

益母草总碱对小鼠前列腺增生模型的影响

刘绍夔,白明,纪晓宁,张颖,苗明三*

(河南中医学院,郑州 450008)

[摘要] **目的:**探讨益母草总碱对小鼠前列腺增生模型的影响。**方法:**昆明种雄性小鼠连续 3 周 sc 丙酸睾酮 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,造前列腺增生模型,将模型小鼠分为 5 组,分别 ig $160, 80, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的益母草总碱液, $450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 癸闭舒胶囊混悬液和同体积的生理盐水,另设一组空白组给同体积生理盐水;每天给药 1 次,连续给药 30 d。末次给药 1 h 后处死小鼠,观察益母草总碱对前列腺指数,对前列腺、睾丸、附睾、胸腺、脾脏组织形态的影响。**结果:**与前列腺增生模型组比,益母草总碱 $160, 80, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可显著降低前列腺增生模型小鼠前列腺指数,前列腺指数分别为 (0.53 ± 0.14) , (0.51 ± 0.11) , $(0.64 \pm 0.18) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;可显著减改善前列腺增生伴发的睾丸、附睾病变;益母草总碱 $160, 80, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可显著改善前列腺增生伴发的胸腺、脾脏萎缩,胸腺皮质厚度及淋巴细胞数分别为 (24.16 ± 2.22) , (26.28 ± 3.20) , $(26.32 \pm 3.31) \mu\text{m}$ 及 (60.3 ± 4.5) , (68.2 ± 5.2) , (53.3 ± 4.2) 个,脾小结及淋巴细胞数分别为 (14.18 ± 2.32) , (16.14 ± 3.04) , $(29.26 \pm 3.52) \mu\text{m}$ 及 (17.2 ± 2.0) , (15.3 ± 3.1) , (28.3 ± 3.4) 个。**结论:**益母草总碱对丙酸睾酮所致的小鼠前列腺增生模型有好的治疗作用。

[关键词] 益母草总碱; 丙酸睾酮; 前列腺增生; 小鼠模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0177-04

Effect of Total Alkaloids Extracted from Leonuri Herba on Mice Benign Prostate Hyperplasia

LIU Shao-yan, BAI Ming, JI Xiao-ning, ZHANG Ying, MIAO Ming-san

(Henan Univeisity of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of total alkaloids in Leonuri Herba (LH) on mice benign prostate hyperplasia (BPH). **Method:** Benign prostatic hyperplasia model was established by subcutaneous injecting of testosterone propionate $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ consecutively for 21 d. The mice were randomly divided into 6 groups: 160, 80, 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ alkaloids dosage group, Longbishu capsule suspension group, model group. normal control group. Every group was daily given the corresponding drugs for 30 days. The prostate index and histomorphology changes of prostate gland, testicle, epididymis, thymus gland and spleen that were determined. **Result:** Compared with model group, the total alkaloids in LH at the dosage of 160, 80, 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ could significantly reduce the prostate index of BPH. The prostate index of different groups was (0.53 ± 0.1) , (0.51 ± 0.1) , $(0.64 \pm 0.18) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ respectively. The total alkaloids in LH could significantly improve the pathological changes of testicle and epididymis concomitant with BPH. The total alkaloids in LH at the dosage of 160, 80, 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ could significantly improve the atrophy of thymus gland and spleen. The thickness of thymus cortical and the number of lymphocyte was (24.16 ± 2.2) , (26.28 ± 3.20) , $(26.32 \pm 3.31) \mu\text{m}$ and (60.3 ± 4.5) , (68.2 ± 5.2) , (53.3 ± 4.2) . The splenic lymph nodes and the number of lymphocyte was respectively (14.18 ± 2.3) , (16.14 ± 3.0) , $(29.26 \pm 3.52) \mu\text{m}$ and (17.2 ± 2.0) , (15.3 ± 3.1) , (28.3 ± 3.4) . **Conclusion:** Total alkaloids in LH has good therapeutic actions on mice BPH.

[Key words] total alkaloids in LH; testosterone propionate; benign prostatic hyperplasia; mice model

[收稿日期] 20110312(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173474);郑州市科技领军人才项目(0910SGYS3527)

[通讯作者] *苗明三,教授,博士,从事中药药理教学与研究, E-mail: miaomingsan@163.com

益母草又称坤草,在《神农本草经》中被列为上品;其味辛、苦,性凉,入心包、肝经,具有活血化瘀、清热解毒、利尿通淋之功,为妇科之圣药。研究表明益母草中所含有效成分为总生物碱(总碱),主要包括益母草碱和盐酸水苏碱等成分^[1]。药理研究证明,益母草具有改善血液流变学、改善微循环、抗炎镇痛、抗氧自由基、保钾利尿、增强免疫和保护心肌等作用^[2-4]。目前前列腺增生发病率逐年升高,男性前列腺自 25~30 岁前列腺就开始出现组织学增大,在 60 岁以上男性中前列腺总体积增大的比例超过 50%^[5]。中医将前列腺增生症归为“癃闭”、“淋证”范畴,主要病机为有湿热下注、气滞血瘀、脾肾气虚等。益母草活血化瘀、清热解毒、利尿通淋的功能针对了前列腺增生的主要病因病机,也是中医药治疗“癃闭”、“淋证”的主要治则。本文报道益母草总碱对小鼠前列腺增生模型的影响。

1 材料

1.1 药品试剂 益母草购自河南张仲景大药房股份有限公司,经河南中医学院曹继华教授鉴定为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt 的地上部分;益母草总碱,河南中医学院化学室提供,含量 > 50%;癃闭舒胶囊,石家庄科迪药业有限公司,批号 060102;丙酸睾酮注射液,上海通用药业股份有限公司,批号 060403;甲醛,中国莱阳市双双化工有限公司,批号 20040519;氯化钠注射液,郑州永和制药股份有限公司,批号 20060302。

1.2 动物 小鼠,昆明种,雄性,18~20 g,由河北省医学实验动物中心提供,合格证编号 707163。

2 方法

2.1 益母草总碱的提取 称取过筛益母草饮片 500 g,快速淋洗后置提取筒中,加 14 倍量水煎煮 1 h,保持微沸,过滤,重提 2 次,合并滤液;冷藏过夜,浓缩至密度为 $1.10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$;加乙醇并使乙醇达 80%,冷藏过夜,抽滤,浓缩至 250 mL;加酸调 pH 至 3,用干燥的漏斗过滤,滤液上离子交换树脂柱;用水冲洗至不显 Molish 反应;加 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 洗脱,洗脱液用固体 NaOH 中和,回收至干。所得固体物加体积分数为 95% 的乙醇超声提取,过滤,残渣重提 3 次,合并滤液回收至干,得总生物碱粗品。把所得粗品重新加 10 倍量无水乙醇溶解,过滤,浓缩即得益母草总碱,测得益母草总碱含量为 52.08%。益母草总碱主要含益母草碱、水苏碱等成分。

2.2 分组与给药 取昆明种小鼠 60 只,雄性,18~20 g,随机分为 6 组,其中 1 组为空白组,另 5 组造前列腺增生模型,方法为每日按 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sc 丙酸睾酮^[6-7](溶于大豆油),连续 3 周,空白组 sc 等量溶媒。造模型 5 组分别 ig 高、中、低剂量的益母草总碱液 ($160, 80, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),癃闭舒胶囊混悬液 ($450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和同体积的生理盐水(模型组),空白组给同体积生理盐水,给药体积均为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;每日 1 次,连续 3 周。末次给药后(禁食 12 h)1 h,称重后脱颈椎处死小鼠,迅速取出前列腺组织、睾丸、附睾、胸腺、脾脏,称前列腺湿重,计算各组小鼠前列腺指数(前列腺指数 = 前列腺湿重 mg/鼠体重 g);另取一部分前列腺组织以及睾丸、附睾、胸腺、脾脏固定于 10% 福尔马林溶液中,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察各组前列腺、睾丸、附睾组织形态学,胸腺皮质厚度、脾小结大小及淋巴细胞数的变化。

2.3 定量方法^[8] 胸腺皮质厚度的测量:采用测微尺测量,测微尺测得胸腺皮质最宽处和最窄处厚度,二者相加求算术均数,即为所测胸腺皮质厚度。胸腺淋巴细胞的计数采用测微尺的基线,计算压在基线上的淋巴细胞的个数,求均数。

脾小结大小的测量:每个脾脏随机测 3 个脾小结。采用测微尺测量,以中央动脉为中心,测定两侧大小,求二者均数为所测脾小结的大小。脾脏淋巴细胞的计数采用测微尺的基线,计算压在基线上的淋巴细胞的个数,求均数。

前列腺增生半定量标准^[7]:根据小鼠前列腺增生程度不同,将其分为四级:“-”腺体无增生,间质无纤维增生和炎细胞浸润;“+”腺体稍有增生,间质出现 2 层纤维增生和少数炎细胞浸润;“++”腺体明显增生,间质出现 3~4 层纤维增生和少数炎细胞浸润;“+++”腺体显著增生,间质出现 5~7 层纤维增生和少数炎细胞浸润。

2.4 统计学分析 实验数据采用采用 SPSS 11.0 统计软件处理。计量资料组间比较采用单因素方差分析,等级资料采用 Ridit 分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠前列腺增生模型前列腺指数的影响 与空白组比,模型小鼠前列腺湿重及前列腺指数均明显增加($P < 0.01$),说明造前列腺增生模型成功。与模型组比,益母草总碱 $160, 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量和癃

闭舒均可显著降低前列腺增生模型小鼠前列腺湿重和前列腺指数($P < 0.01$);有剂量效应关系。

表1 益母草总碱对小鼠前列腺增生模型前列腺指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	前列腺重 /mg	前列腺指数 /mg·g ⁻¹
空白	-	15.82 ± 4.14 ²⁾	0.47 ± 0.14 ²⁾
模型	-	28.33 ± 6.64	0.85 ± 0.21
癉闭舒	450	19.82 ± 5.54 ²⁾	0.60 ± 0.16 ²⁾
益母草总碱	160	18.63 ± 4.80 ²⁾	0.53 ± 0.14 ²⁾
	80	17.70 ± 3.41 ²⁾	0.51 ± 0.11 ²⁾
	40	22.48 ± 6.63	0.64 ± 0.18 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2~4同)。

3.2 对小鼠前列腺增生模型前列腺、睾丸及附睾、胸腺及脾脏组织形态的影响

3.2.1 对前列腺组织形态的影响 空白组前列腺腺体较少,腺腔较大,腺上皮未见增生,间质纤维细胞未见增生;模型组前列腺腺体显著增多,腺上皮未见增生,腺腔内可见少量分泌物,间质纤维细胞明显增生,伴有少量炎细胞浸润;癉闭舒组前列腺腺体未见增多,腺上皮未见增生,间质纤维细胞消失;益母草总碱 160 mg·kg⁻¹ 剂量组前列腺腺体明显增多,腺腔内可见大量分泌物,腺上皮未见增生,间质纤维细胞未见增生;益母草总碱 80 mg·kg⁻¹ 剂量组前列腺腺体明显减少,腺腔缩小,腺上皮未见增生,间质纤维细胞稍有增生,可见大量炎细胞浸润;益母草总碱 40 mg·kg⁻¹ 剂量组前列腺腺体明显减少,腺腔缩小,腺上皮未见增生,间质纤维细胞稍有增生,可见少量炎细胞浸润。经 Ridit 检验,与空白组比,模型组出现显著病理变化($P < 0.01$),说明前列腺增生模型成功。与模型组比,益母草总碱 160,80 mg·kg⁻¹ 剂量组和癉闭舒组均可显著减轻模型小鼠前列腺增生病理变化($P < 0.01$)。以益母草总碱 160 mg·kg⁻¹ 剂量对前列腺增生的减轻作用为优。见表2。

3.2.2 对睾丸及附睾组织形态的影响 空白组及用药各组小鼠睾丸中曲细精管内各级精原细胞、精子和支持细胞及其间质未见异常,附睾管内有精子存在,其间质有少数淋巴细胞和纤维细胞;模型组小鼠睾丸中曲细精管内各级精原细胞出现变性,精子明显减少,支持细胞及其间质未见异常,附睾管内精子明显减少,其间质有纤维细胞的增生和少数淋巴细胞浸润。

表2 益母草总碱对小鼠前列腺增生模型前列腺组织形态的影响($n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	-	+	++	+++
空白	-	2	8	0	0 ²⁾
模型	-	0	1	2	7
癉闭舒	450	6	4	0	0 ²⁾
益母草总碱	160	4	5	1	0 ²⁾
	80	2	4	4	0 ²⁾
	40	0	2	4	4

3.2.3 对胸腺组织形态的影响 空白组小鼠胸腺小叶分界清楚,皮质髓质分界清楚,皮质的淋巴细胞较为密集;模型组小鼠皮质明显变薄,淋巴细胞较为稀疏;癉闭舒组小鼠皮质稍有增厚,淋巴细胞稍有稀疏;益母草总碱各剂量胸腺皮质明显增厚,益母草总碱 160,80 mg·kg⁻¹ 剂量组淋巴细胞较为密集;益母草总碱 40 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠皮质淋巴细胞相对稀疏。与空白组比,模型组小鼠胸腺皮质显著变薄、淋巴细胞个数显著减少($P < 0.01$)。益母草总碱 3 个剂量组和癉闭舒组均可使前列腺增生模型小鼠胸腺皮质厚度显著增大、淋巴细胞个数显著增多($P < 0.01$)。见表3。

表3 益母草总碱对小鼠前列腺增生模型胸腺皮质厚度及淋巴细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	皮质厚度 /μm	淋巴细胞数 /个
空白	-	23.06 ± 3.17 ²⁾	54.4 ± 6.3 ²⁾
模型	-	7.45 ± 2.13	16.4 ± 3.2
癉闭舒	450	16.37 ± 3.12 ²⁾	28.1 ± 4.2 ²⁾
益母草总碱	160	24.16 ± 2.22 ²⁾	60.3 ± 4.5 ²⁾
	80	26.28 ± 3.20 ²⁾	68.2 ± 5.2 ²⁾
	40	26.32 ± 3.31 ²⁾	53.3 ± 4.2 ²⁾

3.2.4 对脾脏组织形态的影响 空白组小鼠脾脏中红骨髓分界清楚,脾窦未见有充血现象,脾小结淋巴细胞较为密集;模型组小鼠脾窦有轻度充血现象,脾小结缩小,淋巴细胞较为密集;癉闭舒组小鼠脾窦明显充血,脾小结稍有增大,淋巴细胞较为稀疏;益母草总碱 160,80 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠脾窦未见有充血现象,脾小结增大,淋巴细胞密集;益母草总碱 40 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠脾窦未见有充血现象,脾小结增大,淋巴细胞较为密集。与空白组比,模型组小鼠脾小结显著减小、淋巴细胞个数显著减少($P < 0.01$)。

益母草总碱 160, 80, 40 mg·kg⁻¹ 剂量组可使前列腺增生模型小鼠脾小结显著增大 ($P < 0.01$)；益母草总碱 40 mg·kg⁻¹ 组使淋巴细胞数显著增多 ($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 益母草总碱对小鼠前列腺增生模型脾小结大小及淋巴细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	脾小结 /μm	淋巴细胞数 /个
空白	-	19.23 ± 2.36 ²⁾	30.6 ± 2.2 ²⁾
模型	-	9.10 ± 2.23	15.3 ± 2.1
癉闭舒	450	12.36 ± 3.04 ¹⁾	12.4 ± 3.2
益母草总碱	160	14.18 ± 2.32 ²⁾	17.2 ± 2.0
	80	16.14 ± 3.04 ²⁾	15.3 ± 3.1
	40	29.26 ± 3.52 ²⁾	28.3 ± 3.4 ²⁾

4 讨论

本实验采用小鼠 sc 丙酸睾酮成功建立前列腺增生模型,睾酮(T)是人体内主要的雄激素,在 5α-还原酶作用下变为双氢睾酮(DHT),前列腺内的 DHT 浓度增加可导致腺体增生。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)通过 DHT 或调节生长因子而发挥作用,导致前列腺组织上皮细胞增生,腺腔变大并且分泌物增多^[9];刺激前列腺上皮细胞生长的表皮细胞生长因子(EGF)与血浆中雄激素的含量呈正相关^[10],导致前列腺的增生。前列腺湿重及前列腺指数可直接反映前列腺增生的状况,前列腺组织形态是确定是否增生的关键。有文献报道,小鼠前列腺炎模型会累及相关的睾丸、附睾、胸腺,但前列腺增生模型是否会累及相关的脏器,未见报道^[11]。

益母草活血化瘀、清热解毒、利尿通淋的功能针对了前列腺增生的主要病因病机,也是中医药治疗“癉闭”、“淋证”的主要治则^[12]。有报道益母草对雄性生殖细胞遗传物质具有保护作用,可明显提高小鼠淋巴因子的活性;可协同 ConA 增强机体细胞免疫功能;对庆大霉素(GM)所致大鼠急性肾功能衰竭有保护作用^[13];所含益母草碱、水苏碱具有保钾利尿作用^[4];这些作用也有利于前列腺增生的治疗。

本实验表明,益母草总碱可显著降低前列腺增生模型小鼠的前列腺湿重和前列腺指数,显著减轻造模所致的前列腺病理变化;使前列腺增生时伴发的睾丸、附睾病理变化明显减轻;使前列腺增生时伴发的胸腺、脾脏萎缩显著减轻,可显著增加胸腺皮质

厚度和淋巴细胞数、显著增加脾小节大小和淋巴细胞数。益母草总碱对丙酸睾酮所致的小鼠前列腺增生模型有好的治疗作用,本实验为益母草临床治疗前列腺增生提供了实验支持,也为前列腺增生的防治提供了新的思路和方法。

[参考文献]

[1] 郑师明,严鹏科,李世煌,等.精制益母草生物碱提取纯化工艺研究[J].中国药房,2010,21(15):1370.

[2] 苗明三,张玉林,史晶晶,等.复方益母草口服液对大鼠痛经模型的影响[J].中药药理与临床,2008,24(5):56.

[3] 熊莺,杨解人.益母草碱对大鼠急性心肌缺血损伤心肌肌钙蛋白 T 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(2):21.

[4] 顾月丽,顾江红.益母草药理作用的研究进展[J].中国中医药科技,2008,15(4):320.

[5] 刘智勇,许传亮,高旭,等.良性前列腺增生患者前列腺体积和移行区体积随年龄变化的调查[J].中华男科学杂志,2008,14(12):1103.

[6] 钱华,高智慧,王衍彬,等.大萆麻根提取物对前列腺增生小鼠的治疗作用[J].中国药学杂志,2008,43(2):108.

[7] 苗明三,张玉林,纪晓宁,等.水蔓菁总黄酮对前列腺增生小鼠模型的影响[J].中药药理与临床,2009,25(2):63.

[8] 苗明三,苗艳艳,方晓艳.大枣多糖对大鼠气血双虚模型胸腺、脾脏中组织形态及骨髓象的影响[J].中药药理与临床,2010,6(2):42.

[9] 孙自学,陈建设,王德军,等.前列安对良性前列腺增生症大鼠模型前列腺组织碱性成纤维生长因子的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):101.

[10] Rosebud O, Roberts, Debra J, et al. Insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein 3, and urologic measures of benign prostatic hyperplasia [J]. Am J Epidemiol, 2003, 157: 784.

[11] 张子梅,苗明三,张玉林.水蔓菁总黄酮对小鼠前列腺及相关组织形态的影响[J].中国现代应用药学,2009,26(2):112.

[12] 邹恩泽,才艳红.前列腺增生症的药物治疗[J].现代中西医结合杂志,2007,16(25):3699.

[13] 魏丽春,李庆军.益母草的药理与临床研究进展[J].西北药学杂志,2009,24(4):333.

[责任编辑 聂淑琴]