

· 基础研究 ·

双氢睾酮对人外周血内皮祖细胞增殖能力的影响*

刘睿¹, 余明华¹, 曹政², 张鹏¹, 柯青³, 黄铁柱^{1△}

(1. 湖北医药学院基础医学院, 湖北十堰 442000; 2. 湖北医药学院附属太和医院心内科, 湖北十堰 442000; 3. 湖北医药学院附属太和医院肿瘤科, 湖北十堰 442000)

摘要:目的 探讨双氢睾酮(DHT)对人外周血内皮祖细胞增殖能力的影响。方法 采用密度梯度离心法从健康成年男性外周血获得单个核细胞,接种于人纤维连接蛋白包被的培养板。培养 7 d 后,经 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)及 FITC 标记的荆豆凝集素-I(FITC-UEA-I)荧光双染法鉴定正在分化的内皮祖细胞。采用人工计数法和 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法观察浓度为 0 nmol/L(对照组),1 nmol/L DHT 组,10 nmol/L DHT 组,100 nmol/L DHT 组 DHT 对内皮祖细胞增殖能力的影响。结果 与对照组相比,各浓度 DHT 组内皮祖细胞增殖能力明显增强,差异有统计学意义($P < 0.01$);随着 DHT 浓度的升高促进作用逐渐增强,但浓度达 100 nmol/L 时 DHT 对内皮祖细胞增殖能力促进作用有所减弱,但仍明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 在一定浓度范围内,DHT 可呈剂量依赖性增强内皮祖细胞增殖能力。

关键词:前列腺肿瘤;双氢睾酮;内皮祖细胞;增殖能力

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.20.027

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)20-2381-03

Effect of dihydrotestosterone on proliferative ability of human endothelial progenitor cells*

Liu Rui¹, Yu Minghua¹, Cao Zheng², Zhang Peng¹, Ke Qing³, Huang Tiezhu^{1△}

(1. School of Basic Medical Science Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000; 2. Department of Cardiology, Affiliated Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 3. Department of Oncology, Affiliated Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective The purpose of this study is to explore the influence of dihydrotestosterone (DHT) on human endothelial progenitor cells (EPCs) proliferation in vitro. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells were isolated from adult healthy male blood donors. The cells were plated on fibronectin-coated plates and maintained in endothelial growth medium-2 (EGM-2). After 7 days, EPCs were identified by double-positive for Dil AcLDL and FITC-UEA-I under laser scanning confocal microscope (LSCM). In order to study the effect of DHT on EPCs, the cells were incubated with a series of concentrations (0, 1, 10 and 100 nMol/L) of DHT for 24 h. The EPCs proliferation was detected by cell counting and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2h-tetrazolium bromide (MTT) assay. **Results** DHT significantly enhanced the proliferative ability of EPCs with DHT concentration increased ($P < 0.01$). However, as the amount of DHT attained 100 nMol/L, proliferative ability of EPCs decreased to a level which was still significantly higher than that of control group. **Conclusion** DHT can enhance proliferation ability of EPCs with a dose-dependent manner in certain limits in vitro.

Key words: prostatic neoplasms; dihydrotestosterone; endothelial progenitor cells; proliferation ability

在美国,前列腺癌是男性最常见的恶性肿瘤,在中国前列腺癌的发病率较低,但也有逐年增加的趋势,然而至今对前列腺癌尚无有效根治方法^[1-2]。众多研究表明,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)参与肿瘤微血管网的形成,在肿瘤新生血管形成过程中发挥着重要作用^[3-4]。前列腺癌的发展与转移与其他实体瘤一样,需要肿瘤周围新生的血管提供氧气和营养,已有研究表明雄激素可通过调节男性体内内皮细胞的功能促进缺血组织新生血管的形成^[5]。在此基础上,作者推测,雄激素也可能通过调节 EPCs 的功能,从而在一定程度上起到促进前列腺癌周围新生血管形成作用。为证实这一假说,本研究主要观察了双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)对早

期 EPCs 增殖能力的影响,为前列腺癌的预防及治疗提供新的思路和依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 健康成年男性志愿者外周血 10 例(年龄小于或等于 40 岁),20~50 毫升/例。人淋巴细胞分离液购自 Sigma 公司,人纤维连接蛋白购自 Millipore 公司,EGM-2 培养基购自 Lonza 公司,Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)购自 Molecular Probe 公司,FITC 标记的荆豆凝集素-I(FITC-UEA-I)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的分离与培养 利用密度梯度离心法分离成年

* 基金项目:湖北医药学院 2011 年度研究生启动基金资助计划项目(2011QDZR-17);湖北省教育厅重点项目(D20092403);湖北省高校优秀中青年科技创新团队项目(T201008)。作者简介:刘睿(1986~),助教,硕士,主要从事激素的血管生物学作用研究。△ 通讯作者, Tel: 13872799888; E-mail: HTZ0212@163.com。

健康男性外周血,获得单个核细胞,等量接种于人纤维连接蛋白包被的培养板,置于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 4 d,换液后继续培养至第 7 d,用 PBS 液洗去非贴壁细胞,以供下一步实验使用。

1.2.2 EPCs 鉴定 观察所接种单个核细胞的形态学改变,并在共聚焦显微镜下观察 EPCs 摄取 DiI-acLDL 以及结合 FITC-UEA-I 的特性。细胞形态呈梭形且经 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-I 双染为阳性的细胞被认为是正在分化的 EPCs。

1.2.3 实验分组 将培养至第 7 天的 EPCs 随机分为 4 个实验组干预 24 h: EPCs 培养液中加入 1/1 000 的 DMSO,作溶剂对照,为对照组;不同 DHT 浓度(1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L)作用的 EPCs 分别分组为 1 nmol/L DHT 组、10 nmol/L DHT 组、100 nmol/L DHT 组。

1.2.4 不同浓度 DHT 对 EPCs 增殖能力检测 将分离的单个核细胞等量接种于纤维连接蛋白包被的培养板,培养至第 7 天的 EPCs,换液后按照上述分组方法,分别加入不同浓度 DHT 置于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24 h。重新将等量 EPCs 接种于纤维连接蛋白包被的 96 孔培养板,各浓度组均做 3 个复孔,并设空白对照孔(含培养液、药物溶解介质、细胞共

200 μL)、调零孔(培养液 200 μL),37 ℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,每孔加入 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT]溶液(5 mg/mL)20 μL,继续培养 4 h,弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,于微量振荡器震荡 10 min,酶标仪波长 490 nm 处测各孔溶液吸光度值。DHT 对 EPCs 增殖能力的影响可用人工计数法重复验证。培养 7 d 的 EPCs,加入不同浓度 DHT 置于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,用人工计数法观察不同浓度 DHT 对 EPCs 数量的影响。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较用方差分析,组间两两比较用 q 检验;检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EPCs 的鉴定 刚接种的细胞呈圆形;培养 4 d 后,大部分贴壁细胞呈椭圆形,并有部分梭形细胞;培养至第 7 天,镜下见大量梭形细胞。能够摄取 DiI-acLDL 的细胞发红色荧光,能够结合 FITC-UEA-I 的细胞发绿色荧光,DiI-acLDL 和 FITC-UEA-I 双染阳性的细胞呈黄色荧光,被认为是正在分化的 EPCs,见图 1。

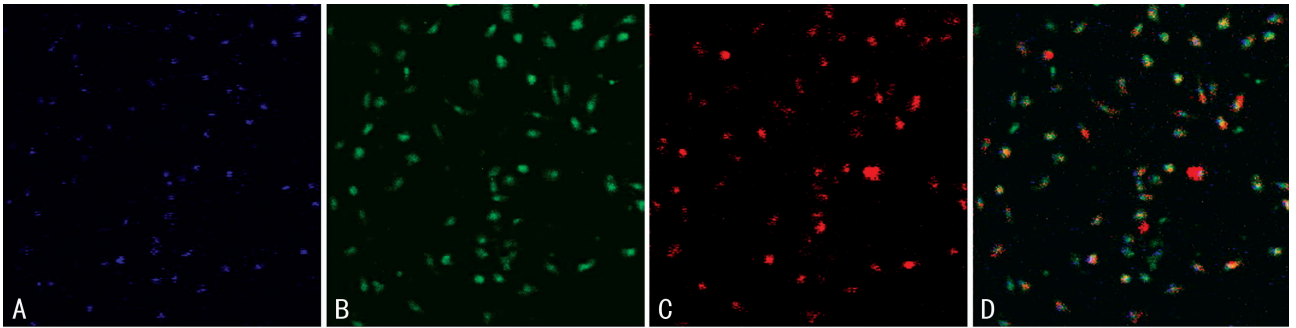


图 1 DAPl 染为蓝色的细胞核;B:FITC-UEA-I 染色阳性细胞,呈绿色;C:DiI-acLDL 染色阳性细胞,呈红色;D:DiI-acLDL 及 FITC-UEA-I 荧光双染阳性细胞。

图 1 正在分化的 EPCs 鉴定图

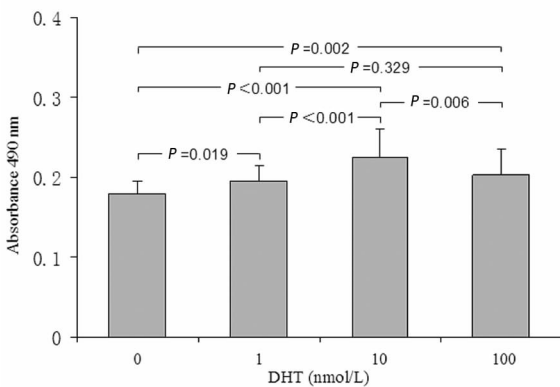


图 2 不同浓度 DHT 对 EPCs 增殖能力的影响

2.2 DHT 对 EPCs 增殖能力的影响 培养 7 d 的 EPCs,不同浓度 DHT 干预 24 h 后,采用 MTT 比色法分析比较不同浓度组 EPCs 增殖能力差异。结果显示,1 nmol/L DHT 组较对照组 EPCs 增殖能力显著增强,差异有统计学意义($P<0.05$);10 nmol/L DHT 组作用更加明显,差异有统计学意义($P<0.01$);100 nmol/L DHT 组作用效果不如 10 nmol/L DHT 组,但较对照组仍显著增强 EPCs 增殖能力,差异有统计学意

义($P<0.05$)($n=10$),见图 2。

2.3 人工计数法观察不同浓度 DHT 对 EPCs 细胞数量的影响 培养 7 d 后的 EPCs,分别加入不同浓度的 DHT 干预 24 h,结果显示,1 nmol/L DHT 组较对照组 EPCs 细胞数量显著增加($P<0.05$);10 nmol/L DHT 组较对照组增加更加明显($P<0.01$);100 nmol/L DHT 组作用效果不如 10 nmol/L DHT 组,但仍显著增加 EPCs 细胞数量($P<0.05$),见图 3。

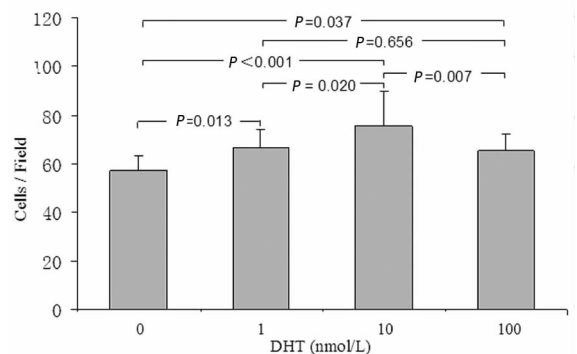


图 3 不同浓度 DHT 对 EPCs 数量的影响

3 讨 论

本研究观察了雄激素 DHT 对人外周血 EPCs 在体外培养过程中增殖能力的影响,实验结果表明在一定的浓度范围内 DHT 可呈浓度依赖性上调 EPCs 的增殖能力,但当浓度达 100 nmol/L 时,这种促进作用有所下降,但仍明显强于对照组。

目前,雄激素对 EPCs 功能的影响仍存在争议,其焦点主要在于雄激素是否能上调 EPCs 的功能^[6-8]。而导致各项研究出现差异的原因,除了与体外干预所选择 EPCs 的时期、雄激素类别有一定关系外,与实验研究所选用的不同对象(如人和鼠)也有一定关系,因为不同生物种类来源的 EPCs 生物学功能可能不完全一致。

本实验主要观察了雄激素 DHT 对早期 EPCs 增殖能力的影响。研究发现,DHT 可上调体外培养 EPCs 的数量,增强其增殖能力,且随 DHT 浓度增加,这种上调作用逐渐增强。然而,并不是像作者预期所期望的高浓度 DHT 产生对 EPCs 影响会更强,而是随着 DHT 浓度增大到 100 nmol/L 时,其上调 EPCs 增殖能力的作用有所下降,但与对照组相比,其上调作用仍十分明显,这表明 DHT 能够上调 EPCs 的增殖能力,但并不是其浓度越高这种作用越明显,而是在一定浓度范围内,这种上调作用呈剂量依赖性。

EPCs 主要存在于骨髓,是内皮细胞的前体细胞,具有增殖、黏附、迁移等功能,可由骨髓释放入外周血,参与新生血管的形成^[9-11]。肿瘤组织在生长过程中,释放大量细胞因子及化学因子,如 VEGF、FGF、TNF 等,他们可诱导 EPCs 由骨髓释放入外周循环参与肿瘤组织周围新生血管的形成^[12-13]。有研究显示,前列腺癌微血管密度与其临床分期、病理分级、疾病进展以及患者的生存密切相关,去势治疗导致雄激素水平降低后前列腺癌组织微血管密度减少^[14-15]。雄激素水平的降低,一方面减少了雄激素对前列腺癌细胞的刺激,使其生长受到抑制;另一方面可能也会导致前列腺癌的新生血管形成减少,从而抑制癌肿的生长。前者已经得到临床的证实,而后者还没有相关研究支持。因此,雄激素是否在促进前列腺癌新生血管形成中发挥作用以及通过何种机制发挥作用是值得进一步研究的。研究明确雄激素对 EPCs 功能的影响及其机制,将为前列腺癌的预防及治疗提供了新的思路。

参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(4): 225-249.

[2] 李曾,王德林. 前列腺癌干细胞研究进展[J]. *中国癌症杂志*, 2008, 18(8): 634-638.

[3] Zhang HR, Chen FL, Xu CP, et al. Incorporation of endothelial progenitor cells into the neovasculature of malignant glioma xenograft[J]. *Neurooncol*, 2009, 93(2): 165-174.

[4] Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(12): 1546-1558.

[5] Yu J, Akishita M, Eto M, et al. Androgen receptor-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(4): 1822-1828.

[6] Foresta C, Caretta N, Lana A, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells in hypogonadal men [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(11): 4599-4602.

[7] Foresta C, Zuccarello D, De Toni L, et al. Androgens stimulate endothelial progenitor cells through an androgen receptor-mediated pathway [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008, 68(2): 284-289.

[8] Fadini GP, Albiero M, Cignarella A, et al. Effects of androgens on endothelial progenitor cells in vitro and in vivo [J]. *Clin Sci(Lond)*, 2009, 117(10): 355-364.

[9] 赵子鄰,许顶立,郭志刚,等. 内皮祖细胞对心梗后心衰患者心功能改变的影响[J]. *南方医科大学学报: 临床研究版*, 2011, 31(3): 504-507.

[10] Imanishi T, Tsujioka H, Akasaka T. Endothelial progenitor cell senescence--is there a role for estrogen[J]. *Thromb Haemostasis*, 2010, 4(1): 55-69.

[11] 涂昌,兰军,杨银广,等. 冠脉介入治疗对不稳定性心绞痛内皮功能及内皮祖细胞的影响[J]. *海南医学院学报*, 2012, 18(11): 1529-1536.

[12] Furuya M, Yonemitsu Y, Aoki I. III. Angiogenesis: complexity of tumor vasculature and microenvironment [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(16): 1854-1867.

[13] 徐承平,张华蓉,陈飞兰,等. 内皮祖细胞在胶质瘤新生血管中的募集和整合作用[J]. *重庆医学*, 2008, 37(21): 2424-2426.

[14] Cheng L, Zhang SB, Sweeney CJ, et al. Androgen withdrawal inhibits tumor growth and is associated with decrease in angiogenesis and VEGF expression in androgen-independent CWR22Rv1 human prostate cancer model [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(4): 2135-2140.

[15] Hrouda D, Nicol DL, Gardiner RA. The role of angiogenesis in prostate development and the pathogenesis of prostate cancer[J]. *Urol Res*, 2003, 30(6): 347-355.

(收稿日期:2013-01-18 修回日期:2013-04-21)

(上接第 2380 页)

[11] 张尹娜,王文雅,张柳. 降钙素对骨性关节炎关节软骨的作用[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(11): 1393-1395.

[12] Bates DO, Hillman NJ, William S, et al. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors[J]. *J Anat*, 2002, 200(6): 581-597.

[13] John S, Brian L. Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival evidence for an autocrine feedback mechanism[J]. *J Orthop Surg Res*, 2009, 4: 19.

[14] 刘磊. 血管内皮生成因子促进骨折愈合的实验研究[D]. 山东: 山东大学, 2007.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-28)