

实验研究 ·

康泉方对大鼠前列腺组织凋亡调控基因 bax、bcl-2 mRNA 表达的影响

黄源鹏^{1,2} 杜建² 洪振丰² 陈治卿¹ 赵锦燕² 李天骄² 吴锦发¹

摘要 目的 探讨康泉方对实验性大鼠前列腺组织凋亡调控基因 bax mRNA、bcl-2 mRNA 的影响。方法 采用大鼠去势后注射丙酸睾酮致前列腺增生法造模,同时灌胃给药 30 天后,处死大鼠取前列腺组织并测量湿重,RT-PCR 法检测各组前列腺腹叶组织 bax mRNA、bcl-2 mRNA 的表达。结果 与模型组比较,康泉各剂量组前列腺湿重显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);康泉高剂量组前列腺湿重与正常组比较,差异无显著性 ($P > 0.05$);与模型组比较,康泉各剂量组 bax mRNA 及 bax/bcl-2 显著升高 ($P < 0.01$),bcl-2 mRNA 显著下降 ($P < 0.01$);康泉高剂量组 bax mRNA、bcl-2 mRNA 及 bax/bcl-2 与正常组比较,差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论 康泉方对大鼠良性前列腺增生有明显的治疗作用,其作用机理可能通过调节前列腺组织 bax mRNA、bcl-2 mRNA 表达,促进前列腺细胞凋亡,并呈明显量效关系。

关键词 康泉方;良性前列腺增生;细胞凋亡

Effect of Kangquan Recipe on Apoptosis Regulatory Genes bax and bcl-2 mRNA in Prostate of Rats HUANG Yuan-peng, DU Jian, HONG Zhen-feng, et al *Zhongshan Hospital, Xiamen University, Fujian (361004)*

Abstract Objective To investigate the effect of Kangquan Recipe (KQR) on apoptosis regulatory genes bax and bcl-2 mRNA in prostate of rats. **Methods** Benign prostatic hyperplasia model rat was established by injecting testosterone after castration. The model rats were killed and prostate glands were removed for examination after being treated with administration of KQR by gastrogavage for 30 days. The wet weight of prostate was measured and the mRNA expressions of bax and bcl-2 in rats' tissue of abdominal lobe of prostate were determined by RT-PCR. **Results** Compared with the model group, wet weight of prostate was lower significantly in the groups treated with different dosages of KQR ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and that in the high dose KQR treated group was similar to that in the normal group ($P > 0.05$). Compared with the model group, the expressions of bax mRNA and ratios of bax/bcl-2 were significantly higher and the expressions of bcl-2 mRNA significantly lower in the KQR treated groups ($P < 0.01$), and these indexes in the high dose KQR treated group were insignificantly different from those in the normal group ($P > 0.05$). **Conclusion** KQR shows an obvious treatment effect on rats with benign prostatic hyperplasia, the mechanism might be through effectively regulating the expressions of bax mRNA and bcl-2 mRNA in prostatic tissue to accelerate the cell apoptosis of prostate in obvious dose-effect manner.

Key words Kangquan Recipe; benign prostatic hyperplasia; cell apoptosis

良性前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 是中老年男性的常见病和多发病,随着老龄人口

的增加,其发病率不断上升,严重影响着中老年男性的身心健康和生存质量。康泉方为我们临床应用中有效治疗该病的中药方之一,收到了良好的效果,为了进一步阐明此药的作用机制,对 SD 大鼠模型进行干预,从细胞和分子水平观察该方对 BPH 大鼠前列腺组织和凋亡调控基因 bax mRNA、bcl-2 mRNA 表达的影响,现报告如下。

基金项目:福建省中医药科研项目(No. wzy0616);厦门市医学科研项目(No. WSK0526);厦门市卫生青年创新课题(No. WQK0510)

作者单位:1. 厦门大学附属中山医院(福建 361004);2. 福建中医药大学

通讯作者:黄源鹏, Tel: 0592 - 8807558, E-mail: huangyp998@sina.com

com



材料与方法

1 动物 雄性 SD 大鼠,清洁级,体重 230 ~ 260 g,8 月龄,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

2 药物 康泉方由蜈蚣 15 g 地龙 15 g 络石藤 20 g 生大黄 5 g 桂枝 5 g 巴戟天 15 g 组成,福建中医学院制剂室负责制备和质量控制,各中药充分混合后,以 20 倍蒸馏水浸泡 2 h 后,水煎并浓缩成药液,相当于每毫升含 1.3 g 生药。保列治:每片含非那雄胺(finasteride) 5 mg,杭州默沙东制药有限公司提供,研磨后加 80 蒸馏水溶解成饱和溶液,冰箱储存备用。

3 试剂及仪器 丙酸睾酮注射液:上海第九制药厂;Trizol:invitrogen 公司;dNTP、M-MLV Reverse Transcriptase: Promag 公司;Taq 聚合酶、Rnase inhibitor: TaKaRa 公司;PCR 仪(9600 型):Eppendorf 公司;凝胶数码成像及分析系统(Gel DOC 2000 型):BioRad 公司;电泳仪及水平式电泳槽(DYY-12 型):BioRad 公司;RNA/DNA 定量检测仪(DU-650 型):Beckman 公司;光学显微镜(BH-2 型):Olympus, Japan。

4 方法

4.1 BPH 模型的建立 参照卫生部《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》^[1],盐酸氯胺酮注射液 100 mg/kg 腹腔麻醉,麻醉成功后,将大鼠 60 只固定于手术台上,皮肤常规消毒,无菌条件下经阴囊摘除双侧睾丸,观察 1 周后,每只大鼠皮下注射丙酸睾酮 3.5 mg/kg,1 次/天,连续 30 天。

4.2 分组与处理 造模前适应性饲养 1 周,按重量编号,按随机数字表分为 6 组,每组 12 只,即康泉低、中、高剂量治疗组(分别简称康泉低组、康泉中组、康泉高组)、保列治组、模型组、正常组。正常组皮下注射生理盐水,其他 5 组在皮下注射丙酸睾酮的同时,康泉低组给中药 5 mL/kg(相当于临床用药量的 5 倍);康泉中组给中药 10 mL/kg(相当于临床用药量的 10 倍);康泉高组给中药 15 mL/kg(相当于临床用药量的 15 倍);保列治组用药量为 0.8 mg/kg(相当于临床用药量的 10 倍)溶于 10 mL/kg 生理盐水;正常组和模型组给 10 mL/kg 生理盐水;以上均采用灌胃给药,1 天 1 次,连续 30 天,末次灌胃后次日,断头处死动物,分离出完整的前列腺组织,存放于 -80 冰箱保存。

5 观察指标及检测方法

5.1 以分析天平测量前列腺组织湿重,容积法测量体积,计算前列腺指数(前列腺指数 = 前列腺湿重/

体重)。

5.2 前列腺组织病理变化 取前列腺腹叶相同部位前列腺组织,常规苏木素伊红(HE)染色,光镜下检查前列腺组织切片的病理形态学改变。

5.3 RT-PCR 检测前列腺腹叶组织 bax mRNA、bcl-2 mRNA 的表达 Trizol 法(异硫氰酸胍法)进行前列腺组织总 RNA 的提取,紫外分光光度计 260/280 nm 测 RNA 浓度,1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 质量。RNA 首先被逆转录为 cDNA,生成以 cDNA 为模板的 PCR 产物,进行 PCR 扩增。bax mRNA、bcl-2 mRNA 和内参照 β -actin 引物由英俊生物有限公司设计提供,bax mRNA sense: 5' CCAA-GAAGCTGAGCGAGTGT-3', antisense: 5' TCACGGAGGAA GTCCA GTGT-3',产物长度:271 bp。bcl-2 mRNA sense: 5' GGTGGTGGAGGAACTCTTCA-3', antisense: 5' GAGCAGCGTCTTCA GAGACA-3',产物长度:268 bp。 β -actin sense: 5' GGCAATTGTGATG GACTC-3', antisense: 5' CAGCACTGTGTTG GCA TAGA-3',产物长度:201 bp。反应参数为:95 预变性 5 min;94 变性 30 s,53 (bax),56 (bcl-2) 退火 40 s,72 延伸 30 s;72 终末延伸 7 min,30 个循环。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶成像系统对 DNA 条带进行光密度扫描,分别以 bax、bcl-2 与 β -actin 的比值表示两者的相对表达水平。实验重复 5 次。

6 统计学方法 采用 SPSS 12.0 统计软件包进行单因素方差分析。

结 果

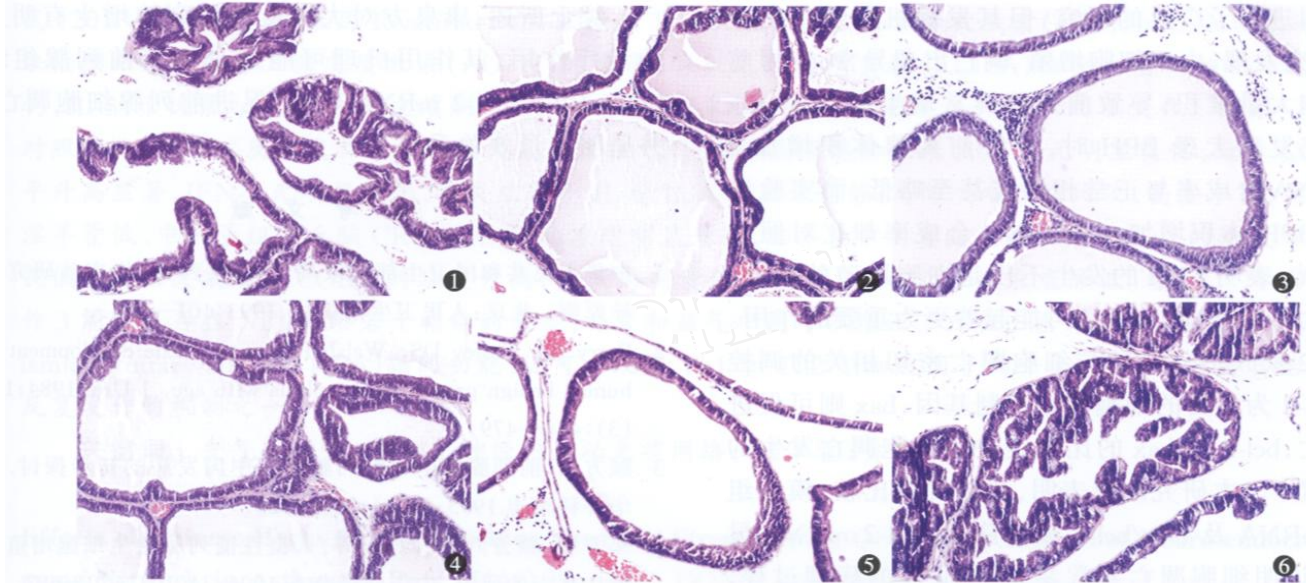
1 各组大鼠体重、前列腺湿重、前列腺体积、前列腺指数的比较(表 1) 各组大鼠体重差异无显著性($P > 0.1$),各组间具有可比性。模型组前列腺湿重、体积及指数明显高于正常组($P < 0.01$),说明造模成功。与模型组比较,康泉高、中组前列腺湿重、体积及指数明显下降,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);康泉低组前列腺湿重明显低于模型组($P < 0.05$),体积及指数与模型组比较,差异无显著性($P > 0.05$)。康泉低、中、高组前列腺湿重、体积及指数与保列治组比较,差异无显著性($P > 0.05$)。康泉高组前列腺湿重、体积及指数与正常组比较,差异无显著性($P > 0.05$)。

2 各组大鼠前列腺组织病理变化(图 1) 正常组腺体排列清楚,腺腔无扩张,腺上皮呈单层柱状。模型组腺体排列密集,腺腔变大,部分腺体扩张,腺上皮

表1 各组大鼠体重、前列腺湿重、前列腺体积及前列腺指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重(g)	前列腺湿重(g)	前列腺体积(mL)	前列腺指数
康泉高	12	408.82 ±29.71	0.62 ±0.21	1.10 ±0.49	0.161 ±0.052
中	12	414.17 ±32.28	0.73 ±0.27*	1.29 ±0.52*	0.183 ±0.071
低	12	399.90 ±38.19	0.79 ±0.25**	1.42 ±0.43**	0.201 ±0.064*
保列治	11	413.90 ±40.50	0.76 ±0.24**	1.30 ±0.47*	0.189 ±0.062
模型	11	435.10 ±43.29	1.08 ±0.26**	1.73 ±0.45**	0.258 ±0.082**
正常	12	402.75 ±45.36	0.52 ±0.15	0.87 ±0.33	0.142 ±0.049

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$



注:1为康泉低组;2为康泉中组;3为康泉高组;4为保列治组;5为正常组;6为模型组

图1 各组大鼠前列腺组织病理变化(HE染色,×100)

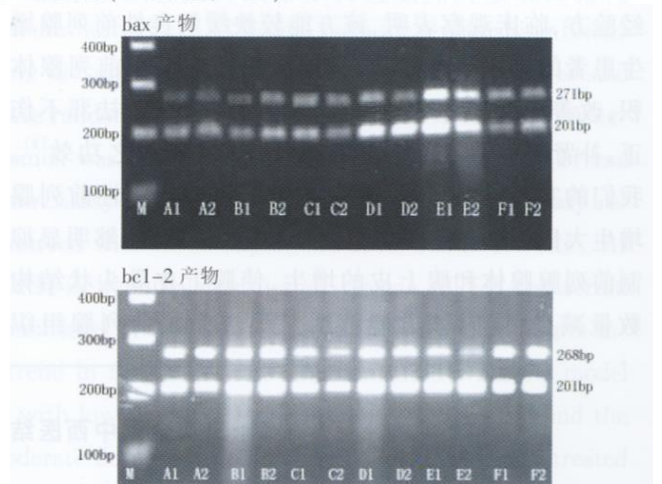
明显增生,部分区域层次增加,排列紊乱,多数腺上皮呈乳头状突向腔内,间质纤维组织及平滑肌组织增多。康泉高、中组见腺腔明显减少,管腔细胞多为单层柱状排列,细胞皱缩,间质少而疏松。康泉低组与保列治组管腔细胞单复层均有出现,上皮细胞多呈高柱状或立方状,乳头状结构明显减少。

3 各组大鼠前列腺腹叶组织 bax mRNA、bcl-2 mRNA 表达的比较(表2,图2) 与正常组比较,模型组的 bax mRNA 及 bax/bcl-2 显著降低($P < 0.01$),bcl-2 mRNA 显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,康泉低、中、高组 bax mRNA 及 bax/bcl-2 显著升高($P < 0.01$),bcl-2 mRNA 显著下降($P < 0.01$)。与保列治组比较,康

表2 各组大鼠前列腺组织 bax mRNA、bcl-2 mRNA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	bax mRNA	bcl-2 mRNA	bax/bcl-2
康泉高	12	0.725 ±0.072	0.786 ±0.059	0.957 ±0.086
中	12	0.697 ±0.075	0.802 ±0.056*	0.891 ±0.089*
低	12	0.609 ±0.065**	0.869 ±0.073**	0.752 ±0.075**
保列治	11	0.637 ±0.062**	0.832 ±0.068**	0.798 ±0.068**
模型	11	0.452 ±0.052**	0.977 ±0.086**	0.483 ±0.062**
正常	12	0.748 ±0.048	0.757 ±0.046	0.981 ±0.071

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $P < 0.01$;与保列治组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$;与康泉低组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$



注:A康泉低组;B康泉中组;C康泉高组;D保列治组;E正常组;F模型组

图2 各组大鼠前列腺组织 bax、bcl-2 产物琼脂糖凝胶电泳图像 康泉高、中组 bax mRNA 及 bax/bcl-2 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),bcl-2 mRNA 差异无显著性($P > 0.05$);康泉低组 bax mRNA、bcl-2 mRNA 及 bax/bcl-2 差异无显著性($P > 0.05$)。与康泉低组比较,康泉高、中组 bax mRNA 及 bax/bcl-2 显著升高($P < 0.01$),bcl-2 mRNA 显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

讨 论

Berry 等^[2]总结 5 组来自不同国家的尸检报告,组织学良性前列腺增生在 35 岁时约 10%,以后随着年龄增长发病率逐渐增加,至 85 岁可达 85%。顾方六等^[3]1993 年对国内 321 例尸检前列腺标本,发现前列腺增生发病率和欧美国家相似。尽管目前对 BPH 的发病原因进行了广泛的研究,但其发病机制仍未完全阐明,研究发现,由于细胞增殖、凋亡出现异常,使得前列腺细胞大量堆积,导致前列腺异常增生^[4]。Barrack 等^[5]研究发现犬患 BPH 时,尽管前列腺体积增加 2 倍,但 DNA 合成率与正常相同或甚至略低,而实验诱导的犬 BPH 体积增加 4 倍,DNA 合成率却比对照组减少 33%,表明 BPH 的发生不仅是细胞增殖的增加,细胞凋亡在 BPH 的发生中可能起着更为重要的作用。

bcl-2 家族是公认的与细胞凋亡密切相关的调控基因,bcl-2 为重要的细胞凋亡抑制基因,bax 则可促进细胞凋亡,bcl-2 和 bax 的比例是决定细胞凋亡发生的重要因素^[6]。本研究结果表明,和正常组比较,模型组的 bax mRNA 及 bax/bcl-2 显著降低,bcl-2 mRNA 显著升高,说明细胞凋亡异常参与了 BPH 的病理过程,结果和相关的文献报道相一致^[7]。

中药康泉方是我们经过长期临床实践总结出来的经验方,临床观察表明,该方能较快缓解良性前列腺增生患者的排尿困难症状,长期服用还能缩小前列腺体积,改善尿流动力学等指标,全方补泻兼施,祛邪不伤正,补肾不留邪,共奏通络补肾,散结利水之功效^[8]。我们的实验结果表明,康泉方能明显抑制良性前列腺增生大鼠模型的前列腺湿重、体积及指数;能够明显抑制前列腺腺体和腺上皮的增生,使腺上皮乳头状结构数量减少;同时该方能够明显促进大鼠前列腺组织

bax mRNA 表达的上调以及 bcl-2 mRNA 表达的下调,调节 bax/bcl-2 的平衡,从而使前列腺体积缩小、重量减轻、指数下降。实验结果同时也发现,康泉方促进细胞凋亡的作用显著优于保列治组,但其抑制前列腺湿重、体积及指数的疗效和保列治组比较差异无显著性,说明 BPH 是细胞凋亡等多因素参与的病理过程,有必要在此基础上进一步研究。

综上所述,康泉方对大鼠良性前列腺增生有明显的治疗作用,其作用机理可能通过调节前列腺组织 bax mRNA、bcl-2 mRNA 表达,促进前列腺细胞凋亡,并呈明显量效关系。

参 考 文 献

- 1 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则. 北京:人民卫生出版社,1993 101—103.
- 2 Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, et al. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol* 1984;132(3) 474—479.
- 3 顾方六. 前列腺增生和前列腺癌在中国发病的初步探讨. *中华外科杂志* 1993;31(6) 323—326.
- 4 邓方明,顾方六,夏同礼,等. 人良性前列腺增生细胞增殖和凋亡状态的研究. *中华外科杂志* 1996;34(10) 620—622.
- 5 Barrack ER, Berry SJ. DNA synthesis in the canine prostate: effects of androgen and estrogen treatment. *Prostate* 1987;10(1) 45—49.
- 6 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281(5381) 1322—1326.
- 7 谢庆祥,汪 鸿,缪友仁,等. 细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 在前列腺增生组织中表达的意义. *中华泌尿外科杂志* 1998;19(2) 98—100.
- 8 黄源鹏,吴锦发. 中医络病理理论与良性前列腺增生关系探析. *中华中医药杂志* 2006;21(1) 45—46.

(收稿:2006-12-01 修回:2007-04-20)

第十三次全国中西医结合疡科学术交流会征文通知

第十三次全国中西医结合疡科学术交流会拟于 2007 年 11 月在海南省海口市召开。现将征文有关事项通知如下。

1 征文内容 (1)有关国内外中西医结合疮疡、糖尿病足、周围血管病、肿瘤、骨伤科、烧伤、皮肤病、肛肠、乳腺病等的临床研究及相关理、法、方、药的基础理论研究;(2)剂型改革、新药开发、剧毒及短缺药材代用品的开发等;(3)治疗与检查仪器的开发使用;(4)应用引进国外新技术、新方法经验介绍。

2 征文要求 (1)论文要以中西医结合为主要内容;(2)总结材料要有客观指标和数据,论证要充分,有实用价值;(3)论文一般不超过 4 000 字,最好打印;(4)论文须经本单位推荐并加盖公章;(5)概不退稿,请自留底稿。截稿日期 2007 年 9 月 30 日;(6)投稿方式:可用稿纸形式(需提供电子版软盘)邮寄或用电子邮件形式发送, E-mail: yangkexuehui@sina.com。投稿邮箱:天津市红桥区北马路 354 号,邮政编码 300120,天津市中医药研究院疮疡研究所李兰青收(请于信封左下角注明“会议稿件”字样)。联系电话:020-27254520。