

桂枝茯苓丸联合补中益气丸对去势大鼠前列腺增生作用机制的研究

王佟¹, 曹余光^{1*}, 刘莹²

(1. 辽宁医学院附属第三医院, 辽宁 锦州 121000;

2. 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁 锦州 121000)

[摘要] 目的: 探讨桂枝茯苓丸联合补中益气丸抑制良性前列腺增生的治疗作用机制, 观察其对良性前列腺增生的治疗效果。方法: 观察桂枝茯苓丸联合补中益气丸对由丙酸睾酮诱导的去势大鼠前列腺增生模型后的前列腺指数、碱性成纤维生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、抑制细胞凋亡因子(Bcl-2)水平以及前列腺组织病理学改变。结果: 桂枝茯苓丸联合补中益气丸各剂量组前列腺指数, bFGF, EGF, Bcl-2 指标均明显低于模型组, 试验药高、中剂量组 bFGF 指标与阳性对照组(癃闭舒)比较有显著性差异, 阳性对照组前列腺指数, bFGF, EGF, Bcl-2 水平低于模型组。结论: 桂枝茯苓丸联合补中益气丸能降低良性前列腺增生模型大鼠的 bFGF, EGF, Bcl-2 水平, 从而抑制前列腺细胞增殖和促进凋亡, 实现抑制良性前列腺增生。

[关键词] 桂枝茯苓丸; 补中益气丸; 良性前列腺增生; 细胞增殖; 碱性成纤维生长因子; 表皮生长因子; 抑制细胞凋亡因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)17-0154-04

良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)是一种复杂的、有多种因素造成的老年男性的常见疾病,且呈进行性发展。关于前列腺增生的发生发展的具体机制至今尚不是很清楚。目前 BPH 的手术治疗效果明显,但手术治疗需要严格的适应症,且 BPH 患者多为老年人,常常合并心、脑、肺、肾等脏器的功能损害,手术治疗有一定的危险性。从而使药物治疗更为重要,尤其对轻、中度患者已成为主要疗法。本试验重点在于通过观察中成药干预下的前列腺组织内相关因子的改变情况,以及前列腺组织病理形态的改变,探讨中成药抑制前列腺增生的机制,评估有效性和安全性,为临床应用和推广提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级 SD 雄性大鼠 60 只,体重在 300 ~ 350 g,由辽宁医学院动物培育中心[合格证号 scxy(辽)2003-007]提供。

1.2 药物 桂枝茯苓丸由山西华康药业股份有限公司生产(批号 Z20053256),主要成分为:桂枝、茯苓、牡丹皮、芍药、桃仁;补中益气丸由北京同仁堂股份有限公司生产(批号 Z11020244),主要成分为:炙黄芪、党参、炙甘草、白术、当归、升麻、柴胡、陈皮;癃闭舒胶囊由石家庄科迪药业生产,主要成分为:补骨脂、益母草、金钱草、海金沙、琥珀、山慈菇。丙酸睾酮注射液由上海通用药业股份有限公司生产(批号 Z10960007)。

1.3 试剂 碱性成纤维生长因子(bFGF)试剂盒(批号 20060930)、表皮生长因子(EGF)试剂盒(批号 20071002)、抑制细胞凋亡因子(Bcl-2)试剂盒(批号 20090802)均购自上海卓康生物科技有限公司。

2 方法

2.1 药物配制

2.1.1 桂枝茯苓丸 按药品说明,成人 1 日口服量为 18 g,折算大鼠用量为 $1.875 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,高剂量为 2 倍即 $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,低剂量为 1/2 倍即 $0.9375 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,每只大鼠按 100 g 给药 1 mL 计算混悬液浓度为 $0.1875 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,高剂量为 $0.375 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,低剂量为 $0.09375 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.1.2 补中益气丸 按药品说明,成人 1 日口服量为 18 g,折算大鼠用量为 $1.875 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,高剂量为 2

[收稿日期] 20100529(001)

[第一作者] 王佟,研究生,主要从事泌尿外科方面研究, Tel: 13464326881, E-mail: wangtong930@163.com

[通讯作者] * 曹余光,主任医师、教授,主要从事泌尿外科方面研究, Tel: 13804169742, E-mail: cyg2921789@126.com

倍即 $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 低剂量为 $1/2$ 倍即 $0.9375 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。给药体积和药物配制浓度同 2.1.1。

2.1.3 癃闭舒胶囊 按药品说明书, 成人 1 日口服量为 1.8 g , 折算大鼠用量为 $0.1875 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每只大鼠按 100 g 给药 1 mL 计算浓度为 $0.01875 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 造模与分组 称取 60 只大鼠质量均在 $300 \sim 350 \text{ g}$, 随机抽出 10 只麻醉后剪开外阴皮肤后立即缝合, 作假手术处理为正常组, 其余 50 只应用戊巴比妥钠 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉, 经阴囊摘除双侧睾丸, 缝合皮肤, 然后每天每只 sc 丙酸睾丸酮 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 持续 7 周造模基本成功。再将造模组随机分为 5 组: 模型组; 试验药(桂枝茯苓丸联合补中益气丸)高、中、低剂量组; 阳性对照组(癃闭舒), 每组 10 只。正常组和模型组每日 ig 等量蒸馏水, sc 等体积的生理盐水, 试验药各剂量组和阳性对照组每日同时 ig 给药。40 d 后称重处死, 摘取前列腺组织称重, 并同时制作光镜及免疫组化标本。

2.3 标本采集和处理 经过 40 d 用药后, 全部大鼠采用脱颈处死, 将前列腺组织完整取出, 分离结缔组织, 在电子天平上称量前列腺质量, 前列腺由中间切为二部分, 左右侧前列腺组织, 分别放入 4% 甲醛(多聚甲醛)溶液和 10% 甲醛溶液中固定, 24 h 内 4% 多聚甲醛固定的组织用清水冲洗后, 放入 80% 乙醇中固定, 用于免疫组化染色。

2.4 检测指标

2.4.1 前列腺指数 称取大鼠体重, 前列腺湿质量, 计算大鼠前列腺指数, 其公式为: 前列腺指数 = 前列腺湿质量(mg) / 大鼠体重(g)。

2.4.2 bFGF, EGF, Bcl-2 的测定 将取出的前列腺组织由中间切为两块, 一块用常规 10% 甲醛溶液固定, 乙醇逐级脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 在光镜下观察其病理改变情况; 另一块行免疫组化染色, 步骤如下: 石蜡切片常规脱蜡至水; 3% H_2O_2 孵育 10 min 灭活内源性过氧化酶; 微波修复抗原: 将切片浸入 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中, 放置在微波炉中加热 $5 \text{ min} \times 2$ 次, 间隔 10 min, 冷却至室温; $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗涤, $3 \text{ min} \times 3$ 次; 滴加适当比例稀释兔来源的一抗, 37°C 孵育 2 h; PBS 洗 $3 \text{ min} \times 3$ 次; 滴加山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体, 37°C 孵育 20 min; PBS 洗 $3 \text{ min} \times 3$ 次; DAB 室温避光显色 $5 \sim 10 \text{ min}$, 显微镜观察, 自来水充分冲洗; 轻度复染, 逐级乙醇脱水、透明、中性树胶封

片, 显微镜观察。

2.5 统计学处理 试验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件, 采用方差分析, 并进一步用 q 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 桂枝茯苓丸联合补中益气丸对 BPH 模型大鼠前列腺指数的影响 试验药(桂枝茯苓丸联合补中益气丸)高、中、低剂量组和阳性对照组(癃闭舒)前列腺指数较模型组明显降低, 差异具有统计学意义(高、中剂量组 $P < 0.01$, 低剂量组、阳性对照组 $P < 0.05$)。试验药高、中剂量组前列腺指数较阳性对照组明显降低($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 桂枝茯苓丸联合补中益气丸对 BPH 模型大鼠前列腺指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	体重 $/\text{g}$	前列腺湿重 $/\text{g}$	前列腺指数 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
正常	-	328.46 ± 15.34	1.35 ± 0.18	$4.11 \pm 0.34^{2)}$
模型	-	324.56 ± 16.13	2.40 ± 0.30	6.39 ± 0.53
桂枝茯苓+补中益气	3.75	317.34 ± 12.68	1.42 ± 0.15	$4.87 \pm 0.29^{2, 4)}$
	1.875	322.12 ± 14.18	1.68 ± 0.18	$5.22 \pm 0.31^{2, 4)}$
	0.9375	314.44 ± 10.69	1.72 ± 0.24	$6.12 \pm 0.21^{1)}$
癃闭舒	0.1875	327.15 ± 16.89	1.65 ± 0.20	$6.08 \pm 0.24^{1)}$

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与癃闭舒组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 桂枝茯苓丸联合补中益气丸对 BPH 模型大鼠 bFGF, EGF, Bcl-2 的影响 试验药高、中、低剂量组和阳性对照组 bFGF, EGF, Bcl-2 指标(A)较模型组明显降低, 差异具有统计学意义(大、中剂量组 $P < 0.01$, 小剂量组、阳性对照组 $P < 0.05$)。试验药大、中剂量组 bFGF, EGF, Bcl-2 指标(A)较阳性对照组明显降低($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 桂枝茯苓丸联合补中益气丸对 BPH 模型大鼠 bFGF, EGF, Bcl-2 A 值的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	bFGF	EGF	Bcl-2
正常组	-	$0.526 \pm 0.021^{2)}$	$0.442 \pm 0.040^{2)}$	$0.411 \pm 0.042^{2)}$
模型组	-	0.667 ± 0.032	0.602 ± 0.057	0.543 ± 0.046
桂枝茯苓+补中益气	3.75	$0.551 \pm 0.022^{2, 4)}$	$0.482 \pm 0.036^{2, 4)}$	$0.446 \pm 0.039^{2, 4)}$
	1.875	$0.569 \pm 0.030^{2, 4)}$	$0.526 \pm 0.048^{2, 4)}$	$0.468 \pm 0.042^{2, 4)}$
	0.9375	$0.640 \pm 0.022^{1)}$	$0.581 \pm 0.035^{1)}$	$0.521 \pm 0.037^{1)}$
癃闭舒	0.1875	$0.632 \pm 0.033^{1)}$	$0.576 \pm 0.029^{1)}$	$0.512 \pm 0.021^{1)}$

3.2 各组大鼠前列腺组织病理变化 正常组前列

腺腔大小、细胞核大小形态较一致, 管腔内见淡粉染均质状物, 间质内未见血管充血、炎细胞浸润和纤维结缔组织增生。模型组前列腺腺体增生, 腺腔扩张明显, 腔内充满粉色浓染均质状物, 有的腺体呈乳头状增生。间质增宽, 其内血管高度扩张充血, 并可见淋巴、单核细胞浸润及纤维结缔组织增生。桂枝茯苓丸联合补中益气丸高、中剂量组和阳性对照组的上述病理改变模型组明显减轻, 而低剂量组与模型组相似, 见图 1。

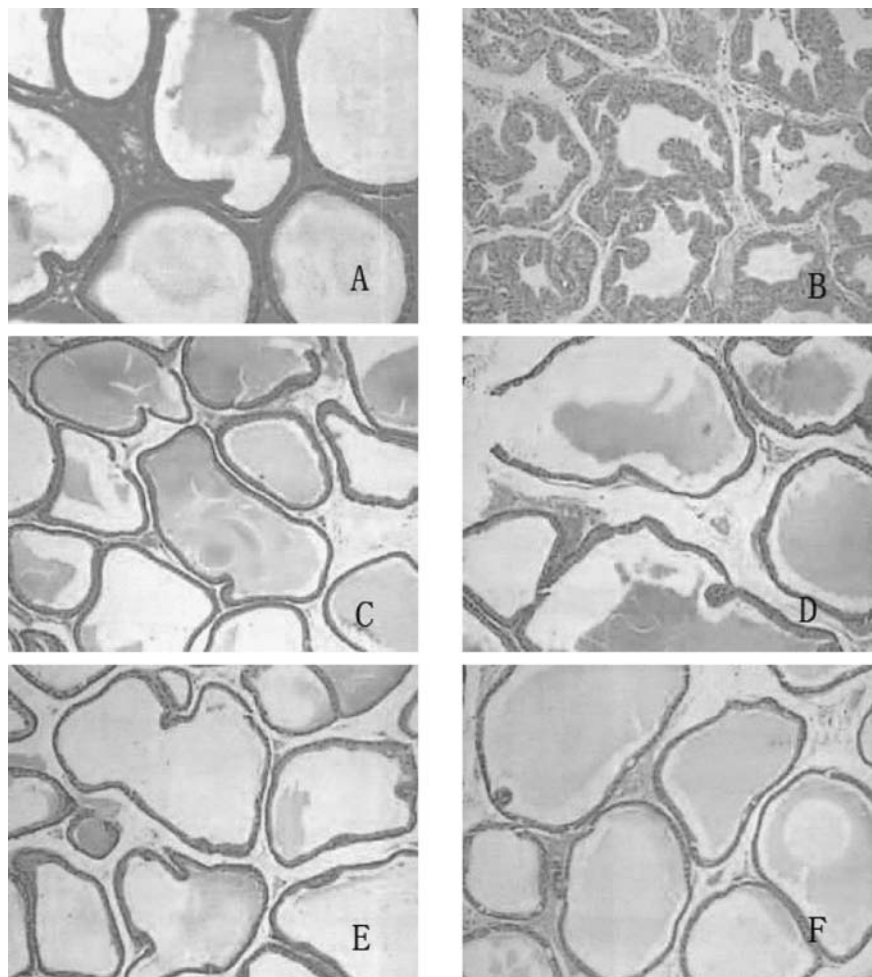


图 1 各组大鼠前列腺组织病理变化(HE 染色, $\times 10$)

A. 正常组; B. 模型组; C. 癃闭舒 $0.1875 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 桂枝茯苓丸联合补中益气丸 $0.9375 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 桂枝茯苓丸联合补中益气丸 $1.875 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 桂枝茯苓丸联合补中益气丸 $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

4 讨论

良性前列腺增生(BPH)属中医学“淋证”范畴^[1]。其治疗以活血化瘀、软坚散结为主。桂枝茯苓丸出自《金匮要略》^[2], 由桂枝、茯苓、牡丹皮、芍药、桃仁 5 味药组成, 方中桂枝发汗解肌、温通经脉、助阳化气; 主治风寒表证, 脘腹冷痛、血寒经闭、关节痹痛、痰饮、水肿、胸痹、心悸、奔豚、癥瘕等; 桃仁为化瘀消癥之要药; 丹皮既能散血行瘀, 又能清退瘀久所化之热; 芍药能和血养血, 与诸祛瘀药合用, 有活血养血之功。水为血之侣, 用茯苓之甘、淡, 性平, 消痰利水、渗湿健脾, 以助消癥之力; 诸药相合, 寒温甘淡并用; 共奏活血化瘀、缓消癥块之效。补中

益气丸由炙黄芪、党参、炙甘草、白术、当归、升麻、柴胡、陈皮 8 味药组成, 现代药理研究证实, 补中益气丸能增强膀胱逼尿肌及盆腔肌肉的收缩能力, 从改善尿流动力学的角度来缓解业已形成的不良排尿状况, 此为治本之药。用桂枝茯苓丸联合补中益气丸, 共奏活血化瘀、培补肾气之功, 益气升阳, 使小便得以畅利而行。可刺激并改善前列腺体的血液循环, 抑制或缩小前列腺体的增生, 从而达到治疗目的。本试验结果表明, 试验药和阳性药在控制模型大鼠的前列腺指数方面效果明显, 与模型组有显著差异, 显著降低良性前列腺增生模型大鼠的 bFGF, EGF, Bcl-2 水平, 从而抑制前列腺细胞的增殖, 达到显著抑制 BPH 模型大鼠的良性前列腺增生的目的。

至今, BPH 的发病机制尚不完全清楚, 主要与下面的几个因素有关: 性激素的平衡失调; 多肽类生长因子; 细胞凋亡及其调控基因; 间质-上皮相互作用。多肽类生长因子在前列腺增生症的发生发展中起着重要的作用, 主要有 bFGF, EGF。

bFGF 广泛存在于各种正常组织器官中, 具有多种生物功能的一类多肽生长因子, 能促进多种来自中胚层和神经外胚层的细胞生长、增殖和分化。bFGF 是由基质细胞分泌, 在前列腺内的主要作用是广泛促进基质细胞的有丝分裂, 刺激基质血管的形成。bFGF 的作用途径是活化前列腺基质细胞的成纤维因子受体而调节基质细胞的增殖, 因此其能反映基质细胞的增殖状态。席氏^[3]动物试验研究发现: 降低前列腺组织中的 bFGF 水平对于抑制前列腺间质细胞的增生具有显著作用。bFGF 结果也提示桂枝茯苓丸联合补中益气丸可降低前列腺组织的 bFGF 阳性表达, 通过减少细胞的分裂、增殖而抑制试验性小鼠前列腺腺组织增生。表明桂枝茯苓丸联合补中益气丸的确能达到治疗前列腺增生的目的。

EGF 作用于细胞表面的同一受体, 并产生相同的生物学效应^[4]。EGF 不仅对人类和小鼠前列腺正常细胞的生长有刺激作用, 而且也是维持其生长所必需的。Sorensen^[5]研究了人的表皮生长因子, 结果表明前列腺增生组织中表皮生长因子的含量显著高于正常前列腺组织。孙氏^[6]研究表明, 移行带是在高浓度的 EGF 环境下, 保持一定增长速度, 并导致 BPH 发病, 并且认为 EGF 主要维持上皮细胞的活跃增长, 这可能是移行区细胞凋亡减少的分子基础。因此, 前列腺组织中的表皮生长因子水平提示其在

前列腺上皮增生过程中起着重要的作用,对于前列腺基底细胞的增殖有重要作用,降低该因子水平对于抑制前列腺增生有较明显的作用。

细胞凋亡 (apoptosis) 亦称为细胞程序死亡 (programmed cell death) 是一种选择性的生理死亡,在正常组织中,细胞增殖速率和细胞死亡速率间存在着平衡,一旦不平衡发生,无论是通过细胞复制速率的增加还是细胞死亡速率的减少,其结果都是前列腺细胞的大量堆积及与之相应的前列腺的生长,而原癌基因是目前最受关注的细胞凋亡相关基因,主要作用是抑制细胞凋亡。Bcl-2 作为一种新型的原癌基因,是 Tsujimoto 等^[7]于 1984 年在大多数滤泡型非霍奇金 B 淋巴瘤细胞瘤中发现的。经研究发现,Bcl-2 基因在 BPH 组织中表达较正常前列腺组织明显升高。张学军等^[8]培育出前列腺组织特异性的人 Bcl-2 转基因鼠,该鼠的前列腺组织中过量表达 Bcl-2 基因,并观察到该鼠发生非典型的 BPH,伴有明显的 BPH 病理改变,直接证明了 Bcl-2 的抗凋亡作用并促进前列腺增生的发生发展。因此,在 BPH 中,Bcl-2 的异常高表达提示其抗细胞凋亡在 BPH 的发生过程中具有重要的作用,Bcl-2 在转基因鼠的前列腺体内的过量表达,能够引发前列腺良性增生。这可以间接地证实细胞凋亡在 BPH 形成中可能发挥的作用。降低 Bcl-2 在前列腺组织中的水平对于抑制前列腺组织细胞的增殖有着积极的作用。

本试验结果表明,试验药在控制模型大鼠的前列腺指数方面效果明显,与模型组差异较大。模型组前列腺指数,bFGF,EGF,Bcl-2 3 因子水平明显高于正常组,表明本试验造模成功,而试验药组 bFGF,EGF,Bcl-2 3 因子表达降低,说明桂枝茯苓丸联合补

中益气丸能降低良性前列腺增生模型大鼠的 bFGF,EGF,Bcl-2 水平,从而抑制前列腺细胞的增殖和促进凋亡,达到抑制 BPH 模型大鼠的良性前列腺增生的目的。

[参考文献]

- [1] 杨安萍. 桂枝茯苓丸治疗前列腺炎[J]. 中国民间疗法, 2004, 14(1): 56.
- [2] 陈玲珍. 桂枝茯苓丸的临床应用[J]. 辽宁中医学院学报, 2004, 6(6): 466.
- [3] 席建元, 贺菊乔, 周亮, 等. 前列散瘀胶囊对试验大鼠前列腺增生的影响研究[J]. 中医药导报, 2006, 12(9): 64.
- [4] 刘洋. 中医药治疗良性前列腺增生机理的研究进展与现状[J]. 中国男科学杂志, 2006, (6): 71.
- [5] Orensen B S, Toring N, Bor M V, et al. Quantitation of the mRNA expression of the epidermal growth factor system: selective induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and amphiregulin expression by growth factor stimulation of prostate stromal cells[J]. J Lab Clin Med, 2000, 136(3): 209.
- [6] 孙宏斌, 夏术阶. 表皮生长因子在前列腺带性结构中的分布及意义[J]. 中华泌尿外科杂志, 2005, 26(6): 390.
- [7] Tsujimoto Y, Finger L R, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic cells with the chromosome translocation [J]. Science, 1984, 226(4678): 1097.
- [8] 张学军, Lee C, Olessin C, et al. Bcl-2 基因在良性前列腺增生中的作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 1997, 18(2): 97.

[责任编辑 聂淑琴]