

# 垂体前叶细胞的增殖及调控

张万会 朱运龙 王复周

(第四军医大学生理教研室、神经内分泌研究室 西安 710032)

垂体前叶(AP)的结构和功能性调控是神经内分泌学的主要研究课题。人们对AP激素分泌过程及其调控机制的认识已相当深入,然而对其细胞增殖的研究尚嫌不足。与分泌过程相似,AP细胞的增殖亦成自众多环节,并在多种因素调节下,使各种AP细胞维持于一定的数目和比例,且随机体的生理变化而相应增减。增殖现象可见于所有的AP细胞,包括GH细胞、PRL细胞、ACTH细胞、LH/FSH细胞、TSH细胞及滤泡星形细胞(folliculostellate Cell, FSC)。以下拟简述有关此课题的研究进展。

## 一、AP细胞增殖的生理性变化

**1. 发育性变动** 在胚胎早期,AP由Rathke's囊衍生并活跃增殖而形成的,其细胞类型、数目、器官的重量和体积等均有明显的发育性变化。在大鼠及人胚胎AP中,首先出现ACTH细胞,继以GH细胞、TSH细胞及LH/FSH细胞也渐次分化,PRL细胞最后出现。大鼠生后2日其AP中分裂指数(MI)达高峰<sup>[1]</sup>,至30日龄时,80—95%AP细胞呈AP激素抗血清免疫染色阳性<sup>[2]</sup>。

**2. 性别差异** 成体大鼠AP中,PRL细胞的分裂相以雌性为多,并呈性周期波动,于动情期内达分裂高峰。卵巢摘除可明显减少AP的MI,雌二醇(E<sub>2</sub>)可翻转此效应。雄鼠去势后,AP中的LH/FSH细胞增殖活跃。

**3. 近日节律及季节性变化** 已知AP激素的分泌有明显的周期性,而AP细胞的DNA合成及细胞分裂亦呈节律性波动,如于晚12时,曾观察到大鼠AP细胞呈旺盛的分裂,

但此时AP激素的合成和分泌活动则处于低谷状态。另大鼠AP的MI有季节性变化,在每年的3月及9月分别达最高和极低值。

**4. 妊娠及哺乳的影响** 妊娠时,AP呈生理性肥大外观,PRL细胞数目及比例渐上升,并于妊娠晚期及哺乳期内,PRL细胞可占AP细胞的50%。断乳后,PRL细胞呈退行性变化,数目减少,7日后其比例方降至孕前水平<sup>[3]</sup>。除此,吮乳刺激可改变AP中PRL细胞的亚群比例,以提高PRL细胞对多巴胺(DA)抑制的耐受性并促进PRL释放<sup>[4]</sup>。

**5. 衰老性变动** 衰老大鼠的激素水平多呈降低,且对下丘脑激素的反应性下降。AP中细胞数目及比例亦有较大改变,如在老年雌鼠,PRL细胞增多,常形成增生过度(hyperplasia),并伴有亚细胞结构的明显变化<sup>[5]</sup>。

**6. 应激性影响** 各种应激性刺激不但引起机体神经内分泌功能变化,也可影响AP细胞的增殖。如大鼠冷暴露(-10℃)仅6分钟,则12小时后即观察到AP中TSH细胞分裂增多,而低张性缺氧则减少TSH细胞的比例<sup>[6]</sup>。除此,甲醛皮下注射所致的痛性应激也使AP中的MI下降。

## 二、下丘脑激素的作用

**1. 促甲状腺素释放激素(TRH)** TRH可提高离体培养AP组织的MI,此作用可被生长抑素(SOM)抑制。TRH还可降低PRL细胞数目,并抑制AP瘤细胞系GH4的增殖。当甲状腺摘除或功能低下时,AP中出现“甲状腺切除后细胞”(thyroidectomy cell),这主要是TRH分泌增多及甲状腺激素的反馈抑制削弱

所致。

**2. 促性腺激素释放激素(GnRH 或LRH)** 有资料表明,在胚胎发育及生后早期,LH细胞的分化和增殖并不需要GnRH。于成体AP内,LH/FSH细胞极少分裂,去势则引起LH/FSH细胞的旺盛增殖,而此时PRL细胞比例减少。GnRH抗体可翻转这类改变,提示阉割后LH/FSH细胞的增殖可能起因于GnRH的过度分泌。

**3. 促生长激素释放激素(GHRH)** 有关GHRH的研究结果较为一致。GHRH不但刺激GH的合成和分泌,还可使离体GH细胞增殖,并引起AP细胞内c-fos原癌基因及FOS蛋白质的暂时表达,这些效应系由cAMP介导的<sup>[7]</sup>。另GHRH还能抑制成年大鼠AP中PRL细胞的增殖。下述事实亦支持这些发现:1)GHRH转基因小鼠AP中,GH细胞增生过度,分裂相极多,AP重量增加,鼠体显著增大;2)以GH基因启动子和霍乱毒素基因嵌合体来构建转基因小鼠,由于AP内表达的霍乱毒素可持续激活腺苷酸环化酶,提高胞内cAMP浓度,故细胞亦增生活跃,动物表现为巨鼠症(gigantism)<sup>[8]</sup>;3)cAMP的效应是由一种蛋白质所介导的,称为“cAMP反应成分结合蛋白”(CREB)。制备转基因小鼠,使其AP细胞中的CREB过量表达但不能被磷酸化修饰,致使cAMP的作用难以发挥,则小鼠AP细胞增生低下,且鼠体生长受阻<sup>[9]</sup>。

**4. 促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)** CRH可提高大鼠AP中ACTH细胞的MI及细胞的绝对数目。去垂体及去势的仓鼠接受同种异体垂体移植后,移植的垂体也对外源CRH产生类似反应。然而McNicol等未能证实CRH对培养AP细胞的促增殖效应,仅当合用精氨酸加压素(AVP)时,方能起到强化后者的增殖刺激作用<sup>[10]</sup>。

### 三、AP的外周靶腺及其激素的效应

**1. 甲状腺及甲状腺素(T<sub>4</sub>)** T<sub>4</sub>可翻转

AP中“甲状腺切除后”细胞的改变<sup>[11]</sup>,并能抑制TRH及E<sub>2</sub>的促AP细胞增殖效应,但不改变AP细胞的离体基础增殖活动。

**2. 雌激素** 在体和离体实验表明,E<sub>2</sub>均可刺激两性大鼠AP细胞DNA的合成及细胞增殖,致使AP重量增加,DNA含量提高,MI加大,甚至引起Fischer 344大鼠AP内腺瘤的形成。E<sub>2</sub>主要作用于PRL细胞,促进PRL的合成和释放,增大PRL细胞的平均核周径、MI及其比例。E<sub>2</sub>对PRL细胞的作用有明显的遗传差异,如Holtzman大鼠AP中PRL细胞对E<sub>2</sub>的敏感性远低于Fischer 344大鼠。E<sub>2</sub>也可刺激人AP瘤细胞的增殖<sup>[12]</sup>。E<sub>2</sub>的效应可有如下机理:1)AP细胞内含有E<sub>2</sub>受体;2)E<sub>2</sub>可提高胞内DNA聚合酶活力;3)导致AP中鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性增加,多胺含量增多并呈性周期波动;4)影响前列腺素的合成和释放,从而间接改变AP细胞的增殖。消炎痛可阻断这一效应;5)提高AP细胞膜上GnRH受体数目并增加细胞对孕酮的结合力;6)AP在E<sub>2</sub>刺激下血流量增多和血管再生活跃。

**3. 睾酮和雄激素** 睾酮(T)可抑制AP中LH细胞的增殖。去势雄鼠亦出现较多的性腺摘除细胞,其胞体增大,胞内空泡形成及分泌活动亢进。增殖以LH/FSH细胞为主,伴有PRL细胞的减少、AP中DNA合成加速及DNA聚合酶活力上升,二氢睾酮可翻转这些变化。除此,给大鼠注射LH抗血清,其AP亦呈去势样改变,并引起性腺萎缩。去势所致AP的变化程度有年龄依赖性,即30日龄大鼠去势二周后的AP之MI升高1.5倍,而70日龄大鼠的相应改变较为和缓<sup>[4]</sup>。

自性腺来源的激动素(activin)也能特异性刺激AP培养中FSH细胞的增殖<sup>[13]</sup>。

**4. 肾上腺皮质** 摘除双侧肾上腺后,AP中ACTH细胞肥大并增殖旺盛。此变化可能主要是CRH所致,因CRH腹腔注射一定时期后,AP出现ACTH细胞的活跃分裂及胞体增

大。地塞米松可减少细胞内 DNA 及蛋白质的合成, 从而抑制人垂体瘤细胞的增殖<sup>[12]</sup>。

### 五、神经肽及生长因子的效应

1. 加压素(AVP) 于短期培养体系中, AVP可刺激 AP 增殖, 提高 MI, 并强化 CRH 的促增殖效应。其作用的靶细胞极可能为 ACTH 细胞, 但尚无直接证据。

2. 血管活性肠肽(VIP) 大鼠 AP 中含有较丰富的 VIP 及其 mRNA, 二者含量受体内甲状腺和性腺机能状态的影响。VIP 可刺激 PRL 分泌, 并影响其他 AP 激素的释放。现已证明, VIP 可剂量依赖性地刺激人垂体腺瘤系细胞 DNA 的合成, 其有效剂量接近垂体门脉血中 VIP 浓度的上限<sup>[12]</sup>。

3. 成纤维细胞生长因子(FGF) 根据 FGF 的来源及类型, 它既可刺激 AP 细胞增殖<sup>[10]</sup>, 增强人垂体瘤系细胞的 DNA 合成(牛 FGF)<sup>[12]</sup>, 又可延长 AP 细胞的增殖周期(bFGF), 还明显抑制 E<sub>2</sub> 的效应, 并降低 GH<sub>4</sub>C 大鼠 AP 瘤细胞的基础增殖活动。血小板源性生长因子(PDGF)及表皮生长因子(EGF)和溴隐亭等均可减轻 bFGF 的抑制作用。AP 中含有 bFGF<sup>[14]</sup>及 aFGF 的事实支持上述作用的可能生理意义。

4. P 物质(SP) SP 与 AP 的关系尤为密切, AP 可合成和释放 SP, SP 亦影响多种 AP 激素的分泌, 且 AP 中有 SP 肽能神经纤维的分布。我们的工作证明, SP 可剂量依赖地促进大鼠 AP 细胞 DNA 的合成, 尤其是 FSC (待发表资料)。

### 六、某些经典递质及相关药物的影响

1. 多巴胺(DA) 作为 PRL 分泌的生理性抑制因子, DA 可明显减少 AP 的 MI, 降低 PRL 及 GH 细胞的百分比<sup>[15,16]</sup>以及对抗 E<sub>2</sub> 的促 PRL 细胞增殖效应, 而 DA 受体阻断剂 Pimozide 和氟哌啶醇则作用相反。

2. 苯二氮草(BZD)类药物 安定注射给药

可减少幼鼠 AP 的 MI<sup>[17]</sup>。应用外周型 BZD 受体激动剂。R<sub>5</sub>-4864 可降低 AP 细胞对 <sup>3</sup>H-PdR 的掺入率, 而中枢型 BZD 受体激动剂则无效。

3. 前列腺素(PG)及其合成阻断剂 镇痛新和阿斯匹林均可减少 AP 的 MI(主要为嗜酸性及嗜碱性细胞)。另外于第三脑室注射 PGE<sub>2</sub> 可显著减少大鼠 AP 的 MI(以嫌色细胞为主)<sup>[18]</sup>, 故这些结果提示 PG 可能在多个环节参与 AP 细胞的增殖调控。

4. 肾上腺素能及胆碱能药物 酚妥拉明可抑制甲状腺半切所致的大鼠 AP 细胞增殖, 而匹鲁卡品及碳甲酰胆碱能提高 AP 的 MI, 并可被阿托品所阻断。已知经典性递质都可影响 AP 激素的分泌, 且 Ach 及受体均存在于 AP 中, 其在雌鼠 AP 中的含量随性周期而变<sup>[19]</sup>, 故这些药理学观察可能有一定的生理意义。

### 七、细胞因子与 AP 细胞增殖

我们利用原代细胞培养体系, 观察到肿瘤坏死因子和白介素 2 (TNF- $\alpha$  及 IL-2) 均可剂量依赖性地刺激大鼠垂体前叶细胞的离体增殖活动, 表现为 DNA 合成的增加, FSC 比例上升(TNF- $\alpha$ )。

### 八、垂体前叶细胞增殖和调控机制

综上所述, 诸多刺激及生物活性物质或相关药物均可从不同角度, 以各异的方式影响 AP 细胞的增殖活动。这些作用无疑应是通过 AP 细胞膜上及胞内的受体而引起的细胞增殖变化, 似应包括如下方面:

1. 配基与受体结合, 如 GHRH 可激活腺苷酸环化酶, 升高胞内 cAMP 浓度, 经 CREB 的磷酸化而促进 GHF 1 蛋白的表达, 后者则作用于 AP 细胞增殖的关键步骤<sup>[20]</sup>。

2. ODC 活性的改变及多胺含量的增减, 可影响增殖过程。因多胺分子中正电荷较多, 能结合于富含负电荷的 DNA 骨架结构, 从而促进 DNA 的转录和复制(E<sub>2</sub> 的效应即部分由

此介导<sup>[21]</sup>。

3. 与肽类生长因子受体相偶联的酪氨酸激酶亦是细胞增殖的有效刺激途径。EGF和FGF的作用与此有关。

4.  $Ca^{++}$ -钙调素系统也参与细胞增殖过程。以电压依赖性的 $Ca^{++}$ 通道入胞的 $Ca^{++}$ ,可负性调节大鼠AP瘤细胞(GH4)的增殖活动<sup>[22]</sup>。然而 $Ca^{++}$ 在正常大鼠AP细胞中的增殖调控作用尚无报道。

5. 受体内移(receptor internalization)也可能不仅为受体循环或降解的途径,从而调节受体的数目(脱敏和耐受现象),而更重要的可能是介导生物活性物质的胞内信号传递过程<sup>[23]</sup>。近来发现,DA对多种细胞增殖的抑制是因其与胞内受体的结合所致<sup>[24]</sup>。考虑到糖皮质激素除在细胞内有特异性受体外,神经元胞膜上也发现有其受体分布<sup>[25]</sup>。因此,胞膜受体与配基结合后向胞内及核内的运转并传递信息亦应是合理的。这将是一个潜在而重要的研究领域。

细胞内蛋白质的磷酸化是上述各种途径的共同交汇。目前,人们对真核细胞增殖周期的调控机制已有较深的了解。概言之,各种外界增殖刺激信号最终将激活34 kD的p34<sup>cdc2</sup>蛋白激酶(cdc为细胞分裂及周期性决定基因,已发现有40余种),此激酶可催化诸如组蛋白H<sub>1</sub>、p105<sup>Rb</sup>及p60<sup>c-myc</sup>等在内的蛋白质磷酸化,从而控制DNA合成的起始,也决定细胞分裂过程的启动<sup>[26]</sup>。除此,细胞增殖的调还涉及其他一些基因(如CLN等)的周期性转其蛋白产物参与DNA代谢,控制细胞变化的顺序或保证细胞内机制的忠实运转<sup>[27]</sup>。相信随着分子生物学的发展,对细胞增殖的调控机制将很快有更透彻的了解,从而澄清有关AP细胞增殖的许多现存问题。

### 摘 要

构成垂体前叶的各型细胞均有一定的增殖活动,并呈生理性波动。本文回顾了诸如下丘

脑促激素及因子。垂体前叶激素的靶腺,神经肽类及经典递质等众多因素对此过程的影响,强调此内分泌“主腺”的增殖活动是机体维持自身稳态并完成一定功能的重要生理性环节。

### 参 考 文 献

- [1] Carbajo-Perez, E and Y. G. Watanabe., 1990, *Cell Tissue Res.*, 261: 333—338.
- [2] Smets, G., et al., 1989, *Histochem. J.*, 21: 337—342.
- [3] Haggi, E. S., et al., 1986, *J. Endocrinol.*, 111: 367—373.
- [4] Nagy, G. M. and L. S. Frawley., 1990, *Endocrinology*, 127: 2079—2084.
- [5] Chuknyiska, R. S., et al., 1986, *Endocrinology*, 118: 1856—1862.
- [6] Gosney, J. R., 1986, *J. Endocrinol.*, 109: 119—124.
- [7] Billestrup, N., et al., 1987, *Mol. Endocrinol.*, 1: 300—305.
- [8] Burton, F. H., et al., 1991, *Science*, 253: 197—199.
- [9] Struthers, R., et al., 1991, *Nature*, 350: 622—624.
- [10] McNicol, A. M., et al., 1990, *J. Endocrinol.*, 126: 255—259.
- [11] Horvath, E., et al., 1990, *Lab. Invest.*, 63: 511—520.
- [12] Prysor-Jones, R. A., et al., 1989, *J. Endocrinol.*, 120: 171—177.
- [13] Katayama, T., et al., 1990, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 69: 179—185.
- [14] Gospodarowicz, D., 1975, *J. Biol. Chem.*, 250: 2515—2522.
- [15] McComb, D. J., et al., 1987, *Am. J. Pathol.*, 122: 7—16.
- [16] Johansen, P. W., et al., 1985, *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 110: 200—206.
- [17] Pawlikowski, M., et al., 1987, *Life Sci.*, 40: 1131—1135.
- [18] Sewerynek, E., et al., 1986, *Res. Exp. Med. Berl.*, 186: 1—4.
- [19] Egozi, Y., et al., 1988, *Brain Res.*, 475: 376—379.
- [20] Castrillo, J. L., et al., 1991, *Science*, 253: 197—199.
- [21] Persson, L., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 165: 391—400.
- [22] Ramsdell, J. S., 1991, *J. Cell Physiol.*, 146: 197—206.
- [23] James, R., and R. A. Bradshaw., 1984, *Ann. Rev. Biochem.*, 53: 259—292.

- [24] Markaverich, B. M., et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 165: 391—400.
- [25] Hua, S. Y., and Y. Z. Chen., 1989, *Endocrinology*, 124: 687—691.
- [26] Draetta, G., 1990, *TIBS.*, 15: 378—383.
- [27] McKinney, J. D., and N. Heintz., 1991, *TIBS.*, 16: 430—435.

## 转基因动物的应用及前景

田小利 陈兰英

(中国医学科学院心血管病研究所实验室 北京 100037)

过去 20 年,用分子克隆及基因转移(*gene-transfer*)等手段,将目的基因导入特定细胞后,通过观察外源基因在靶细胞中的行为,研究真核基因的结构与功能,包括基因调节的顺式元件、反式作用因子及基因产物的生理学特性等,已取得可喜进展。其不足之处,是无法将单一的目的基因和其在整体中的作用加以综合研究,所以不能从整体(个体)水平去全面认识基因的表达、调节及其在发育和疾病中的作用。Jaenisch<sup>[1]</sup>及 Gordon<sup>[2]</sup>等曾将外源基因导入胚泡或受精卵原核内,然后使之发育成个体,为研究目的基因在整体水平的功能作了有意义的探讨。1981年, Costantini<sup>[3]</sup>首次将构建的兔 $\beta$ -血红蛋白基因用显微注射法转入小鼠受精卵,并发育成可将外源基因传给子代的小鼠,产生了第一批转基因动物,这些工作为从分子到个体多层次、多方位地研究基因提供了新的方法和思路。本文主要介绍转基因动物的应用及前景。

### 一、转基因动物的应用

#### (一) 研究基因的结构和功能

##### 1. 转录和复制调控的研究

曾用爪蟾卵母细胞作为受体细胞,注入外源 DNA 或 mRNA,研究外源基因的复制、转录或 mRNA 翻译的调控。实际上爪蟾卵母细胞常常不能从正常的转录起点开始转录<sup>[4]</sup>,且外源 DNA 在该细胞中的复制也常不需特殊的

调控元件,所以由此得出的实验结果很难推演于哺乳类基因<sup>[5]</sup>。用转染细胞研究细胞分化和基因表达的选择性开启会受到限制。但用转基因技术将不同周围序列的目的基因转入动物(如小鼠)的受精卵中,观察外源基因在发育不同时期胚胎或个体中的复制和表达行为,有助于找出复制和调控的元件。用此法研究 SV40 早期基因转录活动时发现:SV40 早期基因转录的增强子在二细胞期后才发挥作用,尽管 SV40 在分化后的小鼠细胞中失活,但在小鼠胚胎发育的早期有活性。这一研究提示人们可用转基因技术在胚胎发育早期研究分化后不再表达的基因的调控<sup>[6]</sup>。

##### 2. 组织表达特异性元件的寻找

把含不同长度周围序列的基因转入动物受精卵,发育成个体后,检查其表达的组织特异性,以推知组织表达特异性的顺式调控元件。如 Fukamizu 等<sup>[6]</sup>将包括上游 3 kb、下游 1.2 kb 的人肾素基因转入小鼠,发现其表达有组织特异性,并认为调节肾素表达的组织特异性元件存在于转入基因的周围序列中。

##### 3. 研究基因改变和功能的关系

将自然或人工突变的基因转入动物,通过研究异常基因和表型的关系,可以有目的地研究兴趣基因结构和功能的关系。目前多用融合基因作转基因<sup>[7]</sup>,而直接突变基因表达区的转基因工作目前较少。

#### (二) 建立动物模型