

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0011

文章编号 1671-8852(2026)03-0306-09

LGR4 通过调控雄激素受体及雌激素受体 α 表达 影响良性前列腺增生症

仇继璋¹ 赵艺乔¹ 张新华^{1,2}

¹武汉大学中南医院泌尿外科 湖北 武汉 430071;

²武汉大学泌尿外科研究所 湖北 武汉 430071

摘要 目的:探讨富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 4(LGR4)对良性前列腺增生(BPH)的影响。方法:在人前列腺组织、BPH-1 和 WPMY-1 细胞系中,采用实时荧光定量 PCR、Western Blot 和免疫荧光染色检测 LGR4 的表达量及定位。BPH-1 和 WPMY-1 细胞系中敲低或过表达 LGR4 后,细胞计数试剂盒-8 和流式细胞仪分析检测细胞增殖活力和凋亡率,Western Blot 检测细胞凋亡相关蛋白。基因型-组织表达(GTEx)数据库中分析人前列腺 LGR4、雄激素受体(AR)和雌激素受体 α (ER α)表达量的相关性,Western Blot 检测敲低或过表达 LGR4 后 BPH-1 和 WPMY-1 细胞的 AR、ER α 表达量。结果:人增生前列腺中,LGR4 表达增加,且 AR、ER α 表达量与 LGR4 正相关。LGR4 上调 BPH-1 和 WPMY-1 中 AR 与 ER α 表达,并促进细胞增殖,抑制细胞凋亡。结论:LGR4 可能通过上调前列腺中 AR 和 ER α 的表达而促进 BPH 发展。

关键词 良性前列腺增生; LGR4; 雄激素受体; 雌激素受体 α ; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号 R393

文献标志码 A

LGR4 affects benign prostatic hyperplasia by regulating the expression of androgen receptor and estrogen receptor α

QIU Jizhang¹, ZHAO Yiqiao¹, ZHANG Xinhua^{1,2}

¹Department of Urology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China;

²Institute of Urology, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the effect of Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 (LGR4) on benign prostatic hyperplasia (BPH). **Methods:** Human prostate tissues, BPH-1 and WPMY-1 cell lines were used to detect LGR4 expression and localization by RT-qPCR, Western Blot and immunofluorescence staining. Cell viability and apoptosis rate were determined by cell counting kit-8 and flow cytometry respectively, apoptosis-related proteins were detected by Western Blot after LGR4 was knocked down or overexpressed in BPH-1 and WPMY-1 cell lines. The correlation of expression levels of LGR4, androgen receptor (AR) and estrogen receptor α (ER α) in human prostate was analyzed in Genotype-Tissue Expression (GTEx) database. The levels of AR and ER α expression in BPH-1 and WPMY-1 cells after LGR4 knockdown or overexpression were detected by Western Blot. **Results:** LGR4 was upregulated in human hyperplastic prostate tissue, and AR and ER α expression were positively correlated with LGR4. LGR4 increased the expression of AR and ER α , promoted cell proliferation, and

作者简介:仇继璋,男,1999—,医学硕士生,主要从事良性前列腺增生的研究,E-mail:604493674@qq.com。

通信作者:张新华,E-mail:zhangxinhua@163.com。

inhibited cell apoptosis in BPH-1 and WPMY-1. **Conclusion:** LGR4 may promote the development of BPH by up-regulating the expression of AR and ER α in the prostate.

Key Words Benign Prostatic Hyperplasia; LGR4; Androgen Receptor; Estrogen Receptor α ; Cell Proliferation; Apoptosis

良性前列腺增生症(benign prostate hyperplasia, BPH)是老年人常见的非恶性疾病,其患病率随着年龄的增长而增加。大约50%的60岁以上男性和80%的70岁以上男性患有BPH^[1]。下尿路症状(lower urinary tract symptoms, LUTS)通常归因于BPH,这一症状会显著影响生活质量和增加经济负担^[2-3]。为了阐明BPH的发病机制,人们提出了多种假说,包括雄激素/雌激素失衡、基质-上皮相互作用、生长因子、前列腺张力变化和炎症因子等^[4-6]。其中衰老和性激素失衡被认为是BPH发生的重要因素^[1]。普遍认为,雄激素受体(androgen receptor, AR)在BPH发病机制中起关键作用。相比较于正常前列腺组织,在人增生前列腺组织中,观察到AR表达水平升高,在临床实践中,阻断AR信号已被证明在治疗BPH中有效,这证实了AR在BPH病理生理学中的重要作用^[7-8]。此外,多条研究证据支持雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)诱导前列腺细胞增殖而促进BPH发生发展^[9]。

富含异亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体(leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors, LGRs)是G蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptors, GPCR)家族中一组高度保守的蛋白^[10]。作为LGRs的家族中的一员,LGR4通过促进细胞增殖、分化、细胞迁移和上皮-间质转化而参与到多种组织器官的发育过程中^[10-12]。在前列腺中,LGR4通过激活Wnt/ β -catenin通路调节前列腺干细胞的增殖和分化功能而促进小鼠前列腺发育^[13]。有研究^[14]表明,LGR4与雌、雄激素受体的表达均有相关。在小鼠睾丸中的肾小管周围肌样细胞,LGR4通过调控Wnt/ β -Catenin信号通路促进AR的表达。在小鼠附睾发育的过程中,LGR4的缺失抑制ER α 的表达^[15]。然而LGR4在BPH中的影响并无报道。因此,本研究旨在探讨LGR4对前列腺中AR及ER α 的调节作用,及其对BPH的影响。

1 材料与方法

1.1 人类前列腺组织收集 收集在武汉大学中南医院行器官捐献的8例年轻脑死亡男性患者[平均

年龄(28.2 $\pm$ 4.4)岁]的前列腺作为正常对照。收集在武汉大学中南医院泌尿外科行经尿道前列腺切除术的14例BPH患者[平均年龄(69.4 $\pm$ 5.7)岁]的前列腺标本及临床资料。术后病理检查证实为前列腺增生。所有样本均由捐赠者或其近亲属在捐赠前签署器官捐赠知情同意后授予研究用途。将前列腺组织分为两部分,一部分保存在液氮中以备后续进行实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和Western Blot分析,另一部分固定在4%中性缓冲甲醛溶液中以备后续进行组织学检测。所有人体标本的收集和处理均遵循经批准的伦理委员会指导方针和《赫尔辛基宣言》中的原则。

1.2 免疫荧光染色 将组织切成5 μ m厚的切片,用低温恒温器(Leica cm 1850, Wetzlar, 德国)将组织解冻,并置于载玻片上。组织风干后,切片在冰丙酮中固定30 min。组织载玻片在含有0.2% Triton X-100和0.1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中孵育2 h,然后与一抗孵育过夜。随后将组织载玻片冲洗3次,每次5 min。在细胞免疫荧光染色实验中,先在6孔板上,用边长为12 mm的正方形盖玻片培养前列腺细胞,再用PBS清洗3次。用4%多聚甲醛固定30 min后,用0.1% Triton X-100室温孵育5 min,再用10% BSA封闭1 h。之后,在4 $^{\circ}$ C条件下用一抗孵育细胞过夜,随后将细胞盖玻片冲洗3次,每次5 min。将组织和细胞在一抗中孵育过夜并冲洗后,用Cy3标记或FITC标记的二抗在室温中孵育1 h。然后用2 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)进行细胞核染色。最后,使用激光扫描共聚焦荧光显微镜(奥林巴斯株式会社,日本)观察染色组织或细胞。所用一抗及二抗分别列于表1和表2。

1.3 细胞培养 人良性前列腺增生上皮细胞系BPH-1(货号BNCC339850)购买于武汉Procell有限公司。人SV40大t抗原永生化基质细胞系WPMY-1(货号GNHu36)购自中国科学院上海干细胞库。PMI-1640(Gibco, 美国)和Dulbecco's改良Eagle's培养基(DMEM, Gibco, 美国)中各加入10%胎牛血清(FBS, Gibco, 美国)后,分别用于培养BPH-1和WPMY-1细胞。细胞在湿度为95%和空气CO₂

表 1 用于免疫荧光染色或 Western Blot 的一抗

抗体	货号*	稀释比例
AR	A19611	1:1 000 (Western Blot)
Bax	A12009	1:1 000 (Western Blot)
Bcl-2	A11025	1:1 000 (Western Blot)
ER α	A12976	1:1 000 (Western Blot)
LGR4	A12657	1:1 000 (Western Blot); 1:50 (免疫荧光染色)
GAPDH	AC027	1:10 000 (Western Blot)

*均为 Abclonal 公司产品。

浓度为 5% 的 37 ℃环境中培养。

1.4 总 RNA 提取、逆转录和 RT-qPCR 分析 使用 Cell RNA Extraction Kit (Vazyme, 中国)试剂盒提取总 mRNA,并使用 NanoPhotometer 分光光度计(Thermo,美国)在 260~280 nm 处测量其吸光度,以确定所提取的 RNA 浓度。使用 Hiscript II Q Select RT Kit (Vazyme,南京)对 mRNA 进行逆转录,生成 cDNA,并依据 iTaq™ Universal SYBR Green Super-mix (Vazyme,南京)的使用说明进行 RT-qPCR,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法比较基因表达水平。mRNA 表达水平由 GAPDH 进行标准化。所用引物序列列于表 3。

1.5 Western Blot 分析 将组织分成小块,加入含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 试剂(Sigma-Aldrich,美国),并用研磨仪研磨得到组织匀浆。在细胞实验中,收集所培养的细胞得到细胞沉淀。细胞沉淀或组织匀浆中加入含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 试剂后,予以超声破碎处理并置于冰上裂解 30 min。随后高速离心机中以 12 000 g 离心 15 min,收集上清。采用比辛胆酸(BCA)法测定蛋

白质含量。随即在收集的蛋白上清液中加入总体积 1/4 的 5×loading 蛋白缓冲液(Vazyme,南京),并转移至已预热至 99 ℃的恒温水浴锅中,水浴加热 10 min,再保存于-20 ℃环境中供后续实验使用。使用 Bio-Rad 湿转移系统,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS/PAGE)凝胶(雅酶生物,上海)分离蛋白质提取物,然后转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF, Millipore,美国)上。用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 2 h,然后在膜上依次孵育一抗和二抗(见表 1 和表 2)。用加强型化学发光试剂盒(Thermo Scientific Fisher,美国)检测反应抗原。蛋白表达水平由 GAPDH 进行标准化。

1.6 LGR4 敲低及过表达细胞模型的建立 靶向 LGR4 的小干扰 RNA (siRNA)生产于中国上海汉恒生物技术公司。按照 siRNA 使用说明,用 Lipofectamine® 2000 (Invitrogen,美国)进行 siRNA 转染,以构建 LGR4 敲低细胞模型。对照组细胞使用阴性对照 siRNA (NC)处理。将细胞置于空气、CO₂ 浓度为 5% 的 37 ℃环境中孵育 6 h,更换新培养基继续孵育细胞 48 h 后,收集细胞进行后续实验。每个 siRNA 的序列见表 4。LGR4 过表达质粒由中国湖南丰晖生物有限公司生产和提供。以空载载体(Vector)为对照。按照制造商的说明,前列腺细胞中分别转染 LGR4 过表达质粒和空载载体,建立 LGR4 过表达模型和空载模型。将细胞置于空气、CO₂ 浓度为 5% 的 37 ℃环境中孵育 6 h,更换新培养基继续孵育细胞 48 h 后,收集细胞进行后续实验。RT-qPCR 分析和 Western Blot 分析检测转染后前列腺细胞的 LGR4 mRNA 和蛋白水平变化。

表 2 用于免疫荧光染色或 Western Blot 的二抗

抗体	供货商	货号	稀释比例
Anti-Rabbit-IgG(H+L)-HRP	Sungene Biotech	LK2001	1:10 000 (Western Blot)
Anti-rabbit IgG(H+L), F(ab') ₂ fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate)	Cell Signaling Technology	no.4412	1:50 (免疫荧光染色)
Hoechst 33342 (1 mg·mL ⁻¹) nucleic acid staining (DAPI)	Molecular Probes/Invitrogen	no.A11007	1:750(免疫荧光染色)

表 3 用于 RT-qPCR 的引物序列

引物名(人)	引物序列(5'—3')	
LGR4	上游	CTTGTTTCAGTTACGGCATCTGT
	下游	CCAGGCTTGAAAGGTTGGTAAAT
GAPDH	上游	ATCCCATCACCATCTTCCAGGAG
	下游	CCTGCTTCACCACCTTCTTGATG

1.7 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)实验 细胞转染 48 h 后收集细胞重新铺板于 96 孔板中,使用 CCK-8 在 0 h、24 h、48 h、72 h 四个时间点检测细胞活力。使用培养基配制的 CCK-8 溶液(10 μ L·100 μ L⁻¹;上

海生工生物工程股份有限公司)均匀加入培养细胞的 96 孔板中,37 ℃环境下避光孵育 1 h。使用微孔板阅读器(Thermo Lab Systems,芬兰),在波长为 450 nm 处测量吸光度。

1.8 流式细胞分析 收集 BPH-1 细胞(1×10^6 个)或 WPMY-1 细胞(1×10^6 个),用 PBS 洗涤后,根据制造商的说明,用细胞凋亡染色试剂盒(中国联科生物技术有限公司,杭州)中的 Annexin V-FITC 和碘化丙啶标记后,通过流式细胞仪分析细胞凋亡水平。

表 4 siRNA 序列		
siRNA 名	正义链序列 (5'—3')	正义链序列 (5'—3')
hs-LGR4-si3	GUCGCUUGGCUAAUCUUCATT	UGAAGAUUAGCCAAGCGACTT
hs-LGR4-si2	GCAGUUCGCCCAAUCUUACATT	UGUAAGAUUGGGGAACUGCTT
hs-LGR4-si1	GUUCAGUUACGGCAUCUGUTT	ACAGAUGCCGUAACUGAACTT
Negative Control siRNA (NC)	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

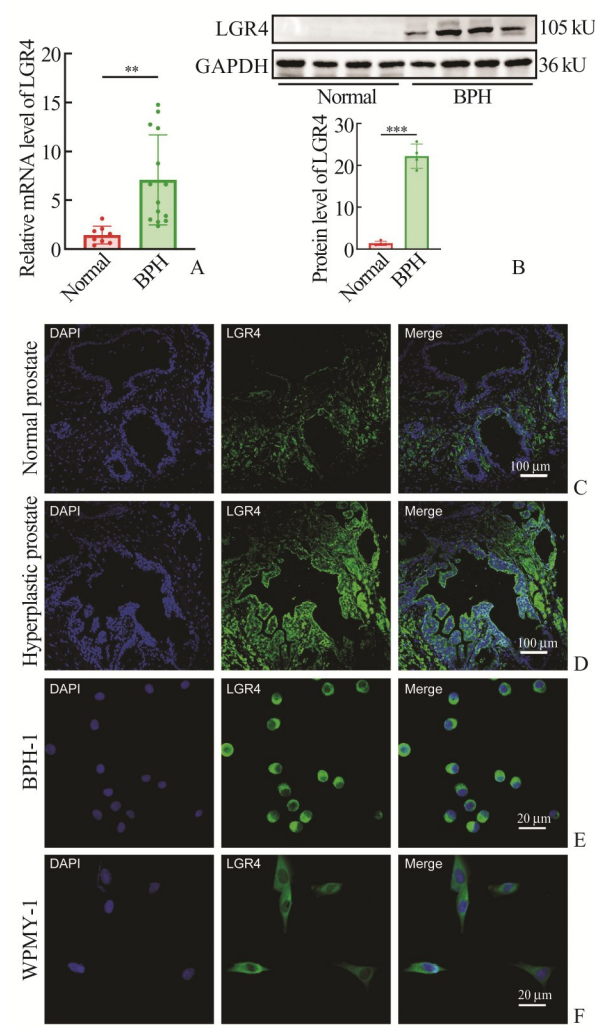
1.9 基因型-组织表达(GTEX)数据库人前列腺组织数据分析 在GTEX数据库(<https://www.gtexpportal.org/home/>)中下载原始数据,随后用R软件(version 4.3.1)'limma'、'ggExtra'、'ggplot2'和'ggpubr'包做LGR4相关性分析,获得相关基因,然后提取这些相关基因。按照LGR4表达量的中位数将GTEX数据库中人前列腺组织的转录组数据分为低LGR4组和高LGR4组,最后使用GSEA 4.3.2软件进行基因富集分析。

1.10 统计学分析 每次分析均包含来自3次重复实验的数据。采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示数据值。使用Student's *t*检验进行两组比较,或使用单因素方差分析(ANOVA)结合SPSS 20.0中的Tukey多重比较检验进行多组均数比较统计分析。*P*<0.05认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LGR4在人前列腺组织和培养细胞中的表达和定位 与正常前列腺组织相比,增生前列腺组织中LGR4 mRNA水平升高了4倍以上(图1A),LGR4蛋白水平也明显升高(图1B)。免疫荧光染色显示LGR4在人前列腺组织的上皮细胞和间质细胞中均有表达,且LGR4在增生前列腺组织中的荧光强度明显强于正常组织(图1C、1D)。同样,LGR4在BPH-1和WPMY-1细胞系中也均有表达(图1E、1F)。

2.2 LGR4敲低抑制前列腺细胞增殖,促进细胞凋亡 将3种靶向LGR4的siRNA(Si-1、Si-2和Si-3)分别转染到BPH-1和WPMY-1细胞中,建立LGR4敲低细胞模型。RT-qPCR分析验证了这三种siRNA的敲低效率,结果显示,转染Si-2或Si-3后,BPH-1细胞中LGR4的mRNA水平显著降低,而在WPMY-1细胞中转染3种siRNA后LGR4的mRNA水平均有降低(图2A、2B)。随后,通过Western Blot分析进一步验证了Si-2和Si-3的敲低效率,结果显示,在两种前列腺细胞系中转染Si-2或Si-3后,LGR4蛋白水平均显著降低(图2C)。因此选择Si-2和Si-3进行后续实验。CCK-8实验表明,敲低LGR4后的BPH-1和WPMY-

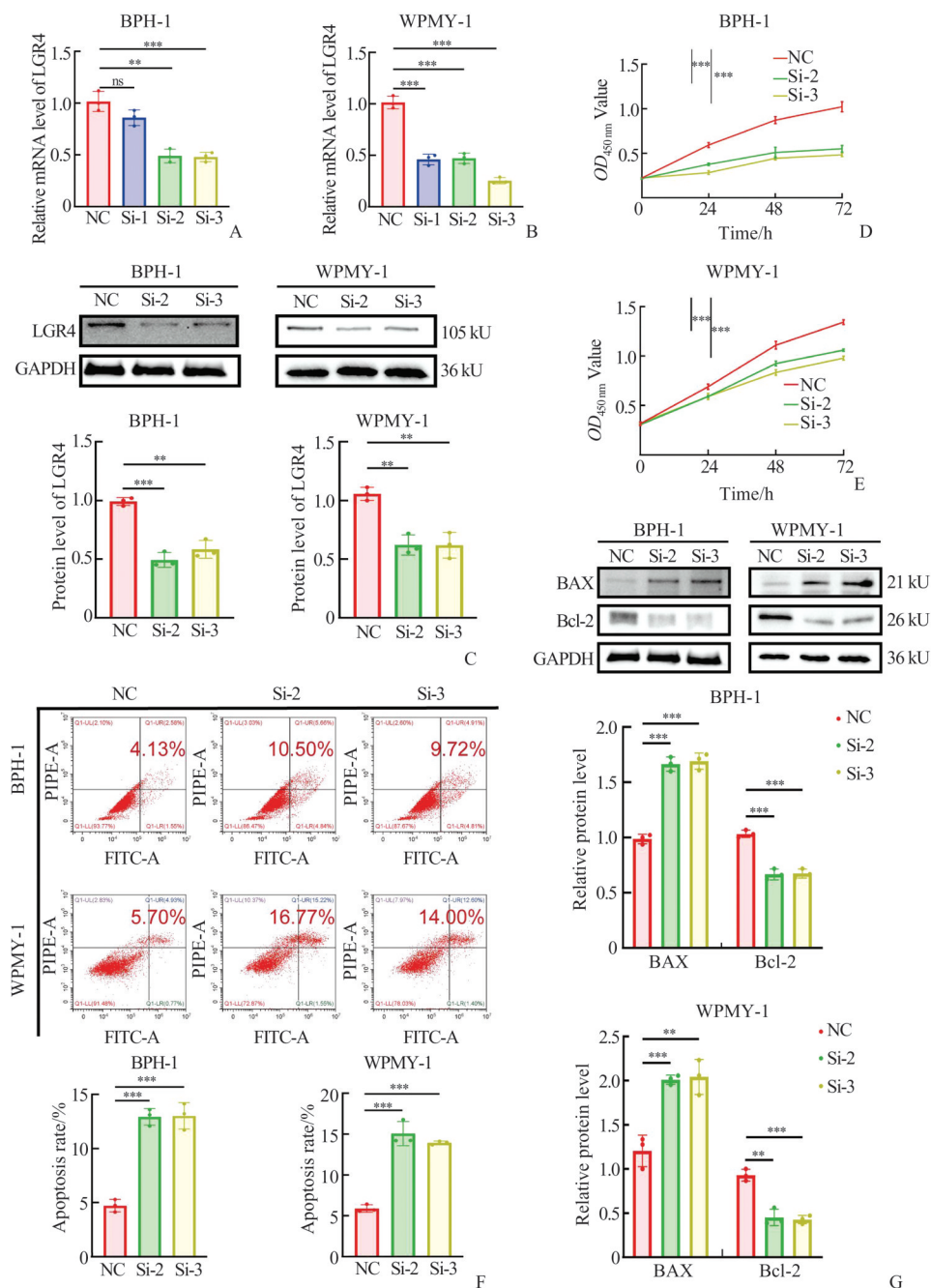


A. 正常前列腺组织(*n*=8)和前列腺增生组织(*n*=14)中LGR4的mRNA相对表达水平,***P*<0.01;B. 正常(*n*=4)和前列腺增生(*n*=4)前列腺组织中LGR4蛋白的相对表达水平,****P*<0.001;C、D. LGR4在人正常和增生前列腺中的荧光定位,DAPI(蓝色)为核染色,绿色荧光表示LGR4蛋白染色,比例尺为100 μm;E、F. LGR4在BPH-1细胞和WPMY-1细胞中的荧光定位,比例尺为20 μm。

图1 LGR4在人前列腺和培养细胞中的表达和定位

1细胞在24 h、48 h和72 h的细胞增殖活性均被明显抑制(图2D、2E)。同时,流式细胞仪分析显示,LGR4敲低后,BPH-1和WPMY-1细胞中的凋亡细胞比例至少是对照组的2倍(图2F)。Western Blot结果表明,在BPH-1和WPMY-1细胞中,敲低LGR4导致

BAX 蛋白表达至少上升 50%, Bcl-2 蛋白表达亦有明显下降(图 2G)。



A、B. 在 BPH-1 和 WPMY-1 细胞中转染 3 种不同 siRNA(Si-1, Si-2, Si-3)后 LGR4 的 mRNA 相对表达量, ns. $P > 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; C. BPH-1 和 WPMY-1 细胞中转染 Si-2 和 Si-3 后 LGR4 的蛋白量相对表达量, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; D、E. CCK-8 实验测定 BPH-1 和 WPMY-1 细胞敲低 LGR4 后不同时间点的细胞增殖活力, $***P < 0.001$; F. 流式细胞仪分析检测 BPH-1 和 WPMY-1 细胞中敲低 LGR4 后的细胞凋亡水平及细胞凋亡率柱状图, $***P < 0.001$; G. BPH-1 和 WPMY-1 中敲低 LGR4 后凋亡相关蛋白(BAX 和 Bcl-2)的蛋白相对表达量, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

图 2 敲低 LGR4 诱导 BPH-1 和 WPMY-1 细胞凋亡并抑制细胞增殖

2.3 过表达 LGR4 促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡
将 LGR4 过表达质粒转染到 BPH-1 和 WPMY-1 细胞系中建立 LGR4 过表达细胞模型。RT-qPCR 分析验证质粒的过表达效率, 结果表明, 转染 LGR4 过

表达质粒后 BPH-1 和 WPMY-1 细胞系中 LGR4 的 mRNA 水平分别增加了 1 484 倍和 2 202 倍(图 3A、3B)。与空载模型相比, 转染 LGR4 过表达质粒后, 两种前列腺细胞中的 LGR4 蛋白水平均显著升高

(图3C)。CCK-8检测显示,过表达LGR4可显著提高细胞增殖活性(图3D、3E)。流式细胞仪分析进一步表明,过表达LGR4后,BPH-1和WPMY-1细胞的凋亡率均减少至对照组的50%以下(图3F)。此外,在LGR4过表达细胞模型中,观察到BAX表达明显下降,Bcl-2表达显著上调(图3G)。

2.4 LGR4调控前列腺细胞中雄激素受体和雌激素受体 α 的表达 我们下载并使用了GTEx数据库中人前列腺组织的转录组数据($n=245$)并根据LGR4表达量的中位数将其分为高LGR4组和低LGR4组,通过基因富集分析,发现雌雄激素信号通路均富集于LGR4高表达组(图4A、4B)。之后我们也分析了这些前列腺组织中LGR4与AR及ER α 表达的相关性,发现随着LGR4表达上调,AR和ER α 的表达量也随之上调(图4C、4D)。同样,Western Blot分析结果显示,在BPH-1和WPMY-1细胞系中,敲低LGR4后AR和ER α 蛋白表达量下降(图4E),而过表达LGR4后AR和ER α 蛋白表达量升高(图4F),这说明LGR4可调控前列腺细胞中AR和ER α 的表达。

3 讨论

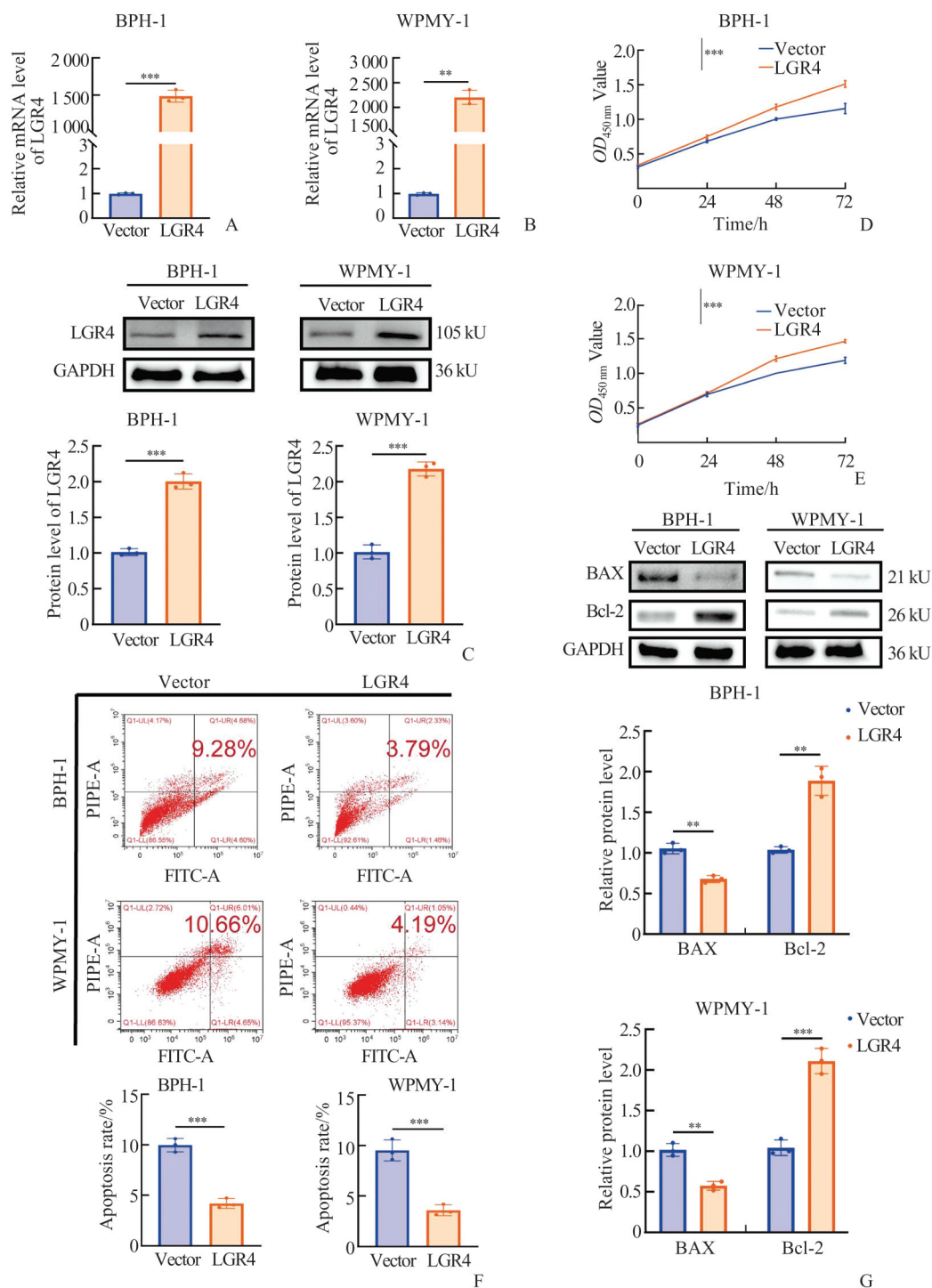
本研究探讨了LGR4在人正常与增生前列腺组织中的表达差异,及LGR4对前列腺细胞增殖凋亡水平和对AR、ER α 表达的影响。结果发现LGR4在增生前列腺中表达水平高于正常前列腺。LGR4可增加前列腺上皮与间质细胞中AR与ER α 的表达,并促进前列腺细胞增殖以及抑制细胞凋亡。本项研究的结果提示LGR4可能通过上调前列腺中AR和ER α 的表达而促进BPH发生发展。

已有研究^[16-17]表明,LGR4调控包括细胞增殖、凋亡、分化、迁移、上皮-间质转化、AR表达等在内的多种生物学过程。BPH被认为是由前列腺细胞异常增殖及分化导致的疾病^[18]。在多发性骨髓瘤中,LGR4通过激活TGF- β 1/Smad信号通路促进肿瘤细胞增殖及抑制细胞凋亡^[19]。与正常前列腺细胞相比,前列腺癌细胞中LGR4表达升高,且LGR4的表达升高减少了细胞凋亡,并提高了细胞存活率^[20]。在前列腺癌中的研究^[21]也表明,LGR4过表达通过激活PI3K/Akt信号通路促进前列腺肿瘤细胞增殖。此外,LGR4缺乏引起的氧化应激抵抗能力下降和线粒体功能障碍增加了心肌细胞的凋亡^[17]。我们目前的研究结果表明在人增生前列腺

中,LGR4在mRNA和蛋白层面上的表达水平均明显高于正常前列腺。LGR4敲低后的前列腺细胞增殖活力下降,细胞凋亡率显著升高。而过表达LGR4可提高前列腺细胞增殖活性,并抑制细胞凋亡。BAX和Bcl-2是与细胞凋亡相关的两个重要蛋白。当内源性或外源性因素刺激细胞凋亡过程发生时,Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, BAX)被募集到线粒体膜上,促进细胞色素c释放到细胞质中,导致哺乳动物细胞凋亡^[22]。Bcl-2基因是一个对细胞凋亡具有显著抑制作用的癌基因,可以通过抵消BAX的激活来抑制细胞程序性死亡^[23]。我们的研究发现LGR4的敲低降低了BPH-1和WPMY-1细胞系中Bcl-2表达量,以及促进了BAX表达。相反,过表达LGR4可增加Bcl-2表达,并降低BAX表达量。这说明,在BPH中,LGR4表达量增加,且LGR4可促进细胞增殖,减少细胞凋亡。

尽管AR在BPH发病过程中的详细机制仍有待阐明,然而,临床上靶向抑制雄激素/AR信号的治疗方法,在BPH中取得了一定的疗效,这说明雄激素/AR信号在BPH发病过程中起到了一定的促进作用^[7]。以往的研究^[8]表明,人增生前列腺中AR的mRNA及蛋白表达量均高于正常前列腺。在大鼠中AR可激活NLRP3增强线粒体氧化而促进前列腺细胞增殖^[24]。在小鼠中,AR可增强巨噬细胞迁移至前列腺,增强炎症反应,进而介导前列腺基质细胞增殖^[25]。过去的实验^[26]还观察到了LGR4对AR表达的调控作用。在前列腺癌中,LGR4可诱导AR表达而促进肿瘤生长。在小鼠睾丸中的肾小管周围肌样细胞,LGR4激活Wnt/ β -Catenin信号通路而上调AR的表达^[14]。与以往的研究结果一致,我们的研究中观察到了在人前列腺组织中,AR表达量随LGR4表达量的增高而增高。在BPH-1和WPMY-1细胞系中,同样观察到了AR随LGR4敲低而表达降低,并随LGR4过表达而表达增加。这说明LGR4可能通过调节AR表达而促进BPH的发生发展。

雌激素受体(estrogen receptor,ER)信号在BPH发病过程中,也起着重要作用。ER分为ER α 和ER β 两种类型。与对照组人前列腺组织相比,增生前列腺组织上皮和间质中的ER α 表达均有增高,但ER β 表达量无明显区别^[27]。ER α 激活可促进前列腺细胞增殖、炎症反应以及异型增生^[28]。在前列腺间质细胞中还观察到,激活ER α 可诱导线粒体自噬而增加细胞增殖活性^[29]。相反,ER β 抑制前列腺细胞

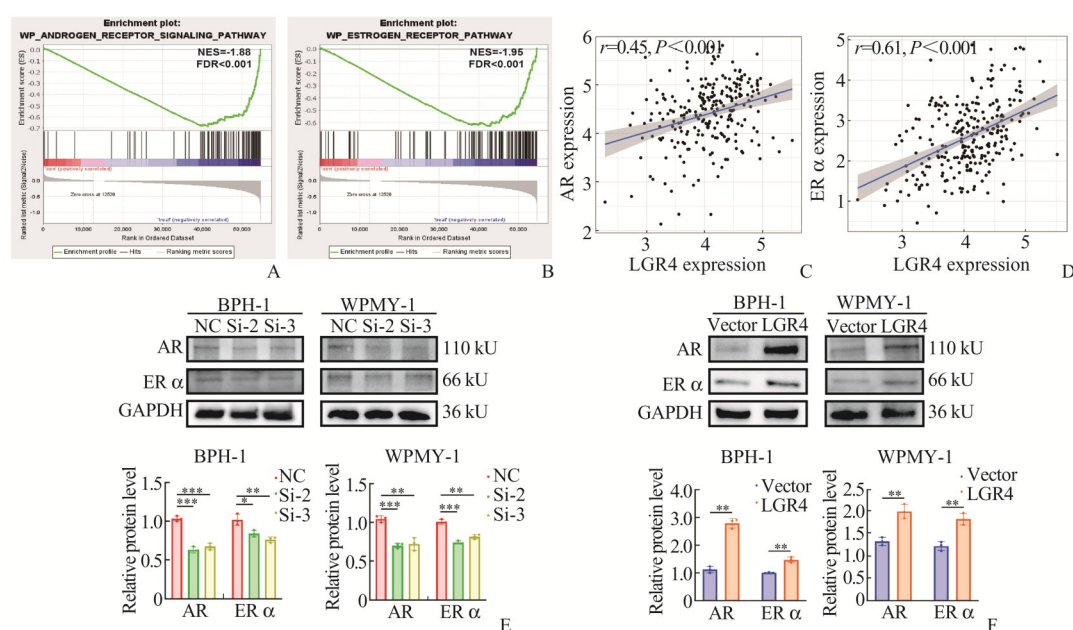


A、B. LGR4在BPH-1和WPMY-1细胞中转染LGR4过表达质粒后,LGR4的mRNA相对表达水平,** $P<0.01$,*** $P<0.001$; C. BPH-1和WPMY-1细胞中转染LGR4过表达质粒后,LGR4相对蛋白表达量,*** $P<0.001$;D、E. CCK-8实验测定BPH-1和WPMY-1细胞过表达LGR4后不同时间点的细胞增殖活力,*** $P<0.001$;F. 流式细胞仪分析检测BPH-1和WPMY-1细胞中过表达LGR4后的细胞凋亡水平及细胞凋亡率柱状图,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;G. BPH-1和WPMY-1中过表达LGR4后凋亡相关蛋白(BAX和Bcl-2)的相对蛋白表达量,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图3 LGR4过表达诱导BPH-1和WPMY-1细胞增殖并抑制细胞凋亡

增殖,敲除ER β 后前列腺增殖活性增加^[28]。因此,在本研究中,我们对LGR4影响ER的探索主要集中在ER α 。在小鼠附睾发育过程中,LGR4缺失抑制ER α

的表达^[15]。在小鼠乳腺中,LGR4激活cAMP-PKA信号传导而增加ER α 表达^[30]。本项研究同样发现,在人前列腺中,当LGR4表达量增加时ER α 表达量



A. 基因富集分析发现AR信号富集于LGR4高表达组($P<0.05$, $FDR<0.001$); B. 基因富集分析发现ER α 信号富集于LGR4高表达组($P<0.05$, $FDR<0.001$); C. 分析GTEX数据库中数据发现,人前列腺中AR表达量与LGR4表达量呈线性相关关系($r=0.45$, $P<0.001$); D. 分析GTEX数据库中数据发现,人前列腺中ER α 表达量与LGR4表达量呈线性相关关系($r=0.61$, $P<0.001$); E. BPH-1和WPMY-1中敲低LGR4后,AR与ER α 的相对蛋白表达量, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; F. BPH-1和WPMY-1中过表达LGR4后,AR与ER α 的相对蛋白表达量, ** $P<0.01$ 。

图4 LGR4调控BPH-1和WPMY-1细胞中AR及ER α 表达

增加。在前列腺细胞中调节LGR4表达后,ER α 表达量也随LGR4表达量增减而增减。因此推测,ER α 也可能是LGR4调控前列腺细胞增殖及凋亡的中间信号分子。

总而言之,本研究发现了LGR4在人增生前列腺组织中的表达量较正常前列腺显著增加,LGR4可能通过促进AR及ER α 表达而上调前列腺细胞增殖活性并抑制细胞凋亡过程。

然而,本研究仍有一些不足之处:仅从细胞层面获得了这些数据结果,但这与患者器官组织内的真实情况相差较大;尚缺乏动物实验来进一步验证本实验的准确性。

综上所述,LGR4可能通过调节AR及ER α 表达水平而促进前列腺细胞增殖并抑制其凋亡。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

参考文献

- [1] EGAN K B. The epidemiology of benign prostatic hyperplasia associated with lower urinary tract symptoms: Prevalence and incident rates[J]. Urol Clin North Am, 2016, 43(3): 289-297.
- [2] WOO H H, HUANG C P, HUANG W J, et al. The EXPANDER-1 trial: Introduction of the novel urocross™ expander system for treatment of lower urinary tract symptoms (LUTS) secondary to benign prostatic hyperplasia (BPH)[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2022, 25(3): 576-582.
- [3] VUICHOU D C, LOUGHLIN K R. Benign prostatic hyperplasia: Epidemiology, economics and evaluation[J]. Can J Urol, 2015, 22(Suppl 1): 1-6.
- [4] ALONSO-MAGDALENA P, BRÖSSNER C, REINER A, et al. A role for epithelial-mesenchymal transition in the etiology of benign prostatic hyperplasia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(8): 2859-2863.
- [5] CHUGHTAI B, FORDE J C, THOMAS D D, et al. Benign prostatic hyperplasia[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16031.
- [6] MCCONNELL J D. Medical management of benign prostatic hyperplasia with androgen suppression[J]. Prostate Suppl, 1990, 3: 49-59.
- [7] IZUMI K, MIZOKAMI A, LIN W J, et al. Androgen receptor roles in the development of benign prostate hyperplasia[J]. Am J Pathol, 2013, 182(6): 1942-1949.
- [8] SONG L M, SHEN W H, ZHANG H, et al. Differential expression of androgen, estrogen, and progesterone receptors in benign prostatic hyperplasia[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2016, 16(3): 201-208.
- [9] HO C K M, HABIB F K. Estrogen and androgen sig-

- naling in the pathogenesis of BPH[J]. *Nat Rev Urol*, 2011, 8(1): 29-41.
- [10] ZHANG N N, YUAN M Y, WANG J Q. LGR4: A new receptor member in endocrine and metabolic diseases[J]. *Endocr Rev*, 2023, 44(4): 647-667.
- [11] FILIPOWSKA J, KONDEGOWDA N G, LEON-RIVERA N, et al. LGR4, a G protein-coupled receptor with a systemic role: From development to metabolic regulation[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 867001.
- [12] LUO W J, TAN P, RODRIGUEZ M, et al. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 (Lgr4) is necessary for prostate cancer metastasis *via* epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(37): 15525-15537.
- [13] LUO W J, RODRIGUEZ M, VALDEZ J M, et al. LGR4 is a key regulator of prostate development and prostate stem cell differentiation[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(11): 2492-2505.
- [14] QIAN Y, LIU S J, GUAN Y T, et al. LGR4-mediated Wnt/ β -catenin signaling in peritubular myoid cells is essential for spermatogenesis[J]. *Development*, 2013, 140(8): 1751-1761.
- [15] HOSHII T, TAKEO T, NAKAGATA N, et al. LGR4 regulates the postnatal development and integrity of male reproductive tracts in mice[J]. *Biol Reprod*, 2007, 76(2): 303-313.
- [16] ORDAZ-RAMOS A, ROSALES-GALLEGOS V H, MELENDEZ-ZAJGLA J, et al. The role of LGR4 (GPR48) in normal and cancer processes[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4690.
- [17] CHEN T, QIAO X R, CHENG L L, et al. LGR4 silence aggravates ischemic injury by modulating mitochondrial function and oxidative stress *via* ERK signaling pathway in H9c2 cells[J]. *J Mol Histol*, 2021, 52(2): 363-371.
- [18] NATHANIEL BRENNEN W, ISAACS J T. Mesenchymal stem cells and the embryonic reawakening theory of BPH[J]. *Nat Rev Urol*, 2018, 15(11): 703-715.
- [19] YI Z G, MA T, LIU J, et al. LGR4 promotes tumorigenesis by activating TGF- β 1/Smad signaling pathway in multiple myeloma[J]. *Cell Signal*, 2023, 110: 110814.
- [20] ZHANG J W, LI Q, ZHANG S J, et al. LGR4 promotes prostate tumorigenesis through the Jmjd2a/AR signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 349(1): 77-84.
- [21] LIANG F, YUE J M, WANG J Y, et al. GPCR48/LGR4 promotes tumorigenesis of prostate cancer *via* PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(3): 49.
- [22] TAIT S W G, GREEN D R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9): 621-632.
- [23] HATA A N, ENGELMAN J A, FABER A C. The BCL2 family: Key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(5): 475-487.
- [24] JIN B R, LIM C Y, KIM H J, et al. Antioxidant mitoquinone suppresses benign prostatic hyperplasia by regulating the AR-NLRP3 pathway[J]. *Redox Biol*, 2023, 65: 102816.
- [25] WANG X H, LIN W J, IZUMI K, et al. Increased infiltrated macrophages in benign prostatic hyperplasia (BPH): Role of stromal androgen receptor in macrophage-induced prostate stromal cell proliferation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(22): 18376-18385.
- [26] LIANG F, ZHANG H, CHENG D, et al. Ablation of LGR4 signaling enhances radiation sensitivity of prostate cancer cells[J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118737.
- [27] BHATTAR R, YADAV S S, TOMAR V, et al. Role of oestrogen receptor- α and - β in bladder tissue of patients with a clinical diagnosis of benign prostatic hyperplasia[J]. *BJU Int*, 2018, 121(1): 130-138.
- [28] CANNARELLA R, CONDORELLI R A, BARBAGALLO F, et al. Endocrinology of the aging prostate: Current concepts[J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 554078.
- [29] HONG G L, KIM K H, KIM Y J, et al. Decreased mitophagy aggravates benign prostatic hyperplasia in aged mice through DRP1 and estrogen receptor α [J]. *Life Sci*, 2022, 309: 120980.
- [30] GENG A J, WU T, CAI C G, et al. A novel function of R-spondin1 in regulating estrogen receptor expression independent of Wnt/ β -catenin signaling[J]. *eLife*, 2020, 9: e56434.

(2025-01-03 收稿)

编辑 张 峻