

地奥司明对雄性大鼠良性前列腺增生的改善作用

陈 涛, 黄文涛*

武汉市中西医结合医院 药学部, 湖北 武汉 430022

摘要: **目的** 探讨地奥司明对大鼠良性前列腺增生的改善作用及其作用机制。**方法** Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、地奥司明 80、160 mg/kg 组, 每组各 6 只。采用手术去势和每日 sc 10 mg/kg 的丙酸睾酮注射液建立大鼠良性前列腺增生模型, 地奥司明组每日 ig 80、160 mg/kg 地奥司明, 各组大鼠连续给药 4 周。实验结束后分离前列腺组织, 观察药物对良性前列腺增生大鼠前列腺指数 (PI)、PACP 酶活力、前列腺组织形态学变化和前列腺组织氧化应激水平的影响, 并采用 Western blotting 法评价 I 型胶原 (Col-I)、雄激素受体 (AR) 和雌激素受体- α/β (ER- α/β) 表达。**结果** 与模型组比较, 地奥司明能够显著降低 PI ($P < 0.01$), 抑制 PACP 的酶活力 ($P < 0.05, 0.01$)。与模型组比较, 地奥司明在一定程度上抑制了前列腺上皮增生和胶原沉积。与模型组比较, 地奥司明组 (160、80 mg/kg) 均能显著提升超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 和过氧化氢酶 (CAT) 的酶活力 ($P < 0.05, 0.01$)。与模型组比较, 地奥司明干预可有效升高前列腺还原型谷胱甘肽 (GSH)、总巯基 (T-SH) 水平, 降低丙二醛 (MDA)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 水平 ($P < 0.05, 0.01$)。与模型组比较, 地奥司明组 Col-I 的表达明显降低 ($P < 0.01, 0.05$), 160 mg/kg 地奥司明能显著抑制 AR 和 ER- α 的表达 ($P < 0.01$), 80 mg/kg 地奥司明则明显降低 AR 的表达 ($P < 0.05$); 且地奥司明能显著提高 ER- β 的表达 ($P < 0.01$)。**结论** 地奥司明改善大鼠良性前列腺增生的作用机制与调控前列腺 AR、ER- α/β 表达和氧化应激有关。

关键词: 地奥司明; 良性前列腺增生; 雄激素受体; 雌激素受体; 氧化应激

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)02-0281-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.02.003

Improvement of diosmin on benign prostatic hyperplasia in male rats

CHEN Tao, HUANG Wen-tao

Department of Pharmacy, Wuhan Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan 430022, China

Abstract: **Objective** To investigate the improvement and mechanism of diosmin on benign prostatic hyperplasia in male rats. **Methods** Wistar rats were randomly divided into the control, model, and diosmin (80, 160 mg/kg) groups, and each group had 6 rats. Rats with benign prostatic hyperplasia model were established by surgical castration, and sc administered with Testosterone Propionate Injection 10 mg/kg. The diosmin groups were ig administered with diosmin 80 and 160 mg/kg every day, and the rats in each group were given the drug continuously for 4 weeks. The prostate tissue was isolated, and the effects of drugs on prostate PI, PACP activity, prostate tissue morphology, and oxidative stress level were observed. And the Col-I, AR, and ER- α/β expression levels were evaluated by Western blotting method. **Results** Compared with the model group, PI was significantly reduced in the diosmin groups ($P < 0.01$), and the enzyme activity of PACP was inhibited ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, diosmin inhibited prostatic epithelial hyperplasia and collagen deposition to a certain extent. Compared with the model group, the activities of SOD, GPx, and CAT were significantly increased in the diosmine 80, 160 mg/kg groups ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the intervention of diosmin could significantly increase GSH and T-SH levels in the prostate, and reduce the MDA and GSSG levels ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the expression of Col-I in the diosmin group was significantly decreased ($P < 0.01, 0.05$), and the expression levels of AR and ER- α were significantly inhibited by 160 mg/kg diosmin ($P < 0.01$), the expression level of AR was significantly decreased by 80 mg/kg diosmin ($P < 0.05$), and the expression level of ER- β was significantly increased by dexamethasone ($P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of diosmin in improving benign prostatic hyperplasia

收稿日期: 2018-08-15

基金项目: 武汉市临床医学科研项目 (WZ17Q05)

作者简介: 陈 涛, 男, 药师, 硕士, 研究方向为药物制剂。E-mail: 990300190@qq.com

*通信作者 黄文涛, 男, 主管药师, 硕士。E-mail: 25513218@qq.com

in rats is related to regulation of AR, ER- α /ER- β expression and oxidative stress in the prostate.

Key words: Diosmin; benign prostatic hyperplasia; AR; ER; oxidative stress

良性前列腺增生是一种前列腺体非恶性增大疾病^[1]。良性前列腺增生的发病率随着年龄递增,在50岁以上人群中约50%患有良性前列腺增生,而90岁以上人群中约90%患有良性前列腺增生^[2]。良性前列腺增生涉及前列腺上皮细胞和平滑肌细胞异常增殖,因此也是导致男性尿潴留、尿频、排尿缓慢等下尿路症状的主要原因^[1]。地奥司明是一种从芸香科植物中提取得到的黄酮类药物,用于治疗各种慢性静脉功能不全^[3]。国内外近年来研究发现地奥司明在前列腺疾病中具有良好的防治作用,能够明显抑制对盆腔淤血所致慢性前列腺炎,改善前列腺局部炎症微环境^[4],促进前列腺癌DU145细胞株凋亡^[5]。临床观察显示地奥司明可改善前列腺炎、前列腺增生的临床症状,提高患者生活质量^[6-7]。本研究拟探讨地奥司明对大鼠良性前列腺增生的改善作用及其机制研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JS1075型凝胶成像系统(上海培清科技有限公司);TGL18M型离心机(湖南凯达科学仪器有限公司);RT-6100型酶标仪(深圳雷杜生命科学有限公司)。

1.2 试剂

地奥司明片由马应龙药业集团股份有限公司生产,规格0.5g,产品批号150819。丙酸睾酮注射液由天津金耀药业有限公司生产,规格1mL:25mg,产品批号150822。

前列腺酸性磷酸酶(PACP)(批号20160803)、超氧化物歧化酶(SOD)(批号20160804)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)(批号20180803)、过氧化氢酶(CAT)(批号20180804)、丙二醛(MDA)(批号20160804)、还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)(批号20160808)和总巯基(T-SH)(批号20160808)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。雄激素受体(AR)(批号11D53)一抗购自武汉博士德生物工程有限公司。雌激素受体- α (ER- α)(批号ab32063)和I型胶原(Col-I)(批号ab34710)一抗均购自英国abcam公司。雌激素受体- β (ER- β)(批号14007-1-AP)一抗均购自美国Proteintech公司。

1.3 动物

雄性SPF级Wistar大鼠,体质量160~180g,由湖北省实验动物研究中心提供,生产许可证号SCXK(鄂)2015-0018,使用合格证号42000600009586。

2 方法

2.1 动物造模和给药

大鼠适应环境1周后,随机分为对照组、模型组和地奥司明80、160mg/kg组,每组各6只。建立大鼠良性前列腺增生模型^[8]:大鼠经350mg/kg水合氯醛麻醉后切开下腹部,去除睾丸(去势)并缝合。恢复3d后,所有大鼠每日sc10mg/kg丙酸睾酮-橄榄油(1:3)。对照组大鼠切开下腹部后随即缝合(假手术),并每日sc等体积的橄榄油(丙酸睾酮溶媒)。地奥司明组每日ig80、160mg/kg地奥司明。各组大鼠连续给药4周。地奥司明给药剂量参考有关报道^[4],并根据人口服剂量通过体表面积换算设定。

2.2 前列腺指数和PACP活力测定

实验结束后记录大鼠的体质量,收集前列腺组织称重,分割并计算前列腺指数(PI,PI=前列腺质量/体质量)。同时分离血浆,用于检测PACP酶活力,操作步骤均依照试剂盒说明书进行。

2.3 前列腺组织形态学变化

部分前列腺组织用4%的多聚甲醛在4℃浸泡固定、石蜡包埋、组织切片分别采用HE染色观察形态学变化和Masson染色观察胶原沉积情况,于200倍显微镜下观察拍照并标注100 μ m标尺。

2.4 前列腺组织氧化应激水平测定

部分前列腺组织用冰冷的0.9%氯化钠溶液制备组织匀浆,用于检测前列腺SOD、GPx、CAT、MDA、GSH、GSSG和T-SH水平来综合评价组织氧化应激水平,操作步骤均依照试剂盒说明书进行。

2.5 前列腺组织Col-I、AR和ER- α /ER- β 蛋白表达

部分前列腺组织用于Western blotting检测前列腺Col-I和AR、ER- α /ER- β 的表达水平。将组织样本剪碎后液氮研磨,提总蛋白并以蛋白与5 $\times$ loading buffer按4:1混匀,100℃变性3min后取20 μ L进行10%SDS-PAGE电泳。电泳结束后转膜在5%的脱脂奶粉中,于37℃封闭1h,然后在4℃孵育相应的一抗[AR(1:800)、ER- α /ER- β (1:800)和

Col-I (1:1000)], 12 h。清洗后在室温下孵育酶标二抗 1 h, 化学发光并成像, β -actin 为内参。

2.6 统计学方法

实验数据采用 SPSS 11.5 软件分析, 并以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (Tukey 检验)。

3 结果

3.1 地奥司明对良性前列腺增生大鼠前列腺指数和 PACP 的影响

各组大鼠之间的初始体质量和终体质量均没有显著差异。与对照组比较, 模型组大鼠的前列腺明显增重, PI 指数显著上升, 血浆 PACP 酶活力显著增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 地奥司明能够显著降低 PI ($P < 0.01$), 抑制 PACP 酶活力 ($P < 0.05, 0.01$), 见表 1。

3.2 地奥司明对良性前列腺增生大鼠前列腺形态学变化的影响

与对照组比较, 模型组大鼠前列腺上皮有明显增厚和乳头状突起 (箭头)。Masson 染色显示模型组大鼠前列腺存在明显胶原沉积 (箭头)。与模型组比较, 地奥司明在一定程度上抑制了前列腺上皮增生和胶原沉积, 见图 1。

3.3 地奥司明对良性前列腺增生大鼠前列腺组织氧化应激水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠的前列腺抗氧化酶 SOD、GPx 和 CAT 酶活力均显著降低 ($P < 0.01$)。相对于模型组, 地奥司明组 160、80 mg/kg 均能显著提升 SOD、GPx 和 CAT 酶活力 ($P < 0.05, 0.01$)。与对照组比较, 模型组大鼠非酶抗氧化物 GSH 和 T-SH 水平显著下降, 氧化指标 MDA 和 GSSG 水平明显上升 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 地奥司明干预可有效升高前列腺 GSH、T-SH 水平, 降低 MDA、GSSG 水平 ($P < 0.05, 0.01$), 见表 2。

3.4 地奥司明对良性前列腺增生大鼠前列腺组织 Col-I、AR、ER- α/β 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组前列腺组织的 Col-I、AR 和 ER- α 蛋白表达显著增强, ER- β 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 地奥司明组 Col-I 表达明显降低 ($P < 0.01, 0.05$), 160 mg/kg 地奥司明能够显著抑制 AR、ER- α 表达 ($P < 0.01$), 而 80 mg/kg 地奥司明则能够明显降低 AR 表达 ($P < 0.05$); 且地奥司明能显著提高 ER- β 表达 ($P < 0.01$), 见表 3、图 2。

表 1 地奥司明对良性前列腺增生大鼠体质量、PI 和 PACP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of diosmin on body weight, PI, and PACP levels in benign prostatic hyperplasia rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	初体质量/g	终体质量/g	PI/(mg g ⁻¹)	PACP/(U L ⁻¹)
对照	—	187.8 ± 5.8	370.3 ± 9.0	2.32 ± 0.18	24.3 ± 1.6
模型	—	188.5 ± 7.1	363.0 ± 11.1	5.06 ± 0.36**	54.8 ± 3.9**
地奥司明	80	186.8 ± 6.1	366.7 ± 8.2	4.08 ± 0.35 ^{##}	48.6 ± 3.1 [#]
	160	188.8 ± 6.8	368.0 ± 8.6	3.41 ± 0.16 ^{##}	35.6 ± 4.8 ^{##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

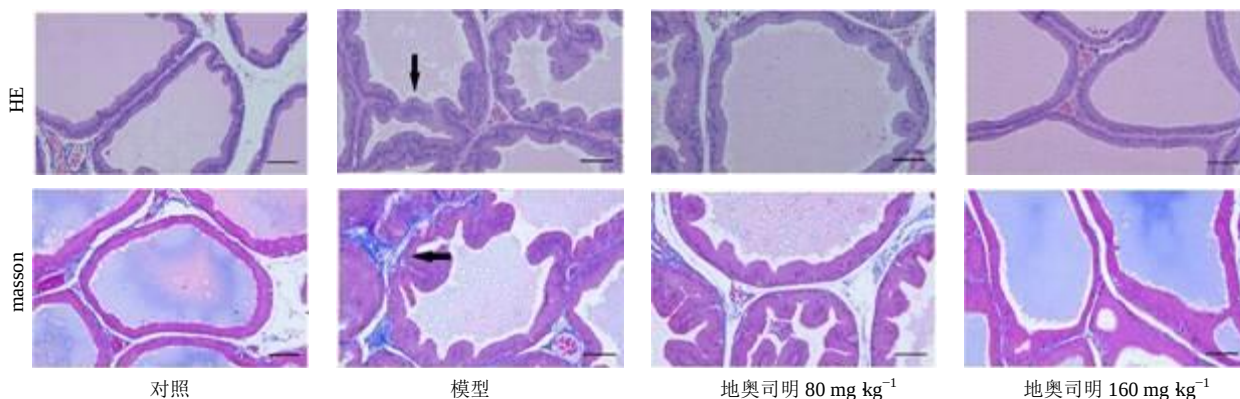


图 1 大鼠前列腺组织病理学检测 (HE 和 Masson 染色)

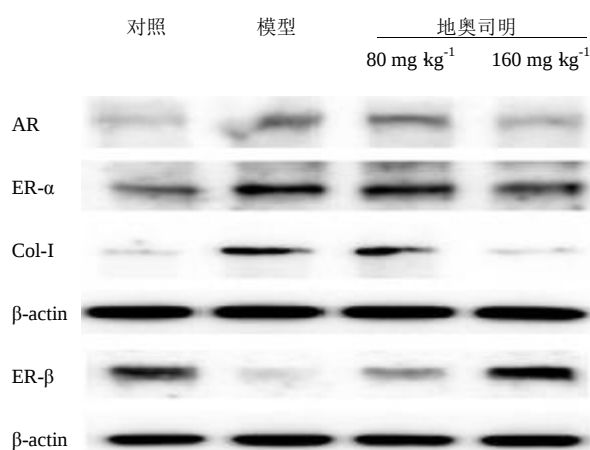
Fig. 1 Pathological examination of prostate in rats (HE and masson staining)

表2 各组大鼠前列腺抗氧化酶活力、非酶抗氧化物和氧化指标比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 2 Comparison on prostate antioxidant enzyme activity, nonenzymatic antioxidants and oxidative indicators in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/ (mg kg ⁻¹)	SOD/ (U mg ⁻¹)	GPx/ (U mg ⁻¹)	CAT/ (U mg ⁻¹)	MDA/ (nmol mg ⁻¹)	GSH/ (nmol mg ⁻¹)	GSSG/ (nmol mg ⁻¹)	T-SH/ (mmol mg ⁻¹)
对照	—	75.61 ± 9.26	106.51 ± 9.49	34.37 ± 4.85	3.57 ± 0.44	4.64 ± 0.44	0.18 ± 0.05	0.018 ± 0.009
模型	—	27.86 ± 6.91**	62.29 ± 7.51**	19.23 ± 3.81**	8.33 ± 0.87**	2.63 ± 0.32**	0.765 ± 0.11**	0.0024 ± 0.0008**
地奥司明	80	54.34 ± 4.75##	67.27 ± 6.89##	24.16 ± 3.25#	6.65 ± 0.34##	3.25 ± 0.34#	0.573 ± 0.07##	0.0040 ± 0.0007##
	160	66.55 ± 9.56##	71.77 ± 7.41##	26.72 ± 4.11##	5.62 ± 0.32##	3.535 ± 0.41##	0.523 ± 0.05##	0.0056 ± 0.0007##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group表3 各组大鼠前列腺 Col-I、AR 和 ER- α/β 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Table 3 Comparison on the prostatic expression of Col-I, AR, and ER- α/β in different group ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	Col-I/ β -actin(相对值)	AR/ β -actin(相对值)	ER- α / β -actin(相对值)	ER- β / β -actin(相对值)
对照	—	1.00 ± 0.31	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.13
模型	—	5.93 ± 0.49**	2.42 ± 0.39**	1.80 ± 0.24**	0.13 ± 0.03**
地奥司明	80	5.15 ± 0.46#	2.00 ± 0.19#	1.53 ± 0.17	0.38 ± 0.05##
	160	1.25 ± 0.28##	1.29 ± 0.18##	1.14 ± 0.17##	0.95 ± 0.05##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group图2 各组大鼠前列腺 AR、ER- α/β 蛋白表达检测结果Fig. 2 Detection of the AR and ER- α/β protein expression in prostate of rats

4 讨论

黄酮类化合物具有多样的生物活性,尤其是在前列腺疾病中的防治价值引起越来越多的关注^[9]。本实验通过计算前列腺指数和检测 PACP 酶活力评价良性前列腺增生程度^[10-11],证实了奥司明能够有效缓解去势和丙酸睾酮注射诱导的大鼠良性前列腺增生,与地奥司明缓解前列腺增生的临床症状的临床观察一致^[7]。氧化应激是细胞环境中活性氧的产

生和机体清除能力失衡的一种状态,表现为活性氧簇(ROS)增多以及酶和非酶抗氧化剂减少,被认为是前列腺增生症的触发机制之一^[12]。现已知局部缺氧微环境是良性前列腺增生的病理学特征之一,ROS在其中发挥枢纽作用,而中等程度的缺氧微环境促进细胞增生,不仅如此自身可通过激活增殖/凋亡相关基因而干预细胞生长^[13]。ROS不仅破坏DNA的完整性和生物功能,还能促进脂质过氧化物的发生,临床观察已发现良性前列腺增生患者伴随着抗氧化酶活性降低和脂质过氧化产物水平升高的现象^[14]。地奥司明是一种不饱和黄酮苷,其苷元上的多酚结构使地奥司明具备较强的抗氧化能力^[15]。本研究结果表明地奥司明的抗良性前列腺增生作用与其恢复体内抗氧化酶活力和增加非酶抗氧化物含量有关。

良性前列腺增生涉及前列腺腺上皮和纤维肌基质的复杂渐进生长,而该过程很大程度上是通过性激素和生长因子调控的^[16]。研究表明,年龄增长正是通过改变这种性激素微环境而增加良性前列腺增生的患病风险^[17]。AR在前列腺细胞生长存活中发挥至关重要的作用。睾酮等雄激素与AR结合启动AR信号通路,一方面可以通过干预间质细胞旁分泌因子而调控前列腺上皮细胞生长分化^[2];另一方

面能调控多种生长因子的分泌,由此促进前列腺增长和通过刺激胶原合成而促进细胞外基质沉积^[18]。ER 同样存在在前列腺基质和上皮细胞中,参与前列腺细胞的增生和存活调控^[17]。ER- α 的活化促进前列腺组织增生、炎症和发育异常。相反,ER- β 通过雄激素独立的方式抑制细胞增殖并促进凋亡^[15]。睾酮能够抑制 ER- β 表达和促进 ER- α 表达^[18]。反过来,ER- β 在前列腺组织表达可抑制 AR 通路的活化^[19]。本研究发现地奥司明能显著抑制良性前列腺增生大鼠 AR 和 ER- α 的表达,并促进 ER- β 的表达。

综上所述,地奥司明能够通过抑制前列腺氧化应激、改善前列腺组织蛋白表达,为地奥司明防治良性前列腺增生的应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] Chung K S, Cheon S Y, An H J. Effects of resveratrol on benign prostatic hyperplasia by the regulation of inflammatory and apoptotic proteins [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(4): 689-694.
- [2] Wang L, Xie L, Tintani F, et al. Aberrant transforming growth factor- β activation recruits mesenchymal stem cells during prostatic hyperplasia [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(2): 394-404.
- [3] 李玉山. 地奥司明药理作用及临床应用研究进展 [J]. 海峡药学, 2015, 27(12): 81-85.
- [4] 崔功廷, 袁 铭. 地奥司明对盆腔淤血所致大鼠慢性非细菌性前列腺炎的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(6): 444-447.
- [5] Lewinska A, Siwak J, Rzeszutek I, et al. Diosmin induces genotoxicity and apoptosis in DU145 prostate cancer cell line [J]. *Toxicol in Vitro*, 2015, 29(3): 417-425.
- [6] 黄智超, 赵晓昆, 王荫槐, 等. 地奥司明片联合盐酸坦索罗辛缓释胶囊治疗III_B型前列腺炎的临床研究 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2016, 31(2): 111-114.
- [7] 刘贻泉. 地奥司明治疗中老年前列腺增生的疗效 [C]. 《医药导报》第八届编委会成立大会暨 2009 年度全国医药学术交流会和临床药学与药学服务研究进展培训班论文集. 武汉: 中国药理学会、同济医院《医药导报》编辑部, 2009: 54.
- [8] Sun H, Li T J, Sun L N, et al. Inhibitory effect of traditional Chinese medicine Zi-Shen Pill on benign prostatic hyperplasia in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115(2): 203-208.
- [9] 陈镜楼, 宋红萍. 黄酮类化合物防治良性前列腺增生的作用机制研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(11): 2287-2290.
- [10] Afriyie D K, Asare G A, Bugyei K, et al. Treatment of benign prostatic hyperplasia with croton membranaceus in an experimental animal model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 157: 90-98.
- [11] Xu D H, Wang L H, Mei X T, et al. Protective effects of seahorse extracts in a rat castration and testosterone-induced benign prostatic hyperplasia model and mouse oligospermia model [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 37(2): 679-688.
- [12] Udensi U K, Tchounwou P B. Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 139.
- [13] Ren H, Li X, Cheng G, et al. The effects of ROS in prostatic stromal cells under hypoxic environment [J]. *Aging Male*, 2015, 18(2): 84-88.
- [14] 张祥华, 马 丁. 衰老基因在良性前列腺增生发生发展中的研究进展 [J]. 中华临床医师杂志, 2013, 7(22): 10238-10240.
- [15] Abdel-Daim M M, Khalifa H A, Abushouk A I, et al. Diosmin attenuates methotrexate-induced hepatic, renal, and cardiac injury: A biochemical and histopathological study in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3281670.
- [16] Minutoli L, Rinaldi M, Marini H, et al. Apoptotic pathways linked to endocrine system as potential therapeutic targets for benign prostatic hyperplasia [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8): E1311.
- [17] Mirone V, Fusco F, Verze P, et al. Androgens and benign prostatic hyperplasia [J]. *Eur Urol Suppl*, 2006, 5(4): 410-417.
- [18] Wu X, Gu Y, Li L. The anti-hyperplasia, anti-oxidative and anti-inflammatory properties of Qing Ye Dan and swertiamarin in testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2017(265): 9-16.
- [19] Wu W F, Maneix L, Insunza J, et al. Estrogen receptor β , a regulator of androgen receptor signaling in the mouse ventral prostate [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(19): E3816-E3822.