

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

唐伟<sup>1</sup>, 郑少斌<sup>1</sup>, 张进华<sup>2</sup> (第一军医大学<sup>1</sup>南方医院泌尿外科, <sup>2</sup>肿瘤研究所, 广东广州 510515)

**摘要:** 目的 研究雄激素和雌激素对培养的人前列腺间质细胞碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和转化生长因子 (TGF- $\beta$ 2) 表达的影响。方法 本实验培养出 11 株良性前列腺增生症 (BPH) 病人前列腺间质细胞, 并给予双氢睾酮 (DHT) 和雌二醇 ( $E_2$ ) 刺激, 通过 RT-PCR 法观察 bFGF 和 TGF- $\beta$ 2 的 mRNA 表达, 同时观察了平滑肌细胞分化特异性抗原 (smoothelin) 的 mRNA 表达。结果 DHT 能明显上调 bFGF 表达,  $E_2$  能明显上调 TGF- $\beta$ 2 和 smoothelin 表达, 且 TGF- $\beta$ 2 和 smoothelin 表达量成正相关。结论 DHT 能诱导 bFGF 表达,  $E_2$  能诱导 TGF- $\beta$ 2 表达。  $E_2$  诱导向平滑肌的细胞转化可能与 TGF- $\beta$ 2 有关。

**关键词:** 人类前列腺间质细胞; 雄激素; 雌激素; 碱性成纤维细胞生长因子; 转化生长因子; 平滑肌细胞分化特异性抗原

中图分类号: Q756 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2002)01-0013-04

Effects of androgen and estrogen on the expressions of basic fibroblast growth factor transforming growth factor and smoothelin

TANG Wei, ZHENG Shao-bin<sup>1</sup>, ZHANG Jin-hua<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, Nanfang Hospital<sup>1</sup>, Institute of Tumors<sup>2</sup>, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract** Objective To study effects of androgen and estrogen on the expressions of basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) in cultured human prostatic stromal cells. Methods Human prostatic stromal cells obtained from 11 patients with benign prostatic hypertrophy (BPH) were cultured and stimulated with dihydrotestosterone (DHT) and estradiol ( $E_2$ ). The expressions of bFGF and TGF- $\beta$ 2 mRNA along with smoothelin mRNA were observed with reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Results DHT significantly upregulated bFGF expression, and  $E_2$  enhanced TGF- $\beta$ 2 and smoothelin expressions. A positive correlation between expressions of TGF- $\beta$ 2 and smoothelin was observed. Conclusion DHT can induce bFGF expression and  $E_2$  promotes TGF- $\beta$ 2 expression, and the transformation toward smooth muscle cells induced by  $E_2$  may involve the action of TGF- $\beta$ 2.

**Key words** human prostatic stromal cells; androgen; estrogen; basic fibroblast growth factor; transforming growth factor- $\beta$ 2; smoothelin

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<sup>[1]</sup>, 细胞实验中 Et 能促进间质细胞增殖并向平滑肌表型转化<sup>[2,3]</sup>。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<sup>[4]</sup>, 抗 Et 药物治疗 BPH 也取得

了良好疗效<sup>[5]</sup>。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物质, 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<sup>[6]</sup>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- $\beta$ 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<sup>[2]</sup>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- $\beta$ 2 能刺激前列腺间质细胞增殖并向平滑肌细胞分化<sup>[7]</sup>, 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- $\beta$ 2 表达的影响,

收稿日期: 2001-08-02

基金项目: 广东省自然科学基金 (980904)

作者简介: 唐伟 (1972-), 男, 重庆人, 2001 年毕业于第一军医大学, 硕士, 主治医师, 电话 020-85141765

同时对细胞的平滑肌表型转化也进行了观察。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences of the primers

Primers	Sequence	Amplification length
bFGF		238bp
Sense	5'GTGTGTGCTAACCGTTACCT3'	
Antisense	5'GCTCTTAGCAGACATTGGAAG3'	
TGF 2		247bp
Sense	5'AAATGGATACACGAACCCAA3'	
Antisense	5'GCTGCATTTGCAAGACTTTAC3'	
Smoothelin		324bp
Sense	5'GGTCGAAGATGCTGCCCATCTT3'	
Antisense	5'ATGCTGCGGTGTGAACCATGT3'	
-actin		587bp
Sense	5'CCAAGCCAACCGCGAGAAGATGAC3'	
Antisense	5'AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC3'	

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12培养基、RPMI1640培养基、胰蛋白酶、RT-PCR试剂盒购自 GIBCO公司。小鼠抗人 vimentin 抗体、小鼠抗人 -平滑肌肌动蛋白抗体、小鼠抗人各类细胞角蛋白 (pancytokeratin) 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<sub>2</sub>) 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 1mm<sup>3</sup>, 1mg/ml 的 I 型胶原酶液消化 8~12h, 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, -平滑肌肌动蛋白阳性为平滑肌细胞, pancytokeratin 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<sup>5</sup>/瓶密度传代于 50cm<sup>2</sup>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<sup>-9</sup>mol/L 的 DHT; (3) E<sub>2</sub> 组: 1×10<sup>-9</sup>mol/L 的 E<sub>2</sub>; (4) DHT+E<sub>2</sub> 组: 1×10<sup>-9</sup>mol/L 的 DHT 和 1×10<sup>-9</sup>mol/L 的 E<sub>2</sub>。各组重复 5 瓶求均值。48h 后 RT-PCR 法观察 bFGF TGF 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, -actin 为内参物, 引物序列见表 1。Perkin Elmer480 型 PCR 仪设置: 50 逆转录 30min; 94 30s 55 50s 72 50s, 扩增 35 个循环。产物于 1.5% 琼脂糖凝胶 100 mV 电压下电泳。UVPIimagestore 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 / -actin 产物荧光度值。

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 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, E<sub>2</sub> 组的 TGF 2 和 smoothelin 表达量高于对照组, DHT+E<sub>2</sub> 组的 TGF 2 和 smoothelin 表达量低于 E<sub>2</sub> 组 (P<0.05); DHT 组与对照组的 TGF 2 和 smoothelin 表达量无显著性差异, E<sub>2</sub> 组与对照组的 bFGF 的表达量无显著性差异, DHT+E<sub>2</sub> 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 2 与 smoothelin 的表达量成正相关 (P<0.05), 见图 1。

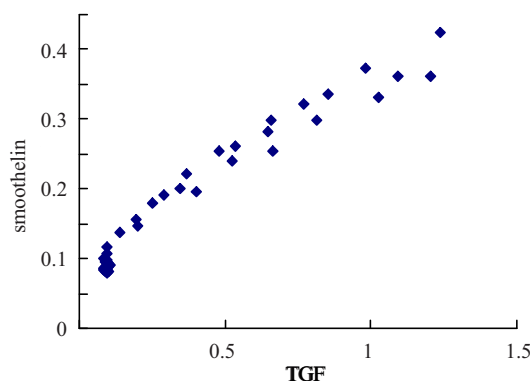


图 1 smoothelin 与 TGF 2 相对表达量的相关性 Fig.1 The correlation between the relative expressions of smoothelin and TGF 2

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。

表 2 各组各株细胞 bFGF、TGF- $\beta$ 2、smoothelin 的相对表达量  
Tab.2 Relative expression levels of bFGF、TGF- $\beta$ 2 and smoothelin in different cell lines and in different groups

Cell line	Group											
	Control			DHT			E <sub>2</sub>			DHT+E <sub>2</sub>		
	bF	T-2	sm	bF	T-2	sm	bF	T-2	sm	bF	T-2	sm
1	0.0646	0.0887	0.0808	0.4087*	0.0925	0.0821	0.0672	0.7673*	0.3213*	0.3994	0.6562	0.2980
2	0.0673	0.0956	0.0985	0.4883*	0.0997	0.0889	0.0691	0.6451*	0.2813*	0.4615	0.5255	0.2409
3	0.0855	0.1082	0.0908	0.2744*	0.0976	0.0933	0.0813	0.9816*	0.3737*	0.2620	0.8511	0.3363
4	0.0768	0.0969	0.1161	0.5256*	0.0947	0.0787	0.0768	0.4783*	0.2553*	0.5491	0.3688	0.2208
5	0.0671	0.0833	0.0993	0.4543*	0.0858	0.0844	0.0736	0.3432*	0.2002*	0.4776	0.2486	0.1806
6	0.0762	0.0999	0.0825	0.3369*	0.0946	0.0876	0.0814	1.2403*	0.4234*	0.3436	1.0916	0.3624
7	0.0836	0.0893	0.0956	0.4568*	0.0927	0.0845	0.0783	0.2882*	0.1908*	0.4911	0.2025	0.1478
8	0.0665	0.0906	0.0889	0.4988*	0.0944	0.0836	0.0701	0.5360*	0.2622*	0.4692	0.4042	0.1956
9	0.0545	0.0964	0.0959	0.3686*	0.0944	0.0903	0.0555	1.2033*	0.3612*	0.3763	1.0272	0.3307
10	0.0633	0.0856	0.0863	0.3076*	0.0937	0.1079	0.0619	0.8121*	0.2993*	0.3107	0.6615	0.2536
11	0.0711	0.0925	0.0876	0.4737*	0.0943	0.0923	0.0682	0.1946*	0.1554*	0.4935	0.1396	0.1384

\*P<0.05 vs controlgroup;#P<0.05 vsE<sub>2</sub> group;bF:bFGF;T-2:TGF- $\beta$ 2;Sm:smoothelin

Collins 等<sup>[2]</sup>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形成复合物,此复合物是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形成复合物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<sub>2</sub>能结合间质细胞膜上的SHBG导致胞内cAMP增高8倍<sup>[9]</sup>。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- $\beta$ 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- $\beta$ 1表达明显增高,给予外源性Ad后TGF- $\beta$ 1表达受抑制,说明TGF- $\beta$ 1表达受Ad负调控。Katz等<sup>[10]</sup>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- $\beta$ 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- $\beta$ 家族在哺乳动物有TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 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<sup>[11]</sup>。人类前列腺中TGF- $\beta$ 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方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24h有生长因子表达增高,3d开始有细胞增殖。因此,本实验在性激素刺激后48h观察细胞生长因子的表达不受细胞数增加的影响。DHT和E<sub>2</sub>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<sup>[12]</sup>。

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- $\beta$ 2 表达不受其影响。E<sub>2</sub> 能上调细胞的 TGF- $\beta$ 2 表达, bFGF 表达不受其影响。DHT 和 E<sub>2</sub> 合用时 DHT 诱导的 bFGF 表达不受 E<sub>2</sub> 影响, 而 E<sub>2</sub> 诱导的 TGF- $\beta$ 2 和 smoothelin 表达都受到 DHT 限制。DHT 对 E<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 但不能增高胞内 cAMP<sup>[9]</sup>。Mori<sup>[6]</sup> 发现 BPH 组织中 TGF- $\beta$ 2 表达高于正常前列腺, 而 TGF- $\beta$ 1 表达与正常前列腺并无增高, 其原因是 TGF- $\beta$  三种亚型的表达调节有所不同。E<sub>2</sub> 能诱导 TGF- $\beta$ 2 表达增高而不影响 TGF- $\beta$ 1 和 TGF- $\beta$ 3 表达, 这与 Et-SHBG-cAMP 系统有关。TGF- $\beta$ 2 表达受 cAMP 诱导, TGF- $\beta$ 1 和 TGF- $\beta$ 3 表达不受 cAMP 影响<sup>[11,13]</sup>。另外, 实验中发现 smoothelin 表达量与 TGF- $\beta$ 2 表达量呈正相关, 提示 E<sub>2</sub> 诱导细胞向平滑肌细胞表型转化可能与 TGF- $\beta$ 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<sub>2</sub> 能诱导 TGF- $\beta$ 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, 而且可能对药物治疗 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 Endocrinol*, 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-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 the 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 2 in human benign prostatic hyperplasia [J]. *Prostate*, 1990, 16: 71-80.
- [7] Peeh IDM, 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 cytoskeletal 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 beta 2 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.

#### 医学论文写作计量单位应用的要求

按照国务院 1984 年 2 月颁布的《中华人民共和国法定计量单位》和 1991 年中华医学会编辑出版的《法定计量单位在医学上的应用》, 贯彻国家标准 GB3100-3102-193《量和单位的规定》, 正确使用、书写量和单位的名称和符号, 如浓度单位用 mol/L, 不再用 M; 放射性活度单位要换算成 Bq, 不用 Ci 等; 相对分子质量不再使用 dalton 和 Kd, 而要用 M<sub>r</sub>, 单位符号中表示相除的斜线不得多于 1 条, 也不可混用斜线和负指数幂, 即不能用 ng/kg·min, 可用 ng/(kg·min), 也不可混用 ng/kg·min<sup>-1</sup> 的形式。不能错把英文缩写 cpm, ppb, ppm, ppt, rpm 等作为计量单位使用。血压单位仍可使用 mmHg, 但在文中第 1 次出现时应注明与 kPa (千帕斯卡) 的换算系数, 中文用 kPa, 英文摘要用 mmHg。