

丁香油对丙酸睾酮诱导大鼠前列腺增生的抑制作用

袁 婷^{1#}, 周芮萱^{1#}, 马松涛^{1,2*}, 李 宏²

1. 成都医学院 药学院, 四川 成都 610500

2. 成都依全科技开发有限公司, 四川 成都 610000

摘 要: **目的** 研究丁香油对丙酸睾酮诱导大鼠前列腺增生的抑制作用, 并探讨其作用机制。**方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分成对照组、模型组、非那雄胺 1 mg/kg 组和丁香油 1、2、4 mg/kg 组, 每组各 10 只。非那雄胺组和丁香油组大鼠每日 ig 给药 1 次, 连续给药 30 d。对照组和模型组 ig 给予同等体积蒸馏水, 检测大鼠前列腺腺体的湿质量、前列腺指数和对大鼠前列腺细胞 NADPH 氧化酶的影响。并观察非那雄胺 10 $\mu\text{mol/L}$ 和丁香油 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 对 5 α -还原酶的抑制作用。**结果** 与模型组比较, 丁香油 1、2、4 mg/kg 组大鼠前列腺湿质量和前列腺指数均明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 丁香油 1、2、4 mg/kg 组的荧光显著降低 ($P < 0.01$), 说明丁香油对前列腺细胞 NADPH 氧化酶的活性有明显抑制作用。与非那雄胺组比较, 丁香油 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组对 5 α -还原酶活性的平均 I 均显著升高 ($P < 0.01$), 说明丁香油对 5 α -还原酶的活性有明显抑制作用。**结论** 丁香油具有明显抑制前列腺增生的作用, 其机制主要是通过抑制 5 α -还原酶和抑制 NADPH 氧化酶的作用。

关键词: 丁香油; 前列腺增生; NADPH 氧化酶; 5 α -还原酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)07-1952-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.07.003

Inhibition of clove oil on benign prostatic hyperplasia induced by testosterone propionate

YUAN Ting¹, ZHOU Rui-xuan¹, MA Song-tao^{1,2}, LI Hong²

1. Department of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

2. Chengdu Yiquan Technology Development Co., Ltd, Chengdu 610000, China

Abstract: **Objective** To study the inhibiting effects of clove oil on benign prostatic hyperplasia induced by testosterone propionate and its mechanism. **Methods** SD rats (60) were randomly divided into control group, model group, finasteride 1 mg/kg group, and clove oil 1, 2, and 4 mg/kg group, and each group had 10 rats. Rats in finasteride group and clove oil group were ig administered with drugs for 30 d, once daily. The control group and model group were ig administered with the same volume of distilled water. Prostate wet mass and index of rat and effects of clove oil on NADPH oxidase in prostate cells of rat were detected. The inhibiting effects of finasteride 10 $\mu\text{mol/L}$ and clove oil 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ on 5 α -reductase were observed. **Results** Compared with the model group, the wet mass of the prostate and the prostate index in clove oil 1, 2, and 4 mg/kg group were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, fluorescence in clove oil 2 and 4 mg/kg group were significantly reduced ($P < 0.01$), indicating that clove oil had the inhibiting effects on NADPH oxidase in prostate cells. Compared with the finasteride group, mean I of clove oil 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ on 5 α -reductase were significantly increased ($P < 0.01$), indicating that clove oil had the inhibiting effects on 5 α -reductase in prostate cells. **Conclusion** Clove oil has significant effect on inhibiting benign prostatic hyperplasia, and its mechanism of action is mainly through inhibition of 5 α -reductase and inhibition of NADPH oxidase.

Key words: clove oil; benign prostatic hyperplasia; NADPH oxidase; 5 α -reductase

良性前列腺增生是老年男性常见病, 其发病率随年龄递增, 可高达 50%~70%。目前, 对良性前列腺增生药物的研究已引起广泛的重视。良性前列腺增生临床表现主要为排尿困难、尿潴留及肾功能

收稿日期: 2019-01-23

基金项目: 四川省人力资源和社会保障厅资助项目 (14Z018); 四川省科技厅资助项目 (2015JY0131)

作者简介: 袁 婷, 在读硕士, 从事临床药学研究。E-mail: yuanting1806@163.com

*通信作者 马松涛, 教授, 主要从事中药药理学研究。E-mail: mstin@163.com

#并列第一作者: 周芮萱

损害,严重影响老年男性患者的生活质量。由于发病机制复杂,单一的靶点药物治疗并不十分理想,而天然植物药在此方面却取得了很好的疗效^[1-2]。丁香为传统中药,具有温中暖肾功效。花蕾富含挥发油即丁香油,油中含有丁香油酚、丁香烯和乙酰丁香油酚等^[3],主要成分丁香油酚常温下为淡黄色黏稠油状液体,呈强烈的丁香气息和特殊辛辣味,微溶于水而易溶于有机溶剂。其广泛用于牙科镇痛、麻醉剂、抗炎镇痛^[4]以及调味剂等。近年来,丁香油的现代药理作用研究主要集中在对消化系统、血液系统、神经系统的作用^[5]。本研究探讨丁香油对丙酸睾酮诱导大鼠前列腺增生的抑制作用及其作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

雄性SD大鼠,体质量(123.12±12.34)g,由四川大学华西医学实验动物中心提供,动物使用许可证号SCXK(川)2013-026。

1.2 药物与试剂

丁香油由成都依全科技开发有限公司提供,相当于原生药186 g/kg,丁香酚质量分数为73.0%;丙酸睾酮注射液,2 mL/支,含丙酸睾酮25 mg/mL,由上海通用药业股份有限公司提供,产品批号160202;非那雄胺片,0.5 mg/片,由默沙东药厂提供,产品批号284979;Tris缓冲液用盐酸调pH值至7.0;WST-1溶液由Biovision公司提供;甾体5 α -还原酶自制(取3只雄性SD大鼠,禁食一夜后取肝脏浸入上述Tris缓冲液中,于0℃条件下匀浆,高速离心,制备出作为甾体5 α -还原酶载体的肝脏微粒体悬液,置于-70℃冰箱备用);睾酮、依赖还原辅酶II(NADPH)均由Sigma化学公司提供。

1.3 主要仪器

微量紫外可见分光光度计由美国NanoDrop Technologies提供。

2 方法

2.1 分组及给药

取雄性SD大鼠60只,随机分成对照组、模型组、非那雄胺1 mg/kg组和丁香油4、2、1 mg/kg组,每组各10只,根据前期临床运用剂量和预实验结果拟定给药剂量。

除对照组外,其余各组sc丙酸睾酮5 mg/(kg·d),连续30 d。对照组ig生理盐水1 mL/kg,模型组ig生理盐水1 mL/kg,非那雄胺组ig非那雄胺片1 mg/kg;

丁香油配制成4%生理盐水混悬液,丁香油1、2、4 mg/kg组分别ig丁香油混悬液1、0.5、0.25 mL/kg,1次/d,共30 d。

2.2 丁香油对大鼠前列腺湿质量和指数的影响

将6组大鼠于第31天禁食12 h,断头处死,迅速摘取完整前列腺,电子天平称质量,计算前列腺脏/体质量比值即前列腺指数^[6]。

2.3 丁香油对大鼠前列腺细胞NADPH氧化酶的影响^[7]

将上述各组前列腺组织分别剪碎,胰酶消化后,取匀浆上清液迅速加入WST-1溶液10 μ L、过氧化氢酶溶液2 μ L,37℃恒温水浴30 min,测定450 nm波长处的吸光度(A)值。在上述溶液中再分别加入1 mmol/L NADPH试剂5 μ L,再次测定450 nm波长处的A值,计算大鼠前列腺细胞NADPH氧化酶的活性。

$$\text{荧光} = (A_{\text{加入NADPH试剂}} - A_{\text{未加NADPH试剂}}) / \text{蛋白质量}$$

2.4 丁香油对5 α -还原酶活性的影响

采用分光光度计法测定丁香油对5 α -还原酶的抑制作用^[8-9]。于反应管中加入对照组、非那雄胺10 μ mol/L组和丁香油(按丁香酚计)10、20 μ mol/L组、系列浓度的睾酮、5 α -还原酶、NADPH和Tris缓冲液,混合后测定A值,37℃恒温孵育60 min后测定A值,扣除NADPH下降本底值,测出空白下降值 ΔA_n 。睾酮设0.5、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8 μ mol/L 7个浓度,每个浓度分3组。计算丁香油对5 α -还原酶的抑制率(I)。

$$I_n = (\Delta A_0 - \Delta A_n) / \Delta A_0$$

ΔA_0 代表未加入各组时的空白下降值, ΔA_n 代表不同睾酮浓度下的空白下降值

2.5 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验结果用SPSS 13.0统计软件进行方差分析。

3 结果

3.1 丁香油对大鼠前列腺湿质量和指数的影响

与对照组比较,模型组的前列腺湿质量和指数均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),表示建模成功。与模型组比较,非那雄胺组的前列腺湿质量和指数均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),丁香油丁香油1、2、4 mg/kg组的前列腺湿质量和指数均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明丁香油对丙酸睾酮所致大鼠良性前列腺增生有明显的抑制作用,见表1。

表1 丁香油对大鼠前列腺湿质量和指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Effect of clove oil on prostate wet mass and index of rat ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	前列腺湿质量/mg	前列腺指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	0.281±0.039	1.078±0.1365
模型	—	0.720±0.083**	2.919±0.294**
非那雄胺	1	0.502±0.078 ^{##}	2.206±0.360 ^{##}
丁香油	1	0.563±0.110 ^{##}	2.200±0.552 ^{##}
	2	0.528±0.050 ^{##}	2.210±0.215 ^{##}
	4	0.380±0.082 ^{##}	1.530±0.375 ^{##}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs model group

3.2 丁香油对大鼠前列腺细胞 NADPH 氧化酶的影响

与对照组比较, 模型组的前列腺细胞 NADPH 荧光显著升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 表示建模成功。与模型组比较, 非那雄胺组的荧光显著降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 丁香油 2、4 mg/kg 组的荧光显著降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 说明丁香油对前列腺细胞 NADPH 氧化酶的活性有明显抑制作用, 丁香油对大鼠前列腺细胞 NADPH 氧化酶的影响见表 2、图 1。

3.3 丁香油对 5 α -还原酶活性的影响

与非那雄胺组比较, 丁香油 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组对 5 α -还原酶活性的平均 I 均显著升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 说明丁香油对 5 α -还原酶的活性有明显抑制作用, 见表 3。

表2 丁香油对大鼠前列腺细胞NADPH氧化酶的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Effect of clove oil on NADPH oxidase in prostate cells of rat ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹)	荧光/ (RLU·mg ⁻¹)
对照	—	1.18±0.10
模型	—	5.14±0.97**
非那雄胺	1	2.28±0.51 ^{##}
丁香油	1	4.48±0.97
	2	4.05±0.78 ^{##}
	4	2.49±0.84 ^{##}

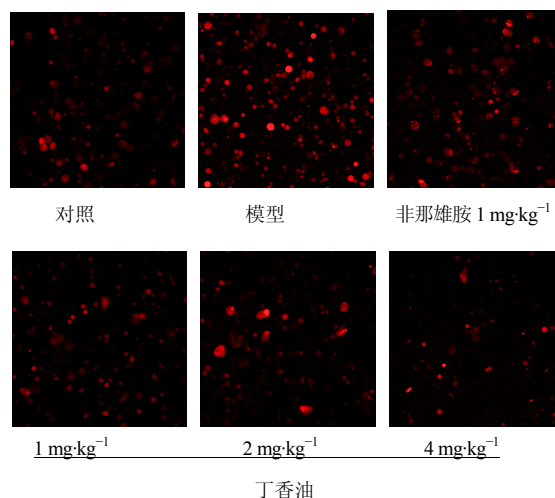
与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs model group

图1 丁香油对大鼠前列腺细胞 NADPH 氧化酶的影响

Fig. 1 Effect of clove oil on NADPH oxidase in rat prostate cells

表3 丁香油对 5 α -还原酶活性的影响Table 3 Effect of clove oil on activity of 5 α -reductase

组别	剂量($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$I_{0.5}$	$I_{0.8}$	$I_{1.2}$	$I_{1.6}$	$I_{2.0}$	$I_{2.4}$	$I_{2.8}$	平均 I
对照	—	0.069±0.002	0.098±0.005	0.160±0.100	0.220±0.003	0.327±0.015	0.475±0.038	0.797±0.021	—
非那雄胺	10	0.166±0.574	0.305±0.006	0.443±0.053	0.592±0.102	0.568±0.010	0.726±0.988	1.218±0.158	0.571
丁香油	10	0.159±0.057	0.215±0.066	0.288±0.007	0.459±0.127	0.529±0.060	0.681±0.011	0.992±0.115	0.650**
	20	0.158±0.064	0.213±0.180	0.238±0.150	0.294±0.003	0.352±0.063	0.482±0.011	0.848±0.014	0.715**

与非那雄胺组比较: ** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs finasteride group

4 讨论

丁香具有温中暖肾功效, 其花蕾含挥发油即丁香油, 丁香油主要含有丁香酚、丁香烯和乙酰丁香酚等。动物实验结果表明丁香油高、中、低剂量均能显著减轻模型大鼠前列腺湿重和前列腺指数, 提示丁香油能有效抑制良性前列腺增生。有关良性

前列腺增生的发病机制研究颇多, 但病因至今仍未阐明^[10]。目前已知良性前列腺增生必须具备睾丸存在和年龄增长及衰老两个条件。White 等^[11]已经证实良性前列腺增生的发生必须依赖体内雄激素的存在。血液中的雄激素以睾酮为主, 睾酮经 5 α -还原酶的作用转变为双氢睾酮, 后者是主要调节前列

腺生长的雄激素。5 α -还原酶抑制剂能竞争性、选择性地抑制 5 α -还原酶的活性,从而抑制双氢睾酮的生成,明显降低前列腺和循环中的双氢睾酮水平,减少前列腺的体积,有效改善下尿路梗阻和刺激症状^[12]。基于以上作用机制,本实验选用非那雄胺为阳性药,该药是目前已上市药物中治疗良性前列腺增生最有效的药物,也是治疗良性前列腺增生药物的金标准和目前最常用阳性对照药。体外实验显示,丁香油对 5 α -还原酶的活性有明显抑制作用。

同时丁香油对前列腺细胞 NADPH 氧化酶的活性有明显抑制作用。NADPH 氧化酶是与胞浆膜相关的酶,主要分布在胚层来源的细胞中,其中前列腺组织中也有分布。NADPH 氧化酶是以胞质 NADPH 为电子供体,催化胞外的 O₂ 生成超氧阴离子(O₂²⁻)的氧化还原酶,广泛参与细胞的增殖、分化和凋亡。当 NADPH 氧化酶的活性上调时,大量生成的 ROS 促进氧化应激的形成^[13-14]。氧化应激在衰老过程中起着十分重要的作用,但直接的抗氧化的效果并不十分理想,还可能导致新问题出现^[15]。而近年来通过抑制 NADPH 氧化酶,在许多疾病如心血管疾病、糖尿病肾病等方面取得了很好的效果,同时也有研究显示其在良性前列腺增生机制研究和治疗方面也取得较好成果^[16]。

综上所述,丁香油具有明显抑制丙酸睾酮诱导大鼠前列腺增生的作用,其作用机制主要是通过抑制 5 α -还原酶和抑制 NADPH 氧化酶的作用,为今后进一步研究和开发相关药物提供了新的思路和靶点。

参考文献

- [1] Keehn A, Taylor J, Lowe F C, *et al.* Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia [J]. *Curr Urol Rep*, 2016, 17(7/8): 165-177.
- [2] Al-Trad B, Al-Zoubi M, Qar J, *et al.* Inhibitory effect of thymoquinone on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in Wistar rats [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(12): 1910-1915.
- [3] 孔晓军,刘希望,李剑勇,等. 丁香酚的药理学作用研究进展 [J]. *湖北农业科学*, 2013, 52(3): 508-511.
- [4] Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, *et al.* The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review [J]. *Phytother Res*, 2007, 21(6): 501-506.
- [5] 朱金段,袁德俊,林新颖. 丁香的药理研究现状及临床应用 [J]. *中国药物经济学*, 2013(1): 32-35.
- [6] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1553.
- [7] Vital P, Castro P, Ittmann M. Oxidative stress promotes benign prostatic hyperplasia [J]. *Prostate*, 2016, 76(1): 58-67.
- [8] 巫传玲,马松涛,王富琴,等. 莲心子提取物对 5 α -还原酶的抑制作用研究 [J]. *中国药业*, 2012, 21(10): 17-18.
- [9] 巫传玲,马松涛. 5 α -还原酶抑制剂体外筛选模型的建立 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013, 15(7): 130-131.
- [10] Sharma M, Chadha R, Dhingra N. Phytotherapeutic agents for benign prostatic hyperplasia: an overview [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2017, 17(14): 1346-1363.
- [11] White J W. The results of double castration in hypertrophy of the prostate [J]. *Ann Surg*, 2008, 22(1): 1-80.
- [12] 袁莉娟,刘爱民. 5 α -还原酶抑制剂的临床应用 [J]. *首都食品与医药*, 2015, 22(2): 42-43.
- [13] Ritchie R H, Drummond G R, Sobey C G, *et al.* The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 116: 57-69.
- [14] Maejima Y, Kuroda J, Matsushima S, *et al.* Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(3): 408-416.
- [15] Van Buren P N, Toto R. Current update in the management of diabetic nephropathy [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2013, 9(1): 62-77.
- [16] Zabaoui N, Mabed D, Lobaccaro J M, *et al.* Oxidative stress in benign prostate hyperplasia [J]. *Andrologia*, 2016, 48(1): 69-73.