

IGF-1 及 IGF-1R 在 SD 大鼠前列腺组织中的表达

熊宇¹ 黄涛¹ 吴奎¹ 刘治¹ 周杭城²

摘要 目的 研究不同饮食和丙酸睾酮对 SD 大鼠前列腺组织的改变及胰岛素生长因子(IGF)-1、IGF-1R 的表达强度。方法 采用高脂高糖饲料饮食及去势后皮下注射丙酸睾酮建造前列腺增生模型,40 d 后处死大鼠;取出前列腺组织称重并 HE 染色观察前列腺增生情况;用免疫组化法检测前列腺组织中 IGF-1、IGF-1R 的表达强度。结果 高脂高糖饮食组前列腺组织增生,IGF-1、IGF-1R 的表达强度均高于普通饮食组($P < 0.05$);去势+低剂量丙酸睾酮皮下注射组前列腺组织明显增生,IGF-1、IGF-1R 的表达强度明显增加($P < 0.05$)。结论 高脂高糖饮食及低剂量丙酸睾酮均可促进大鼠前列腺组织的增生,IGF-1、IGF-1R 与前列腺增生的发展呈正相关性。

关键词 高脂高糖;丙酸睾酮;前列腺指数;前列腺增生;胰岛素生长因子 1;胰岛素生长因子 1 受体

中图分类号 R 697.32

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1247-05

前列腺增生是一种缓慢的渐进的老年男性常见疾病^[1],约 2/3 患者有尿频、尿急、夜尿增多症状,进而出现进行性排尿困难,严重影响老年男性的生活质量和睡眠模式^[2]。近年来中国人口老龄化加剧,

饮食结构改变明显,前列腺增生发病率显著升高。该研究通过高糖高脂饮食喂养 SD 大鼠并对去势大鼠皮下注射不同剂量的丙酸睾酮建立大鼠前列腺增生模型,并对前列腺组织进行免疫组织化学染色,探讨高脂高糖饮食及外源性睾酮对 SD 大鼠前列腺的影响及 IGF-1、IGF-1R 与大鼠前列腺增生发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及饲养条件

1.1.1 SD 大鼠选择及分组 健康清洁级 SD 雄性大鼠 40 只,120~200 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,以上 SD 大鼠先给予普通饲料适应性喂养 3 d,第 4 天所有大鼠随机分为普通饮食组(A 组)和高脂高糖饮食组(B 组),两组大鼠再随机各分 4 组,每组各 5 只。A1 组:普食饮食未处理;A2 组:普通饮食+手术去势+生理盐水 5 mg/(kg·d)皮下注射;A3 组:普通饮食+手术去势+睾酮 2 mg/(kg·d)皮下注射;A4 组:普通饮食+手术去势+睾酮 5 mg/(kg·d)皮下注射;B1 组:高糖高脂饮食未处理;B2 组:高糖高脂饮食+手术去势+生理盐水 5 mg/(kg·d)皮下注射;B3 组:高糖高脂饮食+手术去势+睾酮 2 mg/(kg·d)皮下注射;B4 组:高糖高脂饮食+手术去势+睾酮 5 mg/(kg·d)皮下注射。

1.1.2 饲养条件和饲料配方 室温(22±2)℃,

2015-03-31 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1408085QH152)

作者单位:安徽医科大学附属省立临床学院¹泌尿外科,²病理科,合肥 230001

作者简介:熊宇,男,硕士研究生;

吴奎,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wukuim-nwk@sohu.com

HSC, while markedly increased by TGF- β 1 stimulation. The two concentrations of p38-specific inhibitor (1, 3 μ mol/L) and low concentration ERK-specific inhibitor (1 μ mol/L) had no significant effect on the phosphorylation of Smad2/3; the high concentration of p38-specific inhibitor (10 μ mol/L) significantly down-regulated elevated pSmad2C by TGF- β 1; the two concentrations of ERK-specific inhibitor (3, 10 μ mol/L) could remarkably decrease elevated pSmad2C by TGF- β 1; the three concentrations of JNK-specific inhibitor (1, 3, 10 μ mol/L) inhibited the phosphorylation of Smad2C, Smad2L and Smad3L stimulated by TGF- β 1. All three MAPK-specific inhibitors suppressed increased nuclear translocation of Smad4 protein in TGF- β 1-stimulated HSCs. **Conclusion** The phosphorylation of Smad2/3 and nuclear translocation of Smad4 might be induced by TGF- β 1 via activating ERK, JNK, p38 pathways in HSCs.

Key words HSCs; MAPK inhibitors; Smad2; Smad3; Smad4

湿度 (50 ± 10) % ,光照条件 6 时 ~ 18 时 ,水和饲料充足 ,实验前普通饲料料养适应 3 d。普通饲料由安徽医科大学实验动物中心提供;高糖高脂饲料在普通饲料的基础上加动物油脂 (猪油 10%)、蔗糖 (7%)、伊利全脂奶粉 (10%)、蛋黄 (6%)、豆粉 (2%) ,由安徽医科大学动物实验中心混合配制成棒状饲料喂养。

1.1.3 药品及试剂 丙酸睾酮注射液 (25 mg/ml) 购自天津金耀氨基酸有限公司 (批号: 1202081); 10% 水合氯醛由安徽医科大学附属省立医院动物实验中心提供; IGF-1 抗体 (产品编号 bs-4588R)、IGF-1R 抗体 (产品编号 bs-4985R) 均购自北京博奥森生物技术有限公司; 通用型 kit 兔/小鼠 (产品编号 PV-6000)、DAB 染色剂 (产品编号 ZLI-9018) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.4 免疫组织化学 采用 SP 法 ,参照免疫组化染色试剂盒说明书。选择厚度为 4 μm 组织 ,蜡块进行连续切片 ,其中阴性对照组: 采用 PBS 代替一抗 ,浓度均为 1 : 100; 阳性对照组: IGF-1、IGF-1R 在大鼠的前列腺增生组织阳性表达标本。

1.2 实验方法 所有大鼠购买后在安徽医科大学附属省立医院动物实验室喂养 ,适应 3 d 后去势组 SD 大鼠在麻醉药 (10% 水合氯醛按 0.3 ml/100 g 的剂量) 经腹腔注射麻醉下 ,在无菌手术台上行双侧睾丸切除术。各非去势组只麻醉后剪开外阴皮肤后立即缝合 ,作假手术处理。所有手术组术后 3 d 内应用抗生素 (左氧氟沙星) 预防感染 ,按照分组分别给予不同剂量丙酸睾酮皮下注射 ,按上述喂养条件持续喂养 40 d ,建立前列腺增生模型。实验结束前 1 d 停止睾酮注射 ,所有大鼠称重。

1.3 检测指标

1.3.1 前列腺湿重及前列腺指数 用颈椎脱臼法处死大鼠 ,解剖前列腺 ,分离取出前列腺并用滤纸吸干血迹 ,用 PL403 精密分析天平 (精确度为 0.001 g) 称重 ,计算大鼠前列腺指数。前列腺指数 = 前列腺湿重 (mg) / 大鼠体重 (g)。

1.3.2 前列腺组织 HE 染色 将前列腺组织放入福尔马林溶液中固定 24 h ,进行脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片 ,厚度为 4 μm ,用苏木精 - 伊红染色 ,在 MIAS 2000 型图像分析系统下观察大鼠前列腺组织结构的变化。

1.3.3 免疫组织化学法 石蜡切片常规脱蜡水化 ,3% 过氧化氢室温下孵育 10 min ,蒸馏水冲洗 3 次 ,每次 3 min; 然后将切片浸入 0.01 mol 的枸橼酸盐

缓冲液 (pH6.0) 中 ,用微波炉加热至沸腾后断电 ,间隔 10 min 后再加热 ,反复 2 次; 冷却后用 PBS 液 (pH = 7.2 ~ 7.4) 洗涤 3 次 ,每次 3 min; 甩去水分后加一抗 4 ℃ 过夜; PBS 液冲洗 3 次 ,每次 3 min ,甩去水分后滴加二抗; 37 ℃ 孵育 20 min ,用 PBS 洗 3 次 ,每次 5 min; 按说明书操作使用 DAB 显色试剂盒显色 ,显微镜观察控制反应时间在 30 s 蒸馏水洗涤后复染 ,依次按 70%、80%、90%、95%、100% 梯度酒精脱水各 3 min ,二甲苯透明 ,树脂封片 ,显微镜下观察。

1.3.4 免疫组化结果判断标准 每张切片选择 5 个视野 ,IGF-1、IGF-1R 定位于前列腺上皮的细胞质和细胞膜上 ,以黄色或棕黄色染色信号为阳性标准 ,具体方法和判断标准按照 SP 试剂盒说明书进行 ,以 IGF-1、IGF-1R 平均光密度值作为判定标准。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两组间均数比较采用两独立样本 *t* 检验 ,多组之间均数比较采用方差分析 ,两两比较采用 LSD 检验。用 *t* 检验比较 IGF-1 和 IGF-1R 在不同组大鼠前列腺之间的表达差异。

2 结果

2.1 A 组和 B 组大鼠体重、前列腺湿重和前列腺指数

2.1.1 未去势大鼠体重、前列腺湿重和前列腺指数的比较 两组中 ,大鼠体重均有所增加但差异无统计学意义 ,B1 组大鼠前列腺湿重及前列腺指数增加较 A1 组明显 ,差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 未去势大鼠体重、前列腺湿重和前列腺指数的比较 (n = 5 $\bar{x} \pm s$)

指标	A1 组	B1 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
体重 (g)	263.400 ± 40.290	328.800 ± 52.323	2.214	0.058
前列腺湿重 (mg)	0.277 ± 0.033	1.058 ± 0.264	6.567	< 0.001
前列腺指数	0.106 ± 0.010	0.326 ± 0.083	5.921	0.004

2.1.2 去势大鼠皮下注射不同剂量睾酮后体重和前列腺指数的变化情况 去势大鼠中 ,注射不同剂量丙酸睾酮后 ,大鼠前列腺的体重及前列腺指数均有所增加 ,高脂高糖饮食组较普通饮食组增加明显 ,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。在皮下注射生理盐水和 2 mg/kg 中 ,高脂组与普食组相比体重 (*t* = 2.807 ,*P* = 0.038; *t* = 4.483 ,*P* = 0.003) 和前列腺指数 (*t* = 4.344 ,*P* = 0.007; *t* = 4.032 ,*P* = 0.010) 差异均有统计学意义。在 5 mg/kg 组 ,高脂组与普食组

相比体重差异均有统计学意义 ($t = 3.087, P = 0.034$) ,而前列腺指数的差异无统计学意义 ($t = 1.148, P = 0.289$) 。普食组 ,皮下注射睾酮各剂量组之间去势大鼠体重和前列腺指数差异均有统计学意义 ($F = 21.194, 48.733, P < 0.001$) ;高脂组 ,皮下注射睾酮各剂量组之间去势大鼠体重和前列腺指数差异均有统计学意义 ($F = 4.872, P = 0.037; F = 19.108, P = 0.001$) 。见图 1。

2.2 前列腺组织结构的病理改变 A1 组前列腺无明显增生 ,腺上皮呈单层柱状或立方样改变 ,管腔扩大不明显 ,分泌物染色呈粉红色改变; A2 组前列腺腺体无增生 ,管腔无扩大; A3 组大鼠前列腺腺体的体积明显增大 ,腺体呈乳头样增生 ,腺泡增多 ,管腔分泌亢进 ,见大量深粉红色分泌物 ,有的形成前列腺

凝结核; A4 组大鼠前列腺腺体前列腺轻度增生 ,见单层柱状上皮改变 ,管腔轻度增大 ,分泌物染色呈粉红色。B 组较 A 组相同处理条件下前列腺腺体增生更加活跃。见图 2。

2.3 前列腺组织结构的免疫组织化学改变 IGF-1 在前列腺增生组中平均光密度值为 (0.277 ± 0.005) ,正常前列腺组织中平均光密度值为 (0.212 ± 0.007) ,前列腺增生组织明显高于正常前列腺组织 ,差异有统计学意义 ($t = 16.468, P < 0.001$) ; IGF-1R 在前列腺增生组中平均光密度值为 (0.251 ± 0.005) ,正常前列腺组织中平均光密度 (0.206 ± 0.006) ,前列腺增生组织明显高于正常前列腺组织 ,差异有统计学意义 ($t = 13.387, P < 0.001$) 。IGF-1 主要在前列腺腺管的腺上皮细胞的胞浆中表

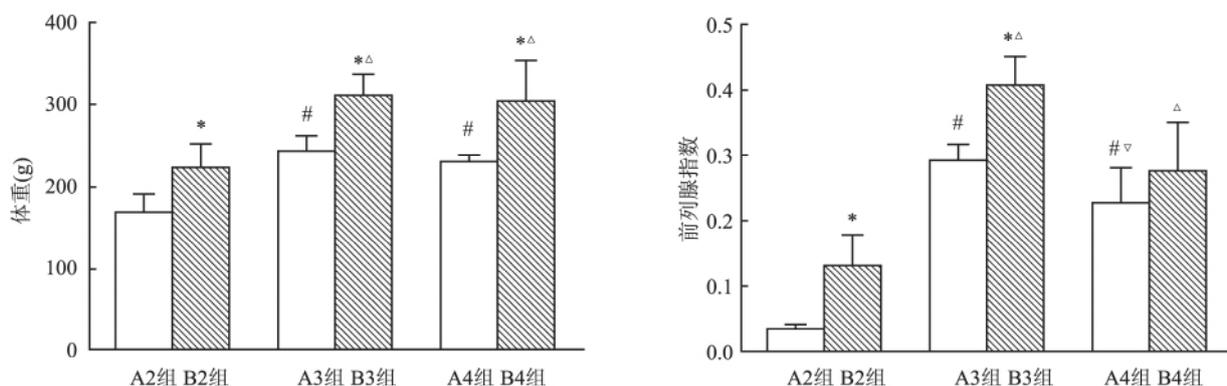


图 1 去势大鼠皮下注射不同剂量睾酮后体重和前列腺指数的改变

与 A 组同一剂量比较: * $P < 0.05$; 与 A2 组比较: # $P < 0.05$; 与 A3 组比较: $\nabla P < 0.05$; 与 B2 组比较: $\Delta P < 0.05$

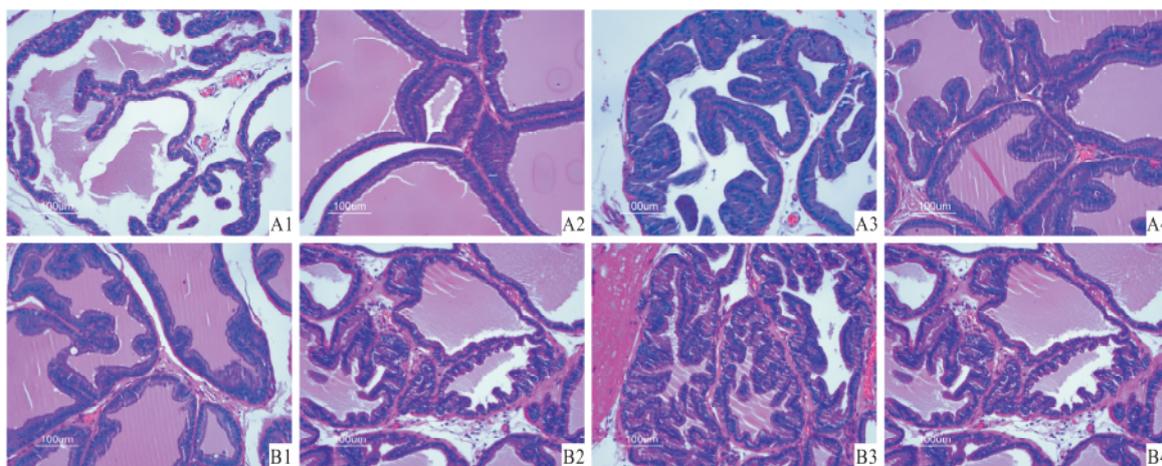


图 2 各组前列腺组织腺体增生情况 HE $\times 200$

A1: 普通饮食未处理组; A2: 普通饮食 + 手术去势 + 生理盐水 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 皮下注射组; A3: 普通饮食 + 手术去势 + 睾酮 $2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 皮下注射组; A4: 普通饮食 + 手术去势 + 睾酮 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 皮下注射组; B1: 高糖高脂饮食未处理组; B2: 高糖高脂饮食 + 手术去势 + 生理盐水 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 皮下注射组; B3: 高糖高脂饮食 + 手术去势 + 睾酮 $2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 皮下注射组; B4: 高糖高脂饮食 + 手术去势 + 睾酮 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 皮下注射组

达 较均匀。IGF-1R 主要在前列腺腺管的腺上皮细胞的胞浆中表达,细胞间质中可见少量弥散的阳性表达。见图 3。

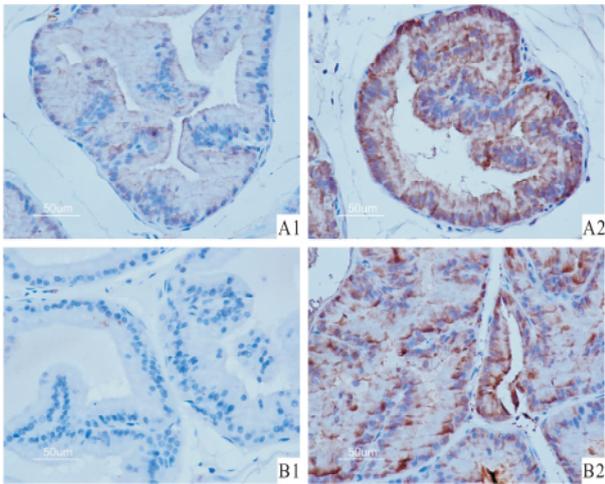


图3 前列腺组织的免疫组织化学改变 ×400
A: IGF-1; B: IGF-1R; 1: 正常前列腺组织; 2: 增生前列腺组织

3 讨论

随着我国人口老龄化的加剧、饮食结构的改变,发生前列腺增生的危险性明显增加,因此研究前列腺增生的发生机制及预防措施对提高老年人生活质量尤为重要。本实验成功建造了SD大鼠前列腺增生模型,大鼠前列腺出现了不同程度体积增大,腺体增生,管腔分泌亢进等表现。这同孙俊英等^[3]研究一致,而研究^[4-6]显示,胰岛素抵抗导致的高胰岛素血症,可以通过调节交感神经系统促进儿茶酚胺的释放,减缓细胞的凋亡引起前列腺增生。动物实验研究^[5]显示使用胰岛素增敏剂改善胰岛素抵抗可缩小高脂饮食喂养的大鼠前列腺体积,说明高脂饮食能导致胰岛素抵抗,胰岛素抵抗能引起高胰岛素血症,进而促进前列腺增生。由此可见,胰岛素抵抗及高胰岛素血症是连接高脂高糖饮食及前列腺增生的重要病因学纽带。

前列腺组织的正常生理状态依赖于前列腺细胞增殖及凋亡之间的动态平衡,当这种平衡被外部因素打破,前列腺上皮细胞的增殖速度超过凋亡速度,前列腺表现腺体增生。雄激素是调控前列腺生长的重要激素,可以通过芳香酶作用转化为雌激素,也可以通过促进生长因子的分泌共同促进前列腺增生。杜传策等^[7]发现雌二醇可以增加前列腺组织对双氢睾酮的吸收和转化,雌激素还能促进雄激素与雄

激素受体的结合,促进前列腺增生。人体内雌、雄激素水平处于一种平衡状态,共同调节前列腺的生长发育、增殖和凋亡,无论是雌激素的增加还是雄激素的减少都会导致雌/雄激素比例增高,进而导致的发生^[8]。陈金海等^[9]发现体内高雌/雄激素比值相对于低雌/雄激素比值更能明显促进前列腺细胞的增殖并减少细胞的凋亡。研究^[10]显示高雌/雄激素比值组大鼠前列腺基质明显增生,说明平衡状态下的雌、雄激素比例被打破后表现为前列腺基质细胞的过度增殖。由于青年人睾丸功能正常,体内雄激素水平过高,雌雄激素相互“抑制”,达到一种平衡状态,老年男性由于脏器的自然衰老及下丘脑-垂体-睾丸轴功能减退,体内睾酮水平随年龄的增加而逐渐下降,从而雌/雄激素比值增高,导致前列腺基质细胞过度增殖,最终发展为前列腺增生。杨佳佳等^[11]通过研究80例男性性腺功能减退合并代谢综合征的患者发现,给予补充小剂量睾酮后患者肥胖、血脂、空腹血糖及胰岛素敏感指数均明显改善,说明小剂量睾酮替代治疗能改善患者代谢症状,进而延缓前列腺增生的进展。

研究^[12]显示一些生长因子在前列腺增生过程中也起到重要的作用,IGF-1与IGF-1R是胰岛素样生长因子家族蛋白(IGFs)中两个重要的多肽蛋白,IGF-1在体内主要由肝脏产生,广泛的存在于机体组织中。研究^[13]显示IGF-1主要位于前列腺基质细胞的细胞质中,而IGF-1R主要位于前列腺腺侧的膜上皮细胞,通过内分泌、旁分泌和自分泌途径作用于组织细胞,IGF-1R是一种跨膜的酪氨酸激酶蛋白,是IGFs系统的主要介导者,IGF-1在上皮组织中具有较强的促有丝分裂作用,IGF-1与其受体(IGF-1R)结合,通过激活PI3/AKT和MAPK途径,促进RNA和DNA的合成,转录并调节蛋白质的合成,发挥促进有丝分裂、细胞增殖及抑制细胞凋亡的作用^[14]。研究^[15]显示高水平的IGF-1在前列腺的生长发育有重要作用,研究^[13]显示雄激素受体的活性可能受到其他信号的控制,如IGF-1可以直接激活雄激素受体或增强雄激素受体核易位,表明IGF-1可以作为去势后的雄激素替代治疗。

本研究显示高脂高糖饮食能诱发大鼠前列腺增生,去势后给予低剂量外源性睾酮补充也能诱导大鼠前列腺增生,因此老年男性适当控制高脂高糖饮食量并给予补充适量外源性睾酮,可以使老年人体内雌雄激素比值保持平衡状态,可以预防前列腺增生的发生,并猜想前列腺增生的发生可能与高脂高

糖饮食引起的高胰岛素血症通过直接作用于前列腺细胞以及改变 IGF 信号通路各因子表达及活性有关,因此可以用 IGF-1、IGF-1R 作为前列腺增生的预测指标和早期诊断指标,以 IGF-1、IGF-1R 为共同靶点阻断其信号转导,提供前列腺增生治疗的新途径。

参考文献

- [1] Barry M J. Evaluation of symptoms and quality of life in men with benign prostatic hyperplasia [J]. *Urology* 2001, 58(6 Suppl 1): 25-32.
- [2] Hellstrom W J, Giuliano F, Rosen R C. Ejaculatory dysfunction and its association with lower urinary tract symptoms of benign prostatic hyperplasia and BPH treatment [J]. *Urology*, 2009, 74(1): 15-21.
- [3] 孙俊英, 郭延云, 陈丽, 等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立与评价 [J]. *安徽医科大学学报* 2007, 42(4): 433-5.
- [4] Vikram A, Jena G, Ramarao P. Pioglitazone attenuates prostatic enlargement in diet-induced insulin-resistant rats by altering lipid distribution and hyperinsulinemia [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(8): 1708-21.
- [5] Vikram A, Jena G, Ramarao P. Insulin-resistance reduces botulinum neurotoxin-type A induced prostatic atrophy and apoptosis in rats [J]. *Eur J Pharmacol* 2011, 650(1): 356-63.
- [6] Vikram A, Jena G B, Ramarao P. Increased cell proliferation and contractility of prostate in insulin resistant rats: linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia [J]. *Prostate*, 2010, 70(1): 79-89.
- [7] 杜传策, 宋乐明, 胡敏, 等. 前列腺体积与血清雌二醇和睾酮浓度及其比例关系的研究 [J]. *中国全科医学* 2011, 14(1B): 159-60, 163.
- [8] Weisser H, Krieg M. Benign prostatic hyperplasia-the outcome of age-induced alteration of androgen-estrogen balance? [J]. *Urologe*, 1997, 36(1): 3-9.
- [9] 陈金海, 胡万里, 程蓓. 雌/雄激素比例变化对大鼠前列腺基质细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *武汉大学学报(医学版)* 2012, 33(5): 623-6.
- [10] Zhou Y, Xiao X Q, Chen L F, et al. Proliferation and phenotypic changes of stromal cells in response to varying estrogen/androgen levels in castrated rats [J]. *Asian J Androl*, 2009, 11(4): 451-9.
- [11] 杨佳佳, 张贤生, 高晶晶, 等. 小剂量睾酮补充治疗男性迟发性性腺功能减退症合并代谢综合征的临床研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2014, 49(6): 815-9.
- [12] Lee K L, Peehl D M. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia [J]. *J Urol* 2004, 172(5 Pt1): 1784-91.
- [13] Gao F, Yang M, Luo C L, et al. Local insulin-like growth factor-1 of ventral prostate was upregulated during long-term castration and may function through the autocrine system [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2011, 14(2): 136-42.
- [14] Tao Y, Pinzi V, Bourhis J, et al. Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway-therapeutic perspectives in cancer [J]. *Nat Clin Pract Oncol* 2007, 4(10): 591-602.
- [15] Cheng I, Stram D O, Penney K L, et al. Common genetic variation in IGF1 and prostate cancer risk in the Multiethnic Cohort. [J]. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98(2): 123-34.

Expression of IGF-1 and IGF-1R in SD rat prostate tissue

Xiong Yu, Huang Tao, Wu Kui, et al

(Dept of Urology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To study different diet and testosterone propionate on SD rat prostatic tissue changes and insulin-like growth factor (insulin-like growth factor, IGF)-1, IGF-1R expression of strength. **Methods** High fat and high-sugar diet after subcutaneous injection of testosterone propionate castrated prostatic hyperplasia model construction. All were killed 40 days later, removed the prostate tissue, weighed and HE staining prostatic hyperplasia cases were detected by immunohistochemistry in prostate tissue IGF-1, IGF-1R expression intensity. **Results** High fat and high sugar diet group prostatic hyperplasia and IGF-1, IGF-1R expression intensity was higher than normal diet group ($P < 0.05$); high fat and high-sugar diet and low-dose subcutaneous injection of testosterone propionate group obviously prostate hyperplasia, IGF-1, IGF-1R expression intensity were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** High-fat and high-sugar diet low dose of exogenous testosterone supplements can promote the proliferation of rat prostate tissue, IGF-1, IGF-1R and the development of benign prostatic hyperplasia are positively correlated.

Key words high-fat and high-sugar diet; testosterone; prostate index; benign prostatic hyperplasia; IGF-1; IGF-1R