泌乳素瘤^[4-6],但是雌激素诱导时间对泌乳素瘤成瘤率的影响尚且不清楚。另外,关于泌乳素瘤模型的稳定性尚有争议。有学者认为雌激素诱导的肿瘤具有激素依赖性,在撤除雌激素后肿瘤会逐渐缩小至正常;但是也有学者认为诱导的肿瘤为功能自主的肿瘤,不依赖雌激素生长。因此,我们在雌激素诱导 8、12 周和撤除雌激素 4 周后分别处死 10 只大鼠来观察致瘤率,并且采用 MRI 动态观察垂体的变化,从而鉴定诱导的泌乳素瘤模型的稳定性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

苯甲酸雌二醇注射液(杭州动物药品厂),苏木素染液(北京罗基生物有限公司),伊红染液(上海双螺旋生物有限公司),抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(基因科技有限公司),PRL 一抗(北京博奥森有限公司),钆双胺注射液(通用电气药业有限公司)。

1.2 动物分组及处理

40 只雌性 Wistar 大鼠,鼠龄 30 d,体质量 80 ~ 100 g。随机分为对照组(A 组)和用药组:注射苯甲酸雌二醇 8 周组(B 组)、注射苯甲酸雌二醇 12 周组(C 组)及用药 12 周后撤除苯甲酸雌二醇存活 4 周组(D 组),每组各 10 只。对照组每 3 d 注射 3 mL 生理盐水,其余组每 3 d 注射 3 mL 苯甲酸雌二醇注射液。观察各组大鼠毛发情况和体质量变化,在相应的时间点颈椎脱臼处死大鼠小心取出垂体,称取质量,然后将垂体固定在 40 mL/L 多聚甲醛溶液中。

1.3 HE 染色

石蜡包埋组织,切片厚度为 5 μm 。将石蜡切

片放置在二甲苯 I、二甲苯 II 中进行脱蜡,各 10 min。接着放在 100%、90%、80%、70%酒精中水化,各 5 min。苏木素染液中染色 5 min,伊红染液染色 2 min。用 70%、80%、90%、100%酒精进行梯度脱水,各 5 min。最后用二甲苯 I、二甲苯 II 透明,各 5 min,中性树胶封片。

1.4 免疫组化

将切片放在 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液,微波抗原修复 15 min,PBS 洗 3 次 \times 5 min。滴加 3%过氧化氢溶液,室温 30 min,PBS 洗 3 次 \times 5 min。滴加山羊血清封闭液,室温 30 min,甩去多余的液体。滴加兔抗鼠 PRL 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 洗 3 次 \times 5 min。滴加羊抗兔二抗,室温 60 min,PBS 洗 3 次 \times 5 min。滴加 DAB 显色液,光镜下控制显色。自来水冲去切片上的 DAB 显色液,滴加 1 滴苏木素染液,染色 1 min,放置自来水中 10 min,最后用中性树胶封片。

1.5 MRI 动态观察垂体大小变化

选用德国西门子 3.0T 超导型共振成像机,做脑部水平面和矢状面增强扫描。T1WI (TR/TE=300/13),层厚为 1.5 mm,扫描野为 100 \times 100。增强剂为 Gd-DTPA,0.1 mmol \cdot L⁻¹ \cdot kg⁻¹,尾静脉注射 10 min 后开始扫描。

1.6 统计分析

结果采用 SPSS 13.0 软件进行分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠毛发与体质量变化

苯甲酸雌二醇诱导 2 周后,苯甲酸雌二醇诱导组大鼠毛发失去光泽,出现脱毛现象。与对照组大鼠相比,苯甲酸雌二醇诱导组大鼠体质量增长明显较缓慢,在撤去雌激素后苯甲酸雌二醇诱导组大鼠体质量增长开始加快(图 1)。

2.2 垂体肉眼观察及质量变化

垂体位于垂体窝内,对照组大鼠垂体前叶与垂体后叶之间由垂体裂相隔,苯甲酸雌二醇诱导组大鼠垂体体积明显增大,垂体分叶结构消失,垂体压迫大脑底侧和两侧神经(图 2)。随着诱导时间的延长,垂体质量逐渐增加,停止诱导 1 个月

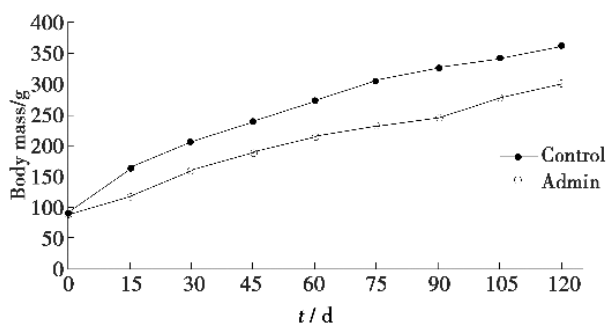


图 1 大鼠体质量增长曲线

Fig.1 The rats body mass growth curve

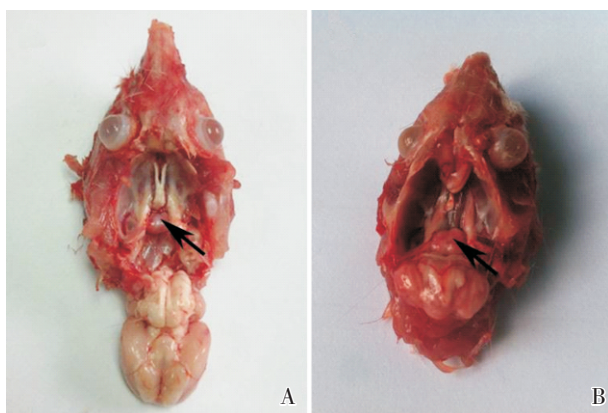


图 2 解剖取出的对照组大鼠垂体标本(A)和苯甲酸雌二醇诱导组大鼠垂体标本(B)

Fig.2 The removed rat pituitary specimens in control group (A) and in experimental group (B)

The arrows point to the pituitary specimens.

后,垂体质量并没有减小(图 3)。

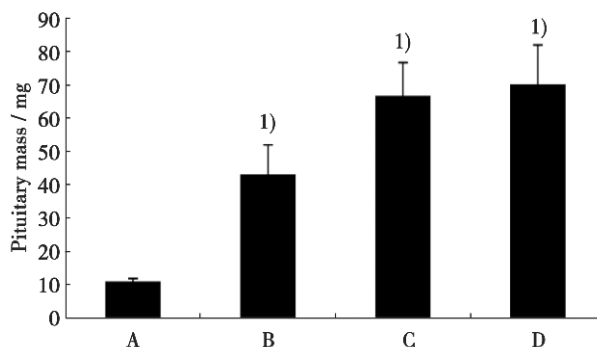


图 3 各组大鼠垂体质量比较

Fig.3 The comparison of pituitary mass in each group

1) the difference is statistically significant when compared with A group.

2.3 HE 染色

对照组垂体细胞大小一致,细胞核呈圆形,染色均匀,可以观察到嗜酸性细胞和嗜碱性细胞。苯甲酸雌二醇诱导组垂体细胞大小不一,细胞核呈圆形或三角形,出现较多核深染细胞,可以观察到大量的血管(图 4)。

2.4 PRL 免疫组化

PRL 分布在胞浆,PRL 阳性细胞胞浆被染成棕黄色。对照组 PRL 阳性细胞零星可见,PRL 染色较浅;而苯甲酸雌二醇诱导组 PRL 阳性细胞显著增加,PRL 阳性细胞充满视野,PRL 染色较深(图 5)。

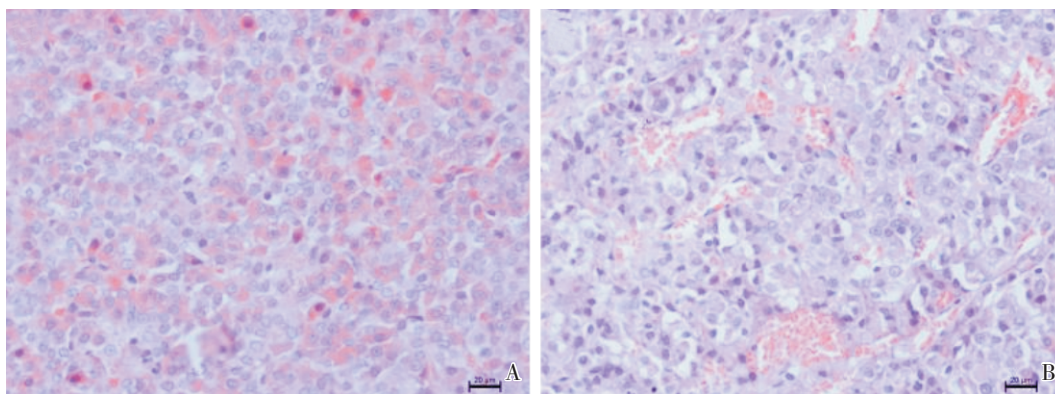


图 4 HE 染色结果

Fig.4 The HE staining results

(A) the cells in control group arranged regularly with the accordant cell size.(B) the cells in experimental groups arranged in disorder with the discordant cell size. In the meantime, we could find some nuclear hyperchromatic cells and a mass of vessels. The scale was 20 μm .

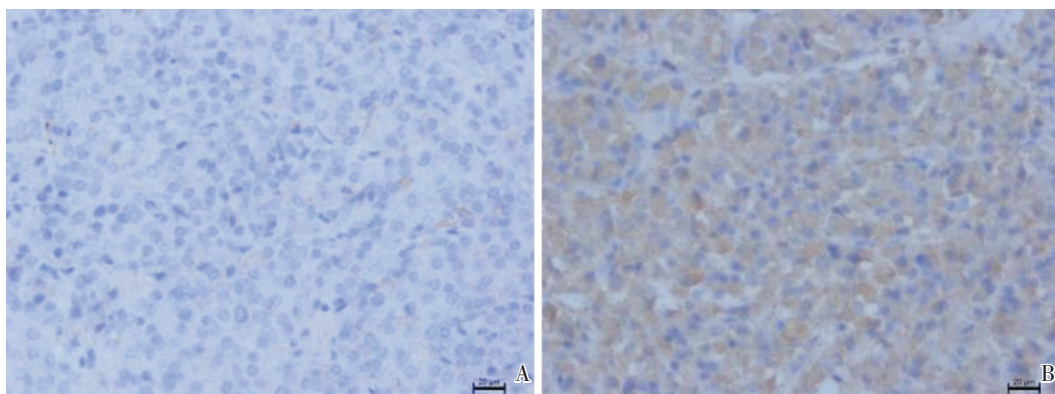


图 5 PRL 免疫组化结果

Fig.5 The PRL immunohistochemistry staining results

Few cells expressed PRL in control group (A) while most cells expressed PRL in experimental group. (B)The scale was 20 μm.

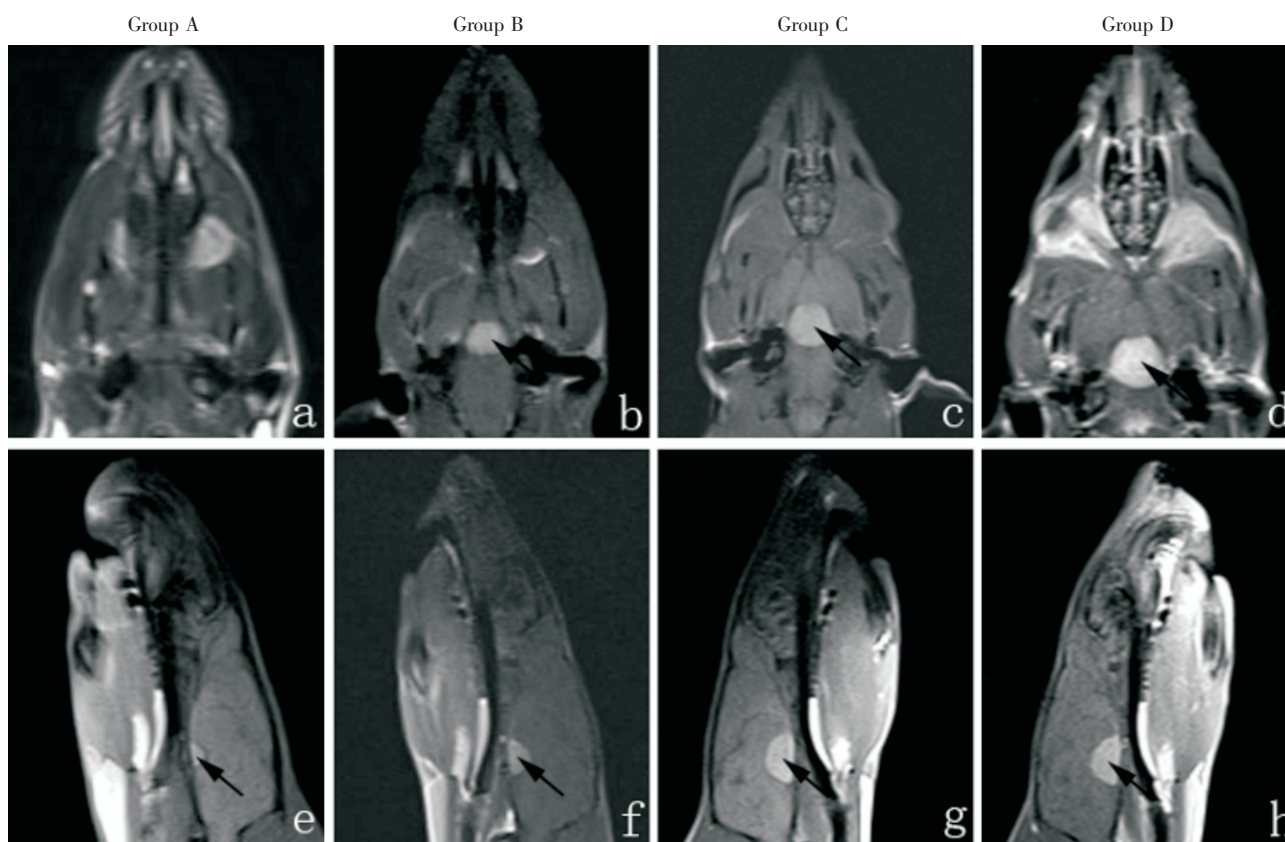


图 6 大鼠脑部 MRI 扫描图

Fig.6 The rat brain MRI transverse results (a, b, c, d) and sagittal results (e, f, g, h)

The arrows point to the pituitary specimens.

2.5 MRI 动态观察垂体大小

注射 MRI 增强剂后,垂体成像信号明显增强。A 组垂体只能在矢状面观察到,而无法在水平面观察到。B、C、D 组垂体明显增大,且随着诱导时

间的增长垂体逐渐增大。我们选择矢状面计算垂体像素点^[7],A 组垂体为 280 像素点,B 组垂体为 810 像素点,C 组垂体为 1780 像素点,D 组垂体为 1730 像素点。与 A 组相比,B 组垂体像素点增加

了 189.3%, C 组垂体像素点增加了 537.7%, D 组垂体像素点增加了 517.9%。撤销苯甲酸雌二醇刺激后, 垂体大小基本没有发生变化(图 6)。

3 讨 论

近年来垂体瘤的发病率逐年提升, 尽管以往学者对垂体瘤进行了大量的研究, 但是垂体瘤的发病机制依然不是十分清楚。泌乳素瘤是一种常见的垂体瘤, 约占垂体瘤的 40%^[8]。为了方便进行泌乳素瘤发病机制的探讨以及药效试验研究, 我们迫切需要建立大鼠泌乳素瘤模型。以往有学者通过长期雌激素作用诱导大鼠泌乳素瘤, 诱导时间一般为 2~3 个月。雌激素诱导大鼠泌乳素瘤的机制一般分为: 第一, 雌激素可以抑制下丘脑多巴胺神经元的作用, 从而促进泌乳素细胞的增殖^[9]; 第二, 雌激素可以调节一些基因的表达, 如 PTTG、bFGF、Pit-1、VEGF 等^[10-17]。尽管以往已经有诱导大鼠泌乳素瘤的研究, 但是肿瘤模型的稳定性尚且存在争议。有学者认为诱导的泌乳素瘤具有激素依赖性, 并非功能自主的肿瘤, 肿瘤在雌激素撤除后会缩小。但是也有学者认为雌激素诱导初期会导致垂体增生, 但是随着诱导时间的延长会变成功能自主的肿瘤^[18]。因此, 我们通过 MRI 技术动态观察撤除雌激素后大鼠垂体的变化, 从而判断雌激素诱导产生的泌乳素瘤是否具有雌激素依赖性。

不同种系大鼠对雌激素诱导泌乳素瘤的敏感性不同, 较为敏感的包括 F344 大鼠、Wistar 大鼠和 SD 大鼠。尽管 F344 大鼠敏感性最高, 但是由于成本较高, 因为我们实验中选择更为廉价并且性情温顺的 Wistar 大鼠。雌激素作用 2 周左右, 雌激素诱导组大鼠出现脱毛现象, 而且体质量增长明显比对照组慢。以往的关于雌激素诱导大鼠泌乳素瘤的过程中都出现脱毛和体质量减轻的现象, 所以可以作为一种外在的参考指标。鉴定泌乳素瘤主要包括三个方面: 第一, 垂体质量大于 50 mg; 第二, 组织病理和免疫组化变化; 第三, 血液中泌乳素水平显著升高。在我们的实验中, 随着雌激素诱导时间的增长, 垂体质量逐渐增加。在 2 个月时, B 组有 7 只大鼠垂体质量超过 50 mg, 泌乳素

瘤诱导成功率达到 70%, 而 3 个月后全部 10 只大鼠垂体质量均超过 50 mg, 泌乳素瘤诱导成功率达到 100%。雌激素撤除 1 个月后, 大鼠垂体并没有减小, 平均垂体质量大于雌激素诱导 3 个月组, 差异没有统计学意义。垂体前叶 HE 染色显示: 对照组垂体前叶由团状排列的腺细胞组成, 细胞排列整齐, 大小一致。雌激素诱导组垂体正常结构消失, 细胞排列紊乱大小不一, 出现三角形和多角形细胞, 胞核深染, 血管明显增多。免疫组化结果显示雌激素诱导组泌乳素表达阳性的细胞明显多于对照组。所以, 通过垂体质量的变化、HE 染色和 PRL 免疫组化的变化证实了我们成功建立了大鼠泌乳素瘤模型。接下来, 我们通过 MRI 观察大鼠垂体的变化, 选择矢状面垂体像素点作为定量指标。A、B、C 和 D 组分别为 280 像素点、810 像素点、1780 像素点和 1730 像素点。相对于 A 组, 随着雌激素诱导时间的延长垂体体积逐渐增大, 撤除雌激素后垂体体积基本保持不变, 为雌激素非依赖性。

我们通过 3 个月腹腔注射苯甲酸雌二醇诱发 Wistar 大鼠泌乳素瘤, 诱发率为 100%。该模型具有稳定性高, 重复性好等优点, 可以方便后续垂体瘤发病机制探讨和药品药效试验。尽管通过注射雌激素成功诱导大鼠泌乳素瘤, 但是具体的诱发机制还不是十分清楚, 以及雌激素诱导组大鼠体质量减轻的原因都值得进一步的研究。

参考文献

- [1] Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review[J]. *Cancer*, 2004, 101(3): 613-619.
- [2] Jiang X, He D, Mao Z, et al. BMI, apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio, and insulin resistance in patients with prolactinomas: a pilot study in a Chinese cohort[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(2): 1171-1176.
- [3] Klibanski A. Clinical practice: prolactinomas [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(13): 1219-1226.
- [4] Zhao W, Shi Z, Yuan F, et al. Melatonin modulates the effects of diethylstilbestrol (DES) on the anterior pituitary of the female Wistar rat [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2010, 48(2): 278-283.
- [5] Pawlikowski M, Pisarek H, Fryczak J, et al. Effects of

- nitric oxide synthase inhibition on diethylstilbestrol – induced hyperprolactinaemia and pituitary tumourigenesis in rats [J]. *Endokrynol Pol*, 2012, 63 (2): 115–118.
- [6] Akinci H, Kapucu A, Dar KA, et al. Aromatase cytochrome P450 enzyme expression in prolactinomas and its relationship to tumor behavior [J]. *Pituitary*, 2013, 16(3): 386–392.
- [7] Spady T, McComb R, Shull J. Estrogen action in the regulation of cell proliferation, cell survival, and tumorigenesis in the rat anterior pituitary gland [J]. *Endocrine*, 1999, 11(3): 217–233.
- [8] el-Azouzi M, Hsu DW, Black PM, et al. The importance of dopamine in the pathogenesis of experimental prolactinomas [J]. *J Neurosurg*, 1990, 72 (2): 273–281.
- [9] Ciccarelli A, Daly AF, Beckers A. The epidemiology of prolactinomas [J]. *Pituitary*, 2005, 8(1): 3–6.
- [10] Xu R, Wu X, Di A, et al. Pituitary prolactin-secreting tumor formation: recent developments [J]. *Biol Signals Recept*, 2000, 9(1): 1–20.
- [11] Heaney AP, Fernando M, Melmed S. Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(2): 277–283.
- [12] Mukdsi JH, De Paul AL, Petiti JP. Pattern of FGF-2 isoform expression correlated with its biological action in experimental prolactinomas [J]. *Acta Neuropathol*, 2006, 112(4): 491–501
- [13] Heaney AP, Horwitz GA, Wang Z, et al. Early involvement of estrogen –induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis [J]. *Nat Med*, 1999, 5 (11): 1317–1321.
- [14] Mukdsi JH, De Paul AL, Muñoz S, et al. Immunolocalization of Pit-1 in gonadotroph nuclei is indicative of the transdifferentiation of gonadotroph to lactotroph cells in prolactinomas induced by estrogen [J]. *Histochem Cell Biol*, 2004, 121(6): 453–462.
- [15] Miyajima K, Takekoshi S, Itoh J, et al. Inhibitory effects of anti-VEGF antibody on the growth and angiogenesis of estrogen-induced pituitary prolactinoma in Fischer 344 Rats: animal model of VEGF-targeted therapy for human endocrine tumors [J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2010, 43(2): 33–44.
- [16] Mukdsi JH, De Paul AL, Gutiérrez S, et al. Subcellular localisation of VEGF in different pituitary cells. Changes of its expression in oestrogen induced prolactinomas [J]. *J Mol Histol*, 2005, 36(8–9): 447–454.
- [17] Lombardero M, Quintanar-Stephano A, Vidal S, et al. Effect of estrogen on the blood supply of pituitary autografts in rats [J]. *J Anat*, 2009, 214(2): 235–244.
- [18] Spady TJ, McComb RD, Shull JD. Estrogen action in the regulation of cell proliferation, cell survival, and tumorigenesis in the rat anterior pituitary gland [J]. *Endocrine*, 1999, 11(3): 217–233.

(编辑 徐杰)