

## 血管抑制因子在前列腺癌及前列腺增生组织中的表达及意义

杨中汉<sup>1</sup>, 李朝阳<sup>2</sup>, 杨霞<sup>1</sup>, 蔡卫斌<sup>1</sup>, 王青松<sup>1</sup>, 周世豪<sup>1</sup>, 邓春华<sup>3</sup>, 高国全<sup>1</sup>, 丘少鹏<sup>3</sup>  
(中山大学 1. 基础医学院生物化学教研室, 2. 中山眼科中心, 3. 附属第一医院泌尿外科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨前列腺增生(BPH)和前列腺癌(PCa)组织中血管增生抑制因子,如视网膜色素上皮细胞源因子(PEDF)、血管抑素(angiotatin)、内皮抑素(endostatin)的表达情况及其血管依赖性生长的分子机制。【方法】收集正常前列腺、前列腺增生和前列腺癌组织标本,RT-PCR技术检测样品中PEDF、angiotatin、endostatin的mRNA表达量,Western blot技术检测样品中PEDF蛋白的表达量。【结果】和正常前列腺组织相比,PEDF表达量在BPH中无明显变化( $P > 0.05$ ),在前列腺癌中普遍显著下降( $P < 0.05$ );良性前列腺增生组织中endostatin表达量较正常前列腺组织显著升高( $P < 0.05$ ),前列腺癌比正常前列腺显著升高( $P < 0.05$ ),而且前列腺癌组织较良性前列腺增生进一步显著增高( $P < 0.05$ );三种组织中均未检测到angiotatin的表达。【结论】良性前列腺增生及前列腺癌组织抑制因子表达变化可能和其血管依赖性生长相关;PEDF可能是前列腺组织最主要的血管增生内源性抑制因子。

关键词:前列腺增生;前列腺癌;血管增生;抑制因子

中图分类号:R697.3

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)02-0126-04

### Expression of Angiogenic Inhibitors in Benign Prostate Hyperplasia and Prostate Cancer

YANG Zhong-han<sup>1</sup>, LI Chao-yang<sup>2</sup>, YANG Xia<sup>1</sup>, CAI Wei-bin<sup>1</sup>, WANG Qing-song<sup>1</sup>, ZHOU Shi-hao<sup>1</sup>,  
DENG Chun-hua<sup>3</sup>, GAO Guo-quan<sup>1</sup>, QIU Shao-peng<sup>3</sup>

(1. Department of Biochemistry, Preclinical Medical College, 2. Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-Sen University, 3. Department of Urology, First Affiliated Hospital, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To evaluate the expression of angiogenic inhibitors such as pigment epithelium-derived factor(PEDF), angiotatin, and endostatin in benign prostate hyperplasia(BPH) and prostate cancer(PCa) and to discuss the molecular mechanism of angiogenic-dependent growth in BPH and prostate cancer.【Methods】Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) was used for detecting PEDF, angiotatin, and endostatin mRNA levels in the specimens from normal prostate( $n = 5$ ), BPH( $n = 5$ ), and prostate cancer( $n = 5$ ) tissues. Western blot analysis was used for detecting PEDF protein levels in the specimens.【Results】mRNA level of PEDF decreased in PCa tissues( $P < 0.05$ ) compared with normal prostate tissues. There was no significant difference between normal and BPH tissues( $P > 0.05$ ). mRNA level of endostatin was higher in BPH tissues than in the normal tissues( $P < 0.05$ ), and even higher in PCa tissues( $P < 0.05$ ). It was also higher in PCa tissues than in the BPH tissues( $P < 0.05$ ). Angiotatin mRNA level was not detected in all tissues.【Conclusions】The expression of angiogenic inhibitors in the BPH and PCa tissues may be correlated with their angiogenic-dependent growth, and PEDF may be the most dominant anti-angiogenic inhibitor in prostate tissues.

Key words: benign prostate hyperplasia; prostate cancer; neovascularization; angiogenic inhibitors

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):126-129]

在肿瘤微环境中,血管新生因子是由肿瘤细胞或其他细胞产生的信号分子,在肿瘤血管的生

成中发挥调节作用;血管增生是由于血管增生刺激因子和抑制因子这两种正负调节因素平衡紊乱

收稿日期:2005-09-19

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371426,30370313);广州市科技攻关计划基金资助项目(2005Z3-E4031);教育部留学回国人员科研基金资助项目(2003);美国中华医学会(CMB)基金资助项目(CMB98-677);广东省医学科学基金资助项目(B2004030)

作者简介:杨中汉(1975-),男,湖南桃源人,博士生,讲师;丘少鹏,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail:urlogy@vip.163.com

的结果<sup>[1,2]</sup>。血管增生抑制因子,例如色素上皮细胞源因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)、血管抑素(angiotatin)和内皮抑素(endostatin)血管能强烈抑制血管新生并进而抑制肿瘤的生长<sup>[3,4]</sup>,但它们在前列腺癌及前列腺增生组织中表达情况及其意义尚未明确。为此,本研究采用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测和半定量分析了它们在前列腺癌及良性前列腺增生组织中表达情况,旨在初步探讨良性前列腺增生及前列腺癌血管依赖性增生的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本及来源

青年男子正常前列腺组织 5 例, BPH 标本 5 例。BPH 临床诊断依据包括 IPSS 评分、前列腺体积和尿流动力学检查,病理诊断并排除前列腺癌(prostate cancer, PCa)。前列腺癌 5 例,均来自前列腺穿刺活检和根治性前列腺切除标本并经病理诊断证实。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及逆转录 取组织标本 100 mg, Trizol 一步法提取总 RNA,溶于 DEPC 水,紫外分光光度计测 A<sub>260</sub> 及 A<sub>280</sub> 值。总 RNA 定量后用于 cDNA 合成。cDNA 合成(50 μL 反应体系):取 3 μg 总 RNA,加随机引物 Random Hexamers(500 mg/L, Promega 公司) 2 μL、加 DEPC 处理水至终体积 25 μL,85 温浴 10 min,冰上冷却后再加 10 μL 5 × 逆转录酶(M-MLV) buffer、2.5 μL dNTPs(10 mmol/L)、0.5 μL RNA 酶抑制剂(30 U/μL)、1 μL M-MLV(200 U/μL, Promega 公司),37 孵育 1.5 h,95 灭活 5 min 后-20 保存;所得逆转录产物用于 PCR 扩增。

1.2.2 PCR 扩增 PEDF、endostatin、angiotatin 和 -actin 基因的 PCR 扩增(50 μL 反应体系),取 2 μL 逆转录产物,加 4 μL MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)、5 μL 10 × buffer、1 μL dNTPs(10 mmol/L)、2 μL 引物(50 μmol/L)、0.5 μL Taq 酶,双蒸水补至终体积 50 μL。根据 GenBank 数据库中基因序列,经计算机辅助设计,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 4 对引物。PEDF: sense primer 5' AAA TCC AGC TTT GTG GCA CCT C 3', 位于 exon6; antisense primer 5' ACG GTC TTC AGT TCT CGG TCT A 3', 位于 exon7, 扩增片段长度为 473 bp;

endostatin sense primer 5' CCG TGC CCA TCG TCA ACC TCA A 3', 位于 exon41; antisense primer 5' ACG ATG TAG GCG TGA TGG CAG C 3', 位于 exon43, 扩增片段长度为 310 bp; angiotatin(plasminogen K1-4) sense primer 5' TAT CGC GGG AAT GTG GCT GTT AC 3', antisense primer 5' TTG TCA GGC CAG CAT TTG GGT AG 3', 该引物分别设计在 K3 和 K4 上,中间包含有 3 个(H、I、J)内含子, sense primer 序列在外显子 8; antisense primer 序列在外显子 9 和 10 上,扩增片段长度为 421 bp; 内参照 -actin: sense primer, 5' TCA TCA CCA TTG GCA ATG AG 3', 位于 exon4; antisense primer 5' CAC TGT GTT GGC GTA CAG GT 3' 位于 exon5,从 RNA 模板扩增的产物长 155 bp,从 DNA 模板扩增产物长 250 bp。反应条件为 94 变性 45 s,55 退火 45 s,72 延伸 60 s,共 35 个循环,72 延伸 300 s。反应完成后取 5 μL PCR 产物,进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳。溴乙锭染色后于紫外透射仪上观察电泳结果。采用 GeneGenius 凝胶图像分析系统摄取图片和获取荧光光密度值, GeneTool 软件进行浓度的定量分析。

1.2.3 Western blot 检测 PEDF 蛋白表达量变化 取手术后鉴定过的组织块,称量后加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris·HCl, 体积分数 1% Triton X-100, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT 和蛋白酶抑制剂),匀浆、超声破碎后,将组织匀浆液加热变性,高速离心后取上清液,DC 法测量蛋白质浓度。在 Bio-Rad 垂直电泳仪中灌注质量分数 12% 分离胶和质量分数 5% 浓缩胶,加入不同组样本,稳压 120 V 电泳 90 min,然后在转膜仪上将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,稳压 100 V 转移 60 min,取出膜后用 7% 脱脂牛奶封闭 60 min,加入 PEDF 一抗(兔抗人, Cell Signaling, 1:1000)4 过夜,次日加入抗兔二抗孵育 2 h, ECL 化学发光剂作用后在暗室中曝光、显影、定影、观察结果, -actin 为内参照。

### 1.3 统计学方法

采用 t 检验, 检验水准取  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 PEDF 的表达变化

PEDF 在良性前列腺增生(benign prostate hyperplasia, BPH)组织中 mRNA 表达量虽较正常

前列腺组织高,但无显著性意义( $P > 0.05$ )。前列腺癌组织中 PEDF 的 mRNA 表达量均比正常前列腺和 BPH 要低,与正常前列腺组织相比, $P < 0.05$ ,表达量具有显著性差别,与前列腺增生组织相比,无显著性意义( $P > 0.05$ ,图 1)。Western blot 显示,以  $\beta$ -actin 为内参照, PEDF 蛋白表达量在三种组织中表达量依次降低(图 2)。

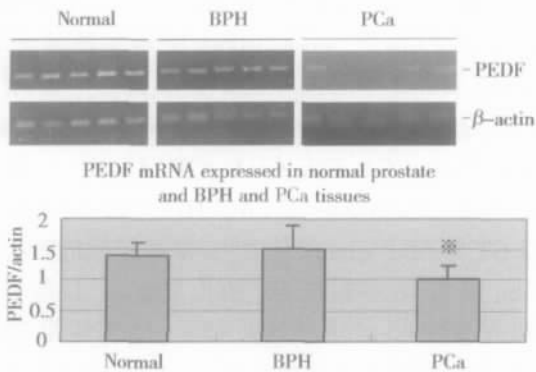


图 1 正常前列腺、良性前列腺增生和前列腺癌组织中 PEDF 的 mRNA 表达量

Fig.1 The expression of PEDF mRNA in normal prostate, BPH, and PCa tissues

mRNA was measured by RT-PCR and showed by agarose gel electrophoresis. BPH: benign prostate hyperplasia; PCa: prostate cancer; \*: Compared with normal,  $P < 0.05$

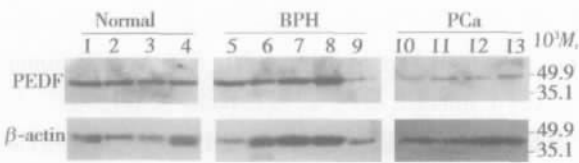


图 2 正常前列腺、良性前列腺增生和前列腺癌组织中 PEDF 蛋白的表达量

Fig.2 The expression of PEDF protein in normal prostate, BPH and PCa tissues.

Protein was measured by Western blot analysis. BPH: benign prostate hyperplasia; PCa: prostate cancer

## 2.2 Endostatin 的表达变化

Endostatin 在正常前列腺、BPH 和前列腺癌组织中均有表达,并且 mRNA 表达量依次增高(图 3),三者间  $P < 0.05$ ,表达量有显著性差别。

## 2.3 Angiostatin 的表达

三种组织中均未见 angiostatin mRNA 的表达。

# 3 讨论

血管增生在人类各种实体瘤的生长和发展中



图 3 正常前列腺、良性前列腺增生和前列腺癌组织中 endostatin 的 mRNA 表达量

Fig.3 The expression of endostatin mRNA in normal prostate, BPH, and PCa tissues.

mRNA was measured by RT-PCR and showed by agarose gel electrophoresis. BPH: benign prostate hyperplasia; PCa: prostate cancer; \*: Compared with normal,  $P < 0.05$  #: Compared with BPH,  $P < 0.05$

起着重要作用。肿瘤病理研究表明,肿瘤的生长是血管依赖性的。采用免疫组织化学技术显示,良性前列腺增生(BPH)和前列腺癌(PCa)中微血管密度(MVD)显著升高,表明其发生与血管增生密切相关,是血管依赖性的。在这两种病变过程中,血管增生起着关键作用,血管增生的强弱影响着 BPH 和 PCa 的发生与发展。

PEDF 作为天然的血管新生抑制剂在两个激素敏感器官前列腺和胰腺中起着关键作用<sup>[5]</sup>。PEDF 缺失,上皮细胞增生,两个器官血管增生显著增加。在前列腺癌组织中 PEDF 的表达量下降,可能与 PEDF 的表达对缺氧和雄激素敏感有关,对血管增生的抑制作用降低,有利于血管依赖性的前列腺癌的发展。用重组 PEDF 处理上皮细胞和前列腺癌上皮细胞可触发它们的凋亡<sup>[3]</sup>。这些结果均显示, PEDF 是前列腺血管增生的关键调节因子, PEDF 可稳定或抑制前列腺癌的血管增生。Wilm's 肿瘤的生长可被 PEDF 直接抑制<sup>[6]</sup>; Zhang 等<sup>[7]</sup>研究显示 PEDF 基因被核酶转基因高友除后的内皮细胞和肺癌细胞其生长得更快,内皮细胞在 PEDF 表达丧失后形成微血管的能力增强; Sidle 等<sup>[8]</sup>用免疫组化技术检测淋巴瘤组织中 VEGF 与 PEDF 的表达量,发现 PEDF 染色较少,而 VEGF 染色增多,而且淋巴瘤反复发样本要无复发样本的 PEDF 活性更低,而本实验也观察到了前列腺癌中 PEDF 表达显著降低的现象,提示

PEDF可能是前列腺组织最主要的血管增生内源性抑制因子, PEDF 具有治疗前列腺癌的潜在临床价值。

本研究观察到前列腺癌组织中 endostatin mRNA 水平表达升高。Andrew 等<sup>[9]</sup>报道肾癌患者血清中 endostatin 平均水平也比正常人要高, 而且肾癌患者血清中 endostatin 与 VEGF 成正相关关系。肿瘤组织或血清 endostatin 表达水平增高的机制可能是由于: 在多种肿瘤组织中, VEGF 表达升高, 促进肿瘤组织中多种胶原酶表达上调<sup>[10]</sup>, 而 endostatin 是 I 型胶原 C 端的一个水解片段, 胶原酶表达增多可以促进 endostatin 生成增多。肿瘤组织自身 endostatin 表达上调对肿瘤患者的意义尚不明确, endostatin 等血管增生抑制因子这种代偿性增高是否反过来拮抗刺激因子 VEGF 等的作用, 以恢复或部分纠正血管增生的平衡失调值得进一步探讨。

本研究在正常前列腺、前列腺癌及良性增生组织中均未检测到 angiostatin mRNA 的表达。国外研究报道<sup>[11]</sup>也表明, 肿瘤细胞内无 angiostatin mRNA 表达, 但却能检测到 angiostatin 蛋白的存在。Migita 等<sup>[12]</sup>研究前列腺癌中 angiostatin 的生成和定位时报道, 前列腺癌细胞裂解上清液与外源纯化的 angiostatin 的前体蛋白纤溶酶原(plasminogen)共育时能产生 angiostatin 片段, 无外源性纤溶酶原不能产生 angiostatin 片段。免疫组化技术在前列腺癌萎缩腺体及血管内血清中检测到纤溶酶原, 而在前列腺肿瘤细胞中却检测不到。肿瘤细胞表达一种组织蛋白酶 cathepsin D<sup>[13]</sup> 以及基质金属蛋白酶(metalloproteinase-2)<sup>[11]</sup>, 能水解 plasminogen 生成 angiostatin。以上结果显示肿瘤细胞自身因产生 angiostatin 前体蛋白的 plasminogen 基因不表达, 所以肿瘤细胞内不能检测到 angiostatin 的 mRNA 表达, 但肿瘤细胞可通过分泌基质金属蛋白酶等将结合在细胞表面的纤溶酶原水解成 angiostatin, 并通过胞吞或其他机制将水解产物 angiostatin 转运至胞浆内, 因而可在肿瘤细胞内检测到 angiostatin 蛋白的存在。肿瘤细胞内吞 angiostatin 是否具有抗肿瘤作用尚待明确。

#### 参考文献:

- [1] GAO G Q, LI Y, MA J X, et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization[J]. FEBS Letters, 2001, 489(2-3): 270-276.
- [2] GAO G Q, LI Y, GEE S, et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor [J]. J Biol Chem, 2002, 277(11): 9492-9497.
- [3] DAWSON D W, VOLPERT O V, GILLIS P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis[J]. Science, 1999, 285(3425): 245-248.
- [4] SIM B K. Angiostatin and endostatin: endothelial cell-specific endogenous inhibitors of angiogenesis and tumor growth[J]. Angiogenesis, 1998, 2(1): 37-48.
- [5] DOLL J A, STELLMACH V M, BOUCK N P, et al. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas [J]. Nat Med, 2003, 9(6): 774-780.
- [6] ABRAMSON L P, STELLMACH V, DOLL J A, et al. Wilms tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model [J]. J Pediatr Surg, 2003, 38(3): 336-342.
- [7] ZHANG L, CHEN J, KE Y, et al. Down-regulation of PEDF expression by ribozyme transgene in endothelial and lung cancer cells its impact on angiogenesis in vitro [J]. Oncol Rep, 2005, 14(6): 1615-1619.
- [8] SIDLE D M, MADDALOZZO J, MEIER J D, et al. Altered pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor levels in lymphangioma pathogenesis and clinical recurrence [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2005, 131(11): 990-995.
- [9] FELDMAN A L, TAMARKIN L, PACIOTTI G F, et al. Serum endostatin levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with stage clear cell renal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(12): 4628-4634.
- [10] KUGLER A, HEMMERLEIN B, THELEN P, et al. Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma [J]. J Urol, 1998, 160(5): 1914-1918.
- [11] O REILLY M S, WIEDERSCHAIN D, STETLER-STEVENSON W G, et al. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance [J]. J Biol Chem, 1999, 274(41): 29568-29571.
- [12] MIGITA T, ODA Y, NAITO S, et al. The accumulation of angiostatin-like fragments in human prostate carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(9): 2750-2756.
- [13] MORIKAWA W, YAMAMOTO K, ISHIKAWA S, et al. Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275(49): 38912-38920.

(编辑 张敏瑞)