



睾丸酮对大鼠前列腺上皮细胞有丝分裂方向的影响

刘向云^{1,2}, 桂博¹, 潘琦¹, 许丽¹, 孙祖越¹

(1. 上海市计划生育科学研究所, 上海 200032; 2. 上海体育学院, 上海 200438)

【摘要】 目的 探讨丙酸睾丸酮(T)对大鼠前列腺上皮细胞染色体有丝分裂方向的影响及其差异基因表达。方法 SPF级SD雄性大鼠(110~130 g)20只,随机分为2组。深麻醉下对所有大鼠进行去势手术,恢复一周后,给药组大鼠皮下注射T,每只0.5 mg,每日1次,连续30d;对照组大鼠皮下注射橄榄油0.1 mL。取前列腺。通过免疫组化、HE染色观察结果。并做基因芯片检查差异基因表达谱。**结果** 给药组大鼠前列腺发生形态学增生。前列腺腺腔扩张,腺上皮高度明显增高,前列腺增生。且前列腺上皮细胞染色体有丝分裂的方向与基底膜平行,而对对照组前列腺上皮细胞有丝分裂的方向与基底膜垂直。AR免疫组化染色后发现给药组的前列腺上皮中,均可见到AR标记的阳性细胞,而对对照组均为阴性。基因芯片和RT-PCR结果:促进细胞增殖的基因如雄激素受体相关蛋白(RAN)、TGM4和Wnt通道的WNT2等基因均上调,而抑制细胞增殖的基因如负调控Wnt通道的DKK3和促进细胞凋亡的Fas等基因下调。**结论** T注射后改变了前列腺上皮细胞有丝分裂的方向,Wnt和AR信号转导通路参与了细胞增殖和有丝分裂方向改变。

【关键词】 有丝分裂方向;丙酸睾丸酮;前列腺;差异基因表达

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0071-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.016

Effect of testosterone on mitotic orientation in rat prostate epithelial cells

LIU Xiang-yun^{1,2}, GUI Bo¹, PAN Qi¹, XU Li¹, SUN Zu-yue¹

(1. Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032, China;

2. Shanghai University of Sport, Shanghai 200438)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of testosterone on mitotic orientation in rat prostate epithelial cells and the relative differential gene expression. **Methods** Twenty SPF male SD rats were divided into 2 groups at random and then subjected to castration. One group of rats was administrated with testosterone 3.7 mg daily for 30 days and the control group was only injected with olive oil. Microscopic analysis was performed using immunohistochemistry. Differential gene expression analysis was conducted by gene microarray and RT-PCR techniques. **Results** In the testosterone-administrated group, there was a significant mitosis orientation parallel to the basement membrane. But in the control group, mitosis orientation was oriented perpendicular to the basement membrane. Using the gene microarray and RT-PCR techniques, the cell proliferation genes such as Ran, Tgm4 and Wnt2 in Wnt signal pathway were up-regulated in the testosterone group. Conversely, suppressor cell proliferation genes such as Dkk3 and Fas were down-regulated. **Conclusions** Mitotic orientation of prostate epithelia cells is changed after testosterone administration. Wnt signal pathway and AR signaling pathway also have an influence on the mitosis orientation and cell proliferation.

【Key words】 Mitosis orientation; Testosterone propionate; Prostate; Differential gene expression; Rat; Testis

我国已步入老龄化社会,《中国人口和就业统计年鉴—2011》资料显示,2010年全国65岁及以上的老年人达11894万人,占总人口的8.9%,估计到

2025年我国老年人口比例将占全国人口20%左右。前列腺增生在老年男性中的发病率非常高,达到50%以上^[1]。众所周知睾丸酮在男性前列腺增生

[作者简介]刘向云(1976-),女,博士,主要从事药物的生殖药理学和毒性病理学研究。电话:021-51253316;Email:h6yf@163.com

[通讯作者]孙祖越,教授,博士生导师,主要从事药物的生殖药理学和毒性病理学研究。电话:021-64229909;Email:sunzy64@163.com

性疾病中发挥着重要作用,但是其引发前列腺增生的机制还不是十分清楚。细胞增殖和染色体有丝分裂不开,曾有研究发现雌激素可以改变大鼠子宫细胞染色体有丝分裂的方向^[2],本研究将从雄性动物着手,观察睾丸酮对前列腺细胞染色体有丝分裂方向的改变并初步探索其发生机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 20 只,110 ~ 130 g,4 ~ 5 周龄,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2008-0016】。动物饲养在上海市计划生育科学研究所 SPF 级动物房内【SYXK(沪)2008-0027】,饲养于 400 mm × 350 mm × 200 mm 塑料笼内,每笼饲养同性大鼠 5 只,自由饮水、摄食。室温 20 ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 70%,光照 12 h,黑暗 12 h。随机分为两组,对照组和给药组,每组各 10 只。在实验前,所有大鼠在深麻醉下去势。

1.2 材料

Rabbit anti-adrogen receptor: 单克隆抗体,购自福州迈新生物技术有限公司,批号:BA0004;规格:0.2 mL(200 μg/mL);DAB 显色试剂盒:福州迈新生物技术有限公司,批号:050324;多聚赖氨酸:Sigma 公司生产,华美生物工程有限公司分装,批号:ISP8920;丙酸睾丸酮(testosterone propionate)(批号:010504,华联制药公司)。

1.3 动物分组及造模

采用 SD 大鼠实验,随机分成对照组和实验组,以 1.0% 的氯胺酮作 50 ~ 100 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,将大鼠四肢及头部固定于手术板上,腹部碘伏消毒后,从尿道上端约 1 cm 处正中切开皮肤约 1 cm,逐层分离进入腹腔,沿脂肪找到睾丸,结扎系膜血管,切除双侧睾丸和附睾,关腹。消毒、对皮。术后肌注庆大霉素每只 0.1 mL,预防感染。恢复一周后,开始给药,对照组注射橄榄油每只 0.1 mL,给药组注射丙酸睾丸酮(每只 0.5 mg)0.1 mL^[3],均给药一个月(30d)。每天皮下注药一次,每周根据动物体重变化调整给药剂量。于最后一次给药后 24 h 取血、处死、取材。测量前列腺体积、湿重、计算前列腺系数。

1.4 取血和取材

在深麻醉下,打开腹腔,经腹主动脉取血,离心,取上层血清,-20℃保存待测。立即取出前列腺、称

重和测量体积,固定于甲醛中。

1.5 病理制片和免疫组化

前列腺组织固定并制成蜡块。制作 5 μm 石蜡切片用于铁苏木素染色。并购买雄激素受体(AR)免疫组化试剂盒,按照说明进行染色。二甲苯脱蜡 3 次,每次 10 s;无水乙醇洗去二甲苯两次,每次 5 s;依次酒精浓度从高到低梯度水化,微波修复抗原后,加一抗(1:50),孵育 1 h(37℃)二抗孵育 20 min(37℃)DAB 显色后终止反应,苏木素复染后,在显微镜下观察。

1.6 基因芯片检测

采用大鼠全基因组芯片对两组大鼠基因进行检测,把大鼠前列腺 RAN 提出,按照组别分别把各组所有的 RNA 混合后检测。检测仪器和软件:GeneChip Scanner 3000;Affymetix;GeneChip operating software: Affymetix。

1.7 实时定量 PCR 检测

使用样品 RNA 进行 cDNA 合成后,制备用于绘制标准曲线的梯度稀释 DNA 模板,进行实时定量 PCR 检测。

1.8 统计方法

以 SPSS 11.5 统计分析软件包对实验数据进行整理和分析。用单因素方差分析进行多组均数比较,再用最小显著差数法(LSD 法)进行两两比较,以检测哪几对均数间的差别有显著意义。

RT-PCR 结果分析方法:各样品的目的基因和管家基因分别进行 real-time PCR 反应。根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线,各样品目的基因和管家基因的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度,即为此样品此基因的校正后的相对含量。

2 结果

2.1 大鼠前列腺标本铁苏木素染色

正如我们预期结果,对照组大鼠前列腺发生形态学萎缩,注射睾丸酮(T)导致前列腺细胞增殖活跃,且前列腺上皮细胞有丝分裂的方向与基底膜平行(染色体有丝分裂方向与基底膜夹角在 0 ~ 45°,见图 1),但是对照组前列腺上皮细胞有丝分裂的方向与基底膜垂直(染色体有丝分裂方向与基底膜夹角在 45° ~ 90°,图 1)。T 的注射导致前列腺上皮细胞有丝分裂方向发生了改变。T 注射后与基底膜平行的前列腺上皮细胞数分别为 7.9%。图 1 见封底。

2.2 雄激素对前列腺雄激素受体表达的影响

T 给药组,经雄激素受体(AR)免疫组化染色观察,给药组均有 AR 阳性表达,腺细胞核内可见大量亮黄褐色颗粒,为 AR 表达(见图 2,封底),而对照组 AR 无明显表达。

2.3 大鼠基因芯片结果

基因芯片检测到一些促进细胞增殖的基因如雄激素受体相关蛋白(RAN)、细胞周期调节因子(ODC1)和 Wnt 通道的 Wnt2 等基因均上调,而抑制细胞增殖的基因如负调控 Wnt 通道的 DKK3 和促进细胞凋亡的 FAS 等基因下调(见表 1)。

2.4 实时定量 PCR 结果

实时定量 PCR 时各样品加样量均为 1 μ L,然而由于受 RNA 浓度定量误差和 RNA 逆转录效率误差等的影响,每个样品的 1 μ L 体积的 cDNA 其含量并不完全相同,为校正此差异,我们使用管家基因 β -actin(不同样品间表达量基本恒定)作为内参,以样品待测基因的值除以该样品内参的值,最终得到的比值为样

表 2 RT-PCR 基因相对表达量

Tab.2 Level of gene expression assessed by RT-PCR

| 样品编号 | β -actin | DKK3 | RAN | FAS | TGM4 | WNT2 |
|------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 对照 | 1.95E-03 | 2.93E-04 | 1.07E-04 | 9.47E-04 | 1.09E-04 | 1.24E-03 |
| TP | 2.66E-03 | 1.18E-05 | 2.37E-04 | 8.85E-06 | 2.46E-03 | 1.44E-04 |

3 讨论

长期暴露于 T,前列腺上皮细胞有丝分裂的方向发生改变,提示我们可以从新的角度研究 T 促进前列腺的增殖作用^[4]。从铁苏木素染色和 AR 免疫组化结果,可以看出前列腺是 T 的靶器官,长期暴露于 T,引起前列腺细胞增殖和细胞有丝分裂方向的改变。由于对照组的前列腺上皮细胞未见明显的细胞增殖和有丝分裂方向与前列腺基底膜平行现象,所以这一现象的机制可能和雄激素受体信号转导通路相关。WNT 信号转导通路是近二、三十年发现的信号分子家族,它在许多增生性疾病的发生和发展过程中,发挥着重要作用^[5,6]。这一现象也可能和 WNT 信号转导通路相关^[7,8]。

据此,我们对 28,000 多个大鼠基因进行了分析,并通过 RT-PCR 试验进行验证。证实 WNT 信号转导通路和 AR 激素受体信号转导通路,参与了雄激素对前列腺上皮细胞的有丝分裂的影响。与对照组相比,本实验暴露于 T 的大鼠,WNT2 等正调控基因上调,而 DKK3 等负调控基因下调。DKK 通过结合及激动 LRP5/6 受体,以及促进溶酶体对它们的

品的待测基因相对含量(见表 2 和图 3,图 3 见封底)。

表 1 T 组与对照组差异基因表达

Tab.1 Differential gene expression between the T and control groups

| Probe ID | 基因名称 Gene names | 基因功能 Gene functions | 变化方向 Direction of changes |
|------------|--------------------|------------------------|------------------------------|
| 1367590_at | RAN | 雄激素受体相关蛋白 | 上调 |
| 1367734_at | AKR1B1 | 前列腺癌相关基因 | 上调 |
| 1370163_at | ODC1 | 细胞周期调节 | 上调 |
| 1370235_at | DBI | GABA 受体调制因子 | 上调 |
| 1371022_at | TGM4 | 前列腺癌相关基因 | 上调 |
| 1371150_at | CCND1 | 细胞周期调节 | 上调 |
| 1382599_at | IGF1 | 正调控细胞增殖 | 上调 |
| 1393927_at | WNT2 | 信号转导因子 | 上调 |
| 1398750_at | CALR | 调控转录 | 上调 |
| 1368394_at | SFRP4 | 前列腺癌侵袭基因 | 下调 |
| 1368785_at | PITX2 | 转录调节因子 | 下调 |
| 1369788_at | JUN | 转录调节因子 | 下调 |
| 1370328_at | DKK3 | 负调控 Wnt 信号通路 | 下调 |
| 1370816_at | NR1D1 | 转移因子 DNA 结合蛋白 | 下调 |
| 1378682_at | EP300 | 转录调节因子 | 下调 |
| 1390127_at | DIXDC1 | 信号转导因子 | 下调 |
| 1397221_at | FAS | 细胞凋亡 | 下调 |

细胞内摄作用,而抑制 Wnt 通道的^[9,10]。目前对 DKK 家族了解较少,尤其是 DKK-3。有研究证明前列腺癌细胞中缺少 DKK-3 基因^[11],其表达量增加可以抑制肿瘤的发展^[12]。但对其在良性前列腺增生中的作用,研究罕见。本实验发现,给予去势大鼠 T,DKK-3 的表达较对照组下调。而 T 亦是诱发良性前列腺增生模型的药物^[13]。由此可见,DKK-3 基因下调致使抑制细胞增生和分化的作用下降,也可以导致前列腺细胞良性增生^[14]。WNT2 参与经典 WNT 信号转导通路刺激细胞增殖,参与调节成纤维

细胞和上皮细胞的衰老过程,在衰老细胞中可以检测到 WNT2 依赖信号下调^[15]。由于 WNT2 的高表达刺激前列腺上皮细胞核分裂增多,激发 WNT 信号通路,改变前列腺上皮细胞极性^[7],可能从此途径造成前列腺上皮细胞染色体的改变。

而 AR 受体是重要的基因调节蛋白,它是细胞内雄激素通路的重要中间体^[16]。长期慢性的雄激素刺激可以促进分泌性上皮细胞表达出 AR 受体。而存在于前列腺上皮基底细胞的亚型被认为是表达干细胞,干细胞衰老和损伤的分子机制是老年性疾病(如 BPH 和肿瘤等)的重要诱发原因^[17]。前列腺

基底细胞不依赖雄激素存活,而雄激素存在时引发其增殖和分化^[18],是引发前列腺细胞增殖的机制之一。*TGM4* 是 AR 信号转导通路的基因之一,其在正常和异常前列腺中均有表达,很多研究均把 *TGM4* 作为前列腺上皮细胞特征性标志物的候选标志物^[19]。T 组大鼠前列腺组织 *TGM4* 上调,促进了前列腺细胞的增殖。本实验 T 给药组 *FAS* 基因下调,抗细胞凋亡能力下降^[20],细胞凋亡减少,可致前列腺细胞发生增殖。*RAN* 是 *RAS* 家族的成员,参与雄激素信号转导途径,正调控 DNA 转录。对 *RAN* 和前列腺癌的关系研究较多,但是对它和前列腺良性增生的关系研究甚少。在本实验中经 RT-PCR 验证,*RAN* 基因较对照组上调,它在 BPH 中也参与了细胞的增殖过程。*AR* 在正常和异常前列腺中均发挥着重要作用,*AR* 受激素与受体结合后共同调节,许多共同调节点和 *RAS* 家族有关。最近有研究发现 *RAS* 反应成分结合蛋白(*RREB-1*)是 *AR* 的配体和共同调节体可以抑制 *AR* 功能。*RAS/MAPK* 激酶通路可以对抗 *RREB-1* 对雄激素信号转导通路的抑制作用^[21],*RAN* 作为 *RAS* 的一员参与了这一过程,从而促进前列腺细胞增殖。此外,*Ran* 还参与有丝分裂纺锤丝组织和生物发生,可能通过该机制改变了前列腺上皮细胞的有丝分裂方向。*Krüppel-like5* 因子在 *RAS* 介导的转化中,通过激活细胞周期调节蛋白 *B1/Cdc2* 复合物,从而促进了细胞的有丝分裂^[22]。

T 可以改变前列腺上皮细胞的染色体有丝分裂的方向。*WNT* 和 *AR* 信号转导通路参与了这一过程,*Krüppel-like5* 因子在这一现象中的作用,仍需继续深入研究。

(本文图 1~3 见封底)。

参 考 文 献

- [1] Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, et al. The development of human benign prostatic hyperplasia with age [J]. *J Urol*, 1984, 132:474-479.
- [2] Gunin AG. Estrogen changes mitosis orientation in the uterine epithelia cells [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001, 97:85-89.
- [3] 刘向云, 邱晓燕, 吴建辉, 等. 雌/雄激素比例对去势大鼠前列腺体积及其脏器系数的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(2):40-44.
- [4] Liu XY, Li DM, Zhang XF, et al. Mitosis orientation in the prostate epithelia cells by endocrine effect [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(1):226-230.
- [5] Liu XY, Xu YW, Xie CJ, et al. Possible mechanism of benign prostatic hyperplasia induced by androgen-estrogen ratios in castrated rats [J]. *Indian J Pharmacol*, 2010, 42(5):312-317.
- [6] Johan H, Anders S., Jan-Åke G. Current concepts and significance of estrogen receptor β in prostate cancer [J]. *Steroids*, 2012, 77:1262-1266.
- [7] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20:781-810.
- [8] Polakis P. Wnt signaling and cancer [J]. *Genes*, 2000, 14:781-810.
- [9] Zitanski N, Ackermann F, Borth H, et al. Cell signalling [J]. *Eur J Cell Biol*, 2010, 89(Suppl 1):1-S2-1.
- [10] Levasseur R, Lacombe D, de Vernejoul MC. LRP5 mutations in osteoporosis-pseudoglioma syndrome and high-bone-mass disorders [J]. *Joint Bone Spine*, 2005, 72:207-214.
- [11] Davidson G, Mao B, del Barco Barantes I, et al. Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning [J]. *Development*, 2002, 129(24):5587-5596.
- [12] Fernando A, Masakiyo S, Mikiro T, et al. Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-Kinase [J]. *Cancer Res*, 2005, 65:9617-9622.
- [13] Hsieh SY, Hsieh PS, Chiu CT, et al. Dickkopf-3/REIC functions as a suppressor gene of tumor growth [J]. *Oncogene*, 2004, 23:9183-9189.
- [14] Kawano Y, Kitaoka M, Hamada Y, et al. Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3 [J]. *Oncogene*, 2006, 25:6528-6537.
- [15] Ye XF, Zerlanko B, Kennedy A, et al. Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells [J]. *Mol Cell*, 2007, 27:183-196.
- [16] Gao WQ. Androgen receptor as a therapeutic target [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2010, 62(13):1277-1284.
- [17] Chatterjee B. The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003(1-2):253:89-101.
- [18] Beltrami AP1, Cesselli D, Beltrami CA. At the stem of youth and health [J]. *Pharm Ther*, 2011, 129(1):3-20.
- [19] Isaacs JT, Coffey DS. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia [J]. *Prostate*, 1989, 15(suppl 2):33-50.
- [20] Thielen JL, Volzing KG, Collier LS, et al. Markers of prostate region-specific epithelial identity define anatomical locations in the mouse prostate that are molecularly similar to human prostate cancers [J]. *Differentiation*, 2007, 75(1):49-61.
- [21] Matsumura Y, Tanaka N, Fujimoto K, et al. Phosphorylation status of the Fas-associated death domain-containing protein (FADD) is associated with the progression of prostate cancer [J]. *J Pathol*, 2005, 206(4):423-432.
- [22] Mukhopadhyay NK, Cinar B, Mukhopadhyay L, et al. The zinc finger protein Ras-responsive element binding protein-1 is a coregulator of the androgen receptor: Implications for the role of the Ras pathway in enhancing androgenic signaling in prostate cancer [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21:2056-2070.