

罗达灵通胶囊对前列腺增生大鼠的影响

李晓华¹, 房志仲^{1*}, 杨金荣¹, 孙 锐², 孟令新³, 吕菁菁¹

(1. 天津医科大学药学院, 天津 300070; 2. 天津医科大学基础医学院, 天津 300070;

3. 天津医科大学肿瘤医院, 天津 300060)

摘 要:目的 探讨罗达灵通胶囊对前列腺增生大鼠模型的作用。方法 采用去势大鼠注射丙酸睾酮的方法复制前列腺增生模型, 采用 ig 方式给予大鼠罗达灵通胶囊高、低剂量及等体积去离子水, 连续 15 d 后处死, 观察前列腺组织形态及质量, 并通过免疫组化的方法检测增殖细胞核抗原 (PCNA) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 表达的变化情况。结果 给药组大鼠前列腺质量、PCNA 增殖指数和 bFGF 表达水平均低于模型组, 其中高剂量组的效果较为明显, 其各项指标都趋近于正常水平。结论 罗达灵通胶囊有较好的抑制前列腺增生的效果。

关键词:罗达灵通胶囊; 前列腺增生; 免疫组化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)09-1376-03

Effect of Luodalingtong Capsula on benign prostate hyperplasia in rats

LI Xiao-hua¹, FANG Zhi-zhong¹, YANG Jin-rong¹, SUN Rui², MENG Ling-xin³, LÜ Jing-jing¹

(1. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. College of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 3. Cancer Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

Key words: Luodalingtong Capsula; benign prostate hyperplasia; immunohistochemistry

前列腺增生症 (benign prostate hyperplasia, BPH) 和前列腺炎是前列腺发病最普遍的两种疾病。罗达灵通胶囊主要由大黄、桂枝、泽泻、白术、瞿麦、麦冬、地黄、竹叶、黄芪、甘草等中药组成, 具有清热解毒、利尿去浊、固脾肾等功效, 用于治疗前列腺增生、前列腺炎等。前列腺增生的发病机制的阐明越来越多的借助了免疫组化的方法, 本实验旨在通过免疫组化的方法验证罗达灵通胶囊抑制前列腺增生的作用, 为申报医院制剂提供药效学依据。

1 材料与方法

1.1 动物: Wistar 大鼠, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂: 罗达灵通胶囊 (批号 20040518, 规格: 350 mg×40 粒, 由河北省沧县中医院提供, 经 HPLC 法测定含大黄素 1.98%)。按照人与大鼠体重折算后, 以人正常剂量的 1 倍和 3 倍剂量分别作为低、高剂量, 取胶囊内粉末加水适量配成 0.018 9 g/mL 和 0.056 7 g/mL 的混悬液, 用时摇匀。丙酸睾酮 (天津市氨基酸公司人民制药厂; 批号 0304271), 注射用油, 增殖细胞核抗原 (PCNA) 单克隆抗体, 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 仪器: Leicarm2025 型组织切片机 (德国徕卡仪器公司 Leica Microsystems Nussloch GmbH), 303A—34 型隔水式培养箱 (通州市申通科化器材有限公司), DS 型电热三用冰箱 (北京医疗设备厂), BP210S 电子天平。

1.4 大鼠前列腺增生模型的制备^[1]: 取体重 (280±20) g 的雄性大鼠 40 只, 预养 3 d, 称重。随机选取 30 只大鼠用乙醚麻醉, 在无菌操作下手术摘除双侧睾丸 (采取经阴囊摘取睾丸的方法), 结扎输精管和血管, 缝合伤口。休养 1 周后每天 im 丙酸睾酮 3 mg/kg, 连续 14 d。另外 10 只作为假手术组 (与模型相同操作但不摘除睾丸, 不结扎输精管和血管), 缝合伤口, 休养 1 周后每天 im 注射用油, 连续 14 d。将模型大鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 分别为罗达灵通胶囊高、低剂量 (567, 189 mg/kg) 组和模型组。各组 ig 给药, 每天 1 次, 连续 15 d。假手术组和模型组 ig 水。给药后第 16 天称体重后, 摘取大鼠前列腺并称质量, 记录各组前列腺湿质量, 计算前列腺指数 [前列腺质量 (mg)/大鼠体重 (g)]。然后将分离的前列腺浸于中性福尔马林中, 固定 24 h, 常规蜡块包埋用以制备光镜及免疫组化标本。

1.5 免疫组化方法

收稿日期: 2007-03-29

作者简介: 李晓华 (1982—), 女, 2005 年毕业于天津医科大学药学院, 现为天津医科大学药剂学专业硕士生。

* 通讯作者 房志仲 Tel: (022) 23530029 E-mail: fangzhizhong@tjmu.edu.cn

1.5.1 PCNA 测定:采用 LSAB 法。将前列腺组织常规石蜡包埋,切片厚约 4 μm ,脱蜡后放入柠檬酸 (pH 6.0) 缓冲液中,置微波炉处理,加一抗 (1:200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。二抗和三抗在湿盒孵育 1 h,各步间均用 PBS 洗片。结果判断:细胞核染成棕黄色为 PCNA 阳性细胞,连续观察 5 个视野,在每个视野计算 100 个细胞中的阳性细胞数,取其平均值作为 PCNA 阳性表达率,即 PCNA 增殖指数。

1.5.2 bFGF 测定:切片常规脱蜡,ABC 法染色,滴加 bFGF 抗体,一抗体滴度为 1:100;PBS 洗后滴加二抗,三抗,DAB 显色,以二甲苯透明,最后以光学树脂胶封固,备检测用。结果判断^[2]:bFGF 阳性物质定位于细胞质,呈棕黄色,主要表达于前列腺的间质组织中,分别观察染色强度和染色面积两项指标,计算积分。其中染色强度积分为:无着色记为 1 分,着浅色记为 2 分,中等着色记为 3 分,强染色记为 4 分;染色面积积分为: $\leq 10\%$ 记为 1 分, $10\% \sim 25\%$ 记为 2 分, $25\% \sim 50\%$ 记为 3 分, $\geq 50\%$ 记为 4 分。将两项积分相加作为每个标本的一次得分,随机观察 5 个视野,取 5 次得分的中位数作为该标本的最后得分。总体积分 < 4 分为阴性, ≥ 4 分为阳性。

1.6 病理切片:每例标本均进行常规 HE 染色,光镜下观察。

1.7 统计学处理:应用 SPSS 11.5 统计软件,采用方差分析,Kruskal-Wallis 秩和检验,Fisher 确切概率法进行分析。

2 结果

2.1 各组间在鼠前列腺湿质量和前列腺指数的差别:经方差齐性检验 (Levene 检验),发现各组间前列腺湿质量指标能够满足方差齐性 ($P=0.2613$),因此选用方差分析的方法进行检验 ($F=45.749$, $P<0.001$),各组间比较采用 LSD- t 检验;而各组间前列腺指数指标不满足方差齐性 ($P=0.0025$),因此选用 Kruskal-Wallis 秩和检验 ($H=26.987$, $P<0.001$) 并进行多重比较。对不同组别大鼠的前列腺湿质量和前列腺指数进行统计分析后发现,其中模型组的这两项指标均高于其他组,罗达灵通胶囊的低、高剂量组均能不同程度地缓解丙酸睾酮导致的前列腺增生引起的前列腺湿质量和前列腺指数的增高,结果见表 1。

2.2 不同组间大鼠 PCNA 增殖指数的区别:通过观察发现,丙酸睾酮所致前列腺增生大鼠的 PCNA 指数较假手术组明显偏高 ($P<0.01$),而罗达灵通胶囊组的 PCNA 指数有不同程度的下降,统计分析

过程中,进行方差齐性检验,满足方差齐性 ($P=0.5155$),进而进行方差分析 ($F=27.122$, $P<0.0001$) 及处理组间的多重比较,结果见表 2。另外,光镜下可见,模型组大鼠前列腺呈弥漫阳性,有乳头状增生,腺腔扩大,染色强度也较大,多呈棕黄色,而罗达灵通组,以散在阳性居多,染色强度也较小。

表 1 罗达灵通胶囊对丙酸睾酮所致大鼠前列腺增生的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of Luodalingtong Capsula on benign prostate hyperplasia in rats caused by testosterone propionate ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	前列腺湿质量/ mg	前列腺指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
假手术	—	843.30 $\pm$ 143.47	2.382 $\pm$ 0.200
模型	—	2061.10 $\pm$ 308.19***	5.812 $\pm$ 0.665***
罗达灵通胶囊	189	1233.30 $\pm$ 320.30*** $\Delta\Delta\Delta$	3.490 $\pm$ 0.898*** $\Delta\Delta\Delta$
	567	954.40 $\pm$ 216.14 $\Delta\Delta\Delta$	2.697 $\pm$ 0.652 $\Delta\Delta\Delta$

与假手术组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

与模型组比较: $\Delta\Delta\Delta P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs Sham group

$\Delta\Delta\Delta P<0.001$ vs model group

表 2 罗达灵通胶囊对丙酸睾酮所致大鼠前列腺增生 PCNA 阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of Luodalingtong Capsula on PCNA positive expression of benign prostate hyperplasia in rats caused by testosterone propionate ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	PCNA 增殖指数
假手术	—	4.692 $\pm$ 5.256
模型	—	25.652 $\pm$ 5.366**
罗达灵通胶囊	189	13.792 $\pm$ 2.636** $\Delta\Delta$
	567	8.796 $\pm$ 7.625 $\Delta\Delta$

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: $\Delta\Delta P<0.01$

** $P<0.01$ vs Sham group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs model group

2.3 不同组间大鼠 bFGF 表达水平的区别:在光学显微镜下进行观察发现,在模型组中阳性染色主要位于间质,部分靠近间质,基底部的腺上皮细胞也有较多的表达。根据方法中的判别标准进行观察,得到各组的阳性例数,应用 Fisher 确切概率法进行统计分析,计算其确切概率,同时利用每个标本的总体积分,进行 Kruskal-Wallis 秩和检验 ($H=24.137$, $P<0.001$),并进行多重比较 (比较时矫正检验水准分别为 0.0083、0.0017),结果见表 3。

2.4 病理观察:光镜下观察到,模型组前列腺组织有较多的病理变化,腺体排列紧密,部分腺体扩张,且上皮细胞数目增多,腺体呈乳头状突向腔内,上皮细胞呈复层,细胞呈柱状,罗达灵通组与假手术组比较,也有不同程度的增生,但增生情况较模型组轻,

表3 罗达灵通胶囊对丙酸睾酮所致大鼠前列腺增生
bFGF 阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of Luodalingtong Capsula on bFGF positive
expression of benign prostate hyperplasia in rats
caused by testosterone propionate ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	阳性例数	平均秩次
假手术	—	10	2	10.75
模型	—	10	10**	34.85**
罗达灵通胶囊	189	10	7	20.15△△
	567	10	3	16.25△△

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: △△ $P<0.01$

** $P<0.01$ vs Sham group; △△ $P<0.01$ vs model group

表现为上皮乳头较少,腺上皮细胞数较模型组少,细胞形态更趋于正常。

3 讨论

PCNA 又称周期蛋白 (cyclin),其量与细胞的增殖周期密切相关,测定细胞的 PCNA 表达情况可反映细胞的增殖状态,近年来它已成为细胞增殖状态的标志物,其表达与细胞分化过程有关。国内已有报道^[3],证明在前列腺增生的过程中 PCNA 的表达也在发生变化,因此本实验对其在实验性前列腺增生大鼠中的表达进行了进一步验证,并且借助这种方法探讨中药制剂在治疗前列腺增生中的分子机制。同时 bFGF 是一种重要的促血管生长因子和细胞有丝分裂促进因子,近年也有越来越多的文献报道^[4,5]其在前列腺增生等疾病中的重要作用,该作用是与其在前列腺细胞生长、增殖、分化及血管形成过程中的作用密切相关的。本实验对于 bFGF 表达的数据处理,采用了两种方法,Fisher 确切概率法和 Kruskal-Wallis 秩和检验。bFGF 表达的观察所得到的指标是等级资料,所包含的信息不及定量的资料准确,如果在统计分析过程中,仅区分出每例样本是否为阳性表达,就更多的损失了数据的信息。因此,笔者在方法的选择和统计的处理方面都进行了详细的设计,对于 bFGF 表达的观察采用了计分的方式,不但考虑了阳性面积还涉及到了染色强度,在进行数据分析的过程中,选用秩和检验,最大限度地体现了观察所得的信息,可以从两种统计方法的结果中看出,低剂量组的阳性例数较多,但从它的平均秩次又可看出他的积分并不是很高,然而只考虑阳性例数,就得到了低剂量组与假手术组和模型组均无差异的结果,显然这样的结果的出现正说明,应尽可能

能多的应用实验数据才能得到较为准确的结果。

祖国医学认为前列腺增生根源于内热火旺,脾肾两虚,湿热下注,瘀块内阻等,因此选用中药一般具有清热解毒,补脾益气,利水渗湿等功效,即起到消肿、消炎、利尿、杀菌、减少前列腺组织充血等作用。罗达灵通胶囊以大黄、地黄、甘草、麦冬、桂枝、黄芪、瞿麦、白术、泽泻等为主要组成。其中大黄泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经,主要成分为蒽醌及二蒽萘酯类化合物,国内外已有多项报道大黄素具有显著的抗菌、抗癌、解痉、利尿等作用^[6]。甘草补脾益气、清热解毒、缓急止痛、调和诸药;地黄滋阴补血、益精填髓^[7]。黄芪补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌。淡竹叶清热除烦、利尿;泽泻性寒,又能祛热,尤善于泄肾火与膀胱之热,故下焦湿热者尤为适宜;可利小便,清湿热^[8]。以上各药合用,从发病根源治疗,调节身体相关器官功能,共奏清热利湿、活血散结、抗炎,减少前列腺体积之功效,有显著的抗炎、抗前列腺增生的作用。

References:

- [1] Li B W, Wang Z X, Xu J Y. Experimental study of effect of bolbastemmosaponins on benign prostatic hyperplasia in the rats [J]. *Chin J Androl* (中国男科学杂志), 2003, 17(3): 168-171.
- [2] Chen X P, Liu Y B, Shi L H. Distribution of perlecan in hepa-tocellular carcinoma and initial exploration of positive standard of perlecan for immunohistochemical study [J]. *J Southeast Univ, Med Sci* (东南大学学报, 医学版), 2005, 24(2): 85-89.
- [3] Guo L L. Significance of PCNA expression in prostatic lesion [J]. *J Clin Urol* (临床泌尿外科杂志), 1997, 12(5): 302-303.
- [4] Wang F L, Wang H, Qin W J. Expression and its significance of b-FGF in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma tissues [J]. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2004, 20(20): 203-205.
- [5] Han L H, Wang H, Wang J L. Study of expression of basic fibroblast growth factor in tissues of prostatic hyperplasia [J]. *J Shenyang Med Coll* (沈阳医学院学报), 2003, 5(3): 149-159.
- [6] Zhang X P, Li Z F. General situation in pharmacological studies on emodin [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(8): 851-854.
- [7] Yu Z, Zhou H Y, Wang J. Pharmacological application of rehmannia glutinosa [J]. *Tradit Chin Med Res* (中医研究), 2001, 14(1): 43-45.
- [8] Zhong G S. Identification test of common traditional Chinese medicine (diuretics for eliminating dampness) [J]. *J Chin Phys* (中国临床医生), 1999, 27(6): 56-57.