

雄激素对大鼠前列腺和精囊腺 AQP3 和 AQP4 表达的影响

裴利军 姜睿 粟宏伟 邓青富 朱永生

【摘要】 目的 探讨雄激素对大鼠前列腺和精囊腺水通道蛋白质(AQP)3和AQP4表达的影响。方法 选择健康雄性8周龄SD大鼠30只,随机分为对照组($n=10$)、睾丸切除组($n=10$)和睾丸切除+睾酮替代组($n=10$)。放射免疫法测定血清睾酮水平。持续电刺激盆腔神经采集前列腺液,细针穿刺精囊管收集精囊液,分别测定前列腺和精囊液水的含量。免疫组化和免疫印迹检测AQP3和AQP4蛋白在前列腺和精囊的表达。结果 AQP3和AQP4在大鼠前列腺和精囊腺上皮细胞均有丰富表达。睾丸切除组前列腺和精囊液的分泌较对照组均显著减少($P<0.05$)。睾丸切除组前列腺AQP3的表达较对照组显著降低($P<0.05$),AQP4的表达与对照组比较无统计学差异。睾丸切除组精囊AQP3和AQP4的表达与对照组相比均显著降低($P<0.05$)。结论 雄激素减退后前列腺液分泌下降与AQP3表达降低有关,精囊液分泌下降与AQP3和AQP4表达降低有关。前列腺AQP4的表达与雄激素水平无关。

【关键词】 雄激素; 水通道蛋白质3; 水通道蛋白质4; 前列腺; 精囊腺; 大鼠, Sprague-Dawley

Effect of androgen on the expressions of AQP3 and AQP4 in prostate and seminal vesicles of rats

Pei Lijun, Jiang Rui, Su Hongwei, Deng Qingfu, Zhu Yongsheng. Department of Urology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

Corresponding author: Pei Lijun, Email: plj0579@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of androgen on the expressions of AQP3 and AQP4 in prostate and seminal vesicle of rats. **Methods** Healthy 8-week old male Sprague-Dawley rats($n=30$) were randomly divided into control group($n=10$), testicular resection group($n=10$) and testicular resection plus testosterone replacement group($n=10$). The serum level of testosterone was measured by radioimmunoassay. The prostate fluid was obtained through electrical stimulation of pelvic nerve. The seminal vesicles fluid was collected using a micropuncture pipette inserted into the seminal vesicle ducts. The water volumes in prostate and seminal vesicles fluids were estimated respectively. The expressions of AQP3 and AQP4 in prostate and seminal vesicles of rats were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** AQP3 and AQP4 express abundantly in the epithelia of prostate and seminal vesicles of rats. The secretion of water in prostate and seminal vesicles was decreased significantly in testicular resection group($P<0.05$). The expression of AQP3 in prostate was lower significantly in testicular resection group($P<0.05$), but the expression of AQP4 was not effected. The levels of AQP3 and AQP4 expression in seminal vesicles of testicular resection group were decreased significantly than control group($P<0.05$). **Conclusion** Androgen deprivation associated reduction of prostate and seminal vesicles secretion is partly due to the lower expression of AQP3 in prostate and the lower expressions both AQP3 and AQP4 in seminal vesicles. The expression of AQP4 in prostate is not related with the level of serum testosterone.

【Key words】 Androgen; Aquaporin 3; Aquaporin 4; Prostate; Seminal vesicles; Rats, Sprague-Dawley

男性不育症发病率高且病因复杂,流行病学显示男性不育占不孕不育症患者的30%,20%为男性女性共同因素导致^[1]。精液量减少是男性不育的重要因素之一,但常常被忽视^[2]。前列腺和精囊腺是男性重要附属性腺器官,具有强大的分泌功能^[3],前列腺液和精囊液是精浆的主要成分,性腺功能减退和高龄导致的男性不育是否与前列腺和精囊的分泌功能障碍有关鲜有报道。水通道蛋白(Aquaporins, AQPs)是一组膜蛋白家族,迄今为止已发现13个亚型(AQP0~12),广泛分布于人体各种组织器官,尤其是具有内分泌功能的器官,AQPs可促进水和小分子物质的跨细胞膜转运,对于维持细胞内环境的稳定具有重要作用^[4]。文献报道人类生殖道中有多种AQPs的表达,有利于生殖道中水的分泌和重吸收,维持精子赖以生存的内环境的稳定。本文探讨雄激素对大鼠前列腺和精囊腺AQP3和AQP4表达的影响,阐述性腺功能减退导致男性不育的可能发病机制。

材料和方法

一、实验动物与分组

健康雄性8周龄SD大鼠30只,体重280~300g,由泸州医学院实验动物中心提供,饲养环境温度20~25℃,12h光照,昼夜交替,正常饮食,自由饮水。适应性喂养1周后,抽签法随机分为对照组($n=10$)、睾丸切除组($n=10$)和睾丸切除+睾酮替代组($n=10$)。

二、动物模型制备

1%戊巴比妥钠30mg/kg腹腔注射麻醉,取下腹正中切口,对照组只切开腹腔,不切除睾丸,其余两组均行双侧睾丸切除术。术后第2天起,睾酮替代组给予丙酸睾酮5mg/kg(上海通用药业股份有限公司)皮下注射,1次/d,对照组和睾丸切除组给予等量生理盐水注射,同样的饲养环境喂养2周后进行后续实验。

三、主要实验试剂与仪器

兔抗大鼠AQP3、AQP4多克隆抗体均购自美国Abcam公司,辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG和BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生

物科技发展有限公司,DAB显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,ECL化学发光液购自美国Millipore公司,RM6280c型多通道生理信号采集处理系统为成都仪器厂生产,电泳槽和蛋白成像仪均为美国Bio-Rad公司生产。

四、前列腺液和精囊液的收集与测定

前列腺液和精囊液的收集采用Knee等^[5]和Clulow等^[6]所描述的方法。1%戊巴比妥钠麻醉后,取下腹正中切口,于前列腺后外侧显露盆神经,连接RM6280c型多通道生理信号采集处理系统电极,调整参数为波幅0.8ms、频率16Hz、电压8~12V,给予持续脉冲式电刺激,可见大鼠阴茎充血并缓慢勃起,直到产生类似射精的动作,收集前列腺液于预先准备好的无菌干燥的小管中。为避免尿液污染前列腺液,电刺激前先用注射器抽空膀胱内尿液,并以细丝线结扎精囊输出管。细针穿刺精囊管,抽取精囊液并收集于无菌干燥管中。收集到的前列腺液和精囊液称重后,置于60℃干燥箱中烘干2h,再次称重,两次重量之差视为前列腺液和精囊液中水的重量。切取腹侧前列腺和精囊腺,剔除周围结缔组织,置于液氮中保存。

五、血睾酮水平测定

心脏取血2ml,放射免疫法测定血睾酮水平。

六、免疫组化检测AQP3和AQP4的表达

免疫组化采用SP法。4%多聚甲醛固定标本24h,脱水,石蜡包埋,4μm连续切片,梯度乙醇脱蜡至水。10mmol/L柠檬酸缓冲液(pH 6.0)微波修复抗原5min,室温冷却,PBS漂洗。滴加1%BSA,室温封闭2h,弃封闭液,滴加兔抗大鼠AQP3(1:100)、AQP4(1:100)抗体,置于湿盒内4℃孵育过夜。PBS漂洗3次×5min,滴加0.3% H₂O₂,室温孵育15min,封闭内源性过氧化物酶,PBS漂洗3次×5min。滴加辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG,室温孵育15min,PBS漂洗3次×5min,DAB显色,光学显微镜下观察染色强度。苏木素复染,脱水、透明、封片。以PBS代替一抗作为阴性对照,光镜下观察棕黄色颗粒为阳性结果。

七、Western blot检测AQP3和AQP4的表达

标本剪碎后加液氮研磨成粉末状,收集于1.5ml离心管中,加入预冷的组织裂解液(每1ml裂解液

含磷酸酶抑制剂 10 μ l, 蛋白酶抑制剂 5 μ l, 100 mmol/L PMSF 5 μ l) 裂解, 12 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 取上清。BCA 法测定蛋白浓度。加 5 \times 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 沸水中变性 5 min, 室温冷却。以 40 g 蛋白上样, 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 湿转法将蛋白转移到 0.2 μ m 孔径 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加兔抗大鼠 AQP3 (1:1 000)、AQP4 (1:2 000) 多克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次 \times 10 min, 加辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (1:5 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次 \times 10 min, 滴加 ECL 化学发光液, Bio-Rad 蛋白成像仪显像。条带灰度值采用 Quantity One 4.6.2 软件分析, 以 β -actin 作为内参。

八、统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、血睾酮水平、前列腺液和精囊液中水含量的变化

睾丸切除组血睾酮为 (13.07 \pm 1.83) nmol/L, 与对照组 [(92.37 \pm 16.23) nmol/L] 相比显著下降 ($F = 4.66$, $P < 0.05$), 睾丸切除+睾酮替代组为 (88.09 \pm 13.24) nmol/L, 与对照组相比无统计学差异 ($F = 0.98$, $P > 0.05$)。

睾酮水平下降后, 睾丸切除组前列腺液和精囊液中水的含量均显著降低, 其中前列腺液水含量为 (5.15 \pm 0.71) mg, 与对照组 [(21.32 \pm 1.23) mg] 相比显著减少 ($F = 9.27$, $P < 0.05$), 睾丸切除+睾酮替代组为 (19.22 \pm 1.09) mg, 与对照组比较无统计学差异 ($F = 1.39$, $P > 0.05$)。睾丸切除组精囊液中水含量为 (139.63 \pm 18.52) mg, 与对照组 [(613.80 \pm 14.70) mg] 相比显著减少 ($F = 10.23$, $P < 0.05$), 睾丸切除+睾酮替代组为 (562.60 \pm 13.80) mg, 与对照组比较无统计学差异 ($F = 1.59$, $P > 0.05$)。

二、AQP3 和 AQP4 的表达定位

免疫组化结果显示, AQP3 和 AQP4 在大鼠前列腺和精囊均表达丰富。在前列腺中, AQP3 主要在腺泡上皮细胞膜表达, 而且在靠近腺腔的部位较丰富, AQP4 主要在靠近基底层的上皮细胞浆膜表达 (图 1)。在精囊中, AQP3 在近腺腔的上皮细胞膜表达, AQP4 主要在腺上皮细胞浆膜表达 (图 2)。

三、AQP3 和 AQP4 的蛋白表达定量分析

免疫印迹结果显示, 在 31 kDa (AQP3) 和 48 kDa (AQP4) 处均可见稳定的特异性条带。目的蛋白灰度值均与 β -actin (43 kDa) 的灰度值比较计算相对灰度值, 结果发现, 睾丸切除组前列腺和精囊中 AQP3 的表达均较对照组显著降低 ($F = 11.49$, $P < 0.05$), 睾丸切除+睾酮替代组 AQP3 表达与对照组无统计学差异 ($F = 1.47$, $P > 0.05$) (图 3)。AQP4 在各组前列腺中的表达无统计学差异 ($F = 2.59$, $P > 0.05$), 但睾丸切除组精囊腺中 AQP4 的表达较对照组显著减低 ($F = 9.82$, $P < 0.05$) (图 4)。

讨 论

精液分析是评估男性不育病因的重要手段, 包括精子数、精子活力以及精子形态等, 但对精液量的评估常不被重视^[2]。膀胱颈张力降低所致逆向射精以及炎症相关性生殖道梗阻是精液量减少的常见病因^[7], 但雄激素水平低下引起的精液减少是否与精液分泌障碍有关尚不清楚。精液中含有精子和精浆, 精浆由前列腺和精囊分泌, 含有水、电解质和蛋白等多种成分, 精囊液约占精液的 60%~70%, 前列腺液约占 20%~30%^[8]。精浆是精子发育成熟的微环境, 同时也是转运精子完成受精的载体。精液进入女性阴道后形成精液池, 精液池位于宫颈右下方的阴道壁压迹, 与宫颈管分泌的黏液形成联系, 利于精子进入宫颈完成受精。精液量减少, 则不能形成精液池, 精子不能进入宫颈, 导致不孕^[9]。正常男性一次排精约 2~6 ml, 少于 2 ml 则称为精液量减少^[10]。前列腺液中含有柠檬酸盐、Zn²⁺、酸性磷酸酶等多种成分, 射精后前列腺液首先进入阴道, 可缓冲阴道的酸性环境, 保护精子免受破坏, 同时前列腺液中的多种酶类有利于精液液化, 保持精子的活动度和游动^[11]。精子由睾丸产生后暂时储存于精囊腺中, 精囊液适宜的渗透压和理化性质是精子赖以生存并保持活力的重要条件。正常的精液量还可缓冲阴道的酸性环境, 减少阴道酸性环境对精子的破坏。水是精浆的主要成分, 维持精浆渗透压、电解质浓度等理化性质的稳定, 因此研究精液的生成尤其是水的分泌机制具有非常重要的意义。

AQP 蛋白家族具有水和小分子物质的转运特性, 研究显示 AQP0、1、2、4、5、6 和 8 对水具有通透性, AQP3、7、9 和 10 对水和甘油均具有通

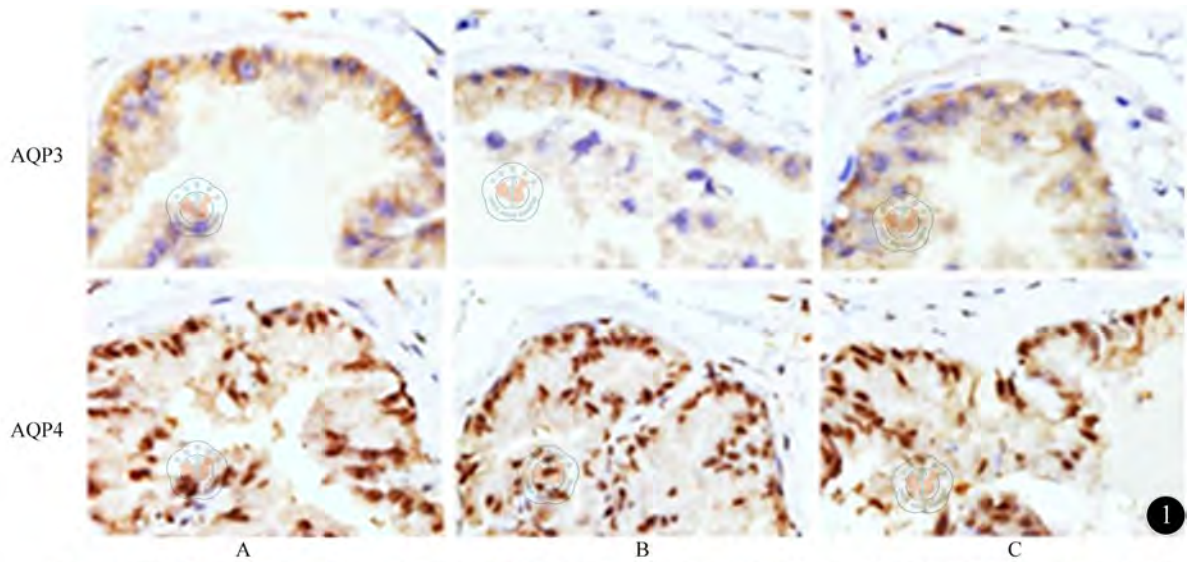


图1 AQP3和AQP4在大鼠前列腺的表达 (SP法×400)。图中棕黄色染色颗粒为蛋白阳性表达。A: 对照组, B: 睾丸切除组, C: 睾丸切除+睾酮替代组

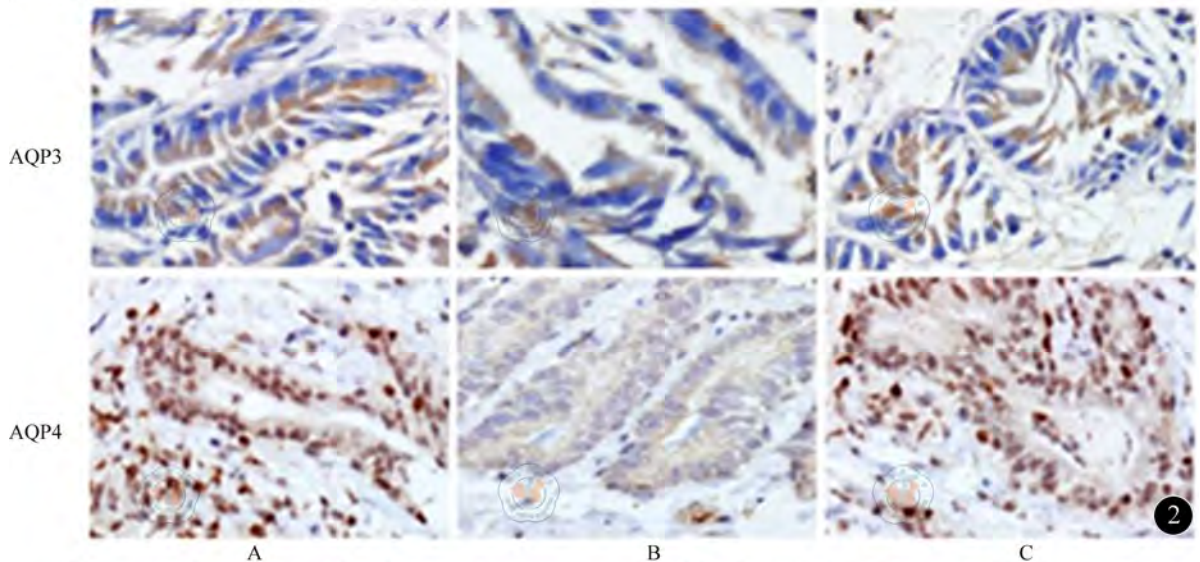


图2 AQP3和AQP4在大鼠精囊的表达 (SP法×400)。图中棕黄色染色颗粒为蛋白阳性表达。A: 对照组; B: 睾丸切除组; C: 睾丸切除+睾酮替代组

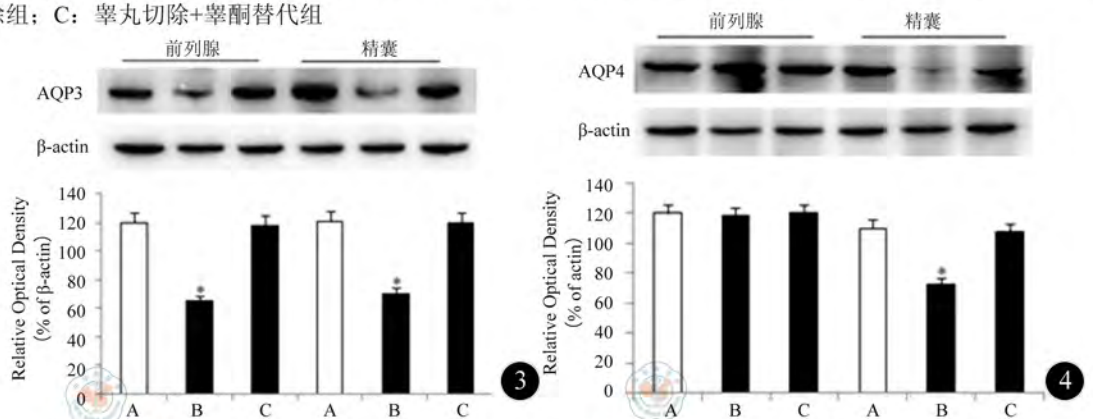


图3 免疫印迹检测AQP3 (31 kDa) 的表达。条带下方柱状图代表蛋白与β-actin (43 kDa) 的相对灰度值。A: 对照组, B: 睾丸切除组, C: 睾丸切除+睾酮替代组。与对照组比较, * $P < 0.05$ 图4 免疫印迹检测AQP4 (48 kDa) 的表达, 条带下方柱状图代表蛋白与β-actin (43 kDa) 的相对灰度值。A: 对照组, B: 睾丸切除组, C: 睾丸切除+睾酮替代组。与对照组比较, * $P < 0.05$

透性,但 AQP11 和 12 的结构与其他亚型不同,其功能尚不清楚^[12-14]。AQPs 分布广泛,尤其是具有旺盛分泌功能的器官和组织。在人类肾脏集合管上皮细胞 AQP2 表达丰富,可促进肾小管对水的重吸收,对尿液浓缩起重要作用^[15],AQP3 可以促进小鼠表皮细胞的水合作用^[16]。Park 等^[17]发现 AQP1、2 和 3 高表达可促进大鼠阴道分泌增加,Pei 等^[18]发现高血糖可抑制 AQP1、2 和 3 的表达,从而减低阴道分泌。近年研究显示 AQPs 与液体转运障碍引起的多种病理机制有关,肾脏 AQP2 的表达下降导致糖尿病性多尿症^[19],AQP4 引起局部缺血缺氧性脑水肿的发生^[20]。胃肠道强大的转运水和离子的功能需要 AQPs 的参与,但在多种炎症介质的作用下,AQP2 和 3 的表达常出现异常,导致感染性腹泻的发生^[21]。由此可见,AQPs 的表达受到血糖、缺氧、炎症介质等多种因素的影响,但是在具有分泌功能的前列腺和精囊腺是否有 AQPs 的表达以及睾酮水平是否会影响其表达研究甚少。

近年来的研究显示,在男性生殖道中有多种 AQPs 的表达,其表达部位具有组织特异性。例如在人类输精管上皮细胞的刷状缘检测到 AQP1 和 AQP2 的表达,睾丸液和附睾液从附睾管输出后,近 50%~90% 的液体成分被重吸收,从而使精子浓度急剧升高^[22-23]。AQP1 在人类精囊腺内皮细胞和前列腺毛细血管内皮细胞表达,但在附睾组织中未检测到 AQP1,表明 AQP1 可能参与精囊液和前列腺液的分泌^[24]。Wang 等^[25]发现在人类前列腺腺泡基底膜及中间层细胞中 AQP3 大量表达,这也是具有分泌功能的柱状细胞含量最多的部位,而在间质细胞未见表达,认为 AQP3 与前列腺的分泌功能有关,但未能进一步研究 AQP3 与雄激素水平的关系。另有研究发现 AQP9 在前列腺的上皮细胞表达,而且睾酮可诱导其表达上调,但在精囊腺中无表达,说明 AQP9 也可能参与前列腺的分泌^[26]。

本研究结果显示,AQP3 和 AQP4 两种亚型在大鼠前列腺和精囊均有丰富表达,而且都位于具有分泌功能的腺上皮细胞,提示这两种水通道蛋白与前列腺和精囊的分泌功能有关。雄激素减退后前列腺和精囊的分泌均下降,可能与前列腺 AQP3 的表达降低以及精囊 AQP3 和 AQP4 的表达降低有关。本研究发现 AQP4 在前列腺的表达不受睾酮水平的影响,推测 AQP4 可能具有其他功能。由于精液的组成成分复杂,本研究只探讨了水分泌障碍的可能

机制,其他如电解质、蛋白质等成分的分泌与代谢是否与 AQPs 有关尚需更多的研究予以证实。

参 考 文 献

- [1] Winters BR, Walsh TJ. The epidemiology of male infertility[J]. Urol Clin North Am, 2014, 41(1): 195-204.
- [2] Roberts M, Jarvi K. Steps in the investigation and management of low semen volume in the infertility man[J]. Can Urol Assoc J, 2009, 3(6): 479-485.
- [3] Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, et al. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility[J]. Hum Reprod, 2002, 17(11): 2904-2911.
- [4] Connolly DL, Shanahan CM, Weissberg PL. The aquaporins. A family of water channel proteins[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1998, 30(2): 169-172.
- [5] Knee RA, Hickey DK, Beagley KW, et al. Transport of IgG across the blood-luminal barrier of the male reproductive tract of the rat and the effect of estradiol administration on reabsorption of fluid and IgG by the epididymal ducts[J]. Biol Reprod, 2005, 73(4): 688-694.
- [6] Clulow J, Jones RC, Hansen LA. Micropuncture and cannulation studies of fluid composition and transport in the ductuli efferentes testis of the rat: Comparisons with the homologous metanephric proximal tubule[J]. Exp Physiol, 1994, 79(6): 915-928.
- [7] Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function[J]. Urology, 1997, 49(4): 508-513.
- [8] Ndovi TT, Parsons T, Choi, et al. A new method to estimate quantitatively seminal vesicle and prostate gland contributions to ejaculate[J]. Br J Clin Pharmacol, 2007, 63(4): 404-420.
- [9] Sherins RJ. Clinical use and misuse of automated semen analysis[J]. Ann NY Acad Sci, 1991, 637(2): 424-435.
- [10] Cour F, Droupy S, Faix A, et al. Anatomy and physiology of sexuality[J]. Prog Urol, 2013, 23(9): 547-561.
- [11] Said L, Galeraud-Denis I, Carreau S, et al. Relationship between semen quality and seminal plasma components: neutral alpha glucosidase, fructose and citrate in Tunisian men[J]. Andrologia, 2009, 41(3): 150-156.
- [12] Agre P, King LS, Yasui M, et al. Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine[J]. J Physiol, 2002, 542(Pt 1): 3-16.
- [13] Ishibashi K, Sasaki S. The dichotomy of MIP family suggests two separate origins of water channels[J]. News Physiol Sci, 1998, 13(1): 137-142.
- [14] Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, et al. Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain[J]. BMC Biochem, 2006, 7(1): 14-17.
- [15] Nielson S, Frokiaer J, Marples D, et al. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine[J]. Physiol Rev, 2002, 82(1): 205-244.
- [16] Ma T, Hara M, Sougrat R, et al. Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3[J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 17147-17153.
- [17] Park K, Han HJ, Kim SW, et al. Expression of aquaporin water channels in rat vagina: potential role in vaginal lubrication[J]. J Sex Med, 2008, 5(1): 77-82.
- [18] Pei L, Jiang J, Ouyang F, et al. Expression of aquaporins in vagin of diabetes mellitus rats[J]. J Sex Med, 2013, 10(2): 342-349.
- [19] Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, et al. Requirement of human

- renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine[J]. *Science*, 1994, 264(5155): 92-95.
- [20] Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, et al. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002, 72(2): 262-265.
- [21] Guttman JA, Samj FN, Li Y, et al. Aquaporins contribute to diarrhea caused by attaching and effacing bacterial pathogens[J]. *Cell Microbiol*, 2007, 9(1): 131-141.
- [22] Clulow J, Jones RC, Hansen LA, et al. Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis[J]. *J Reprod Fertil*, 1998, 53(5): 1-14.
- [23] Stevens AL, Breton S, Gustafson CE, et al. Aquaporin 2 is a vasopressin-independent, constitutive apical membrane protein in rat vas deferens[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278(4): C791-C802.
- [24] Mobasheri A, Marples D. Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(3): C529-C537.
- [25] Wang J, Tanji N, Kikugawa T, et al. Expression of aquaporin 3 in the human prostate[J]. *Int J Urol*, 2007, 14(12): 1088-1092.
- [26] Wang J, Tanji N, Sasaki T, et al. Androgens upregulate aquaporin 9 expression in the prostate[J]. *Int J Urol*, 2008, 15(10): 936-941.
- (收稿日期: 2014-05-18)
(本文编辑: 郝锐)

裴利军, 姜睿, 粟宏伟, 等. 雄激素对大鼠前列腺和精囊腺 AQP3 和 AQP4 表达的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8 (13): 2488-2493.

