

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 18. 006

蒲黄颗粒抗小鼠前列腺增生机制的实验研究^{*}

朱成彬,秦兆江,张克辉,周 曙[△]

(广东省佛山市中医院男科 528000)

摘 要:**目的** 观察蒲黄颗粒对小鼠前列腺增生模型前列腺组织 Ki67、CD34 抗原表达的影响。**方法** 将 60 只小鼠随机分为正常组、造模组、舍尼通组、蒲黄组,每组 15 只;皮下注射丙酸睾酮 5 mg/kg 连续 21 d 造前列腺增生模型。各组分别按设计剂量给药,连续 30 d。摘取前列腺病理组织观察,免疫组织化学法检测各组小鼠前列腺组织 Ki67、CD34 抗原表达。**结果** 蒲黄组与舍尼通组均可一定程度改善前列腺细胞增生的病理变化。造模组 Ki67 与 CD34 表达水平升高,与正常组比较差异有统计学意义($P<0.05$);蒲黄组与舍尼通组均可降低 Ki67、CD34 表达水平,与造模组比较差异有统计学意义($P<0.05$),而两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 蒲黄颗粒降低前列腺组织 Ki67、CD34 抗原表达水平,抗前列腺增生作用与抑制前列腺细胞增殖和新生血管产生有关。

关键词:蒲黄颗粒,药理学; 良性前列腺增生,中药疗法; 小鼠模型

中图法分类号:R597+.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)18-2705-03

Experimental study of Puhuang Dispensing Granule for the treatment benign prostate hyperplasia in mice model^{*}

ZHU Chengbin, QIN Zhaojiang, ZHANG Kehui, ZHOU Shu[△]

(Department of Andrology, Foshan Traditional Chinese Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract:**Objective** To study the expression of Ki67 and CD34 in the mice model of benign prostatic hyperplasia(BPH). **Methods** A total 60 mice were randomly divided into 4 groups: normal control group, mice benign prostate hyperplasia group, Cernilton group, Puhuang dispensing granule group. The BPH model was established by subcutaneous injecting of testosterone propionate consecutively for 21 days. Each group was daily given the corresponding medicine through gastric perfusion for 30 days. The mice were sacrificed and their prostates taken for pathological examination. The prostatic spicemens were immunohistochemically stained for Ki67 and CD34. **Results** Cernilton and Puhuang dispensing granule could inhibit prostate hyperplasia in mice. The expression of Ki67 and CD34 increased in mice benign prostate hyperplasia group with statistically significant difference as compared with normal control group ($P<0.05$). Cernilton and Puhuang dispensing granule could decrease the expression of Ki67 and CD34 and there was significant differences compared with normal control group ($P<0.05$). The results between Cernilton group and Puhuang dispensing granule group were not significant ($P>0.05$). **Conclusion** Puhuang dispensing granule could inhibit the growth of the prostate, and the mechanism may be associated with inhibiting proliferation of prostate tissue and formation of new capillary blood vessels.

Key words: Puhuang dispensing granule, pharmacology; benign prostatic hyperplasia, traditional Chinese medicine therapy; mice model

良性前列腺增生(BPH)系男子老年性疾病,主要症状为夜尿频多、排尿困难,甚者尿潴留、肾功能损害。目前中国进入老龄化社会,且前列腺增生有年轻化趋势,其发病率逐年增加,BPH 的发病机制除年龄、性激素等因素以外,近年来有学者发现,该病发生还与肥胖、糖尿病、高脂血症等代谢综合征密切相关^[1-2]。中药蒲黄为香蒲科植物水烛香蒲、东方香蒲

的干燥花粉,广泛应用于 BPH 并取得良好的临床疗效,本研究观察蒲黄颗粒对小鼠前列腺组织 Ki67、CD34 抗原表达的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 NIH 雄性小鼠 60 只,SPF 级,体质量 16~21 g,平均(20±4)g,由本院骨伤科研究所动物中心提供。

^{*} 基金项目:广东省佛山市科学技术局医学类科技攻关项目(200510200047);广东省佛山市医学类科技攻关项目(2015AB00351)。

作者简介:朱成彬,男,主任中医师,主要从事男科临床工作。 [△] 通信作者,E-mail:fsqfr2009@sina.com。

1.2 药物与试剂 蒲黄颗粒由本院中药颗粒药房提供;丙酸睾酮注射液由广州明兴制药公司提供;舍尼通(普适泰 375 mg)由南京美瑞制药有限公司提供。免疫组织化学法所用试剂由美国 Zymed 公司生产。

1.3 方法

1.3.1 分组与造模 将 60 只小鼠分为正常组、造模组、舍尼通组、蒲黄组,各 15 只;除正常组外,连续 21 d 皮下注射丙酸睾丸素 5 mg/kg 制作 BPH 模型^[3]。造模 24 h 后舍尼通组用舍尼通 75 mg · kg⁻¹ · d⁻¹灌胃 3 d,蒲黄组以蒲黄颗粒 30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹灌胃 30 d。

1.3.2 病理检查 取前列腺腹叶做常规石蜡切片固定于 10%福尔马林液中,HE 染色,观察前列腺组织间质炎症、水肿、充血和纤维组织增生等。

1.3.3 免疫组织化学 先经脱蜡、水化、抗原修复后,其他步骤按 EliVision™plus 两步法提供的试剂盒进行。电子光镜观察染色结果。PBS 替代一抗作为阴性对照,已知的阳性片作为阳性对照。

1.3.4 Ki67 阳性的判定 阳性标志为细胞核上有黄至棕色颗粒着色,使用 Ki67 标记指数法^[4](Ki67 LI)。染色结果根据阳性细胞数分为 Ki67 LI>5%、1%~5%、<1% 3 个等级。

1.3.5 CD34 抗体染色和微血管密度(MVD)计数标准 CD34 阳性定位于细胞质,呈黄至棕黄色。在血管致密区计算新生小血管数目,取 5 个高倍视野平均值为 MVD 值^[5]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件包进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病理切片观察 正常组光镜下前列腺组织结构清楚,腺体排列整齐,腺体上皮呈单层排列,腺腔内充满了嗜伊红的分泌物。造模组镜下腺体增生活跃,小叶增生,排列紧密;细胞数量增加排列呈复层或假复层,多属腺体上皮细胞向腺腔内呈乳头状突起而细长,腺腔内嗜伊红的分泌物显著减少。蒲黄组与舍尼通组各种病理现象较造模组明显改善,上皮增生不明显,乳头状突起较少,细胞呈低柱状或扁平状,排列整齐,间质、血管充血较轻。

表 1 各组小鼠前列腺组织 Ki67 LI、CD34 抗原表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ki67 LI(%)	MVD
正常组	15	0.00±0.00	2.57±1.06
造模组	15	21.40±5.84	39.31±12.82
舍尼通组	15	14.16±4.75	17.57±6.34
蒲黄组	15	16.55±5.03	19.33±7.02

2.2 小鼠前列腺组织 Ki67、CD34 的表达 正常组前

列腺组织中 Ki67 无表达;造模组 Ki67 LI 水平显著高于正常组($P<0.05$);舍尼通组、蒲黄组 Ki67 LI 水平均显著低于造模组($P<0.05$),两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$);正常组和造模组前列腺组织中均有 CD34 表达,舍尼通组、蒲黄组 CD34 表达均显著低于造模组($P<0.05$),组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

3 讨 论

前列腺湿质量为评价治疗 BPH 一个很重要的指标。本课题前期实验结果表明,舍尼通组及蒲黄组的小鼠前列腺的湿质量及血清睾酮水平,与造模组比较明显降低,表明蒲黄颗粒对丙酸睾酮所致的小鼠前列腺增生具有一定的抑制作用,提示蒲黄治疗前列腺增生具有较好疗效,并能降低血清睾酮水平,为临床更好的使用提供了证据^[6]。

Ki67 抗原作为增殖细胞中表达的一种核抗原是现今最好的细胞增生标志物^[7]。研究发现,Ki67 不在正常前列腺组织中表达,而在造模组中明显增高,舍尼通组及蒲黄组中又显著降低($P<0.05$),表明蒲黄颗粒能降低前列腺组织细胞的增生和增殖活性。

CD34 作为目前较敏感的血管标记物,与微小血管形成密切相关,广泛表达血管内皮细胞、胚胎成纤维细胞和某些神经组织的细胞,其色泽清晰,便于血管密度的计数^[8-9]。本实验发现造模组的 CD34 表达明显高于正常组,也高于舍尼通组及蒲黄组,提示蒲黄颗粒能够通过减少血管内皮细胞聚集、降低血管密度从而抗前列腺组织增生。蒲黄颗粒和舍尼通均可使 Ki67、CD34 表达降低,蒲黄颗粒的抗增生作用机制与舍尼通相似。

中医认为 BPH 属“癃闭、癥瘕”范畴,肾虚为本,瘀阻为标,肾虚膀胱气化无力,瘀血阻滞,为癃为闭。治宜虚实兼顾,标本同治。蒲黄味甘性平,主心腹膀胱寒热,利小便,止血,消瘀血,久服轻身益气力。《名医论》:“香蒲生于水中,色黄味甘,禀水土之专精,而调和其气血。主治心腹膀胱寒热,利小便者,禀土气之专精,通调水道,则心腹膀胱之寒热俱从小便出,而气机调和矣。止血、消瘀血者,禀水气之专精,生其肝木,则止新血,消瘀血,而血脉调和矣。久服则水气充足,土气有余,故轻身益气力,延年神仙”。《本草汇言》“蒲黄性凉而利洁膀胱之原,清小肠之气,故小便不通,前人所必用也。至于治血之方,血之上者可清,血之下者可利,血之滞者可行,血之行者可止。”蒲黄功兼活血与止血,又能利水且行血,为血水同病之要药。治疗 BPH,切中病机,补虚不恋邪、祛瘀不伤正。

现代药理研究认为蒲黄具有镇痛、抗炎、抗低压低氧、抗微生物、促进血液循环、降低血脂、防止动脉硬化、增强免疫力等作用;老年 BPH 患者常伴心脑血管及代谢性疾病,临床应用蒲黄治(下转第 2710 页)

FIA)^[9-10]、光激化学发光免疫分析法(LICA)及化学发光法(CLIA),检测 PG 的参考方法是化学发光免疫分析法^[10]。本研究的 PG 流式荧光发光免疫测定方法,其分析血清中 PG 的精密度、准确度、检出限、线性,和参考方法 Abbott 公司化学发光法相关性良好,两法测定的结果具有一致性^[10]。本研究通过流式荧光法检测 PG I、PG II 灵敏度和特异度为 74.85%、79.02%,而化学发光法检测 PG I、PG II 灵敏度和特异度为 63.81%、63.75%,流式荧光法检测灵敏度和特异度高。本研究通过试验,结果发现采用流式荧光技术检测 PG I、PG II 的线性范围分别为 0.65~190.00 ng/mL 和 0.22~110.00 ng/mL,和其他研究的结果基本一致^[11]。可能由于两种检测方法的原理不同,灵敏度和特异度的差距等,导致两种检测方法的线性范围差别较大。而且流式荧光法精密度和回收率均比较好,可以准确测定标本中的 PG I、PG II。与化学发光法进行对比分析,两种方法检测 PG I、PG II、PG I/PG II 相关性良好,存在较好的可比性。

综上所述,流式荧光技术检测 PG I、PG II 的方法学性能比较好,与化学发光法具有良好的相关性,可在临床上推广应用。

参考文献

[1] 李洪涛,高庭.流式荧光发光法检测多肿瘤标志物的方法学评价[J].国际检验医学杂志,2014,35(2):203-204.
[2] 李萌,吴诗琴.两种胃蛋白酶原检测方法比较及偏倚评估

[J].国际检验医学杂志,2015,36(18):2706-2707.
[3] 徐燕萍,李敏,赵荣平.流式荧光技术检测血清胃蛋白酶原 I/II 方法学性能评价与应用评估[J].临床检验杂志,2014,32(6):474-477.
[4] 王绍亮.流式荧光法检测胃蛋白酶原在临床的应用[D].石河子:石河子大学,2015.
[5] 田峰,齐素文.基于量子点荧光标记技术检测 SCCa 方法的研究[J].激光杂志,2015,36(4):52-55.
[6] 王绍亮,程江.流式荧光法检测血清胃蛋白酶原 I/II 的应用评价[J].国际检验医学杂志,2015,36(13):1839-1841.
[7] 周伟,金磊,孟伟,等.胃蛋白酶原光激化学发光免疫测定方法的建立[J].中国医药指南,2013,11(12):64-66.
[8] 邱志奇,温少磊,谭智毅.胃蛋白酶原 I、II 及其比值在胃癌筛查中的应用[J].检验医学与临床,2013,10(14):1806-1807.
[9] CHO E J, KIM H K, JEONG T D, et al. Method evaluation of pepsinogen I/II assay based on chemiluminescent immunoassays and comparison with other test methods[J]. Clin Chim Acta, 2016(452):149-154.
[10] 朱国民,邱峰.三种血清胃蛋白酶原检测方法在胃癌筛查中的比较分析[J].检验医学,2012,27(11):961-962.
[11] 丁娟,郑桂喜,杜鲁涛,等.外周血 sHLA-G 与 PGR、GPR 联合检测在胃癌诊断中的效能评估[J].山东大学学报(医学版),2015,53(11):59-63.

(收稿日期:2018-02-07 修回日期:2018-04-22)

(上接第 2706 页)
疗 BPH 更为适合^[10]。同时工艺简单,价格低廉,使用安全方便。本研究初探蒲黄抗 BPH 作用机制,如能推广临床,具有显著的社会效益。

参考文献

[1] 王晓峰.男科疾病诊治进展[M].北京:人民军医出版社,2012:234.
[2] 张杰,潘永军,黄捷,等.肥胖与良性前列腺增生的相关性研究[J].检验医学与临床,2016,13(16):2258-2259.
[3] 苗明三.实验动物和动物实验技术[M].北京:中国中医药出版社,1997:349.
[4] TURNER H E, NAGY Z, GATTER K C, et al. Proliferation, bcl-2 expression and angiogenesis in pituitary adenomas: relationship to tumour behaviour[J]. Br J Cancer, 2000, 82(8):1441-1445.
[5] WEIDNER N, SEMPLE J P, WELCH W R, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma[J]. N Engl J Med, 1991, 324(1):1-8.

[6] 秦兆江,朱成彬,张克辉,等.蒲黄颗粒抗小鼠前列腺增生的实验研究[J].实用中医药杂志,2017,33(9):1004-1006.
[7] GERDES J, SCHWAB U, LEMKE H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation[J]. Int J Cancer, 1983, 31(1):13-20.
[8] ZHANG Y I, XU Y, MA J, et al. Adrenomedullin promotes angiogenesis in epithelial ovarian cancer through upregulating hypoxia-inducible factor-1α and vascular endothelial growth factor[J]. Sci Rep, 2017, 7(7):40524.
[9] TANIGAWA N, AMAYA H, MATSUMURA M, et al. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas[J]. Cancer Res, 1996, 56(11):2671-2676.
[10] 李芳,陈佩东,丁安伟.蒲黄化学成分研究[J].中草药,2012,43(4):667-669.

(收稿日期:2018-02-09 修回日期:2018-04-24)