

雄激素和雌激素对人类前列腺间质细胞bFGF、TGF β 2以及smoothelin表达的影响

良性前列腺增生症(BPH)是老年男性常见病,其病因复杂学说众多,至今仍有许多不明之处。雄激素(androgen, Ad)在BPH病因学中的作用已被普遍接受,Ad对前列腺间质和上皮都有刺激生长作用,抗Ad药物已在BPH临床治疗中得到广泛应用。然而,Ad在前列腺的作用机制仍未完全清楚。近年来雌激素(estrogen, Et)在BPH病因学中的作用也倍受关注。动物实验中Et能刺激前列腺间质平滑肌生长[1],细胞实验中Et能促进间质细胞增殖并向平滑肌表型转化[2][3]。间质平滑肌增生在BPH组织学和病因学中都具有重要意义,因此许多学者认为Et在BPH病因中也具有重要作用。研究表明BPH组织中的Et水平明显高于正常前列腺[4],抗Et药物治疗BPH也取得了良好疗效[5]。然而,有关Et在前列腺的作用机制目前报道很少。生长因子是调节细胞生长分化的直接介质,多种生长因子在调节前列腺间质和上皮细胞的生长分化起重要作用。Mori[6]研究发现人类BPH组织中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和转化生长因子(TGF β 2)的表达比正常前列腺组织明显增高,说明两种生长因子在BPH病因学中有重要意义。bFGF对前列腺间质和上皮细胞都有刺激增殖作用,这与Ad对前列腺的作用相似。Collins等[2]发现Ad对前列腺的作用是通过影响生长因子而实现的,实验中没有进一步观察Ad对生长因子的影响。TGF β 2能刺激前列腺间质细胞增殖并向平滑肌细胞分化[7],这与Et对前列腺的作用相似。因此,Ad和Et对前列腺的作用都可能与生长因子有关,通过观察它们对生长因子表达的调节可以证明性激素对生长因子的调节作用。本实验通过体外培养的人类前列腺间质细胞进行实验,观察了Ad和Et刺激对bFGF和TGF β 2表达的影响,同时对细胞的平滑肌表型转化也进行了观察。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12培养基、RPMI 1640培养基、胰蛋白酶、RT-PCR试剂盒购自GIBCO公司。小鼠抗人vimentin抗体、小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白抗体、小鼠抗人各类细胞角蛋白(pan cytokeratin)抗体、SABC试剂盒购自武汉博士德公司。I型胶原酶、双氢睾酮(DHT)、雌二醇(E_2)购自Sigma公司。细胞裂解液购自Boehringer Mannheim公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及鉴定 细胞培养方法参考文献[8]:手术取出的BPH组织剪碎为小于1 mm³,1 mg/ml的I型胶原酶液消化8~12 h,离心,洗涤,接种于RPMI 1640完全培养液,得到原代细胞。0.25%胰蛋白酶液消化分瓶培养得传代细胞。细胞类型通过免疫细胞化学染色鉴定。Vimentin阳性为间质细胞, α -平滑肌肌动蛋白阳性为平滑肌细胞,pan cytokeratin阳性为上皮细胞。

1.2.2 性激素实验 第3代细胞(主要是间质细胞)以 1×10^5 /瓶密度传代于50 cm²培养瓶,过渡到DMEM/F12无血清培养,分4组给予不同的性激素处理:(1)对照组:空白溶剂;(2)DHT组: 1×10^{-9} mol/L的DHT;(3) E_2 组: 1×10^{-9} mol/L的 E_2 ;(4)DHT+ E_2 组: 1×10^{-9} mol/L的DHT和 1×10^{-9} mol/L的 E_2 。各组重复5瓶求均值。48 h后RT-PCR法观察bFGF、TGF β 2和smoothelin的mRNA表达。

1.2.3 总RNA提取和RT-PCR 按细胞裂解液说明书提取总RNA,按RT-PCR试剂盒说明进行逆转录和扩增, β -actin为内参物,引物序列见表1。Perkin Elmer 480型PCR仪设置:50 °C逆转录30 min;94 °C 30 s、55 °C 50 s、72 °C 50 s,扩增35个循环。产物于1.5%琼脂糖凝胶100 mV电压下电泳。UVP Iimagestore 7500型凝胶电泳图象扫描分析仪检测各产物的荧光度值。待测物相对表达量=待测产物荧光度值/ β -actin产物荧光度值。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences of the primers

| Primers | Sequence | Amplification length |
|----------------|-------------------------------|----------------------|
| bFGF | | 238 bp |
| Sense | 5'GTGTGTGCTAACCGTTACCT3' | |
| Antisense | 5'GCTCTTAGCAGACATTGGAAG3' | |
| TGF β 2 | | 247 bp |
| Sense | 5'AAATGGATACACGAACCCAA3' | |
| Antisense | 5'GCTGCATTTGCAAGACTTTAC3' | |
| Smoothelin | | 324 bp |
| Sense | 5'GGTCGAAGATGCTGCCCATCTT3' | |
| Antisense | 5'ATGCCTGCCGTGTGAACCATGT3' | |
| β -actin | | 587 bp |
| Sense | 5'CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC3' | |
| Antisense | 5'AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC3' | |

1.3 统计方法

Friedman检验, Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 细胞培养及一般观察

本实验从16例BPH病人手术标本中成功地培养出11株人类前列腺间质细胞。前列腺间质细胞体外培养一般能传10~15代, 贴壁后呈梭形生长。成纤维细胞较细长, 平滑肌细胞较粗短, 两种间质细胞形态无严格区别, 不易分离培养。上皮细胞成团簇状生长, 很难贴壁生长。从第3代起间质细胞纯度>95%, 可用于间质细胞实验。

2.2 性激素刺激实验结果

人类前列腺间质细胞经性激素处理48 h后, bFGF、TGF β 2、smoothelin的mRNA表达量见表2。Friedman检验结果表明: DHT组的bFGF表达量高于对照组, E₂组的TGF β 2和smoothelin表达量高于对照组, DHT+E₂组的TGF β 2和smoothelin表达量低于E₂组(P<0.05); DHT组与对照组的TGF β 2和smoothelin表达量无显著性差异, E₂组与对照组bFGF的表达量无显著性差异, DHT+E₂组与DHT组的bFGF表达量无显著性差异(P>0.05)。Spearman等级相关分析表明, TGF β 2与smoothelin的表达量成正相关(P<0.05), 见图1。

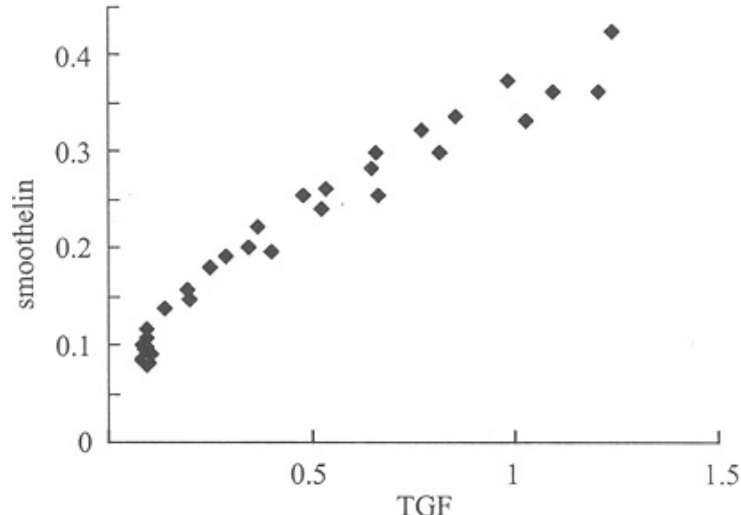


图1 smoothelin与TGFβ2相对表达量的相关性
Fig.1 The correlation between the relative expressions of smoothelin and TGFβ2

表2 各组各株细胞 bFGF、TGFβ2、smoothelin 的相对表达量
Tab.2 Relative expression levels of bFGF, TGFβ2 and smoothelin in different cell lines and in different groups

| Cell line | Group | | | | | | | | | | | |
|-----------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|----------------|----------|----------|--------------------|----------------------|----------------------|
| | Control | | | DHT | | | E ₂ | | | DHT+E ₂ | | |
| | bF | Tβ2 | sm | bF | Tβ2 | sm | bF | Tβ2 | sm | bF | Tβ2 | sm |
| 1 | 0.064 6 | 0.088 7 | 0.080 8 | 0.408 7* | 0.092 5 | 0.082 1 | 0.067 2 | 0.767 3* | 0.321 3* | 0.399 4 | 0.656 2 [#] | 0.298 0 [#] |
| 2 | 0.067 3 | 0.095 6 | 0.098 5 | 0.488 3* | 0.099 7 | 0.088 9 | 0.069 1 | 0.645 1* | 0.281 3* | 0.461 5 | 0.525 5 [#] | 0.240 9 [#] |
| 3 | 0.085 5 | 0.108 2 | 0.090 8 | 0.274 4* | 0.097 6 | 0.093 3 | 0.081 3 | 0.981 6* | 0.373 7* | 0.262 0 | 0.851 1 [#] | 0.336 3 [#] |
| 4 | 0.076 8 | 0.096 9 | 0.116 1 | 0.525 6* | 0.094 7 | 0.078 7 | 0.076 8 | 0.478 3* | 0.255 3* | 0.549 1 | 0.368 8 [#] | 0.220 8 [#] |
| 5 | 0.067 1 | 0.083 3 | 0.099 3 | 0.454 3* | 0.085 8 | 0.084 4 | 0.073 6 | 0.343 2* | 0.200 2* | 0.477 6 | 0.248 6 [#] | 0.180 6 [#] |
| 6 | 0.076 2 | 0.099 9 | 0.082 5 | 0.336 9* | 0.094 6 | 0.087 6 | 0.081 4 | 1.240 3* | 0.423 4* | 0.343 6 | 1.091 6 [#] | 0.362 4 [#] |
| 7 | 0.083 6 | 0.089 3 | 0.095 6 | 0.456 8* | 0.092 7 | 0.084 5 | 0.078 3 | 0.288 2* | 0.190 8* | 0.491 1 | 0.202 5 [#] | 0.147 8 [#] |
| 8 | 0.066 5 | 0.090 6 | 0.088 9 | 0.498 8* | 0.094 4 | 0.083 6 | 0.070 1 | 0.536 0* | 0.262 2* | 0.469 2 | 0.404 2 [#] | 0.195 6 [#] |
| 9 | 0.054 5 | 0.096 4 | 0.095 9 | 0.368 6* | 0.094 4 | 0.090 3 | 0.055 5 | 1.203 3* | 0.361 2* | 0.376 3 | 1.027 2 [#] | 0.330 7 [#] |
| 10 | 0.063 3 | 0.085 6 | 0.086 3 | 0.307 6* | 0.093 7 | 0.107 9 | 0.061 9 | 0.812 1* | 0.299 3* | 0.310 7 | 0.661 5 [#] | 0.253 6 [#] |
| 11 | 0.071 1 | 0.092 5 | 0.087 6 | 0.473 7* | 0.094 3 | 0.092 3 | 0.068 2 | 0.194 6* | 0.155 4* | 0.493 5 | 0.139 6 [#] | 0.138 4 [#] |

*P<0.05 vs control group; [#]P<0.05 vs E₂ group; bF: bFGF; Tβ2: TGFβ2; Sm: smoothelin

3 讨论

Ad是调节前列腺生长的重要因素，这在动物实验和细胞实验都已得到充分证实。动物切除双侧睾丸后前列腺萎缩，给予外源性Ad后前列腺生长恢复。Collins等[2]实验发现睾酮能刺激培养的人前列腺间质细胞增殖，更换培养液细胞则不能增殖，因此认为睾酮的作用通过生长因子实现。Collins的实验没有进一步观察睾酮刺激到底影响前列腺间质细胞哪些生长因子的表达。雄激素受体(AR)是核受体，Ad可直接进入细胞核与AR形成复合体，此复合体是Ad依赖性基因的启动子。Ad依赖性基因转录后对生长因子有何影响目前不甚清楚。

Et在前列腺中的作用长期以来争论较多。Et在许多组织中具有对抗Ad的作用，作为BPH治疗药物。然而后来研究发现，

Et在前列腺组织中能增强Ad的作用。近年大量动物实验和细胞实验结果表明, Et可以不依赖Ad而直接刺激前列腺间质细胞生长。目前只发现犬类和灵长类两类动物受Et刺激后前列腺间质细胞生长, 犬类和灵长类也是仅有的能形成自发性BPH的种属。因此, 动物前列腺对Et刺激的反应存在明显的种属差异性, 研究前列腺中Et的作用机制在种属选择上有限制, Et作用于动物前列腺的许多实验结果不一致与此有关。本实验中, 我们选择BPH患者分离培养的人类前列腺间质细胞作为实验对象。

Et在前列腺组织的作用机制有两种结合途径: 雌激素受体(ER)和性激素结合球蛋白(SHBG), 两者都只存在于间质细胞。ER也是胞核受体, 也能调节基因转录, 但Et结合ER形成复合体后有何效应目前也不清楚。近年来前列腺内SHBG的研究表明, E_2 能结合间质细胞膜上的SHBG导致胞内cAMP增高8倍[9]。cAMP是胞内重要的信号介质, 通过磷酸化作用调节多种细胞功能。因此许多学者认为Et-SHBG-cAMP系统在Et作用中有重要意义。至于cAMP增高后如何影响细胞生长目前仍不甚清楚。

BPH组织中Ad和Et的作用都有所增强, 两种性激素作用增强与bFGF和TGF β 2两种生长因子表达增高有何联系, 这方面的研究很少报道。影响生长因子的各种因素中, 性激素是最重要的外界条件。动物实验发现大鼠经去势后前列腺中TGF β 1表达明显增高, 给予外源性Ad后TGF β 1表达受抑制, 说明TGF β 1表达受Ad负调控。Katz等[10]报道去势大鼠经Ad刺激后前列腺中bFGF表达明显增强, 证明bFGF表达受Ad正调控。然而, 细胞实验中Ad如何影响前列腺生长因子的报道很少。另外, TGF β 2在前列腺组织中表达增高的原因与性激素有何关系、Et对前列腺生长因子表达有何影响, 这两方面的动物实验和细胞实验国内外目前都很少报道。TGF β 家族在哺乳动物有TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3三种亚型, 它们有相同的生物效应, 但产生部位和表达调节有所不同[11]。人类前列腺中TGF β 三种亚型都有表达, 它们都能刺激间质细胞生长而抑制上皮细胞, 并能诱导成纤维细胞转化为平滑肌细胞。

许多学者研究发现体外培养的人类前列腺间质细胞仍保持对Ad和Et的反应性。我们的预实验证实了这一点, 而且发现不同BPH病人来源的细胞株受性激素刺激后细胞增殖情况有差异, 因此推测其生长因子表达情况可能也有差异。免疫细胞化学法不能满意地反映这种细微的差异, 因此我们采用了RT-PCR法来检测生长因子表达。预实验发现细胞受性激素刺激后一般在24 h有生长因子表达增高, 3 d开始有细胞增殖。因此, 本实验在性激素刺激后48 h观察细胞生长因子的表达不受细胞数增加的影响。DHT和 E_2 分别是前列腺内主要的Ad和Et, 本实验选用这两种性激素作用刺激因素。Smoothelin是一种新发现的肌动蛋白的连接蛋白, 只在完全分化的平滑肌细胞内表达, 因此本实验采用它作为平滑肌细胞的标志蛋白[12]。

本实验结果表明, DHT能明显增强人类前列腺间质细胞的bFGF表达, TGF β 2表达不受其影响。 E_2 能上调细胞的TGF β 2表达, bFGF表达不受其影响。DHT和 E_2 合用时DHT诱导的bFGF表达不受 E_2 影响, 而 E_2 诱导的TGF β 2和smoothelin表达都受到DHT限制。DHT对 E_2 的抑制作用可能与前列腺间质细胞膜上的Et-SHBG-cAMP系统有关, 因为DHT结合SHBG的能力强于 E_2 但不能增高胞内cAMP[9]。Mori[6]发现BPH组织中TGF β 2表达高于正常前列腺, 而TGF β 1表达与正常前列腺并无增高, 其原因是TGF β 三种亚型的表达调节有所不同。 E_2 能诱导TGF β 2表达增高而不影响TGF β 1和TGF β 3表达, 这与Et-SHBG-cAMP系统有关。TGF β 2表达受cAMP诱导, TGF β 1和TGF β 3表达不受cAMP影响[11][13]。另外, 实验中发现smoothelin表达量与TGF β 2表达量呈正相关, 提示 E_2 诱导细胞向平滑肌细胞表型转化可能与TGF β 2有关。

本实验证明DHT能诱导人类前列腺间质细胞bFGF的表达, E_2 能诱导TGF β 2表达并影响平滑肌细胞表型转化。明确性激素、生长因子、平滑肌细胞三者的关系可以加深对BPH病因学的认识, 而且可能对药理治疗BPH提供更多的理论基础。临床上BPH有5种组织类型: 纤维肌腺瘤增生, 纤维腺瘤增生, 纤维肌增生, 平滑肌增生, 基质增生。它们的差别实际上是反映前列腺组织中成纤维细胞、平滑肌细胞、腺上皮细胞各自增生程度的差异。各种细胞成分增生的差异实际上反映生长因子和Ad和Et功能的差异, 因此不同组织类型的BPH需要不同侧重的抗Ad治疗或抗Et治疗。目前临床上BPH药物治疗仍有不满意之处, 相信随着BPH病因学研究和认识的不断深入, BPH药物治疗必定会有更好的前景。

参考文献:

[1] Hodes L, Ding VD, Kemp RK, et al. Estradiol causes a dose-dependent stimulation of prostate growth in castrated beagle dogs[J]. Prostate, 2000, 44: 8-18.

[2] Collins AT, Zhiming B, Gilmore K, et al. Androgen and oestrogen responsiveness of stromal cells derived from the human hyperplastic prostate: oestrogen regulation of the androgen receptor[J]. J Endocrin, 1994, 143: 269-77.

[3] Zhang J, Hess MW, Thurnher M, et al. Human prostatic smooth muscle cell in culture: estradiol enhances expression of smooth muscle cell-specific marker[J]. Prostate. 1997, 30: 117-129.

[4] Krieg M, Nass R, Tunn S, et al. Effect of aging on endogenous level of 5α -dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1993, 77: 375- 81.

[5] Boehm S, Nirnberger G, Ferrari P. Estrogen suppression as a pharmacotherapeutic strategy in the medical treatment of benign prostatic hyperplasia: evidence for its efficacy from studies with mepartricin[J]. Wien Klin Wochenschr, 1998, 110(23): 817-23.

[6] Mori H, Maki M, Oishi K, et al. Increased expression of gene for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor type β 2 in human benign prostatic hyperplasia[J]. Prostate,

- [7] Peehl DM, Sellers RG. Induction of smooth muscle cell phenotype in cultured human prostatic stromal cells[J]. *Exp Cell Res*, 1997, 232(2): 208-15.
- [8] Kassen A, Sutkowski DM, Ahn H, et al. Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization[J]. *Prostate*, 1996, 28 (2): 89-97.
- [9] Nakhla AM, Khan MS, Romas NP, et al. Estradiol causes the rapid accumulation of cAMP in human prostate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5402-5.
- [10] Katz AE, Benson MC, Wise GJ, et al. Gene activity during the early phase of androgen-stimulated rat prostate regrowth[J]. *Cancer Res*, 1989, 49: 5889-97.
- [11] Roberts AB, Kim SJ, Noma T, et al. Multiple forms of TGF-beta: distinct promoters and differential expression[J]. *Ciba Found Symp*, 1991, 157(7-15): 15-28.
- [12] Vander TL, Schaart G, Timmer ED, et al. Smoothelin, a novel cyto-skeletal protein specific for smooth muscle cells[J]. *J Cell Biol*, 1996, 134: 401-11.
- [13] Bang YJ, Kim SJ, Danielpour D, et al. Cyclic AMP induces transforming growth factor beta2 gene expression and growth arrest in the human androgen-independent prostate carcinoma cell line PC-3 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(8): 3556-60.

参考文献:

- [1] Hodes L, Ding VD, Kemp RK, et al. Estradiol causes a dose-dependent stimulation of prostate growth in castrated beagle dogs[J]. *Prostate*, 2000, 44: 8-18.
 - [2] Collins AT, Zhiming B, Gilmore K, et al. Androgen and oestrogen responsiveness of stromal cells derived from the human hyperplastic prostate: oestrogen regulation of the androgen receptor[J]. *J Endocrin*, 1994, 143: 269-77.
 - [3] Zhang J, Hess MW, Thurnher M, et al. Human prostatic smooth muscle cell in culture: estradiol enhances expression of smooth muscle cell-specific marker[J]. *Prostate*, 1997, 30: 117-129.
 - [4] Krieg M, Nass R, Tunn S, et al. Effect of aging on endogenous level of 5 α -dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 77: 375- 81.
 - [5] Boehm S, Nirnberger G, Ferrari P. Estrogen suppression as a pharmacotherapeutic strategy in the medical treatment of benign prostatic hyperplasia: evidence for its efficacy from studies with meparttricin[J]. *Wien Klin Wochenschr*, 1998, 110(23): 817-23.
 - [6] Mori H, Maki M, Oishi K, et al. Increased expression of gene for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor type β 2 in human benign prostatic hyperplasia[J]. *Prostate*, 1990, 16: 71-80.
 - [7] Peehl DM, Sellers RG. Induction of smooth muscle cell phenotype in cultured human prostatic stromal cells[J]. *Exp Cell Res*, 1997, 232(2): 208-15.
 - [8] Kassen A, Sutkowski DM, Ahn H, et al. Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization[J]. *Prostate*, 1996, 28 (2): 89-97.
 - [9] Nakhla AM, Khan MS, Romas NP, et al. Estradiol causes the rapid accumulation of cAMP in human prostate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5402-5.
 - [10] Katz AE, Benson MC, Wise GJ, et al. Gene activity during the early phase of androgen-stimulated rat prostate regrowth[J]. *Cancer Res*, 1989, 49: 5889-97.
 - [11] Roberts AB, Kim SJ, Noma T, et al. Multiple forms of TGF-beta: distinct promoters and differential expression[J]. *Ciba Found Symp*, 1991, 157(7-15): 15-28.
 - [12] Vander TL, Schaart G, Timmer ED, et al. Smoothelin, a novel cyto-skeletal protein specific for smooth muscle cells[J]. *J Cell Biol*, 1996, 134: 401-11.
 - [13] Bang YJ, Kim SJ, Danielpour D, et al. Cyclic AMP induces transforming growth factor beta2 gene expression and growth arrest in the human androgen-independent prostate carcinoma cell line PC-3 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(8): 3556-60.
-

