

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.08.002

环巴胺对良性前列腺增生大鼠 Hedgehog 通路相关因子的影响*

朱文雄¹,袁轶峰^{1△},张 熙²,刘 涛¹,李 博¹,陈其华¹

(1. 湖南中医药大学第一附属医院男科,湖南长沙 410007;2. 湖南省第二人民医院,湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 观察环巴胺对良性前列腺增生(BPH)大鼠 Hedgehog 通路相关因子的影响。**方法** 先利用丙酸睾酮诱导去势大鼠建立 BPH 模型,再将 30 只造模成功的 BPH 大鼠随机分为模型组(BPH 组)和环巴胺组,未造模的 15 只大鼠为正常对照组(Normal 组)。环巴胺组大鼠腹腔注射环巴胺,Normal 组和 BPH 组腹腔注射等剂量生理盐水,1 次/天,连续 7 d。给药结束后处死大鼠,获得各组大鼠的前列腺组织,并对其各项指标的测定。**结果** 与 Normal 组比较,BPH 组和环巴胺组 Ki-67 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$); G_0/G_1 期细胞比例明显减少,S 期细胞比例明显增多,细胞凋亡率明显下降($P<0.05$),Shh、Ptc1、Gli1、TGF- β 、b-FGF、Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平明显升高,Bax mRNA 及蛋白表达水平明显下降(均 $P<0.05$)。与 BPH 组比较,环巴胺组 Ki-67 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$); G_0/G_1 期细胞比例明显增多,S 期细胞比例明显减少,细胞凋亡率明显升高($P<0.05$),Shh、Ptc1、Gli1、TGF- β 、b-FGF、Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平明显下降,Bax mRNA 及蛋白表达水平明显升高(均 $P<0.05$)。**结论** 环巴胺通过阻断 Hedgehog 通路,减少前列腺细胞增殖并促进前列腺细胞凋亡,从而有效抑制 BPH 的进展。

[关键词] 环巴胺;前列腺增生;Hedgehog 通路;前列腺细胞;细胞凋亡

[中图分类号] R697+.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)08-1266-06

Effect of cyclopamine on Hedgehog pathway related factors in rats with benign prostatic hyperplasia*

ZHU Wenxiong¹,YUAN Yifeng^{1△},ZHANG Xi²,LIU Tao¹,LI Bo¹,CHEN Qihua¹

(1. Department of Andrology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. The Second People's Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of cyclopamine on Hedgehog signaling pathway related factors in rats with benign prostatic hyperplasia. **Methods** Firstly, castrated rats were induced by testosterone propionate to establish BPH model, and then 30 successful BPH rats were randomly divided into the model group (the BPH group) and the cyclopamine group (the cyclopamine group), and 15 rats without modeling were served as normal control group (the normal group). Rats in the cyclopamine group were intraperitoneally injected with cyclopamine, and rats in the normal group and the BPH group were intraperitoneally injected with the same dose of normal saline, once a day, for seven consecutive days. After the end of administration, the rats were killed to obtain the prostate tissue of each group, and the indexes were determined. **Results** Compared with the normal group, the expression level of Ki-67 protein in the BPH group and the cyclopamine group increased significantly ($P<0.05$), the proportion of cells in G_0/G_1 phase decreased significantly, the proportion of cells in S phase increased significantly, and the apoptosis rate decreased significantly ($P<0.05$); the expression levels of mRNA and protein of Hedgehog signaling pathway factors such as Shh, Ptc1, Gli1, TGF- β , b-FGF, Bcl-2 mRNA were significantly increased, while the expression levels of mRNA and protein of Bax were significantly decreased (all $P<0.05$). Compared with the BPH group, the expression level of Ki-67 protein in the cyclopamine group decreased significantly ($P<0.05$); the proportion of cells in G_0/G_1 phase was significantly increased, the proportion of cells in S phase was significantly decreased, and the apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$). The expression levels of mRNA and protein such as Shh, Ptc1, Gli1,

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373708);湖南省自然科学基金面上项目(2020JJ4484);湖南省教育厅科学研究项目(19C1429);湖南省中医药科研计划重点项目(2021001);湖南省技术创新引导计划临床医疗技术创新引导项目(2018SK50601)。作者简介:朱文雄(1987—),主治医师,硕士,主要从事中西医结合防治男性病的研究。△ 通信作者,E-mail:yyf10172001@163.com。

TGF- β , b-FGF, Bcl-2 were significantly decreased, while the expression levels of mRNA and protein of Bax were significantly increased (all $P < 0.05$). **Conclusion** Cyclopamine can effectively inhibit the progression of BPH by blocking Hedgehog signaling pathway, reducing the proliferation of prostatic cells, and promoting the apoptosis of prostatic cells.

[Key words] cyclopamine; benign prostatic hyperplasia; hedgehog signaling; prostatic cells; apoptosis

良性前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 是指 1 组由前列腺细胞增生为实质改变而引起的症候群。BPH 为引起中老年男性排尿障碍原因中最为常见的 1 种良性疾病^[1]。其病理学特点为前列腺上皮与间质细胞的过度增生, 前列腺体积增大, 当引起临床症状时则称为临床 BPH。据 1 组国外尸解资料报告显示, 80.1% 40 岁以上男性, 90.5% 80 岁以上男性有组织学 BPH。关于临床 BPH 的发病率, 国内有报告称 60~69 岁的男性有中到重度症状者达到了 60%^[2]。BPH 的主要临床表现为尿频、尿急、排尿踌躇、排尿费力、尿线变低、尿流无力、尿末滴沥、排尿时间延长, 严重时出现尿潴留及急迫性或充盈性尿失禁等。此外, 还可继发血尿、泌尿系感染、膀胱结石及上尿路积水和肾功能损害等严重合并症。因此, 寻找 1 种对 BPH 行之有效的药物对维护中老年患者的健康及提高其生活质量具有重要意义。新近研究发现 Hedgehog 通路在胚胎发育、干细胞自稳态、细胞分化、组织极化和细胞增殖等过程起着非常重要的调控作用, 众多增生性疾病、肿瘤发生都与该通路的异常密切相关。环巴胺是 1 种强大的 Hedgehog 通路阻断剂, 该化合物在前列腺癌治疗中的地位越来越高, 但其对 BPH 的干预作用尚不明确^[3]。本研究旨在探究环巴胺对 BPH 大鼠 Hedgehog 通路相关因子的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

成年雄性 SD 大鼠, 体重 400~450 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK(湘)2019-0006。

1.2 主要试剂与仪器

环巴胺购自以色列 Fermentek 公司。丙酸睾酮购自襄阳华中药业股份有限公司。二甲苯购自上海明投工贸有限公司。苏木素购自上海盈公试剂有限公司。胎牛血清(FBS)购自上海依科赛生物制品有限公司。3,3-二氨基联苯胺购自北京博奥森生物技术有限公司。碘化丙啶(PI)购自美国 Sigma 公司。链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液购自北京中山生物技术有限公司。细胞裂解液购自上海远慕生物科技有限公司。ECL 超敏发光液购自美国 Biomiga 公司。Annexin-V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Biovision 公司。TaqMan MicroRNA Assays Reverse Transcription Primer 购自美国 Applied Biosystems 公司。BCA 试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司。Ki67 单克隆抗体购自南京巴微得生物科技有限公司。

多克隆抗体 Shh、Gli1、Ptc1、b-FGF、TGF- β 、Bax、Bcl-2、GAPDH, 小鼠抗羊 IgG 二抗购自美国 Abcam 公司。光学显微镜购自深圳博视达光学仪器有限公司。流式细胞仪 CytoFLEX 购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.3 BPH 大鼠模型的构建^[4]

先按剂量 40 mg/kg 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠的方式进行麻醉, 对大鼠皮肤进行消毒, 在无菌环境下经阴囊摘除双侧睾丸。术后大鼠恢复 7 d, 于第 8 天选取已去势且状态恢复较好的模型大鼠, 每天按剂量 4 mg/kg 皮下注射丙酸睾酮(将丙酸睾酮溶于植物油中), 持续 30 d。造模成功的评价标准: 穿刺获取前列腺组织, 光镜下可见整个前列腺腺腔充满增生的腺上皮细胞, 腺上皮细胞及间质组织出现了不同程度的增生。

1.4 分组、给药与标本获取

将造模成功的 30 只 BPH 大鼠随机分为模型组 (BPH 组) 和环巴胺组, 未造模的 15 只大鼠作为正常对照组 (Normal 组)。环巴胺组大鼠按剂量 50 mL/kg 腹腔注射 10 μ mol/L 环巴胺, 1 次/天, 连续 7 d; Normal 组和 BPH 组大鼠腹腔注射等剂量生理盐水, 1 次/天, 连续 7 d。给药结束后, CO₂ 处死大鼠, 获得各组大鼠前列腺组织, 对每组大鼠进行以下指标的测定。用分析天平测前列腺组织湿重, 用容积法测各组大鼠前列腺体积, 计算前列腺指数 (PI), PI = 前列腺湿重/体积。所有动物实验均经过相关伦理委员会的批准。

1.5 前列腺细胞的提取、培养

取大鼠的前列腺组织, 前列腺每叶各取部分, D-Hanks 液清洗 2 次后剪碎, 去除肉眼可见的大血管组织, 用 2% 胰蛋白酶室温消化前列腺各叶 30 min, 离心后用 0.06% II 型胶原酶室温消化 15 min, 过滤, 取滤液加细胞培养液混匀, 接种于包被有纤维连接蛋白的培养瓶内, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱内培养。每 48~72 小时换液 1 次。培养液为细胞培养液, 加入 10% 胎牛血清, 添加体积比为 1:100 的胰岛素-转铁蛋白-硒添加物、0.5 μ g/L β -内皮细胞生长因子 (ECGF)、 1×10^5 U/L 青霉素和链霉素双抗。取前列腺移动带组织按上述方法处理, 提取培养前列腺间质细胞。

1.6 免疫组织化学法检测各组大鼠前列腺组织中增殖因子 Ki67 蛋白表达阳性率

取甲醛固定标本, 石蜡包埋, 连续 4 μ m 厚切片。将组织切片放入 60 °C 温箱烘 1 h, 常规二甲苯脱蜡,

梯度乙醇脱水,将切片放入 3% H₂O₂ 中 10 min,蒸馏水洗涤切片,每次 3 min,共 3 次。高压抗原修复 90 s,凉水中冷却到室温,用 PBS 洗涤切片,每次 3 min,共 3 次。滴加 5% 牛血清清蛋白(BSA),37 ℃ 孵育 30 min。取出切片,将其擦干,滴加 Ki67 单克隆抗体(1:200),4 ℃ 下孵育过夜。之后取出切片,PBS 洗涤切片,每次 3 min,共 3 次。滴加含有生物素标记的小鼠抗羊 IgG 二抗(1:1 000)工作液,37 ℃ 孵育 30 min。取出切片,PBS 洗涤切片,每次 3 min,共 3 次。滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液,37 ℃ 孵育 30 min。取出切片,PBS 洗涤切片,每次 5 min,共 3 次。3,3-二氨基联苯胺(DAB)室温显色。在镜下控制反应时间,使用自来水冲洗中止反应。当所有切片均显色后,将其摆放在切片架上,在蒸馏水中浸泡 5 min。切片架浸入苏木素染色 5 min 后,在自来水下冲洗。取出切片架,1% 盐酸乙醇中浸洗 4 s,自来水返蓝 20 min。PBS 代替一抗作为阴性对照,已知的阳性切片作为阳性对照。染色分为阳性和阴性 2 种结果,以细胞质及细胞核内出现棕黄色颗粒状着色判断为阳性,以细胞质及细胞核内无棕黄色颗粒状着色判断为阴性。光学显微镜下观察并摄片:每张切片选取 5 个高倍镜视野(200×),每个视野数 100 个细胞,阳性细胞占比小于 10% 为阴性,阳性细胞占比在 10%~<50% 为阳性,阳性细胞占比大于 50% 为强阳性。

1.7 流式细胞术分析细胞周期和细胞凋亡率

收集细胞,用 0.25 % 胰蛋白酶溶液消化,调整细胞数为 1×10⁶/mL,取 1 mL 细胞液 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,收集细胞,加 PBS 2 mL,再离心,弃上清液后,用预冷的 70% 乙醇溶液固定细胞,4 ℃ 过夜。第 2 天将之前固定好的细胞用 PBS 洗涤 2 次,吸取细胞悬液 100 μL (细胞不少于 1×10⁶/mL),加入 50 mg/L 的 PI 染液(含 RNAase) 1 mL,避光孵育 30 min 后,100 目尼龙网过滤,流式细胞仪记录激发波长在 488 nm 处红色荧光检测细胞周期。Annexin V-FITC/PI 双标染色检测细胞凋亡,细胞处理方法与细胞周期检测方法相同。置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次后离心将细胞重悬于 200 μL 结合缓冲液中,按照 Annexin-V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒的说明,按 1:2:60 比例将 Annexin-V-FITC、PI、HEPES 缓存液配成 Annexin-V-FITC/PI 染液。加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 轻轻混匀,避光室温反应 15 min,加入 300 μL HEPES,用流式细胞仪在激发波长 488 nm 处检测 HEPES 细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.8 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 Hedgehog 通路相关因子的表达水平

TRIzol 法提取各组大鼠前列腺细胞总 RNA,测定总 RNA 的浓度和纯度。按照 TaqMan MicroRNA Assays Reverse Transcription Primer 说明书进行反转录,反应体系 20 μL,将 RNA 模板、Primer Mix、

dNTP Mix、DTT、RT Buffer、HiFi-MMLV 和无 RNA 酶水置于冰上溶解备用。设定反应条件为:42 ℃ 30~50 min (反转录反应),85 ℃ 5 s (反转录酶失活反应)。上述反应获得的 cDNA 中加入 65 μL DEPC 水稀释,并充分混匀,按照以下组分配制 PCR 反应体系:5 μL SsoFast EvaGreen Supermix (2×),0.5 μL 正向引物(10 μmol/L),0.5 μL 反向引物(10 μmol/L),4.0 μL cDNA。Shh、Ptc1、Gli1、成纤维因子(b-FGF)、转化生长因子(TGF-β)、Bcl-2、Bax 和 GAPDH (GAPDH 作为内参) PCR 扩增条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s;30 个循环。各基因引物由华大基因有限公司合成,序列见表 1。实验重复 3 次。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	引物方向	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
Shh	正向	ACCGAGGGCTGGGACGAAGA	20
	反向	ATTTGGCCGCCACCGAGTT	19
Ptc1	正向	TTTGGA CTGCTTCTGGGAAGGG	22
	反向	TTTTTGT TGGGGGCTGTGGC	20
Gli1	正向	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	18
	反向	GTCCAGGCTGGCATCCGACA	20
b-FGF	正向	GAGGAGTTGTGTCTATCAAAG	21
	反向	GTTCGTTTCAGTGCCACATACC	22
TGF-β	正向	CAAGAGGCTGTGTTGVTGTGAATC	23
	反向	GTTGGTTTGAGAAAATCCATCGG	23
Bax	正向	GACCAGGGTGGCTGGGAAGG	20
	反向	GATGGTGAGCGAGGCGGTGA	20
Bcl-2	正向	CCGGCATCTGCACACCTGG	19
	反向	CACA ACTTTGT TTTTCATGGTCCATCC	25
GAPDH	正向	AACGGATTGGTCGTATTGGG	21
	反向	TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT	21

1.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Hedgehog 通路相关蛋白的表达水平

取冻存于-80 ℃的前列腺组织 80 mg (3 组)置于玻璃研磨器中加入 1 mL RIPA 裂解液[裂解液组成:50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、150 mmol/L 氯化钠(NaCl)、5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)、1%乙基苯基聚乙二醇(NP-40)、5 μg/mL 抗蛋白酶肽(Aprotinin)、2 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)],置冰浴上研磨成匀浆;12 000 r/min 4 ℃低温离心 20 min,弃除脂层,取上清液采用 BCA 试剂盒测定每个样品的蛋白浓度,样品与加入上样缓冲液混合,100 ℃煮沸 5 min,冰浴、离心后用微量加样器各泳道加入 30 μg 蛋白进行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离,再将凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维

素膜上。5%脱脂奶粉 4℃封闭硝酸纤维素膜过夜。加入稀释的一抗多克隆抗体 Shh、Gli1、Ptc1、b-FGF、TGF-β、Bax、Bcl-2、GAPDH(1:1 000、1:1 500、1:1 500、1:200、1:2 000、1:2 000、1:500、1:2 500) 4℃孵育过夜;次日室温下 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加二抗单克隆抗体 IgG (1:200)孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,添加 ECL 在暗室中显影、定影。使用凝胶分析软件 BandScan 5.0 对内参条带和目的条带进行灰度值检测。细胞蛋白收集步骤:转染 48 h 后收集细胞加入 100 μL RIPA 裂解液,冰浴 30 min,12 000 r/min 4℃低温离心 20 min 收集上清液,后续蛋白定量与电泳实验步骤同上。实验重复 3 次。

1.10 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间的比较采用单因素方差分析;两变量相关性分析采用 Pearson 相关性分析法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组织化学法测 Ki67 蛋白表达情况

免疫组织化学结果显示,与 Normal 组比较,BPH 组和环巴胺组 Ki-67 蛋白表达水平明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 BPH 组比较,环巴胺组 Ki-67 蛋白表达水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 流式细胞术检测细胞周期与凋亡情况

PI 单染色法结果:与 Normal 组比较,BPH 组和环巴胺组 G_0/G_1 期细胞比例明显减少,S 期细胞比例明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 BPH 组比较,环巴胺组 G_0/G_1 期细胞比例明显增多,S 期细胞比例明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Annexin V-FITC/PI 双标染色法检测结果所示:与 Normal 组比较,BPH 组和环巴胺组细胞凋亡率均有明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 BPH 组比较,环巴胺组细胞凋亡率明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

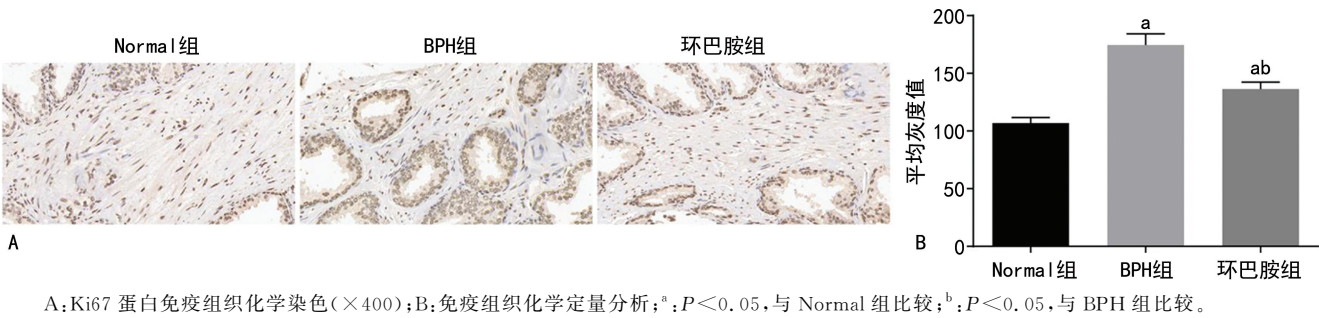


图 1 各组大鼠 Ki-67 蛋白免疫组织化学分析

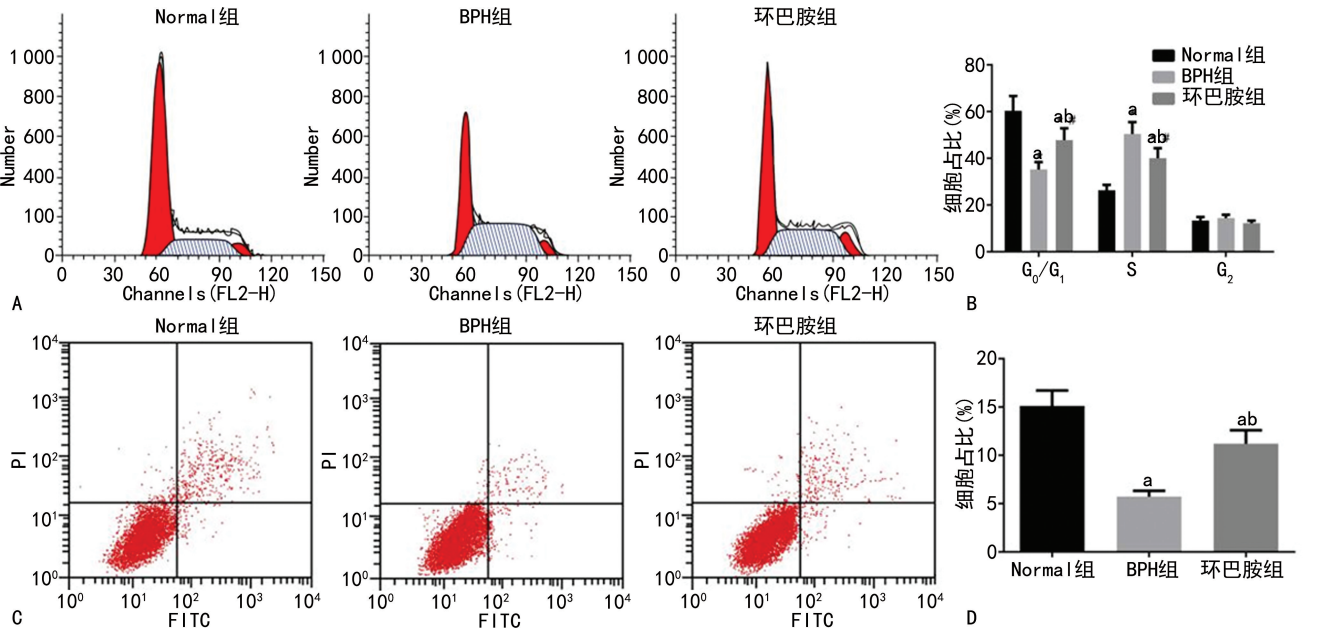


图 2 各组细胞周期及细胞凋亡检测结果分析

2.3 各组大鼠 Shh、Ptc1、Gli1、b-FGF、TGF-β、Bax、Bcl-2 mRNA 的表达水平

RT-qPCR 检测显示,与 Normal 组比较,BPH 组和环巴胺组 Shh、Ptc1、Gli1、TGF- β 、b-FGF、Bcl-2 mRNA 表达水平明显上升,Bax mRNA 表达水平明显下降,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 BPH 组比较,环巴胺组 Shh、Ptc1、Gli1、TGF- β 、b-FGF、Bcl-2 mRNA 表达水平明显下降,Bax mRNA 表达水平明显上升,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 3。

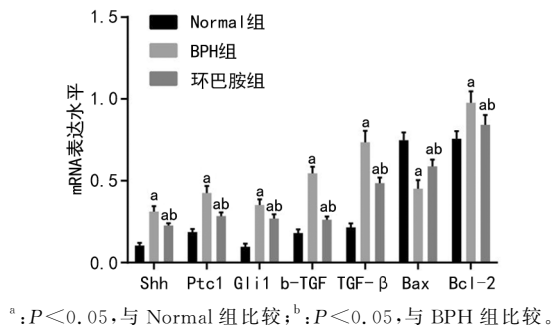
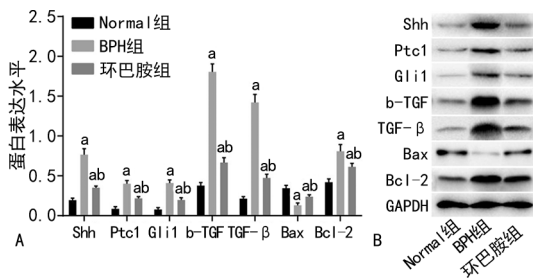


图 3 各组细胞 mRNA 表达水平分析

2.4 各组大鼠 Shh、Ptc1、Gli1、b-FGF、TGF- β 、Bax、Bcl-2 蛋白的表达水平

Western blot 结果显示,与 Normal 组比较,BPH 组和环巴胺组信号通路因子 Shh、Ptc1、Gli1、TGF- β 、b-FGF、Bcl-2 蛋白表达水平明显上升,Bax 蛋白表达水平明显下降,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 BPH 组比较,环巴胺组信号通路因子 Shh、Ptc1、Gli1、TGF- β 、b-FGF、Bcl-2 蛋白表达水平明显下降,Bax 蛋白表达水平明显上升,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 4。



A: Western blot 分析图; B: Western blot 图; ^a: $P < 0.05$, 与 Normal 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 BPH 组比较。

图 4 各组细胞相关蛋白表达水平

3 结 论

BPH 是前列腺上皮与间质细胞的过度增殖性疾病,其发生的具体机制尚不明确,随着人类研究的不断深入,生长因子与细胞凋亡这两大方面越来越得到大家的关注,BPH 很可能就是由于上皮和间质细胞的增殖和细胞凋亡的平衡遭到破坏所引起^[5]。故以调控细胞增殖与凋亡为干预靶点或可为防治 BPH 提供新的治疗途径。近年来,研究发现分泌蛋白 Hedgehog 家族成员在脊椎动物和非脊椎动物的发育中起着至关重要的调控作用,包括细胞增殖、分化和组织的形成等^[6]。如果 Hedgehog 通路失调,会引起多种增生性疾病、先天畸形、恶性肿瘤、肥胖症等。脊椎动物体内发现了 3 种 Hedgehog 家族的成员:Shh、Dhh 和

Ihh,其中 Shh 信号通路的作用最广泛,对人类而言最为主要^[7]。很多研究发现,Shh 及其信号传导系统中的分子在增生前列腺组织中呈高表达^[8]。在前列腺细胞的生长中,Hedgehog 通路已经被证明是正调节剂和增殖刺激物。

Hedgehog 信号通路由分泌型糖蛋白(Hh)配体、2 种主要的膜蛋白受体,即 Ptc (patched) 和 Smo (smoothened)、核转录因子 Gli (Glioma) 和下游靶基因 4 部分组成,通过 1 条复杂的信号转导级联反应来执行它的生物学功能^[9-10]。在脊椎动物的 Shh、Dhh 和 Ihh 3 个同源基因可以编码类似的分泌蛋白即 Hh 配体,其本身并不具有活性,但可以通过自身催化加工的能力经修饰后产生生物学活性。Hh 配体活化后,原本与 Smo 结合以抑制 Smo 活性的 Ptc 与 Hh 配体结合,Ptc-Smo 复合物解离,Smo 进入细胞内。Ptc 是 1 种 12 次跨膜蛋白,有 2 个细胞外结合域和 1 个细胞内结合域,其可分为 Ptc1 和 Ptc2 2 个亚型。环巴胺可以与 Ptc 竞争性地结合 Smo,从而抑制 Smo 的活性。Smo 蛋白是具有 7 个疏水跨膜区的信号转导蛋白,激活的 Smo 可以将信号向下传导,激活 Hedgehog 信号通路的核心部位——含锌指结构的核转录因子,即 Gli,包括 Gli1、Gli2 和 Gli3,随后 Gli 进入细胞核并启动下游目标基因的表达。在没有 Hh 配体参与的情况下,Ptc 与 Smo 结合并抑制 Smo 的活性,核转录因子 Gli 家族的 Gli2、Gli3 处于无活性的 GliR 复合体形式,而 Gli1 的活性形式 Gli1A 则被 Su-fu 蛋白所抑制,需要经过磷酸化后表现出相应的生物学活性^[11-14]。在 Hedgehog 信号通路中,Hh 配体、Smo、Gli 作为激动因子发挥正调节作用,而 Ptc 作为抑制因子发挥负调节作用。在激活转录因子 Gli 基因家族后,Hh 可以调控 VEGF、c-myc、Wnt、TGF- β 、Bcl-2、Bcl-x 等靶基因的表达,维持胚胎的发育、促进自我更新、血管生成、细胞增殖等多种生物学功能^[15-17]。

研究结果显示,环巴胺能够降低 BPH 大鼠 Ki67 蛋白阳性表达率。Ki67 蛋白已被作为诊断和评估正常前列腺组织、前列腺上皮内瘤样病变和前列腺肿瘤患者中细胞增殖活性的有用和有效工具^[18]。其与细胞周期的增殖相关,其过度表达可能牵涉前列腺细胞数量的增加。环巴胺可以降低 Ki67 蛋白的表达。环巴胺能够抑制细胞增殖,使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,并能促进前列腺上皮细胞的凋亡,从而减少上皮细胞的数目。本研究发现,与 Normal 组大鼠比较,BPH 模型大鼠 Shh、Ptc1、Gli1、b-FGF、TGF- β 和 Bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达水平明显增加,而 Bax 的 mRNA 及蛋白表达水平明显下降,表明了激活的 Hedgehog 通路可使细胞增殖增加和细胞凋亡减少。这与环巴胺的治疗使 Hedgehog 通路的激活被抑制,细胞增殖受抑制且细胞凋亡增强的结论一致。Shh、Ptc1、Gli1 是 Hedgehog 通路中的 3 个关键成员,其表达对 BPH

的发展产生重要影响。成纤维因子 b-FGF 和 TGF- β 可诱导和促进 BPH 的上皮细胞增殖。Bcl-2 和 Bax 均属于 Bcl-2 家族,前者是抗凋亡成员,后者是促凋亡成员。环巴胺可以有效阻断 Hedgehog 通路,下调 b-FGF、TGF- β 和 Bcl-2 的表达,增加 Bax 的表达,导致前列腺细胞增殖减少,细胞凋亡增加,BPH 进展受到抑制。

总之,本研究提供的证据表明环巴胺通过阻断 Hedgehog 通路,减少前列腺细胞和增殖并促进前列腺细胞凋亡,从而能够有效抑制 BPH 的进展。未来可以进一步研究环巴胺阻断 Hedgehog 通路干预 BPH 进展的具体机制,并探讨其治疗 BPH 的临床价值。

参考文献

- [1] BUSHMAN W. Etiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia[J]. *Urol Clin North Am*, 2009, 36(4): 403-415.
- [2] 黄健. 中国泌尿外科和男科疾病诊断治疗指南(2019 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2019.
- [3] YANG R, MONDAL G, WEN D, et al. Combination therapy of paclitaxel and cyclopamine polymer-drug conjugates to treat advanced prostate cancer[J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(2): 391-401.
- [4] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 前列腺增生动物模型制备规范(草案)[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 15-19.
- [5] 李宏军, 黄宇烽. 实用男科学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2015: 352.
- [6] INGHAM P W, MCMAHON A P. Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles[J]. *Genes Dev*, 2011, 15(23): 3059-3087.
- [7] CREANGA A, GLENN T D, MANN R K, et al. Scube/You activity mediates release of dually lipid-modified Hedgehog signal in soluble form[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(12): 1312-1325.
- [8] GOETZ S C, ANDERSON K V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 11(5): 331-344.
- [9] HUI C C, ANGERS S. Gli proteins in development and disease[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 27: 513-537.
- [10] MUKHOPADHYAY S, WEN X, RATTI N, et al. The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling[J]. *Cell*, 2018, 152(1/2): 210-223.
- [11] ZHANG S, WANG Y, MAO I H, et al. Inhibition of CK2 α downregulates Hedgehog/Gli signaling leading to a reduction of a stem-like side population in human lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38996.
- [12] CHEN Y, SASAI N, MA G, et al. Sonic Hedgehog dependent phosphorylation by CK1 α and GRK2 is required for ciliary accumulation and activation of smoothened[J]. *PLoS Biol*, 2016, 9(6): e1001083.
- [13] HUMKE E W, DORN K V, MILENKOVIC L. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins[J]. *Genes Dev*, 2018, 24(7): 670-682.
- [14] HSU S H, ZHANG X, YU C, et al. Kif7 promotes hedgehog signaling in growth plate chondrocytes by restricting the inhibitory function of SuFu[J]. *Development*, 2017, 138(17): 3791-3801.
- [15] DORN K V, HUGHES C E, ROHATGI R. A Smoothened-Evc2 complex transduces the Hedgehog signaling at primary cilia[J]. *Dev Cell*, 2012, 23(4): 823-835.
- [16] WEN X, LAI C K, EVANGELISTA M, et al. Kinetics of hedgehog-dependent full-length Gli3 accumulation in primary cilia and subsequent degradation[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(8): 1910-1922.
- [17] MARKS S A, KALDERON D. Regulation of mammalian Gli proteins by Costal 2 and PKA in drosophila reveals Hedgehog pathway conservation[J]. *Development*, 2016, 138(12): 2533-2542.
- [18] ADISA J O, EGBUJO E C, IBRAHIM B, et al. Expression of some selected cytokeratins and Ki67 protein in prostatic tumor: can these be used as tumor markers[J]. *Pan Afr Med J*, 2014, 20(46): 3926.

(收稿日期: 2021-12-23 修回日期: 2022-01-29)