

基于PI3K/Akt信号通路研究升降通癥方中空栓对 前列腺增生大鼠的影响

胡黄金^{1,2}, 雷利娟¹, 赵鹏³, 郑靓怡¹, 杨妮¹, 孟春慧³, 孟婧妮³, 张恒^{3*}
(1. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619; 2. 黄石市中医医院, 湖北 黄石 435000;
3. 山西省中医药研究院, 太原 030012)

[摘要] 目的:通过观察升降通癥方中空栓对前列腺增生大鼠前列腺中双氢睾酮(DHT)的水平、及前列腺中磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路相关蛋白的影响,探究升降通癥方中空栓治疗前列腺增生大鼠的机制。方法:从60只SD雄性大鼠中随机选取10只为假手术组,其余大鼠经去势后连续4周皮下注射丙酸睾酮造前列腺增生大鼠模型,采用随机数字表法随机分为模型组、非那雄胺(0.45 mg·kg⁻¹)组、升降通癥方中空栓高、中、低剂量(3.98、1.99、0.99 g·kg⁻¹)组,每组10只。去势7 d后,假手术组及模型组选用空白中空栓,非那雄胺组及升降通癥方中空栓组选用相应中空栓,连续肛塞直肠给药28 d。杀检大鼠,分离并称量前列腺组织,观察药物对各组大鼠前列腺指数的影响,苏木素-伊红(HE)染色前列腺组织进行病理观察,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测DHT的水平,并采用蛋白免疫印迹法检测前列腺组织PI3K/Akt信号通路蛋白及B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、 α B-晶状体蛋白(CRYAB)蛋白表达水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠前列腺指数显著升高,光镜下模型组大鼠前列腺明显增生,DHT水平明显升高,CRYAB、Bcl-2、PI3K及Akt蛋白表达水平上升,Caspase-3及Bax蛋白表达水平下降($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,升降通癥方中空栓高剂量组大鼠前列腺指数下降($P<0.05$),升降通癥方中空栓各剂量组大鼠前列腺中DHT水平、CRYAB、Bcl-2、PI3K及Akt蛋白表达水平下降,Caspase-3及Bax蛋白表达水平上升($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:升降通癥方中空栓可通过降低CRYAB蛋白表达,负性调控PI3K/Akt信号通路,下调DHT水平,Bcl-2、PI3K及Akt蛋白表达水平,上调Caspase-3及Bax蛋白表达水平,抑制细胞增殖和促进细胞凋亡,从而发挥对BPH的治疗作用;高剂量升降通癥方中空栓改善大鼠前列腺增生效果显著。

[关键词] 升降通癥方中空栓; 前列腺增生; α B-晶状体蛋白(CRYAB); 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路

[中图分类号] R285.5;R966;R697+;R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)19-0089-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221792

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220321.1820.028.html>

[网络出版日期] 2022-03-22 17:05

Effect of Shengjiang Tonglong Prescription Hollow Suppository on Rats with Prostatic Hyperplasia Based on PI3K/Akt Signaling Pathway

HU Huangjin^{1,2}, LEI Lijuan¹, ZHAO Peng³, ZHENG Jingyi¹, YANG Ni¹,
MENG Chunhui³, MENG Ruoya³, ZHANG Heng^{3*}

(1. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;
2. Huangshi Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Huangshi 435000, China;
3. Shanxi Provincial Institute of TCM, Taiyuan 030012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository on rats with prostate hyperplasia, and the effect of the proteins related to phosphoinositide 3-kinase/protein

[收稿日期] 2021-11-11

[基金项目] 山西省重点研发计划项目(201903D321232)

[第一作者] 胡黄金, 硕士, 从事中医药防治周围血管疾病的研究, E-mail:1624204450@qq.com

[通信作者] * 张恒, 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 从事中医内科疑难病的诊治研究, E-mail:yjszh9155@163.com

kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway in the prostate, thus exploring the mechanism of Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository in the treatment of rats with prostate hyperplasia. **Method:** Ten SD male rats were randomly selected from 60 SD male rats to form a sham operation control group, and the rest rats were subcutaneously injected with testosterone propionate for 4 consecutive weeks after castration to induce the rat model of prostatic hyperplasia. According to the random number table method, the 50 rats were randomly divided into a model group, a finasteride group ($0.45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and three high, middle, and low-dose Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository groups ($3.98, 1.99, 0.99 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with ten rats in each group. After castration for 7 d, the sham operation control group and the model group used the blank hollow suppositories, and the finasteride group and the Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository groups used the corresponding hollow suppositories. The drugs were given to the rats by anal plugs continuously for 28 d. The rats were then killed, and the prostate tissues were separated and weighed to observe the effects of drugs on the prostate index of rats in each group. The hematoxylin-eosin (HE) staining was used for the pathological observation of the prostate tissues. The level of dihydrotestosterone (DHT) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was used to detect the expression levels of PI3K/Akt signaling pathway protein, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), cysteine aspartate-specific protease-3 (Caspase-3), Bcl-2-associated X protein (Bax), and α B-crystallin (CRYAB) protein in the prostate tissues. **Result:** As compared with the sham operation control group, the protein expression levels of prostate index, DHT level, CRYAB, Bcl-2, PI3K, and Akt in the model group were increased, and the protein expression levels of Caspase-3 and Bax were decreased ($P<0.05, P<0.01$). As compared with the model group, the prostate index in the high-dose Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository group was decreased ($P<0.05$), and the level of DHT and the protein expression levels of CRYAB, Bcl-2, PI3K, and Akt in the prostate of the Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository groups were decreased, and the protein expression levels of Caspase-3 and Bax were increased ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository decreases the expression of CRYAB protein, negatively regulates the PI3K/Akt signaling pathway, down-regulates the level of DHT and the protein expression levels of Bcl-2, PI3K, and Akt, and up-regulates the protein expression levels of Caspase-3 and Bax, thereby inhibiting cell proliferation and promoting cell apoptosis, which plays a therapeutic role in the benign prostate hyperplasia (BPH). The high-dose Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository significantly improves prostatic hyperplasia in rats.

[Keywords] Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository; prostatic hyperplasia; α B-crystallin (CRYAB); phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway

前列腺增生(BPH),又称良性前列腺增生,是中老年男性最常见的疾病之一,由于其腺体上皮和间质的增生,可导致膀胱刺激征,并发症包括急性尿潴留和尿路梗阻等,严重影响患者身心健康^[1-2]。随着我国老龄化的到来、年轻人生活压力增大及生活节奏加快等,BPH的发病率逐年上升,且越来越年轻化^[3]。关于BPH发病机制尚未完全明确,双氢睾酮(DHT)是前列腺组织的发育、生长和增殖的雄激素受体激动剂,DHT水平升高可能是导致BPH重要因素^[4]。越来越多的学者普遍认为前列腺细胞增殖和凋亡平衡紊乱是BPH发病的机制,这对于深入理解BPH发病机制具有重大意义。近些年来,研究者证实BPH发生与多种信号通路作用相关^[5-7],激活磷

脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路可促进蛋白质合成和新血管形成,从而促进增殖而抑制细胞凋亡^[8],抑制PI3K/Akt信号通路,则能改善BPH^[9]。目前的西医疗法,存有缺陷,例如西药不良反应明显不宜长期服用及手术具有后遗症等^[10-11],天然中医药虽然效果明显并且能避免西医疗法的欠缺^[12-14],但临床上中药汤剂剂型的使用有局限性、药物稳定性差及服用不便等缺陷。而升降通癥方中空栓使药物包裹在中空栓壳内,既减少氧化潮解,同时也避免药物与基质产生硬度效应,与普通栓剂相比,中空栓在人体肠道环境中迅速裂解,提高了生物利用度。肛塞直肠给药方式,使药物不受或少受胃肠道pH值或酶的破坏,通过直肠直接吸

收可避免肝脏的首过效应。升降通癥方采用现代中药提取、纯化技术,制成一种既可以减少患者用药量、又能保证治疗效果、作用机制明确的中空栓剂剂型,使用方便、疗效快捷,为中医药治疗BPH提供新的思路及方法。

中医学认为,肾与膀胱气化功能失调,尿液的生成排泄障碍是前列腺增生症基本病机。“升降通癥方”为山西省中医药研究院根据中医传统理论,辨证与辨病结合,总结出的治疗BPH疗效颇佳的院内验方,从“肾虚血瘀”论治,攻补兼施^[15-16],既重视扶助肾之阴阳亏损、补中益气、升清降浊,又清利湿热、活血逐瘀、消癥散结,临床应用10余年,治疗BPH患者总有效率达92.31%。本实验研究通过去势后皮下注射丙酸睾酮复制大鼠的BPH模型,观察大鼠前列腺指数,前列腺DHT水平、前列腺组织PI3K/Akt信号通路蛋白及B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、 α B-晶状体蛋白(CRYAB)蛋白表达水平。探讨升降通癥方中空栓对PI3K/Akt信号通路及大鼠BPH的影响,为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方剂

1.1 动物 60只SPF级SD性成熟雄性大鼠,体重200~220g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司动物[合格证号SCXX(京)2019-008],22~26℃温度,35%~55%湿度环境中饲养。本实验符合动物伦理委员会要求(伦理批号201903D321232)。

1.2 药品与试剂

1.2.1 药品 升降通癥方(熟地黄20g、山药10g、酒山萸肉12g、酒肉苁蓉10g、益母草15g、醋三棱10g、炒王不留行10g、夏枯草10g、黄芪10g、泽泻10g、升麻12g、牛膝10g、黄柏8g、盐车前子15g、甘草6g)颗粒剂,每剂总质量为25.5g,购于山西省中医药研究院颗粒剂处(江阴天江药业有限公司);假手术组及模型组用空白中空栓均由山西省中医药研究院中心实验室自制,生产批号20210410;升降通癥方中空栓,由山西省中医药研究院中心实验室自制,生产批号20210410,每1粒含升降通癥方颗粒剂0.59g;非那雄胺片[AIAC International Pharma LLC(Puerto Rico),国药准字J20150143],由山西省中医药研究院中心实验室制成中空栓,每1粒含非那雄胺片0.135mg,所制备的中空栓含药量均按体表面积换算法求得。

1.2.2 试剂 混合脂肪酸甘油酯36型(山东瑞生药用辅料有限公司,批号YZ20200801);丙酸睾酮注

射液(杭州动物药品厂,兽药字110201054);注射用青霉素钠(瑞阳制药有限公司,国字准号H37021950);1-2丙二醇(西陇科学股份有限公司,批号2008171);橄榄油[艾贝克有限公司(西班牙),批号843701604333];大鼠DHT酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号ml002998);PI3K多克隆抗体(北京Bioss公司,货号BSM-33219M);Akt、Bax、 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(武汉Servicebio公司,货号分别为GB111114、GB11690、GB12001);Caspase-3多克隆抗体(武汉三鹰顺武技术有限公司,货号66470-2-1g);CRYAB多克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司,货号45844);Bcl-2多克隆抗体(美国Affinity公司,货号BF9103);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、辣根过氧化物酶HRP标记山羊抗大鼠二抗、聚偏氟乙烯(PVDF)膜、BCA试剂盒、电化学发光法(ECL)化学发光试剂盒、苏木素、伊红染液(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号分别为GB12002、GB23302、G6015-0.45、G2014、G1004-100ML、G1001-100ML)。

1.2.3 中空栓制备^[17] 水浴40℃于烧杯中融化混合脂肪酸甘油酯36型,倒入已均匀涂抹润滑剂的中空栓模具中,冷却成型,封底;将升降通癥方颗粒剂粉碎过120目筛网后溶于1-2丙二醇(按1kg·L⁻¹)所得药液注入栓腔,封底,制成升降通癥方中空栓;将非那雄胺片粉碎过120目筛网后溶于1-2丙二醇(按0.675g·L⁻¹)所得悬浮液注入栓腔,封底,制成非那雄胺中空栓。

1.3 仪器 适用大鼠子弹头型中空栓模具(浙江省诸暨凯亚制药机械厂),HH.W21.600型电热恒温水箱(余姚市东方电工仪器厂),Synergy H1型多功能微孔读板机酶标仪(美国Bio Tek公司),KDC-1044型低速冷冻离心机,F325型旋转石蜡切片机(美国Thermo公司),H1型多功能微孔读板机(美国伯腾),221BR型转膜仪,Mini-PROTEAN型电泳仪(美国伯乐公司),FluorChem HD2型凝胶成像仪(美国Protein Simple公司),TKY-BMB型石蜡包埋机(湖北康泰医疗设备有限公司),BX43型光学显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 实验分组及模型制备 将60只雄性SD大鼠适应性喂养7d后,随机分为假手术组、模型组、非那雄胺组、升降通癥方中空栓高、中低剂量组,用3%三硝基苯酚溶液进行染色标记,每组10只。

造模组大鼠,按照参考文献[18]进行造模,用10%的水合氯醛,按 $3.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,切除双侧睾丸,假手术组大鼠仅行假手术切开阴囊,暴露睾丸于空气中10 min,再缝合。术后青霉素抗感染7 d,于第8天造模组经背、侧腹部皮下多个注射部位交替注射 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 丙酸睾酮(规格 25 g L^{-1} ,按1:4溶于无菌橄榄油),即给药体积为 $1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,根据每周四上午所称体质量,每周调整1次丙酸睾酮剂量,假手术组大鼠仅背部皮下注射无菌橄榄油按 $1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,所有大鼠均连续注射28 d。同时于术后第8天,假手术组及模型组大鼠给与空白中空栓,非那雄胺($0.45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组(及升降通癆方中空栓高、中、低剂量(3.98 、 1.99 、 $0.99\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组大鼠给与相应中空栓(70 kg的成人升降通癆方中空栓的临床剂量为 $25.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 换算成300 g大鼠的剂量为 $1.99\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),均通过肛塞直肠给药,塞入后按住肛门5 min,待中空栓栓壳融化释放药液,连续给药28 d。

2.2 大鼠前列腺指数 用电子天平称各组大鼠的体质量,末次给药1 h后,腹腔注射10%的水合氯醛麻醉处死,分离前列腺组织,洗净表面血液,称质量,计算前列腺指数=前列腺质量(mg)/大鼠体质量(g),一部分前列腺组织放入4%多聚甲醛固定液中,为病理石蜡切片作准备。一部分的前列腺组织和置于超低温冰箱中保存。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察前列腺组织形态学变化 取4%多聚甲醛固定好的前列腺组织,常规石蜡包埋,切片脱腊至水,HE染色,光学显微镜下观察各组大鼠前列腺组织形态变化,并保留病理图片。

2.4 ELISA检测大鼠前列腺中DHT水平 取适量前列腺,于冰块上匀浆,以 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min(离心半径10 cm),取上清液,严格按照试剂盒说明书测定前列腺组织中DHT水平。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测前列腺组织PI3K/Akt信号通路蛋白及Bcl-2、Caspase-3、Bax、CRYAB蛋白表达 取出超低温冰箱中保存的前列腺组织,称取适量前列腺组织,加入10倍量RIPA裂解液(在使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂),在冰上匀浆裂解30 min,于 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心机离心15 min(离心半径20 cm),取上清液BCA蛋白定量,严格参照试剂盒说明书电泳;转膜;TBST漂洗后浸入5%脱脂牛奶中封闭,室温置于脱色摇床封闭2 h,加一抗(1:1 000),孵育摇床慢摇过夜;次日用TBST液冲洗条带4次每次10 min,加入二抗(1:

3 000),孵育2 h,TBST液冲洗4次,每次15 min。滴加超敏发光液,凝胶成像系统拍照显影,运用Image J软件分析条带灰度值,计算相对表达量。

2.6 统计学方法 采用SPSS 22.0统计软件包进行统计学处理。所有实验数据为计量资料均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据经正态检验,均服从正态分布,所以各组间进行比较均采用单因素方差分析[最小显著性差异(LSD)-*t*检验], $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对BPH大鼠前列腺指数的影响 与假手术组比较,模型组大鼠前列腺指数显著升高($P<0.01$);与模型组比较,非那雄胺组和升降通癆方中空栓高剂量组大鼠前列腺指数明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),升降通癆方中空栓中剂量组和升降通癆方中空栓低剂量组大鼠前列腺指数有下降趋势,但差异无统计学意义。见表1。

表1 升降通癆方中空栓对各组BPH大鼠前列腺指数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

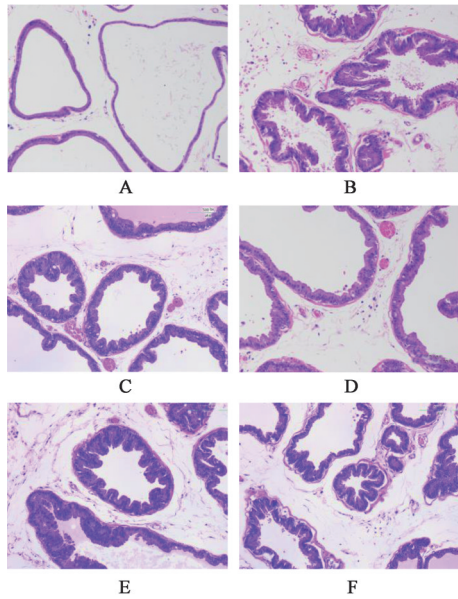
Table 1 Effect of Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository on prostate index in BPH rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	前列腺指数/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
假手术组		2.826 ± 0.358
模型组		$5.119\pm 0.482^{2)}$
非那雄胺组	0.45×10^{-3}	$4.122\pm 0.612^{4)}$
升降通癆方中空栓高剂量组	3.98	$4.509\pm 0.250^{3)}$
升降通癆方中空栓中剂量组	1.99	4.829 ± 0.495
升降通癆方中空栓低剂量组	0.99	4.960 ± 0.223

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表4同)

3.2 对BPH大鼠前列腺病理组织形态学的影响 假手术组前列腺腺上皮光滑,上皮细胞排列呈单柱状,形态结构等正常;模型组前列腺腺腔明显缩小、变形,腺上皮增厚形成明显的皱褶;经非那雄胺中空栓处理后,能明显降低上皮细胞的增生,腺上皮皱褶显著减轻;经升降通癆方中空栓高剂量处理后,腺上皮厚度变薄、腺上皮细胞数量及增生的乳头状物明显下降;升降通癆方中空栓中剂量组,腺上皮仍可见较多乳头状向腺腔内突起和少量的纤维组织增生;升降通癆方中空栓低剂量组,腺上皮仍可见较多增生褶皱,腺腔缩小和间质纤维组织增生。见图1。

3.3 对BPH大鼠前列腺中DHT水平的影响 与假手术比较,模型组大鼠前列腺中DHT水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,非那雄胺组及升降通癆方



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 非那雄胺组; D~F. 升降通癆方中空栓高、中、低剂量组(图2和图3同)

图1 升降通癆方中空栓对各组BPH大鼠前列腺组织的病理结构改变的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository on pathological structural changes of prostate tissue in BPH rats in each group (HE, ×200)

中空栓各剂量组大鼠前列腺中DHT水平均明显下降($P<0.05, P<0.01$)。见表2。

3.4 对BPH大鼠前列腺组织PI3K/Akt信号通路蛋白及Bcl-2、Caspase-3、Bax、CRYAB蛋白表达的影响

3.4.1 对BPH大鼠前列腺组织PI3K/Akt信号通路蛋白、Caspase-3、Bax及Bcl-2蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠前列腺组织Caspase-3及Bax蛋白表达水平显著下降($P<0.01$),前列腺组织Bcl-2、PI3K及Akt蛋白表达水平显著上升($P<0.01$)。

表3 升降通癆方中空栓对各组BPH大鼠前列腺组织Caspase-3、Bax及Bcl-2蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository on expression of Caspase-3, Bax, and Bcl-2 in prostate tissues of BPH rats in each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Caspase-3/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	PI3K/ β -actin	Akt/ β -actin
假手术组		1.02±0.05	0.88±0.09	0.25±0.03	0.15±0.12	0.28±0.12
模型组		0.14±0.05 ²⁾	0.08±0.01 ²⁾	1.18±0.02 ²⁾	1.38±0.41 ²⁾	1.12±0.25 ²⁾
非那雄胺组	0.45×10 ⁻³	0.84±0.07 ⁴⁾	0.65±0.06 ⁴⁾	0.43±0.07 ⁴⁾	0.28±0.07 ⁴⁾	0.38±0.19 ⁴⁾
升降通癆方中空栓高剂量组	3.98	0.70±0.02 ⁴⁾	0.54±0.08 ⁴⁾	0.55±0.05 ⁴⁾	0.52±0.60 ⁴⁾	0.51±0.15 ⁴⁾
升降通癆方中空栓中剂量组	1.99	0.58±0.03 ⁴⁾	0.38±0.02 ⁴⁾	0.82±0.03 ⁴⁾	0.74±0.12 ³⁾	0.63±0.08 ³⁾
升降通癆方中空栓低剂量组	0.99	0.41±0.15 ⁴⁾	0.24±0.01 ³⁾	1.06±0.08 ³⁾	1.06±0.26	0.82±0.15 ³⁾

3.4.2 对BPH大鼠前列腺组织CRYAB蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠前列腺组织

表2 升降通癆方中空栓对各组BPH大鼠前列腺中DHT水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository on level of DHT in prostate of BPH rats in each group($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	DHT/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
假手术组		23.86±4.20
模型组		47.51±3.78 ²⁾
非那雄胺组	0.45×10 ⁻³	25.60±3.69 ⁴⁾
升降通癆方中空栓高剂量组	3.98	30.06±3.76 ⁴⁾
升降通癆方中空栓中剂量组	1.99	32.03±3.45 ⁴⁾
升降通癆方中空栓低剂量组	0.99	42.27±2.38 ³⁾

与模型组比较,升降通癆方中空栓各剂量组Caspase-3及Bax蛋白表达水平明显上升($P<0.05, P<0.01$), Bcl-2、Akt蛋白表达水平明显下降($P<0.05, P<0.01$);升降通癆方中空栓高、中剂量组PI3K蛋白表达水平上升($P<0.05, P<0.01$)。见图2、表3。

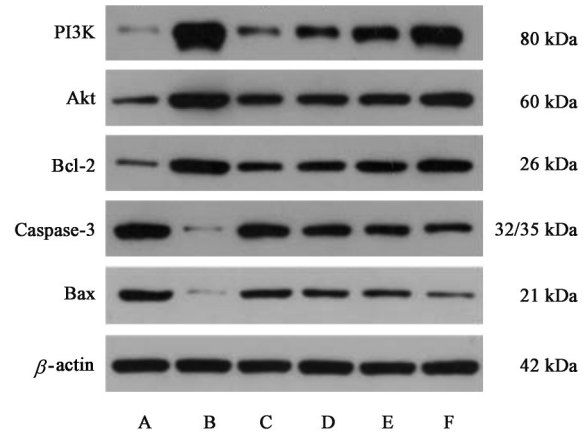


图2 PI3K/Akt信号通路蛋白、Caspase-3、Bax及Bcl-2蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of PI3K/Akt signaling pathway proteins, Caspase-3, Bax and Bcl-2 proteins

CRYAB蛋白表达水平显著上升($P<0.01$);与模型组比较,非那雄胺组及升降通癆方中空栓各剂量组

大鼠前列腺组织CRYAB蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$)。见表4、图3。

表4 升降通癃方中空栓对各组BPH大鼠前列腺组织CRYAB蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Shengjiang Tonglong prescription hollow suppository on expression of CRYAB in prostate tissues of BPH rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CRYAB/ β -actin
假手术组		0.39±0.72
模型组		1.44±0.37 ²⁾
非那雄胺组	0.45×10 ⁻³	0.83±0.18 ³⁾
升降通癃方中空栓高剂量组	3.98	0.84±0.15 ³⁾
升降通癃方中空栓中剂量组	1.99	0.91±0.15 ³⁾
升降通癃方中空栓低剂量组	0.99	0.99±0.38 ³⁾

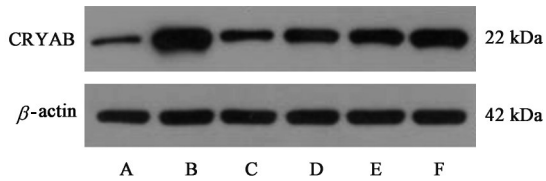


图3 CRYAB蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of CRYAB protein

4 讨论

中医学将BPH归纳于“癃闭”“淋证”等病证范畴,与肾和膀胱这两病位密切相关。《黄帝内经·素问·上古天真论》曰:“丈夫八岁……天癸竭,精少,肾脏衰,形体皆极。”肾与膀胱相表里。《黄帝内经·素问·灵兰秘典论》曰:“膀胱者,州都之官,津液藏焉,气化则能出矣。”升降通癃方以熟地黄、益母草为君药,熟地黄益精髓,滋肾精,益母草活血利水,善祛膀胱之瘀。山药补脾肾,即补肾固精,又补脾助后天之本;山茱萸补肝肾,肉苁蓉补肾阳、益精血,药力和缓,补阳不燥,补阴不腻,能润肠通便,从而改善直肠对尿道的压迫,三者同为臣药;莜术行气活血,夏枯草消癥散结,王不留行走厥阴经络,消肿散瘀,通利关窍;气化则水出矣,中气不足,溲便为之变,气之不化水液不行,故加入黄芪,升麻,旨在升气补中,助阳化气;泽泻利湿泻浊,下走膀胱以利水,又能防止滋腻太过。牛膝活血能引药下行,且使药物直达病所,四药升降相宜,恢复气机升降;BPH合并前列腺炎时往往以湿热为标,故加黄柏、车前子清利下焦湿热、化浊通淋,均为佐药;生甘草调和诸药,为佐使药。诸药合用,既重视扶助肾之阴阳亏损、补中益气、升清降浊、又清利湿热、活血逐瘀、消癥散结。现代药理研究发现,益母草中益

母草碱可显著降低BPH前列腺中睾酮(T)及DHT水平^[19];王不留行有抑制新生血管增生之效^[20];黄芪能缓解尿路的不适症状^[21]。

本实验采用去势皮下注射外源性丙酸睾酮复制BPH的造模方法,排除自身雄激素的影响,可重复率高。前列腺指数能实际反映BPH状态,实验中,模型组大鼠前列腺指数明显高于假手术组,结合前列腺组织光镜下观察病理形态发现,模型组前列腺腺腔明显缩小、变形,腺上皮增厚形成明显的皱褶,说明BPH模型复制成功。药物干预后,升降通癃方中空栓中剂量组和升降通癃方中空栓低剂量组大鼠前列腺指数无明显变化,而非那雄胺和高剂量升降通癃方中空栓能降低前列腺指数,此外,病理切片显示高剂量升降通癃方中空栓腺上皮厚度变薄、上皮细胞数量及增生的乳头状物明显下降,证实了升降通癃方中空栓能改善增生的前列腺,且高剂量升降通癃方中空栓效果显著,具有一定的药效效应。

目前BPH的发病学说主要包括双氢睾酮、间质-上皮细胞转化、雌/雄激素紊乱、胚胎再唤醒细胞增殖/凋亡紊乱^[22-23]。关于雄激素在BPH的发生中的作用已被学者很好的报道及普遍认同。雄激素中最主要的T,而前列腺组织内的主要雄激素为DHT是常见的雄激素,是T对BPH代谢过程的中间产物。前列腺间质中5 α 还原酶具有较高活性,能将T转化为更具有亲活力的DHT与雄激素受体结合,促进前列腺细胞的蛋白质合成和细胞生长^[24],进而能刺激BPH,引起下路尿路梗阻的症状^[25]。实验中模型组大鼠前列腺中DHT水平较假手术组升高,升降通癃方中空栓干预后能降低大鼠前列腺中DHT水平,证实了升降通癃方中空栓可能通过降低大鼠前列腺中DHT水平改善增生的前列腺组织。

近些年来有研究发现CRYAB通过激活PI3K/Akt信号通路和增强PI3K活性来抑制细胞凋亡^[26]。PI3K/Akt信号通路在凋亡过程中起关键作用^[27-29]。 α B-crystallin又称为CRYAB、HSPB5,是小热休克蛋白(sHps)家族的主要成员,其蛋白结构含有一个N-末端结构域,中央结构域和一个C-末端结构域。CRYAB是一种抵抗各种细胞凋亡的蛋白,主要性质为负调节Caspase-3和Bax。Caspase-3基因以无活性的酶原形式存在于细胞浆中,其被上游信号激活后,进一步作用于底物,导致Caspase级联反应放大,活化的Caspase-3参与了一系列与凋亡有关的细胞变化过程,包括导致细胞骨架和DNA破坏,抑

制DNA的修复及RNA和蛋白质的合成,从而引起DNA断裂、染色体浓缩,细胞发生凋亡,促使凋亡小体形成等。CRYAB与最有效的内源性凋亡抑制剂X染色体连锁的凋亡抑制蛋白(XIAP)相互作用,最终抑制Caspase-3^[30]。而细胞增殖和凋亡的动态平衡是保证人体器官稳定的基础,Bcl-2是与Bax同源的水溶性相关蛋白,Bcl-2可以抑制由多种细胞毒因素所引起的细胞死亡,Bcl-2的过度表达可减少氧自由基的产生和脂质过氧化物的形成,抑制线粒体通透性改变,从而抑制凋亡。CRYAB能抑制Bcl-2由细胞质向线粒体的易位,从而对抗Bcl-2的抗凋亡作用^[31]。PI3K是PI3K/Akt通路的上游启动分子,是细胞内重要的信号转导分子,当细胞发生应激后,细胞膜上PI3K磷酸化成PIP3,PIP3可使Akt从细胞质内转移到细胞膜上,Akt是一种Ser/Thr蛋白激酶,活化的Akt能自身发挥抑制细胞凋亡的功能促进细胞增殖,是其发挥促细胞生存功能的重要前提^[32-33]。激活的Akt主要通过促进Bcl-2、Caspase-3等下游底物磷酸化而发挥广泛的生物学效应,包括抗凋亡、激活蛋白的翻译、增强细胞的生长^[34]。而CRYAB通过激活抑制PI3K/Akt信号通路和增强PI3K活性来抑制细胞死亡^[35]。CRYAB蛋白表达增高与内质网应激、氧化应激和细胞死亡发生抵抗,故CRYAB蛋白可能是导致前列腺组织增生的关键蛋白。本研究中,发现BPH模型组大鼠前列腺组织CRYAB、Bcl-2、PI3K及Akt蛋白表达水平较假手术组高,Caspase-3及Bax蛋白表达水平较假手术组低,说明BPH的确会激活CRYAB、Bcl-2、PI3K及Akt蛋白表达,抑制Caspase-3及Bax蛋白表达;升降通癃方中空栓干预后,发现大鼠前列腺组织CRYAB、Bcl-2、PI3K及Akt蛋白表达水平显著下降,Caspase-3及Bax蛋白表达水平显著上升,说明升降通方中空栓能通过降低CRYAB、Bcl-2蛋白表达,升高Caspase-3及Bax蛋白表达,实现对PI3K/Akt信号通路的负性调节,抑制细胞增殖和促进细胞凋亡,从而发挥对BPH的治疗作用。

综上所述,升降通癃方中空栓能有效改善增生的前列腺,高剂量升降通癃方中空栓效果更佳。升降通癃方中空栓下调DHT水平,Bcl-2、PI3K及Akt蛋白表达水平,上调Caspase-3及Bax蛋白表达水平,实现了对PI3K/Akt信号通路的负性调节,抑制细胞增殖和促进细胞凋亡,从而发挥对BPH的治疗作用。升降通癃方中空栓创新了传统中医药治疗BPH的给药方式,为BPH患者提供了一种作用机制

明确、疗效肯定,使用简便的新剂型,将传统中药与科学技术相结合,突破中医药现代化瓶颈,推动中医药事业发展项,当然更深层次的明确其对改善大鼠BPH的分子生物学机制仍需努力。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 潘月,孙梦圆,马晴晗,等.老年良性前列腺增生生活质量与自我护理能力的相关性[J].中国老年学杂志,2020,40(10):2215-2218.
- [2] KIM H B, KIM Y I, JEON J H, et al. Effectiveness and safety of electroacupuncture and its cotreatment with electronic moxibustion in the treatment of patients with moderate benign prostatic hyperplasia using alpha blocker: Study protocol for an assessor-blinded, randomized controlled clinical trial [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(15): e19678.
- [3] WANG Y R, XU Y, JIANG Z Z, et al. Triptolide reduces prostate size and androgen level on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in Sprague Dawley rats [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(5): 341-346.
- [4] MCVARY K T. BPH: Epidemiology and comorbidities [J]. *Am J Manag Care*, 2006, 12(5 Suppl): S122-S128.
- [5] 曹德宏,柳良仁.炎症与良性前列腺增生及CD40/CD40L信号通路的研究进展[J].现代泌尿外科杂志,2016,21(3):233-237.
- [6] 譙旭芳.榉树(*Zelkova serrata*)抗前列腺增生组分提取优化及其药理研究[D].重庆:西南大学,2020.
- [7] 羊羨.基于ERK1/2信号通路探讨E₂/T失衡对BPH发病的作用机制及益肾通癃胶囊对BPH模型大鼠的干预作用[D].长沙:湖南中医药大学,2019.
- [8] YANG L, XIE S, JAMALUDDIN M S, et al. Induction of androgen receptor expression by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt downstream substrate, FoxO3a, and their roles in apoptosis of LNCaP prostate cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(39): 33558-33565.
- [9] 周宇,李海松,谢知音,等.益肾通淋方对良性前列腺增生大鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J].中国中医药信息杂志,2019,26(7):56-59.
- [10] IQBAL J, AL-RASHED J, KEHINDE E O. Detection of *Trichomonas vaginalis* in prostate tissue and serostatus in patients with asymptomatic benign prostatic hyperplasia [J]. *BMC Infect Dis*, 2016, 16(1): 506.
- [11] 宋春生.中西医结合治疗良性前列腺增生症的思路

- 与方法[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(8): 747-749.
- [12] 郑人文, 蒋静, 宁艳哲, 等. 中医对良性前列腺增生的认识及治疗现状[J]. 世界中医药, 2017, 12(8): 1974-1978.
- [13] 潘杰, 梁健峰, 陈举锋. 黄芪春泽汤治疗癃闭的临床观察[J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(11): 40-41.
- [14] 吴钟彪, 房华. 前列通窍汤治疗良性前列腺增生合并前列腺炎的疗效观察[J]. 中医药导报, 2017, 23(23): 93-95.
- [15] 张玲, 谢辉, 颜苗, 等. 克癯胶囊对前列腺增生大鼠模型及Nrf2/ARE信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 87-91.
- [16] 曾玉霞, 张恒. 良性前列腺增生症中医药治疗进展[J]. 山西中医, 2019, 35(7): 55-57, 62.
- [17] 白怡鑫. 逍遥中空栓对肝郁型大鼠行为学以及性激素的药效学研究[D]. 山西省中医药研究院, 2017.
- [18] 李卓, 莫介荣, 叶木石, 等. 氨氯地平对去势大鼠前列腺增生的影响及其机制[J]. 实用医学杂志, 2021, (11): 1409-1413.
- [19] 苗明三, 肖开, 高渐联, 等. 益母草总碱对老龄大鼠前列腺增生模型的影响[J]. 中草药, 2015, 46(13): 1937-1943.
- [20] 牛彩琴, 敬华娥, 张团笑. 王不留行对大鼠子宫平滑肌的影响[J]. 河南中医, 2014, 34(2): 234-236.
- [21] 张立庄, 谢冰川. 黄芪通闭汤治疗良性前列腺增生症的临床研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(3): 166-168.
- [22] TANG J, YANG J. Etiopathogenesis of benign prostatic hyperplasia[J]. Indian J Urol, 2009, 25(3): 312-317.
- [23] BOSCH R J. Pathogenesis of benign prostatic hyperplasia[J]. Eur Urol, 1991, 20(Suppl 1): 27-30.
- [24] YOUN D H, PARK J, KIM H L, et al. Berberine improves benign prostatic hyperplasia via suppression of 5 alpha reductase and extracellular signal-regulated kinase *in vivo* and *in vitro*[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 773.
- [25] 黄成然, 陈钱, 张春阳, 等. 雌激素及雌激素受体与良性前列腺增生症[J]. 中国男科学杂志, 2015, 29(8): 62-65.
- [26] JEHLE S, VOLLMAR B S, BARDIAUX B, et al. N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(16): 6409-6414.
- [27] WU D D, GAO Y R, LI T, et al. PEST-containing nuclear protein mediates the proliferation, migration, and invasion of human neuroblastoma cells through MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 499.
- [28] 张天琪, 李传成, 张铁峰, 等. 基于网络药理学和体外实验探讨黄芪甲苷通过激活PI3K/AKT信号通路减轻PC12细胞损伤的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(24): 6465-6473.
- [29] 赵革, 张丹, 杨小会, 等. 丁香活性组分抑制PI3K/Akt/mTOR通路诱导人结肠癌HCT116细胞凋亡的研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1197-1204.
- [30] WU X, YU J, YAN J, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors inhibit the growth of melanoma cells with mTOR H2189Y mutations *in vitro* [J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(7): 584-589.
- [31] 乔铁, 梁可, 马进, 等. 黄芪皂苷对化疗贫血小鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路相关基因mRNA表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3828-3832.
- [32] LEE J S, KIM H Y, JEONG N Y, et al. Expression of alphaB-crystallin overrides the anti-apoptotic activity of XIAP[J]. Neuro Oncol, 2012, 14(11): 1332-1345.
- [33] 李峰, 郑仿, 谢江平, 等. 加味桂枝茯苓颗粒对实验性良性前列腺增生大鼠VEGF/Bcl-2表达及前列腺超微结构的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8): 1977-1980.
- [34] HU W F, GONG L, CAO Z, et al. alphaA- and alphaB-crystallins interact with Caspase-3 and Bax to guard mouse lens development[J]. Curr Mol Med, 2012, 12(2): 177-187.
- [35] PASUPULETI N, MATSUYAMA S, VOSS O, et al. The anti-apoptotic function of human alphaA-crystallin is directly related to its chaperone activity[J]. Cell Death Dis, 2010, 1(3): e31.

[责任编辑 王鑫]