

中药消癥通闭对大鼠前列腺平滑肌一氧化氮合酶及上皮细胞凋亡的影响^{*}

贾金铭 马春涛 王勒渝 毕振春

内容提要 目的 探讨中药消癥通闭对大鼠前列腺平滑肌中一氧化氮合酶(NOS)及上皮细胞凋亡的影响。方法 用还原型辅酶Ⅱ组化染色结合形态学定量分析方法,检测各组大鼠前列腺中 NOS 神经含量;采用免疫组化原位末端标记染色法,检测大鼠前列腺上皮细胞的凋亡百分率。结果 消癥通闭高剂量组在用药 3 周后,前列腺组织中 NOS 神经的长度密度(L_v)为 0.113 ± 0.023 ,与其他 3 组(消癥通闭低剂量组、保列治组及对照组)比较差异均有显著性($P < 0.01$)。消癥通闭高剂量组及保列治组在实验第 7 天时,凋亡细胞百分率达到高峰(分别为 9.27%、5.65%),第 14 天时稍减少,第 21 天时有所恢复。去势组大鼠在第 7 天时凋亡细胞即出现,到第 14 天时凋亡细胞百分率达到高峰,与其他组比较差异有显著性。结论 中药消癥通闭可增加模拟前列腺增生大鼠前列腺中 NOS 含量,在较短时间内促进大鼠前列腺上皮细胞凋亡。

关键词 前列腺增生 消癥通闭 一氧化氮合酶 细胞凋亡

Experimental Study on Effect of Xiaolong Tongbi on Nitric Oxide Synthase and Epithelial Cell Apoptosis in Prostate of Rats JIA Jin-ming, MA Chun-tao, WANG Le-yu, et al Department of Urology, Guang'anmen Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100053)

Objective: To explore the effect of Xiaolong Tongbi (XLTB), a Chinese herbal preparation, on nitric oxide synthase (NOS) containing nerve and epithelial cell apoptosis. **Methods:** NOS containing nerve level of various groups prostate was determined by NADPH histochemical staining and morphological quantitative analysis, and the cell apoptosis rate in rats' prostatic epithelium was tested immunohistochemically with TUNEL method. **Results:** After 3 weeks treatment with high dose XLTB, the length density of NOS contained nerves in prostate tissue of rats was 0.113 ± 0.023 , which was significantly different to that in the other 3 groups (low dose XLTB, Finasteride and testosterone) respectively ($P < 0.01$). Cell apoptosis reached its peak at the day 7 of experiment in XLTB treated groups (9.27%), and Finasteride treated group (5.65%), which lowered slightly at day 14 and got some recovery at day 21. Castration induced cell apoptosis began at day 7 and reached its peak at day 14, which was significantly different from that in the other groups. **Conclusion:** XLTB could increase the NOS contained nerve level and accelerate the apoptosis of epithelial cell in prostate tissue of simulating benign prostatic hyperplasia rats.

Key words prostatic hyperplasia, Xiaolong Tongbi, nitric oxide synthase, cell apoptosis

一氧化氮(NO)作为一种平滑肌舒张因子、神经递质参与了前列腺增生(PH)的发生和发展,它在体内的半衰期很短,故目前主要通过 NO 合成的关键酶一氧化氮合酶(NOS)来间接测定其变化。细胞凋亡是主动的程序性死亡,受雄激素等因素调控,对前列腺的稳态发展起重要作用。中药消癥通闭临床研究证实,该药可缩小 PH 患者前列腺体积及改善排尿症状;为进一步探索消癥通闭缩小前列腺体积及改善排尿症状的机理,我们用还原型辅酶Ⅱ(NADPH)组化染色结合形态

学定量分析方法,研究该药对大鼠前列腺中 NOS 神经含量的影响;采用免疫组化原位末端标记染色法,对大鼠前列腺上皮细胞的凋亡情况作定量分析,现报道如下。

材料与方

1 动物 Wistar 大鼠,雄性,体重 120 ~ 150g,购自军事医学科学院实验动物中心。

2 药物与试剂 中药消癥通闭药粉(简称中药,组成:黄芪、桃仁、莪术、夏枯草、土茯苓、川牛膝、山豆根等),每克药粉相当 4.8g 生药,中国中医研究院广安门医院制剂室提供;保列治片,每片含非那甾胺 5mg,

^{*} 国家自然科学基金资助课题(No. 3957084)

中国中医研究院广安门医院(北京 100053)

杭州默沙东制药有限公司提供 ;丙酸睾酮注射液 , 50mg/ml ,上海第九制药厂生产 ;M30 CytoDeath 购自德国宝灵曼公司 ;Anti-Mouse Ig-Biotin、HRP、DAB 由北京中山生物技术有限公司提供 ;NADPH、四硝唑氮 (NBT)、TritonX-100、BSA、Tween20 均为美国 Sigma 公司生产。

3 方法

3.1 PH 造模大鼠前列腺平滑肌 NOS 神经的测定 用 10% 水合氯醛 3.5ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠后 ,无菌手术摘除双侧睾丸 ,经 1 周恢复后 ,将 36 只大鼠按体重随机分为 4 组 ,每天皮下注射丙酸睾酮 5mg/kg。(1) 中药高剂量组 (简称中药高组) ,10 只 ,每天灌服中药 2mg/kg (相当临床用量的 20 倍) (2) 中药低剂量组 (简称中药低组) ,8 只 ,每天灌服中药 1mg/kg (相当临床用量的 10 倍) (3) 保列治组 ,9 只 ,每天灌服保列治片 1.67mg/kg (相当临床用量的 20 倍) (4) 对照组 ,9 只 ,每天灌服自来水。以上药物均用蒸馏水稀释成混悬液 ,按 10ml/kg 体重给药 ,每天 1 次 ,连续给药 21 天 ,断头处死 ,摘除前列腺各叶 ,称大鼠及其前列腺重量 ,计算前列腺重/体重比值 ,按文献^[1]方法行大鼠前列腺腹叶 NADPH 组化染色 ,用结构参数 Lv 表示单位体积中神经纤维长度所占相对量的多少^[2] ,对每张切片进行 NOS 神经纤维显微图像定量分析 (× 200) ,每张切片随机选 5 个视野 ,计算平均值。

3.2 大鼠前列腺上皮细胞凋亡的测定 将大鼠去势后按体重随机分为 5 组 :中药高组 16 只 ,每天灌服中药 2mg/kg ,中药低组 16 只 ,每天灌服中药 1mg/kg ,保列治组 16 只 ,每天灌服保列治片 1.67mg/kg ;空白组 16 只 ,每天灌服自来水 1mg/kg ;去势组 16 只 ,不作任何处理。去势处理 :实验第 1 天用 10% 水合氯醛 3.5mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠后 ,无菌手术摘除双侧睾丸 ,予正常饮食 ,无药物添加。所有药物均用蒸馏水稀释成混悬液 ,按 10ml/kg 给药 ,每天 1 次。各组大鼠分别在处理后第 7、14、21 天时分批断头处死 ,摘除前列腺腹叶 ,称大鼠及其前列腺重量 ,计算前列腺重/体重比值 ,按试剂盒所示方法进行免疫组化原位末端标记染色 ,采用 MPIAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统进行显微图像定量分析 ,计算每 100 个上皮细胞中染色细胞 (凋亡细胞) ,用凋亡百分比表示阳性细胞染色率 ,每张切片随机选 5 个视野 (× 400) 检测 ,取平均值。

3.3 统计学方法 用 Wstata 软件进行 t 检验 ,方差分析。

结 果

1 中药消癥通闭对 PH 大鼠前列腺重量及前列

腺重/体重比值的影响 见表 1。中药高、低组和保列治组在给药 3 周时 ,增生的前列腺重量减轻 ,前列腺重/体重比值减小 ,中药高组、保列治组的前列腺重、前列腺重/体重比值与对照组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠前列腺重量、体重及前列腺重/体重比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	体重 (g)	前列腺重 (g)	前列腺重/体重 (%)
中药高	10	287.6 ± 17.1	1.797 ± 0.423 *	6.248 ± 0.831 **
中药低	8	290.5 ± 19.3	1.921 ± 0.744	7.708 ± 1.816
保列治	9	294.4 ± 13.4	2.031 ± 0.204 *	6.422 ± 0.565 *
对 照	9	284.4 ± 12.2	2.493 ± 0.625	8.772 ± 2.606

注 :与对照组比较 , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2 中药消癥通闭对去势后 PH 造模大鼠前列腺重量和前列腺重/体重比值的影响 见图 1、2。前列腺重量 :去势组大鼠在第 7 天时前列腺萎缩 ,第 21 天时前列腺严重萎缩 (仅剩一份标本) ;中药高组与去势组有同样的趋势 ,但前列腺重量减轻程度低于去势组。前列腺重/体重比值 (简称比值) :中药高组在第 7 天与保列治组比较、第 14 天与中药低剂量组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$) ,第 21 天时 ,与中药低剂量组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。

3 PH 大鼠前列腺组织中 NOS 神经纤维含量的测定结果

3.1 HE 染色 镜下可见对照组表现为前列腺腺体管腔细胞多为复层 ,排列较整齐 ,间质明显增多且致密 ;中药高组见管腔细胞多为单层柱状排列 ,粘液细胞较少 ,间质少而疏松。中药低组及保列治组管腔细胞单复层均有出现 (图略)。

3.2 NADPH 染色 切片中 4 组均可见 NOS 神经纤维染色 ,主要分布在前列腺平滑肌细胞周围 ,神经元较少 ;中药高组在用药 3 周后 ,前列腺组织中 NOS 神经纤维的长度密度明显增加 (见表 2) ,与其他 3 组比较差异均有显著性 ($P < 0.01$) ,而中药低组和保列治组与对照组比较 ,NOS 神经纤维的长度密度差异无显著性。

表 2 各组前列腺组织中 NOS 神经纤维长度密度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	Lv
中药高	10	0.11349 ± 0.02330 *
中药低	8	0.04374 ± 0.03917
保列治	9	0.04237 ± 0.06981
对 照	9	0.02648 ± 0.01308

注 :与其他 3 组比较 , * $P < 0.01$

4 各组大鼠前列腺上皮细胞凋亡定量分析结果
4.1 各组大鼠 HE 染色 (× 100) 结果 去势组大鼠前列腺腺体明显萎缩 ,有的标本腺体几乎消失 ,腺腔

数目明显减少,体积明显缩小、成团,腔隙不清,间质纤维化,细胞变小,呈低立方状,胞核多呈三角或不规则形,排列不整齐;中药高组中腺体及细胞变化不如去势组明显,但也可看到腺腔较少,细胞皱缩,且许多胞核呈月牙形(染色质移向周边),甚至“环形”,中药低组与保列治组形态改变程度较中药高组轻;空白组整个视野内腺腔充满,上皮细胞多呈高柱状或立方状,排列整齐(图略)。

4.2 各组大鼠免疫组化染色结果 见图 3。前列腺上皮细胞凋亡百分率中药高组、中药低组与保列治组在不同的实验天数中,此值均较空白组高,但只有中药高组有凋亡趋势($P < 0.06$)。去势组中,此值在第 7 天时已明显增高,与空白组、中药低组与保列治组比较差异均有显著性($P < 0.01$),与中药高组比较差异无显著性,到第 14 天时凋亡百分率达到高峰,与空白组及各治疗组比较差异均有显著性($P < 0.01$),第 21 天时又恢复。

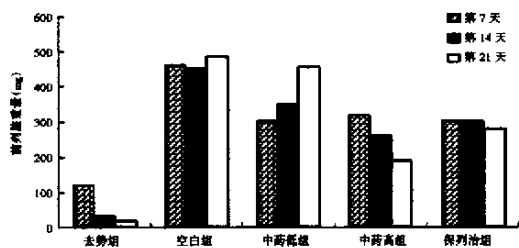


图 1 各组大鼠前列腺重量比较

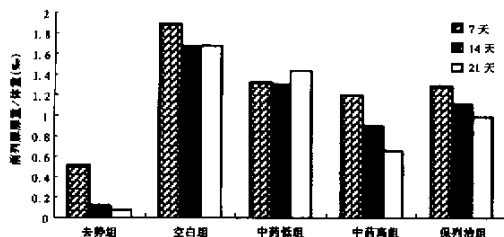


图 2 各组大鼠前列腺重/体重比值比较

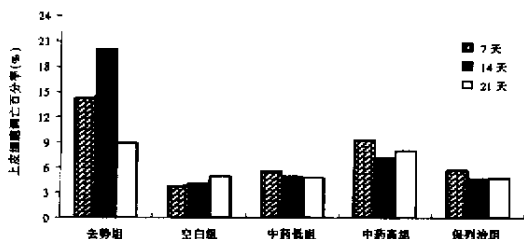


图 3 各组大鼠前列腺细胞凋亡百分率比较

讨 论

前列腺间质平滑肌张力增高引起的动力性梗阻在 PH 所致的膀胱出口梗阻中起重要作用,Chapple 等⁽³⁾发现膀胱出口梗阻者逼尿肌中含神经递质肠血管活性

肽(VIP)、P 物质、NO 的神经密度减少,推测 PH 所致的前列腺征候群可能与传入神经纤维中非肾上腺非胆碱能(NANC)变化有关。Burnett 等⁽⁴⁾发现在人和鼠的前列腺内存在着 NOS 神经元、神经纤维,主要分布在间质平滑肌细胞周围,属于 NANC 神经系统,调节着前列腺平滑肌的舒张,PH 的发生与 NOS 神经减少有关。Takeda M 等⁽⁵⁾在体外对人和犬的前列腺组织进行等张力试验,发现前列腺组织的松弛作用被 NOS 抑制剂所抑制,而被 NO 供体硝普钠加强,证实在人和犬的前列腺组织中 NO 是一种内源性 NANC 神经递质,在松弛前列腺平滑肌中起重要作用,有研究提示 PH 的发病可能与 NOS 神经减少有关^(1,6)。

中药消癥通闭以往研究发现可减轻患者临床症状、缩小前列腺体积,改善尿流率参数⁽⁷⁾,其机理研究证实可明显抑制犬大脑 α -肾上腺素受体(α -AR),抑制大鼠前列腺内碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达⁽⁸⁾,揭示了消癥通闭治疗 PH 的机理。本研究采用 NAD-PH 组化技术对大鼠 PH 组织中 NOS 神经定量分析发现, NOS 神经纤维主要存在于前列腺间质平滑肌细胞周围,且经过治疗的大鼠前列腺组织 NOS 神经纤维含量高于对照组,这证实了 PH 的发病与 NOS 神经纤维减少有关, NO 参与了前列腺平滑肌张力的调节,这与以往研究结果相一致。中药高组中 NOS 神经纤维含量尤为丰富,明显高于中药低组、保列治组及对照组,表明中药可明显增加前列腺中 NOS 神经纤维的含量,从而松弛前列腺平滑肌的张力,改善 PH 的临床症状,为该药治疗 PH 提供了又一实验依据。

PH 的发生依赖雄激素及年龄的增长,雄激素是控制前列腺增生和萎缩的主要因子。以往研究发现,对成年动物去势后,可造成前列腺萎缩和大量的前列腺细胞发生凋亡,而注射超正常水平的雄激素给成年大鼠,并不引起前列腺的过度生长,然而,一旦雄激素的循环浓度低于某一点,前列腺细胞数目就会迅速减少⁽⁹⁾。双氢睾酮(DHT)主要由睾酮在 I、II 型 5α -还原酶作用下转换而来。以往对中药消癥通闭的研究发现,该药可使老龄犬前列腺组织中 5α -还原酶活性降低,通过抑制 5α -还原酶活性而使前列腺体积缩小⁽¹⁰⁾。细胞凋亡表现之一是细胞数量的减少,体积减小,在去势诱导的凋亡中尤为明显,在本实验中再次证实。本实验中凋亡的前列腺上皮细胞形态学的改变与牛远杰等⁽¹¹⁾对犬前列腺的病理改变研究结果及 Rittmaster 等⁽¹²⁾在 1995 年对保列治所做研究结果相仿。本实验中前列腺上皮细胞凋亡百分率的变化与 Rittmaster 等⁽¹²⁾所做结果相一致,而保列治组中则低于其结果,

这反映出药物浓度的高低对细胞凋亡的发生有一定影响。

本项实验对 PH 动物模型中前列腺的 NOS 神经分布和含量,及大鼠前列腺上皮细胞凋亡进行了较深入的研究,为中药治疗 PH 提供了又一个实验依据及新的思路。

参 考 文 献

1. 邓春华,郑克立,高国权,等. 良性前列腺增生组织中一氧化氮合酶活性的变化. 中华泌尿外科杂志 1998 ;19(2): 95—97.
2. 徐根兴. 线性结构的定量分析. 长春:吉林科学技术出版社, 1993:58—59.
3. Chapple CR, Smith D. The pathophysiological changes in the bladder obstructed by benign prostatic hyperplasia. Br J Urol 1994 ;73 :117—123.
4. Burnett AL, Takeda M, Maguire MP, et al. Characterization and localization of nitric oxide synthase in the human prostate. Urology 1995 ;45:435—439.
5. Takeda M, Tang R, Shapiro E, et al. Effects of nitric oxide on

human and canine prostates. Urology 1995 ;45:440—446.

6. 王阴槐,黄循,刘任,等. 良性前列腺增生组织一氧化氮合酶表达的免疫组化研究. 中华泌尿外科杂志 1998 ;19(2):93—94.
7. 贾金铭,李寅增,孙利民,等. 消癃通闭胶囊治疗良性前列腺增生症的疗效观察及机理研究. 中医杂志 1998 ;39(11):664—667.
8. 贾金铭,禹更生,韩启德,等. 消癃通闭对犬大脑皮层 α_1 受体的结合作用. 中华泌尿外科杂志 1996 ;17(1):3—4.
9. Berry SJ, John TL. Comparative aspects of prostatic growth and androgen metabolism with aging in the dog versus the rat. Endocrinol 1984 ;111:511—520.
10. 贾金铭,李寅增,孙利民,等. 中药消癃通闭治疗前列腺增生的机理研究. 中国学术期刊文摘 1995 (增刊):67—69.
11. 牛远杰,董克权,白景文,等. 去势前后犬前列腺的动态病理学改变. 中华泌尿外科杂志 1998 ;19(7):429—433.
12. Rittmaster RS, Manning AP, Wright AS, et al. Evidence for atrophy and apoptosis in the ventral prostate of rats given the 5α -reductase inhibitor finasteride. Endocrin 1995 ;136(2):741—748.

(收稿 2000 - 11 - 01 修回 2001 - 11 - 30)

第六次全国中西医结合呼吸病 学术交流会征文通知

第六次全国中西医结合呼吸病学术交流会拟于 2002 年 10 月在青岛市召开,现将征文的有关事项通知如下。

1 征文内容 支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺间质纤维化和肺癌、睡眠呼吸暂停综合征、肺栓塞等呼吸系统疾病的中医、西医、中西医结合基础和临床研究进展、临床研究、实验研究、方法学、基础理论等诊治研究。

2 征文要求 (1) 5000 字以内的全文 1 份,1000 字左右的摘要 2 份,尽量使用打印稿,有条件者附软盘 1 张(应用 Word 软件)。征文可以是研究性论文,也可是综述或讲座形式。(2) 论文须未公开发表,加盖单位公章,注明作者单位、邮编、具体通信地址及联系电话。(3) 截稿日期 2002 年 6 月 30 日(以邮戳为准)。(4) 请在信封上注明“呼吸会议征文”字样。来稿请寄:北京海淀区西苑操场 1 号 中国中医研究院西苑医院呼吸科,邮编:100091。联系人:张燕萍、张京安、苗青。电话:010 - 62862284

全国第六届中西医结合妇产科 学术会议征文通知

全国第六届中西医结合妇产科学术会议拟于 2002 年 10 月在成都市举行,现将有关征文事项通知如下。

1 征文内容 (1) 中西医结合生育调节研究。(2) 妇科疾病中西医结合临床和基础研究。

2 征文要求 (1) 来稿必须实事求是,有科学性、实用性,从未在任何学术期刊上发表。请附单位介绍信或单位盖章。(2) 来稿一律用 Word 软件排印,并附软盘。来稿要求全文(4000 字以内)及摘要(800 字)各 1 份。摘要应以目的、方法、结果、结论顺序表达,无摘要者恕不采用。(3) 来稿务必写清作者、单位、邮编,请自留底稿,来稿一律不退。(4) 截稿日期 2002 年 7 月 30 日(以邮戳为准)。

3 征文寄送地点 上海市中西医结合学会(北京西路 1623 号,邮政编码 200040)张雯菊收。信封上请注明“全国第六届中西医结合妇产科学术会议征文”字样。亦可用 E-mail 发送至如下地址:kdjli@shmu.edu.cn