

NGF 和 CgA 对 RWPE-1 细胞内钙离子浓度变化的影响及其在慢性前列腺炎中的作用

丁华洋¹ 樊松^{1,2} 张力^{1,2} 郝宗耀^{1,2} 周骏^{1,2} 张翼飞^{1,2} 梁朝朝^{1,2}

摘要 目的 探讨神经生长因子(NGF)和嗜铬颗粒蛋白 A(CgA)处理后前列腺上皮细胞系 RWPE-1 细胞内钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的差异及 NGF 和 CgA 在慢性前列腺炎(CP)发病中的作用。方法 不同浓度的 NGF 和 CgA(50、200 ng/ml)刺激 RWPE-1 细胞,用激光共聚焦显微镜观察不同浓度的 NGF 和 CgA 刺激后细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 变化,加入 TRPV1 受体拮抗剂后继续观察细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 变化。然后将正常细胞外液换成 D-PBS,再加入 NGF 和 CgA 观察细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 变化。结果 50 ng/ml NGF 和 CgA 刺激细胞后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 未见明显变化。200 ng/ml NGF 和 CgA 刺激细胞后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显增加,加入 TRPV1 受体拮抗剂后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 未见明显变化。将正常细胞外液换成 D-PBS,用 NGF 和 CgA 刺激后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 未见明显改变。结论 CP 的发生可能是通过分泌和释放 NGF 和 CgA,引起前列腺上皮细胞膜 TRPV1 通道开放,促使细胞内钙离子浓度增加,导致前列腺上皮分泌功能下降所致。

2016-09-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81170698、81400757);安徽省自然科学基金(编号:1508085QH171);卫生部国家临床重点专科建设项目(2012)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,合肥 230022

²安徽医科大学泌尿外科研究所,合肥 230032

作者简介:丁华洋,男,硕士研究生;

梁朝朝,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: liang_chaozhao@163.com

关键词 前列腺炎;神经生长因子;嗜铬颗粒蛋白 A;RWPE-1 细胞;钙离子

中图分类号 R 697.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0173-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.005

慢性前列腺炎(chronic prostatitis, CP)是一种常见的泌尿系统疾病,多发生于青壮年男性,发病率为 4.5%~9.0%^[1]。然而,CP 的发病机制至今尚不清楚,治愈率低、复发率高,严重影响患者的身心健康。研究^[2-3]表明神经内分泌机制在 CP 的发生、发展中发挥重要作用以及神经内分泌细胞与 CP 的进展密切相关。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和嗜铬颗粒蛋白 A(chromogranin A, CgA)是神经内分泌细胞重要的标志蛋白,在炎症的发展中发挥重要作用^[4-5]。研究^[6]表明,瞬时受体电位通道亚型 1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)调控 NGF 所介导的相关级联反应。Zhu et al^[7]研究认为 NGF 灵敏地调控 TRPV1 的活动,但是介导此效应的机制尚未可知。细胞内钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)可能与 NGF 和 CgA 所介导的信号通路有关。因此,定量或者定性分析细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 可能对于研究 NGF 和 CgA 与 CP 的神经内分泌机制之间的关系提供有价值的信息。该实验使用 Ca^{2+}

in human gastric adenocarcinoma MGC80-3 cells. **Methods** Cell cycle arrest and intracellular reactive oxygen species(ROS) generation were detected by utilizing flow cytometry analysis after treatment with different concentrations of CsA on MGC80-3 cells. Morphological changes of apoptotic cells were observed under fluorescent microscope through acridine orange/ethidium bromide(AO/EB) staining method. Western blot was performed to measure Caspase-3 protein expression. **Results** Flow cytometry indicated that CsA could arrest the cell cycle in G0/G1 phase($F=48.21$, $P<0.05$, $P<0.01$) and significantly increased intracellular ROS content in a dose-dependent manner. Compared with the control group, the difference was statistically significant($F=90.24$, $P<0.01$). After being treated with CsA, AO/EB staining results showed that the cells of apoptosis were characterized by typical morphological changes such as swelling, shrinking and fragmentation. Western blot analysis also showed that CsA obviously increased the expression of Caspase-3 protein($P<0.01$). **Conclusion** CsA may inhibit proliferation of MGC80-3 cells by blocking cell growth cycle, and the mechanism of CsA induced apoptosis may be correlated with high levels of intracellular ROS generation and increasing expression of Caspase-3 protein.

Key words cyclosporin A; MGC80-3 cells; cell cycle; apoptosis; Caspase-3 protein

荧光探针 Fluo-3/AM 孵育后,在激光共聚焦显微镜下动态观察受 NGF 和 CgA 处理后 RWPE-1 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化;同时,通过加入 TRPV1 受体拮抗剂和无 Ca^{2+} 细胞外液(D-PBS)后观察 RWPE-1 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化,以期阐明其变化的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系及主要试剂 RWPE-1 细胞由上海细胞生物研究所提供;K-SFM 培养基、RPMI 1640 培养基、0.05% EDTA、胎牛血清(FBS)、D-PBS(不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 购自美国 Gibco 公司;NGF(20 μ g)、CgA(1 mg/ml) 购自以色列 ProSpec 公司;TRPV1 受体拮抗剂购自英国 Abcam 公司;Fluo-3/AM 购自美国 AAT Bioquest 公司;激光共聚焦专用培养皿购自美国 Thermo Fisher 公司;NaCl、KCl、 $NaHCO_3$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、Hepes、Glucose、DMSO 购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 实验仪器 Leica TCS SP5 激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司;VC3-8PX 加药系统购自美国 ALA 公司。

1.1.3 负载液配置 取适量 Fluo-3/AM 溶于 DM-SO 配成浓缩储存液(1 mmol/L), $-20^\circ C$ 低温避光保存。以 K-SFM 培养基将 Fluo-3/AM 稀释成 5 μ mol/L, 作为负载液。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养基成分是 K-SFM, 为无血清培养基。因此, RWPE-1 细胞在用 0.05% EDTA 消化 80% ~ 90% 后必须加入 5 ml RPMI 1640 + 10% FBS 终止胰酶消化, 且该细胞的消化时间较长, 一般约 5 ~ 6 min。置于 $37^\circ C$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 每 2 d 换液 1 次, 将生长 90% 汇合的细胞进行传代, 该过程约需 4 ~ 5 d。前 2 代细胞培养结果见图 1。

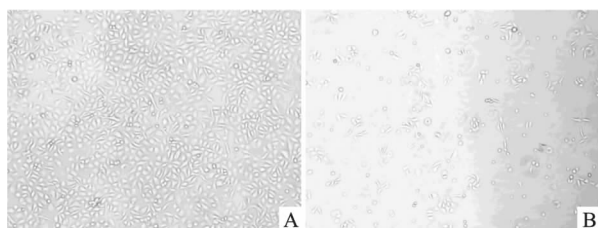


图1 前2代 RWPE-1 细胞培养结果 $\times 100$
A: 第1代 RWPE-1 细胞; B: 第2代 RWPE-1 细胞

1.2.2 荧光染色 将 RWPE-1 细胞以 2×10^5 接种

于共聚焦培养皿中, 待细胞铺满激光共聚焦专用培养皿底(约需 12 h), 用 PBS 漂洗 2 ~ 3 次, 往激光共聚焦专用培养皿中央凹槽中加入 100 μ l 含有 Fluo-3/AM 的负载液, $37^\circ C$ 孵育 45 min。吸取负载液后, 再用 PBS 漂洗 2 ~ 3 次。加 100 μ l 细胞外液, 待上机进行实验。

1.2.3 激光共聚焦显微镜系统 将进行荧光染色后的 RWPE-1 细胞转移到激光共聚焦显微镜上, 激发波长为 488 nm, 选择 128×128 像素采集二维图片, 每 1.314 s 扫描一帧。将配置好的正常细胞外液、不同浓度的 NGF、CgA(50、200 ng/ml, 用细胞外液配置) 和 TRPV1 受体拮抗剂(100 mmol/L, 用 DM-SO 配置) 以及 D-PBS 装入 VC3-8PX 加药系统。首先加入正常细胞外液, 观察细胞内 Ca^{2+} 荧光强度变化。然后, 分别加入不同浓度的 NGF、CgA(50、200 ng/ml) 刺激 RWPE-1 细胞, 继续观察细胞内 Ca^{2+} 荧光强度变化。最后, 在加入不同浓度的 NGF、CgA 的同时加入 TRPV1 受体拮抗剂, 观察细胞内 Ca^{2+} 荧光强度变化。接着, 将正常细胞外液换成 D-PBS(不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 进行实验, 再用不同浓度的 NGF、CgA 刺激 RWPE-1 细胞, 观察细胞内 Ca^{2+} 荧光强度变化。共计荧光成像 10 min, 所得图片应用 Lecia 激光共聚焦显微镜专用软件进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对 t 检验进行统计学检验。图表用 GraphPad Prism 5.0 生成。

2 结果

2.1 50 ng/ml NGF 和 CgA 对 RWPE-1 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 根据荧光强度图和 Intensity-t 曲线图可知, 在 50 ng/ml NGF 组中, 静息状态下荧光强度始终维持在平稳水平, 第 20 秒加入 NGF(50 ng/ml) 后, 荧光强度在 30 s 后稳定且缓慢地减弱。在 50 ng/ml CgA 组中, 静息状态下荧光强度也较平稳, 第 20 秒分别加入 CgA(50 ng/ml) 后, 仍维持在相对较稳定的水平, 在第 310 秒后荧光强度逐渐地平稳减弱。见图 2、3。

在 RWPE-1 细胞内, 两组比较, 与 10 s 和 100 s 时细胞内的荧光强度相比, 30 s 和 310 s 时荧光强度表达差异无统计学意义; 而 300 s 和 550 s 时荧光强度表达明显减弱, 差异有统计学意义($t = 4.742, P < 0.01$; $t = 12.343, P < 0.01$)。见表 1、图 4。

2.2 200 ng/ml NGF 和 CgA 对 RWPE-1 细胞内

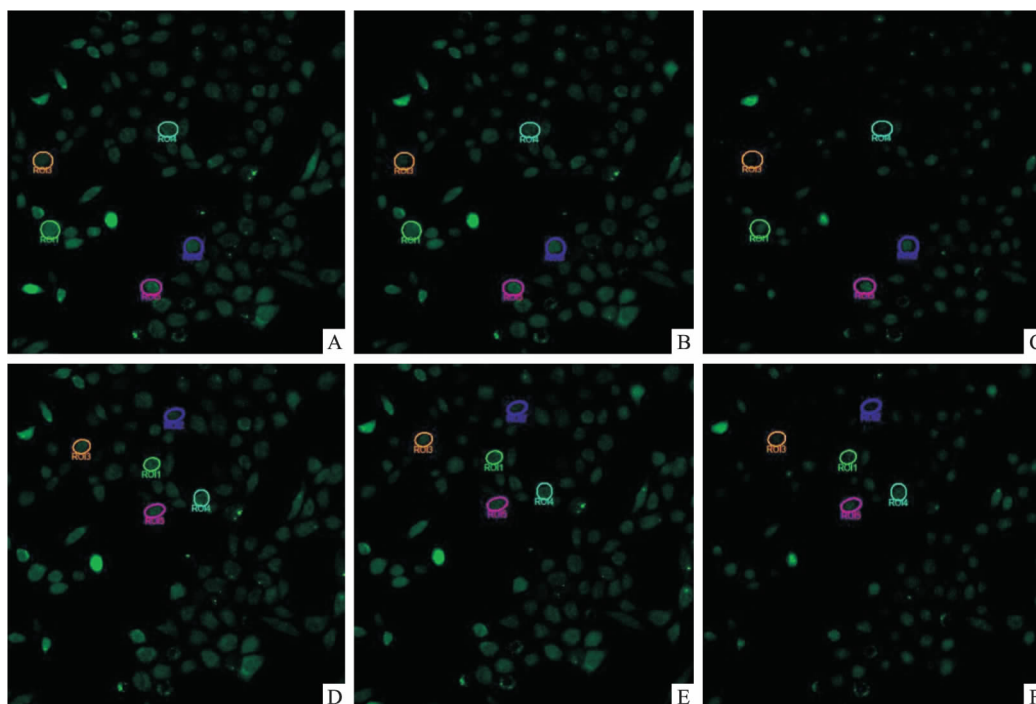


图2 RWPE-1 细胞内 Fluo-3/AM 荧光强度图像 ×400

A:10 s 50 ng/ml NGF; B:30 s 50 ng/ml NGF; C:300 s 50 ng/ml NGF; D:100 s 50 ng/ml CgA; E:310 s 50 ng/ml CgA; F:550 s 50 ng/ml CgA

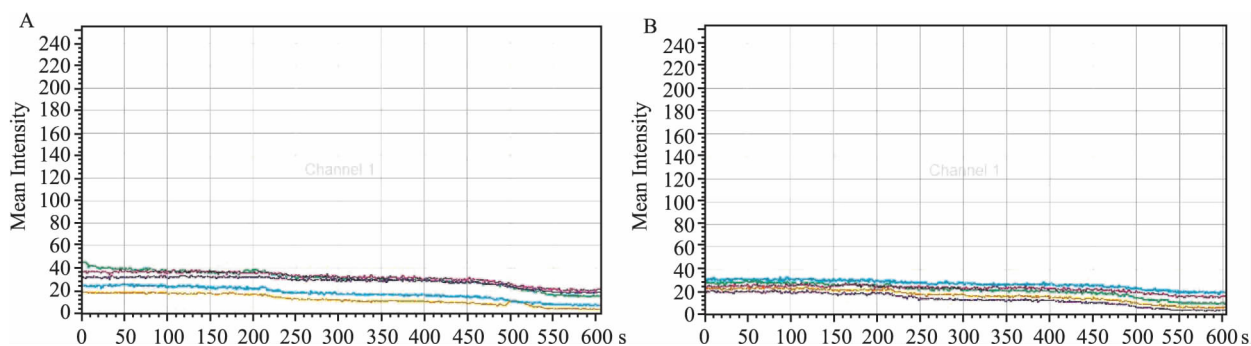


图3 RWPE-1 细胞内 Ca²⁺ 荧光强度随时间(Intensity-t) 变化的曲线

A:50 ng/ml NGF; B:50 ng/ml CgA

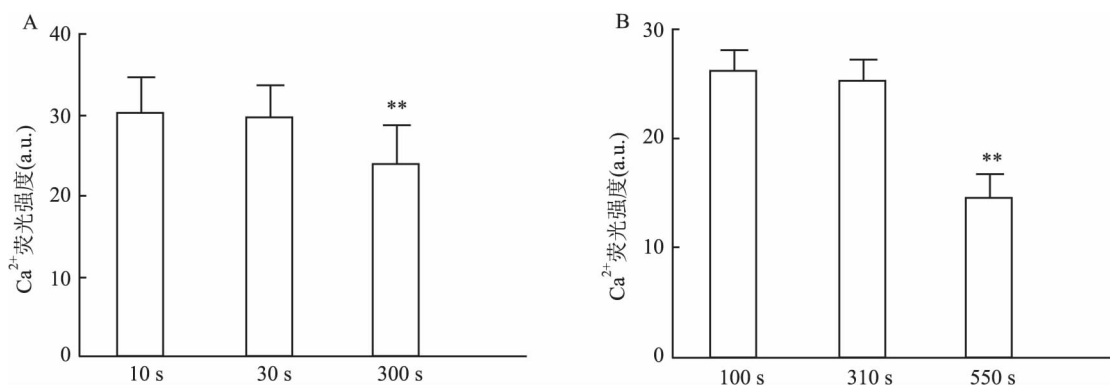


图4 RWPE-1 细胞内 Ca²⁺ 荧光强度在各时间段中表达情况

A:50 ng/ml NGF 与 10 s 比较: ** P < 0.01; B:50 ng/ml CgA 与 100 s 比较: ** P < 0.01

[Ca²⁺]_i 的影响

2.2.1 200 ng/ml NGF 对 RWPE-1 细胞内 [Ca²⁺]_i 变化的影响 根据荧光强度图和 Intensity-t 曲线图

可知 在正常细胞外液组中 潜伏期内(10 s) 荧光强度一直维持在平稳水平 第 20 秒加入 NGF(200 ng/ml) 后 , 荧光强度一过性地达到最大值 , 在第 30 秒

达到峰值水平(峰值期)后,细胞内荧光强度迅速减弱,且较刚开始静息状态荧光强度弱,在第50秒后荧光强度逐渐地平稳减弱。在TRPV1受体拮抗剂组和D-PBS组中,潜伏期(10 s)荧光强度一直维持

在平稳水平,第20秒分别加入TRPV1受体拮抗剂、NGF(200 ng/ml)及将正常细胞外液换成D-PBS后,未见明显峰值水平出现,且在第50秒后荧光强度逐渐地平稳减弱。见图5、6。

表1 不同浓度NGF和CgA刺激下RWPE-1细胞内Ca²⁺荧光强度变化(n=5, $\bar{x} \pm s$)

项目	50 ng/ml NGF	50 ng/ml CgA	200 ng/ml NGF			200 ng/ml CgA		
			正常细胞外液组	TRPV1受体拮抗剂组	D-PBS组	正常细胞外液组	TRPV1受体拮抗剂组	D-PBS组
潜伏期	30.03 ± 9.36	26.14 ± 4.38	58.38 ± 19.91	58.07 ± 19.76	58.51 ± 19.83	29.29 ± 5.68	28.52 ± 6.12	28.44 ± 6.09
峰值期	29.26 ± 8.86	25.11 ± 4.45	150.06 ± 21.48	56.37 ± 19.49	55.55 ± 19.13	133.82 ± 10.33	27.05 ± 6.51	26.89 ± 2.91
衰退期	23.69 ± 9.78	14.50 ± 4.91	24.94 ± 7.77	40.93 ± 16.19	39.97 ± 14.79	104.29 ± 13.39	25.77 ± 6.69	24.85 ± 6.41
t ₁ 值	2.440	2.58	-6.105	2.075	2.251	-38.627	2.483	2.460
t ₂ 值	4.742	12.343	2.816	8.256	6.803	-18.071	3.115	4.154
P ₁ 值	0.071	0.061	0.004	0.107	0.088	0.000	0.068	0.070
P ₂ 值	0.009	0.000	0.048	0.001	0.002	0.000	0.036	0.014

t₁:峰值期与潜伏期相比;t₂:衰退期与潜伏期相比;P₁:峰值期与潜伏期相比;P₂:衰退期与潜伏期相比

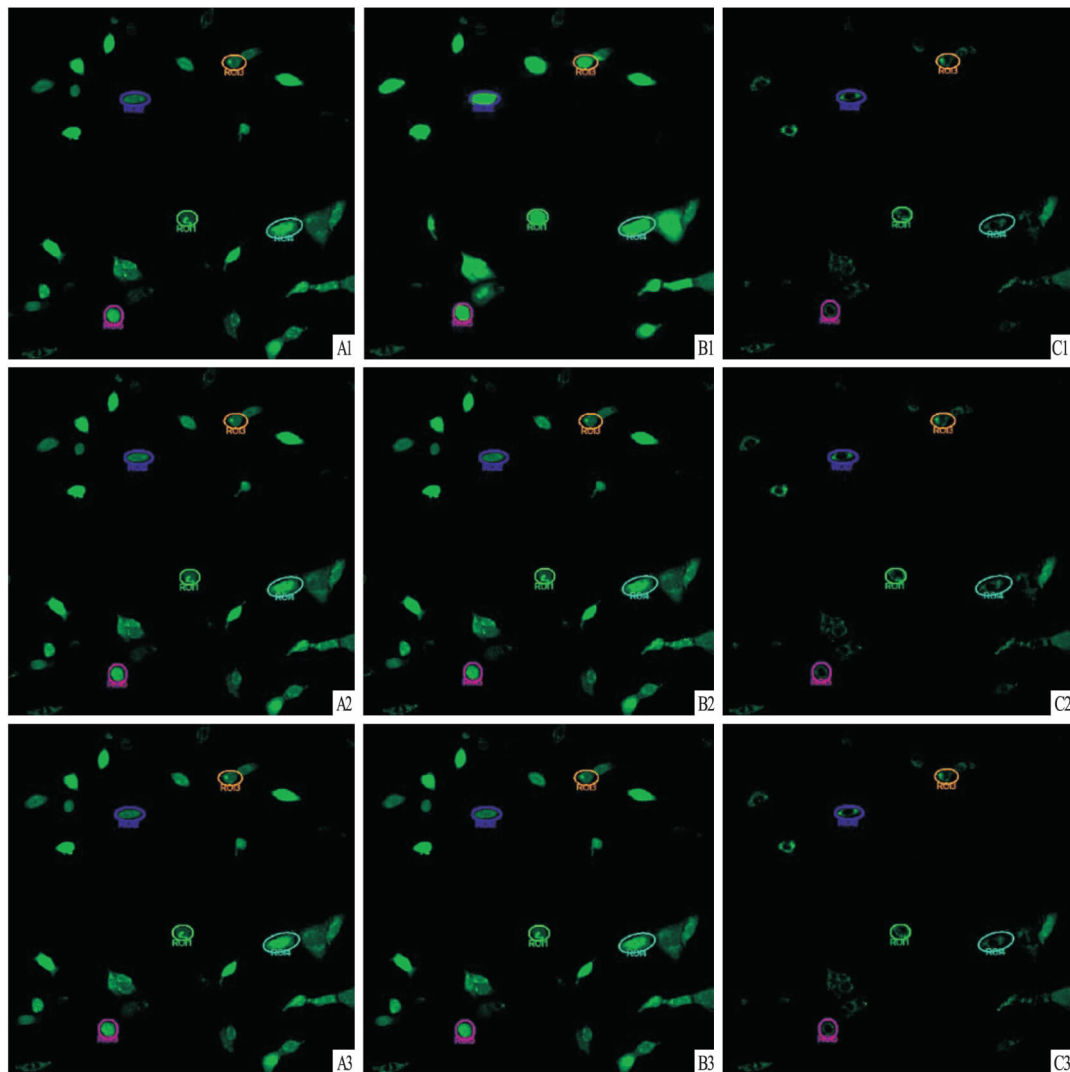


图5 200 ng/ml NGF作用下RWPE-1细胞内Fluo-3/AM荧光强度图像 ×400

A:潜伏期(10 s);B:峰值期(30 s);C:衰退期(300 s);1:正常细胞外液组;2:TRPV1受体拮抗剂组;3:D-PBS组

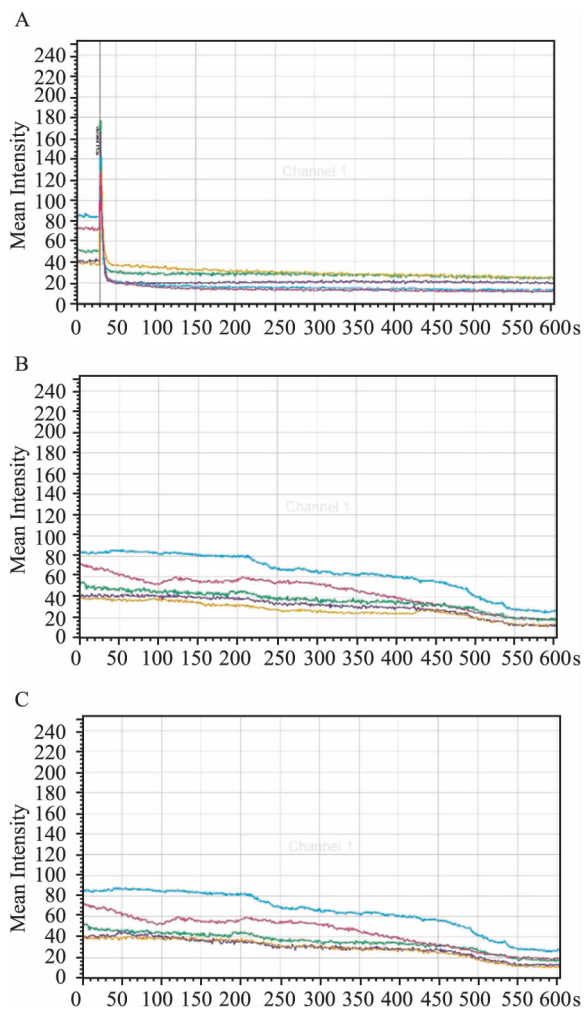


图6 200 ng/ml NGF 作用下 RWPE-1 细胞内 Ca^{2+} 荧光强度随时间 (Intensity-t) 变化的曲线

A: 正常细胞外液组; B: TRPV1 受体拮抗剂组; C: D-PBS 组

在 RWPE-1 细胞内, 在正常细胞外液组中, 与潜伏期(10 s)相比, 峰值期(30 s)细胞内 Ca^{2+} 荧光强度表达明显增强, 差异有统计学意义 ($t = -6.105$, $P < 0.01$)。而在其余两组内, 峰值期(30 s)细胞内 Ca^{2+} 荧光强度表达无明显增强。各组内, 与潜伏期(10 s)相比, 衰退期(300 s)细胞内 Ca^{2+} 荧光强度表达均明显减弱, 差异有统计学意义 ($t = 2.816$, $P < 0.05$; $t = 8.256$, $P < 0.01$; $t = 6.803$, $P < 0.01$)。见表 1、图 7。

2.2.2 200 ng/ml CgA 对 RWPE-1 细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的影响 根据荧光强度图和 Intensity-t 曲线图可知, 在正常细胞外液组中, 潜伏期内(100 s)细胞内荧光强度处在平稳水平, 第 20 秒加入 CgA (200 ng/ml) 后, 细胞内荧光强度未见明显波动, 一直维持在较为平稳水平, 从 230 s 开始荧光强度缓慢增

强, 在第 310 秒达到峰值水平(峰值期)后, 细胞内荧光强度缓慢减弱。在 TRPV1 受体拮抗剂组和 D-PBS 组中, 静息状态下荧光强度维持在平稳水平, 第 20 秒分别加入 TRPV1 受体拮抗剂、CgA (200 ng/ml) 及将正常细胞外液换成 D-PBS 后, 未见明显峰值水平出现, 总体来说一直处于相对平稳状态。见图 8、9。

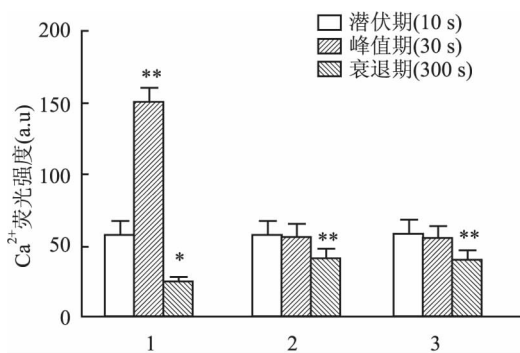


图7 200 ng/ml NGF 作用下 RWPE-1 细胞内 Ca^{2+} 荧光强度在各组中表达情况

1: 正常细胞外液组; 2: TRPV1 受体拮抗剂组; 3: D-PBS 组; 与潜伏期比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

在 RWPE-1 细胞内, 在正常细胞外液组中, 与潜伏期(100 s)相比, 峰值期(310 s)细胞内 Ca^{2+} 荧光强度表达明显增强, 差异有统计学意义 ($t = -38.627$, $P < 0.01$)。而在其余两组内, 峰值期(30 s)细胞内 Ca^{2+} 荧光强度表达无明显增强。各组内, 与潜伏期(100 s)相比, 衰退期(550 s)细胞内 Ca^{2+} 荧光强度表达差异均有统计学意义 ($t = -18.071$, $P < 0.01$; $t = 3.115$, $P < 0.05$; $t = 4.154$, $P < 0.05$)。见表 1、图 10。这些结果说明, 200 ng/ml NGF 和 CgA 引起细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增强主要是通过触发细胞膜上 TRPV1 通道开放, 而并非是细胞内钙库释放所致。而后期细胞内荧光强度衰弱主要是细胞内的荧光量常规衰减所致。

3 讨论

NGF 和 CgA 是 NECs 特异性的标志物。NGF 是典型的、研究最多的神经营养因子家族成员。NGF 在单次或者反复组织损伤/炎症时合成和释放, 并调控着基因的表达, 引起持续的疼痛^[5-8]。在炎症和损伤的情况下, NGF 浓度增加将会诱导 TRPV1 水平的进一步表达^[9]。CgA 是一种亲水性酸性蛋白质, 存在于正常组织和神经内分泌肿瘤的神

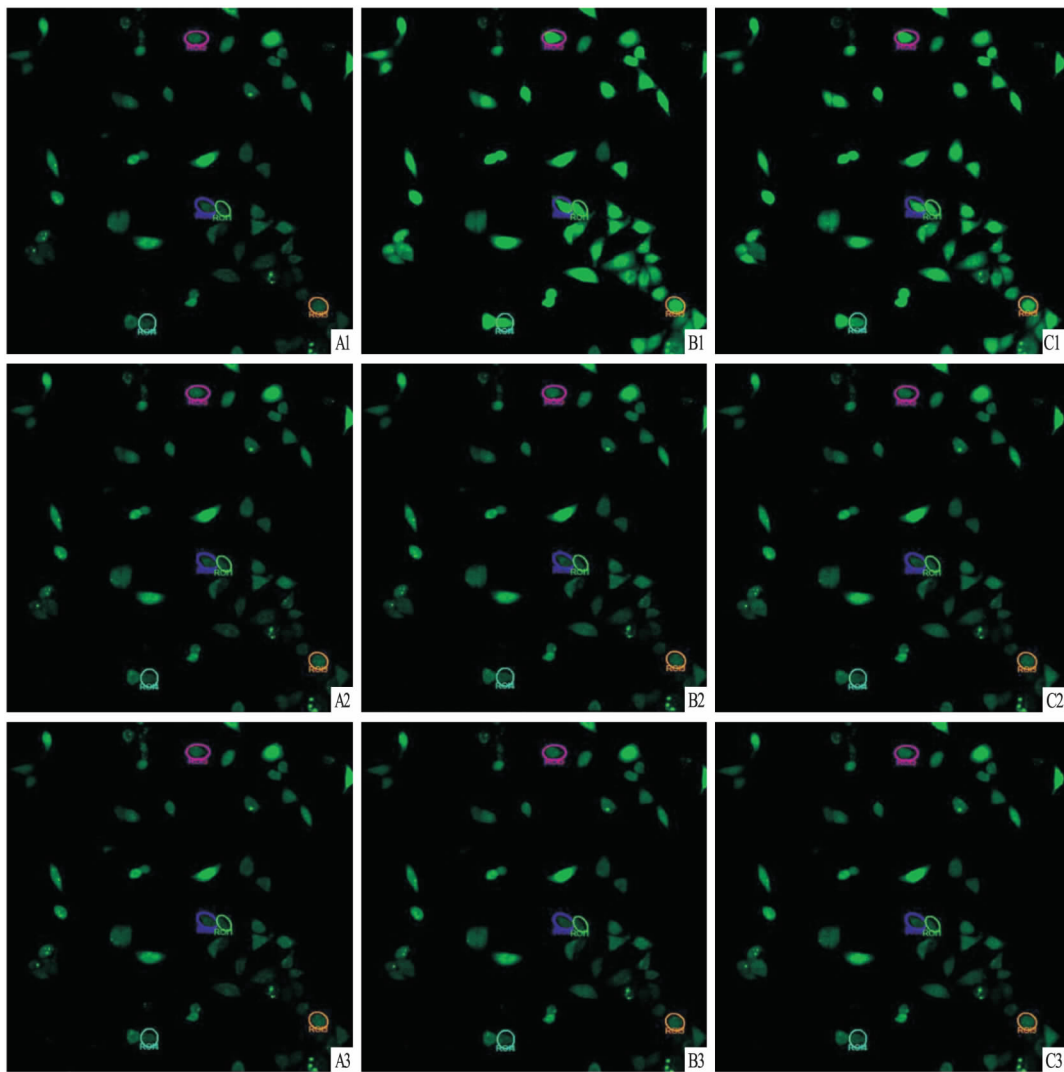


图8 200 ng/ml CgA 作用下 RWPE-1 细胞内 Fluo-3/AM 荧光强度图像 ×400

A: 潜伏期(100 s); B: 峰值期(310 s); C: 衰退期(550 s); 1: 正常细胞外液组; 2: TRPV1 受体拮抗剂组; 3: D-PBS 组

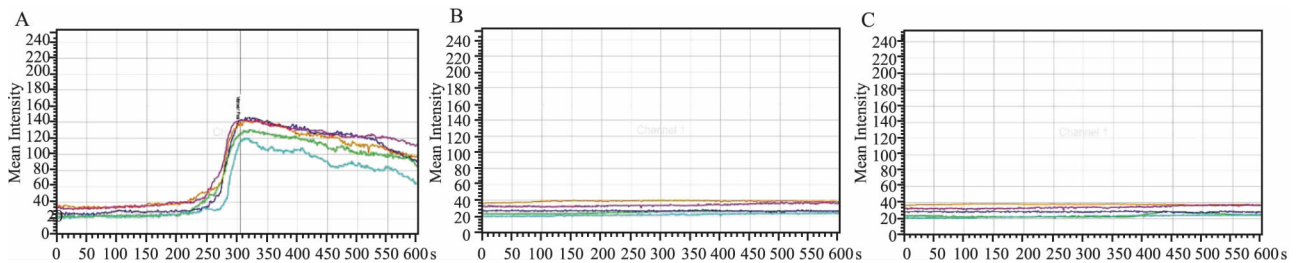


图9 200 ng/ml CgA 作用下 RWPE-1 细胞内 Ca²⁺ 荧光强度随时间(Intensity-t) 变化的曲线

A: 正常细胞外液组; B: TRPV1 受体拮抗剂组; C: D-PBS 组

内分泌细胞嗜铬颗粒中^[10],分子量约为 48 ku,可作为前体肽在不同的组织中分解为不同的片段发挥着不同的生理作用,同时还是一种重要的炎性介质,在多种疾病的发生、发展中起关键作用。研究^[11]显示 CgA 及其衍生物在炎症腺体内异常聚集,能增加上

皮细胞的通透性,促使前列腺液渗入基质,表明 CP 的发生和神经内分泌细胞之间可能存在着一定的联系。

细胞内 Ca²⁺ 不仅参与调节细胞的运动、代谢、分泌、信号跨膜传递等多种细胞功能活动,且其浓度

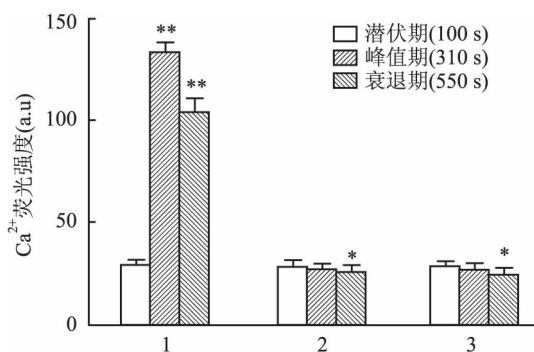


图 10 200 ng/ml CgA 作用下 RWPE-1 细胞内 Ca²⁺ 荧光强度在各组中表达情况

1: 正常细胞外液组; 2: TRPV1 受体拮抗剂组; 3: D-PBS 组; 与潜伏期比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

的变化对维持细胞质膜和细胞器膜两侧的跨膜梯度以及对外界刺激的应答反应具有重要的调控作用^[12-13]。钙离子通道是一类镶嵌在膜结构脂质中的大分子蛋白质复合体,广泛分布于人体各种组织细胞,在维持人体正常结构和机体功能以及参与人体内多种生物活动代谢过程中起关键作用。瞬时感受器电位(transient receptor potential, TRP)是受体门控 Ca²⁺ 通道(receptor operated calcium channels, ROCCs)的一种,当配体和受体结合后使 ROCCs 开放,细胞外 Ca²⁺ 流入细胞内。而 TRPV1 是 TRP 家族中研究最清楚的亚型。

本课题前期研究^[14]显示,慢性非细菌前列腺炎大鼠模型的前列腺中 CgA 蛋白表达水平明显增加,表明神经内分泌细胞与 CP 有一定的相关性。同时,本课题前期研究^[15]显示慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠前列腺细胞中存在着钙离子通道功能的变化。本实验使用 NGF 和 CgA 等神经内分泌因子直接刺激人类前列腺上皮细胞系 RWPE-1,观察细胞内 [Ca²⁺]_i 的变化及其发生机制,间接将前列腺神经内分泌功能与钙离子通道联系起来。本研究使用 Ca²⁺ 荧光指示剂 Fluo-3/AM 作为荧光探针,可透过细胞膜进入细胞,进入细胞后在胞浆脂酶的作用下分解为 Fluo-3,与 Ca²⁺ 结合后能被激光激发而产生荧光,采用此方法可对细胞内游离 Ca²⁺ 进行定量或定性分析。首先采用 50 ng/ml NGF 和 CgA(正常细胞外液配置)刺激 RWPE-1 细胞,观察细胞内 [Ca²⁺]_i 无明显变化。接着,加大药物浓度进行实验,结果显示 200 ng/ml NGF 和 CgA(正常细胞外液配置)刺激 RWPE-1 细胞后均能引起细胞内

[Ca²⁺]_i 增加。然后,在加入 NGF 和 CgA 的同时混入 TRPV1 受体拮抗剂,显示细胞内 [Ca²⁺]_i 无明显变化。如果细胞外 Ca²⁺ 进入细胞是通过 NGF 和 CgA 触发电压依赖或者其他通道开放引起,那么在没有 Ca²⁺ 溶液中,细胞内 [Ca²⁺]_i 不会增加。为了进一步探索细胞内 Ca²⁺ 的来源,采用 D-PBS(不含 Ca²⁺ 和 Mg²⁺)作为细胞外液进行实验,显示采用同等浓度的 NGF 和 CgA 刺激 RWPE-1 细胞后,细胞内 [Ca²⁺]_i 无明显变化。由此可知,NGF 和 CgA 引起细胞内 [Ca²⁺]_i 的增加主要依赖于细胞外液 [Ca²⁺]_i 和 TRPV1 通道的开放,而并非细胞内钙库的释放。

综上所述,NGF 和 CgA 引起细胞内 [Ca²⁺]_i 增加,主要是依赖于 TRPV1 通道开放,促使细胞外 Ca²⁺ 内流所致。进一步说明,CP 可能的发病机制:各种伤害性因素刺激前列腺神经末梢,引起前列腺神经内分泌细胞分泌 NGF 和 CgA,通过旁分泌、自分泌等机制导致前列腺上皮细胞膜 TRPV1 通道开放,促使细胞内 Ca²⁺ 增加,引起前列腺上皮分泌功能下降。

参考文献

- [1] Clemens J Q, Meenan R T, O'Keeffe Rosetti M C, et al. Prevalence of and risk factors for prostatitis: population based assessment using physician assigned diagnoses [J]. J Urol, 2007, 178 (4 Pt 1): 1333-7.
- [2] Lee J C, Yang C C, Kromm B G, et al. Neurophysiologic testing in chronic pelvic pain syndrome: a pilot study [J]. Urology, 2001, 58(2): 246-50.
- [3] Yang C C, Lee J C, Kromm B G, et al. Pain sensitization in male chronic pelvic pain syndrome: why are symptoms so difficult to treat? [J]. J Urol, 2003, 170(3): 823-6.
- [4] Helle K B. The chromogranin A-derived peptides vasostatin-I and catestatin as regulatory peptides for cardiovascular functions [J]. Cardiovasc Res, 2010, 85(1): 9-16.
- [5] Zhu W, Oxford G S. Differential gene expression of neonatal and adult DRG neurons correlates with the differential sensitization of TRPV1 responses to nerve growth factor [J]. Neurosci Lett, 2011, 500(3): 192-6.
- [6] Mills C D, Nguyen T, Tanga F Y, et al. Characterization of nerve growth factor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in rats [J]. Eur J Pain, 2013, 17(4): 469-79.
- [7] Zhu W, Oxford G S. Phosphoinositide-3-kinase and mitogen activated protein kinase signaling pathways mediate acute NGF sensitization of TRPV1 [J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 34(4): 689-700.

- [8] Paterson S, Schmelz M, Mcglone F, et al. Facilitated neurotrophin release in sensitized human skin [J]. *Eur J Pain*, 2009, 13(4): 399–405.
- [9] Zhang X, Huang J, McNaughton P A. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels [J]. *EMBO J*, 2005, 24(24): 4211–23.
- [10] Modlin I M, Gustafsson B I, Moss S F, et al. Chromogranin A-biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(9): 2427–43.
- [11] Helle K B. Regulatory peptides from chromogranin A and secretogranin II: putative modulators of cells and tissues involved in inflammatory conditions [J]. *Regul Pept*, 2010, 165(1): 45–51.
- [12] Teruel M N, Chen W, Persechini A, et al. Differential codes for free Ca^{2+} -calmodulin signals in nucleus and cytosol [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(2): 86–94.
- [13] Katz E, Verbitsky M, Rothlin C V, et al. High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor [J]. *Hear Res*, 2000, 141(1-2): 117–28.
- [14] Fan S, Hao Z Y, Zhang L, et al. Increased chromogranin A and neuron-specific enolase in rats with chronic nonbacterial prostatitis induced by 17-beta estradiol combined with castration [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7): 3992–9.
- [15] 樊松, 梁朝朝, 郝宗耀, 等. 新型钙通道 TRPV5 在慢性前列腺炎患者前列腺上皮细胞中的表达及其意义 [J]. *中国男科学杂志*, 2007, 21(10): 12–5.

Effect of NGF and CgA on the intracellular calcium ion concentration of RWPE-1 cells and the role of NGF and CgA in chronic prostatitis

Ding Huayang¹, Fan Song^{1,2}, Zhang Li^{1,2}, et al

(¹*Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

²*Urological Institute of Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To explore difference of intracellular calcium ion ($[Ca^{2+}]_i$) concentration of nerve growth factor (NGF) and chromogranin A (CgA) treated prostate epithelial cell line RWPE-1 cells and evaluate the role of NGF and CgA in chronic prostatitis (CP). **Methods** Using different concentrations of NGF and CgA (50 ng/ml and 200 ng/ml) to stimulate RWPE-1 cells, the difference of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ concentration was observed by using Laser Scanning Confocal Microscopy. The difference of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ concentration was observed after infusing NGF and CgA mixed with TRPV1 receptor antagonist. When the extracellular solution was changed to D-PBS, the intracellular $[Ca^{2+}]_i$ concentration was observed after NGF and CgA infusion. **Results** Change in intracellular $[Ca^{2+}]_i$ concentration did not occur by infusing 50 ng/ml NGF and CgA. Intracellular $[Ca^{2+}]_i$ concentration significantly increased by infusing 200 ng/ml NGF and CgA. Intracellular $[Ca^{2+}]_i$ concentration did not change after infusion of NGF and CgA mixed with TRPV1 receptor antagonist. Even when the extracellular solution was changed to D-PBS, the intracellular $[Ca^{2+}]_i$ concentration did not change after NGF and CgA infusion. **Conclusion** NGF and CgA might participate in the mechanism of CP and cause the opening of TRPV1 of prostate epithelial cell membrane. Then, the intracellular $[Ca^{2+}]_i$ concentration increase. In the end, prostate epithelial secretion decline.

Key words prostatitis; nerve growth factor; chromogranin A; RWPE-1 cells; calcium ion