

本文引用:蔡蔚,谢海平,龙鑫,谢晓,杨华伟.马归液对腺性膀胱炎模型大鼠 TGF- β 1、EGF- β 的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(8):870-874.

马归液对腺性膀胱炎模型大鼠 TGF- β 1、EGF- β 的影响

蔡蔚,谢海平,龙鑫,谢晓,杨华伟
(湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] 目的 研究马归液对腺性膀胱炎模型大鼠转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1,TGF- β 1)、表皮生长因子- β (epidermal growth factor- β , EGF- β)的影响机制。方法 采用膀胱灌注 DH5 α 大肠杆菌溶液的方法建立腺性膀胱炎大鼠模型,将模型大鼠分为模型组(灌注生理盐水,1周1次)、马归液1组(灌注马归液,1周1次)、马归液2组(灌注马归液,1周2次)、吡柔比星组(灌注吡柔比星,1周1次),连续干预8周后对大鼠膀胱进行病理学检查,免疫组化法检测 TGF- β 1、EGF- β 的表达。结果 病理学显示马归液1组和马归液2组大鼠的膀胱黏膜恢复正常。与模型组比较,吡柔比星组、马归液1组和马归液2组 TGF- β 1、EGF- β 的平均吸光度值、蛋白表达明显升高($P<0.01$)。与吡柔比星组比较,马归液1组 TGF- β 1 平均吸光度值、蛋白表达降低,EGF- β 平均吸光度值、蛋白表达与吡柔比星组相近,差异均无统计学意义($P>0.05$);与吡柔比星组比较,马归液2组 TGF- β 1 平均吸光度值、蛋白表达与吡柔比星组相近,差异无统计学意义($P>0.05$),但马归液2组 EGF- β 平均吸光度值、蛋白表达高于吡柔比星组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与马归液1组比较,马归液2组 TGF- β 1、EGF- β 的平均吸光度值、蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 马归液能促进腺性膀胱炎大鼠膀胱炎性组织的修复,其机制可能与马归液对 TGF- β 1、EGF- β 的调控作用有关。

[关键词] 马归液;腺性膀胱炎;转化生长因子 β 1;表皮生长因子 β

[中图分类号]R285.5;R256.52 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.08.007

Effect of Magui Liquid on Transforming Growth Factor- β 1 and Epidermal Growth Factor- β in a Rat Model of Glandular Cystitis

CAI Wei, XIE Haiping, LONG Li, XIE Xiao, YANG Huawei

(The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of the effect of Magui Liquid on the expression of transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) and epidermal growth factor- β (EGF- β) in a rat model of glandular cystitis. **Methods** A rat model of glandular cystitis was established by bladder infusion with *Escherichia coli* strain DH5 α solution. The rats were divided into model group (infusion with saline once a week), Magui Liquid 1 group (infusion with Magui Liquid once a week), Magui Liquid 2 group (infusion with Magui Liquid twice a week), and pirarubicin group (infusion with pirarubicin once a week). The rats received pathological examinations after 8 continuous weeks of drug intervention. Immunohistochemistry was used to measure the expression of TGF- β 1 and EGF- β . **Results** Pathological examinations showed that the bladder mucosa returned to normal in the Magui Liquid groups. The pirarubicin group and the Magui Liquid groups had significantly higher mean absorbance and expression levels of EGF- β and TGF- β 1 than the model group ($P<0.01$). There were no significant differences in mean absorbance or expression levels of EGF- β or TGF- β 1 between the pirarubicin group and the Magui Liquid 1 group ($P>0.05$). There were also no significant differences in mean absorbance or expression level of TGF- β 1 between the pirarubicin group and the Magui Liquid 2 group ($P>0.05$). However, the Magui Liquid 2 group had significantly higher mean absorbance and expression level of EGF- β than the pirarubicin group ($P<0.01$). The Magui Liquid 2 group had significantly higher mean absorbance and expression levels of EGF- β and TGF- β 1 than the Magui Liquid 1 group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Magui Liquid can promote the repair of the inflammatory tissue in rats with glandular cystitis, probably by regulation of TGF- β 1 and EGF- β .

[Keywords] Magui Liquid; glandular cystitis; transforming growth factor- β 1; epidermal growth factor- β

[收稿日期]2018-01-26

[基金项目]湖南省中医药管理局重点项目(201728);湖南省教育厅优秀青年项目(15B175);湖南省省级教学规划课题(XJK015BGD049)。

[作者简介]蔡蔚,女,副教授,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中医药防治泌尿外科疾病,E-mail:2240430455@qq.com。

腺性膀胱炎是膀胱黏膜增生性病变,多伴有非特异性感染,与膀胱癌有着密切联系^[1]。有学者^[2]认为腺性膀胱炎是膀胱癌的潜在癌前病变。目前腺性膀胱炎的治疗多为膀胱黏膜电切联合化疗药物膀胱灌注,但术后易复发,且膀胱灌注也易出现膀胱刺激征,患者难以耐受。近年来,本课题组临床使用马归液膀胱灌注治疗腺性膀胱炎取得了较好的效果^[3]。本研究以腺性膀胱炎大鼠模型为研究对象,观察自制马归液对腺性膀胱炎的作用机制,现报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

成年雌性 SD 大鼠 62 只,体质量(220±10)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(湘)2011-0003,于湖南中医药大学 SPF 级动物实验中心喂养。所有动物均给予自由饮水,普食喂养,适应饲养 1 周。

1.2 药物

吡柔比星药液制备:吡柔比星冻干粉针剂 30 mg,加注射用水配成 50 mL 溶液备用(吡柔比星,10 mg/支,深圳万乐药业有限公司生产,批号:1505c4)。马归液:由马鞭草 30 g,当归 20 g,赤芍 20 g,生黄芪 20 g 四味药物制备而成,以上饮片均由湖南中医药大学第一附属医院药剂科制剂中心提供,经湖南中医药大学中药学教研室鉴定符合药典规定。大肠埃希菌溶液(浓度在 10^8 ~ 10^9 CFU/100 μ L)由湖南中医药大学第一附属医院检验科微生物室提供。25%乌拉坦溶液,由湖南中医药大学实验动物中心提供。

1.3 特殊药品制作

大肠埃希菌溶液的制备:在无菌条件下,从-70 $^{\circ}$ C 冰箱取出 DH5 α 大肠埃希菌菌种,挑起菌种接种在装有 5 mL LB 培养基的无菌离心试管中,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床,转速 150 r/min。10 h 后,用分光光度仪测定大肠杆菌的浓度,大肠埃希菌溶液的浓度应保持在 10^8 ~ 10^9 CFU/100 μ L。马归液的制备:将当归冷浸 0.5 h,用水蒸气蒸馏提取挥发油,蒸馏后的水溶液另器保存,药渣与马鞭草、赤芍、黄芪加水煎煮 3 次,加水量分别为药材量的 10 倍、8 倍、8 倍,第 1 次煎煮 2 h,第 2、3 次各煎煮 1.5 h,合并煎液,滤过,滤液与上述水溶液合并,静置 24 h,滤过,

浓缩至近 50 mL、药物浓度为 1.8 g/mL,加入适量防腐剂与当归挥发油,调整总容量至 50 mL,搅匀,灌封,灭菌,即得。

1.4 试剂与主要仪器

SABC 试剂盒,TGF- β 1 抗体(批号:11A24),EGF- β 抗体(批号:BA0049),均购自武汉博士德生物公司。pv-9000 二步法免疫组化检测试剂盒(购自北京中杉金桥公司,批号 201502)。LEICA DM LB2 型双目显微镜(德国 LEICA 公司);S2-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);KD2258 型石蜡切片机(浙江金华科迪仪器设备有限公司);DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);Motic B5 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司);OLYMPUS BX43 型双目生物摄像显微镜、H-600 型透射电子显微镜(日本)。

2 方法

2.1 腺性膀胱炎大鼠造模方法^[4-5]

将成年雌性 SD 大鼠 62 只,完全随机分为 3 组:空白组(10 只)、生理盐水灌注组(10 只)和造模组(42 只)。造模组:膀胱灌注 DH5 α 大肠杆菌溶液(10^8 ~ 10^9 CFU/100 μ L)0.2 mL,隔日 1 次,共 20 次;生理盐水灌注组:膀胱灌注生理盐水,隔日 1 次,共 20 次;空白组:不行膀胱灌注。用 25%乌拉坦按 1.0 g/kg 剂量腹腔注射麻醉 SD 大鼠,仰卧固定大鼠,常规消毒会阴部。将无菌硬膜外导管用无菌液体石蜡润滑后,提起尿道外口的皮肤,沿尿道后壁插入尿道 1 cm 左右。通过抽吸导管排除大鼠残余尿液,分别用 1 mL 注射器向大鼠膀胱注入 0.2 mL 无菌生理盐水、大肠杆菌溶液,然后退出导管,将大鼠放入鼠笼等待自然苏醒。50 d 后每组随机选取大鼠 2 只,处死取出膀胱,行 H-600 型透射电子显微镜超微病理学检测,造模组大鼠膀胱黏膜固有层出现炎性浸润、Brunn 巢、囊腔,证实造模成功。

2.2 分组与给药

(1)分组方法:将造模组造模成功的 40 只大鼠完全随机分成 4 组:模型组、马归液 1 组、马归液 2 组、吡柔比星组。模型组:每周一膀胱灌注生理盐水 0.2 mL;马归液 1 组:每周一膀胱灌注马归液 0.2 mL;马归液 2 组:每周一、周五各膀胱灌注 1 次马归液 0.2 mL;吡柔比星组:每周一膀胱灌注吡柔比星注射液

0.2 mL。每组均干预 8 周。(2)操作方法:用 25%乌拉坦按 1.0 g/kg 剂量腹腔注射麻醉大鼠后,将无菌硬膜外导管用无菌液体石蜡润滑,再提起尿道外口的皮肤,沿尿道后壁插入尿道 1 cm。通过抽吸导管排除大鼠残余尿液,分别用 1 mL 注射器向大鼠膀胱注入 0.2 mL 无菌生理盐水、马归液、吡柔比星注射液。最后退出导管,将大鼠放入鼠笼等待自然苏醒。

2.3 标本切取

给药结束后将各组大鼠用 25%乌拉坦溶液进行麻醉,剂量为 1.0 g/kg,然后进行断颈处死,取仰卧位,固定四肢,剪开会阴部皮肤,提起大鼠膀胱底部,分离至尿道近端剪断,取出膀胱。

2.4 各组标本指标检测

观察膀胱的大体形态,迅速用 10%甲醛溶液将膀胱体部和膀胱三角固定。用 10%甲醛溶液将标本定型、然后流水冲洗、酒精脱水,使用二甲苯将标本进行两次透明,然后标本浸蜡,用硬蜡将浸蜡后的标本包埋,并做好标记。对包埋好的标本修切,进而连续常规切片、展片、进行 HE 染色。切片做好后,分别置于 100 倍、200 倍、400 倍光学显微镜下观察膀胱黏膜固有层是否有炎性细胞浸润、腺体样结构、囊腔和 Brunn 巢结构。各组大鼠膀胱免疫组化检测严格参照试剂盒产品说明书进行操作,分别检测转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$,TGF- $\beta 1$)、表皮生长因子- β (epidermal growth factor- β ,EGF- β)的表达,采用 HMIAS 高清晰度医学图文分析系统检测 TGF- $\beta 1$ 、EGF- β 的平均吸光度值。

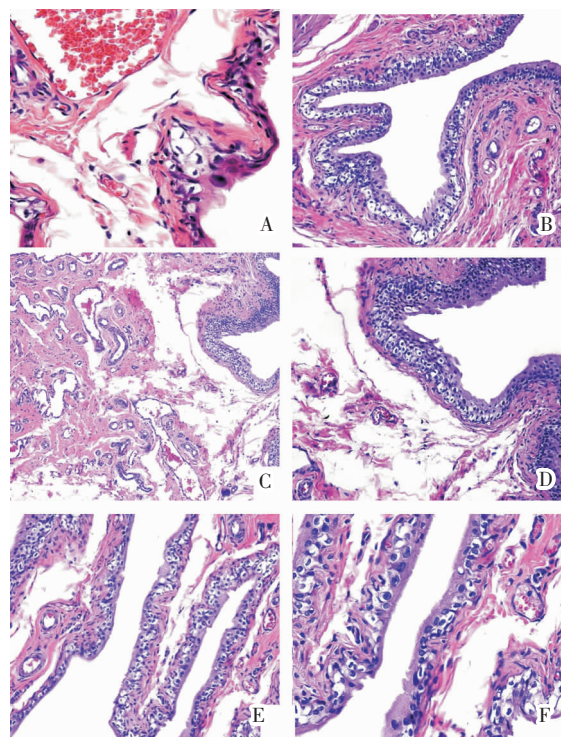
2.5 统计方法

所有实验数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 21.0 进行统计学处理,两组间比较用 SNK-q 检验,多组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 病理切片 HE 染色镜下观察结果

模型组:可见膀胱黏膜上皮层变薄,固有层排列混乱,基底层空泡样变,局部有炎性浸润,血管增多,可见腺体样结构。吡柔比星组:可见膀胱黏膜上皮层变厚,固有层排列混乱,基底层空泡样变,血管增多,未见炎性浸润。马归液 1 组、马归液 2 组:膀胱黏膜完好,未见坏死、炎性浸润。见图 1。



注:A.模型组;B.吡柔比星组;C、D.马归液 1 组;E、F.马归液 2 组

图 1 各组大鼠膀胱组织切片光镜图(HE 染色, $\times 400$)

3.2 各组大鼠 TGF- $\beta 1$ 、EGF- β 的平均吸光度值比较

与模型组比较,吡柔比星组、马归液 1 组和马归液 2 组 TGF- $\beta 1$ 、EGF- β 的平均吸光度值明显升高 ($P < 0.01$)。与吡柔比星组比较,马归液 1 组 TGF- $\beta 1$ 平均吸光度值降低、EGF- β 平均吸光度值与吡柔比星组相近,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);与吡柔比星组比较,马归液 2 组 TGF- $\beta 1$ 平均吸光度值与吡柔比星组相近,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但马归液 2 组 EGF- β 平均吸光度值高于吡柔比星组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与马归液 1 组比较,马归液 2 组 TGF- $\beta 1$ 、EGF- β 的平均吸光度值明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 TGF- $\beta 1$ 、EGF- β 的平均吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF- $\beta 1$	EGF- β
模型组	10	0.129 \pm 0.022	0.141 \pm 0.014
吡柔比星组	10	0.177 \pm 0.008**	0.185 \pm 0.011**
马归液 1 组	10	0.154 \pm 0.011**	0.184 \pm 0.013**
马归液 2 组	10	0.181 \pm 0.013** Δ	0.202 \pm 0.015** $\bullet\Delta$

注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与吡柔比星组比较, $\bullet P < 0.05$;与马归液 1 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3.3 各组大鼠 TGF- $\beta 1$ 、EGF- β 蛋白表达比较

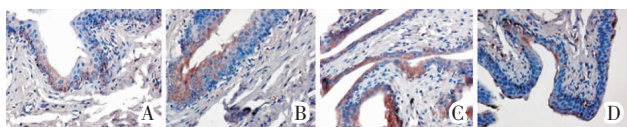
与模型组比较,吡柔比星组、马归液 1 组、马归液 2 组 TGF- $\beta 1$ 、EGF- β 蛋白表达均升高,差异有统

计学意义($P < 0.01$)。与吡柔比星组比较,马归液 1 组 TGF- β 1 蛋白表达降低、EGF- β 蛋白表达与吡柔比星组相近,差异均无统计学意义($P > 0.05$);与吡柔比星组比较,马归液 2 组 TGF- β 1 蛋白表达与吡柔比星组相近,差异无统计学意义($P > 0.05$),但马归液 2 组 EGF- β 蛋白表达高于吡柔比星组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与马归液 1 组比较,马归液 2 组 TGF- β 1、EGF- β 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2、图 2-3。

表 2 各组大鼠 TGF- β 1、EGF- β 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

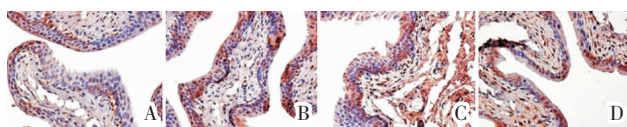
组别	n	TGF- β 1	EGF- β
模型组	10	142.1 \pm 7.9	136.7 \pm 8.2
吡柔比星组	10	194.4 \pm 8.5**	156.4 \pm 7.6**
马归液 1 组	10	179.6 \pm 7.7**	159.5 \pm 7.3**
马归液 2 组	10	198.2 \pm 5.2** $\Delta\Delta$	176.2 \pm 8.4** $\bullet\bullet\Delta\Delta$

注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与吡柔比星组比较, $\bullet\bullet P < 0.01$;与马归液 1 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。



注:A.模型组;B.吡柔比星组;C.马归液 1 组;D.马归液 2 组

图 2 各组大鼠膀胱组织 TGF- β 1 免疫组化光镜图($\times 400$)



注:A.模型组;B.吡柔比星组;C.马归液 1 组;D.马归液 2 组

图 3 各组大鼠膀胱组织 EGF- β 免疫组化光镜图($\times 400$)

4 结论

腺性膀胱炎是一种以尿频、尿急、耻骨上方胀痛及夜尿频繁等为主要表现的慢性膀胱疾患,目前腺性膀胱炎的病因尚未完全明确^[5],部分研究表明腺性膀胱炎是一种少见的肿瘤炎性病变,被认为是一种癌前病变,具有演变为膀胱腺癌的趋势^[6]。而非可控性炎症是指在一些不确定因素的影响下,持续或低强度的炎症刺激使靶组织处于长期或过度反应,炎症无法从抗感染、修复组织损伤模式下转变成为稳定的平衡状态,导致炎症反应持续进行。长期慢

性的非可控性炎症可以诱导肿瘤的发生,并在肿瘤发病进程和转归中起到重要作用^[7-8]。非可控性炎症感染可激活和募集大量白细胞,分泌各种细胞因子,如转化生长因子(TGF)^[9]、表皮生长因子(EGF)^[10]、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)等,一起组成新的炎症微环境,另外炎细胞也可分泌蛋白溶解酶,这些炎症介质可在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用,并刺激肿瘤细胞生长、血管和淋巴管生成以及肿瘤的浸润转移。

TGF- β 1 是调节细胞生长和分化的 TGF- β 超家族成员,能使正常的成纤维细胞的表型发生转化,TGF- β 1 对正常细胞及癌变早期细胞具有抑制作用,而 TGF- β 1 被认为是最强的致纤维化因子^[11]。腺性膀胱炎的发生发展与 TGF- β 1 具有密切关系,TGF- β 1 参与了膀胱形态的变化,在膀胱炎症及纤维化的进程中也有着重要作用。近期研究发现,TGF- β 1 可依赖 Smad2/3 方式介导膀胱上皮间质转化过程,促进纤维细胞合成胶原纤维以利于损伤区修复^[12]。而 EGF 是人体一种很强的促有丝分裂因子,能促进组织细胞增生与分裂,增强表皮细胞的活力,加速皮肤、黏膜的创伤愈合和损伤修复,并能促进肿瘤细胞浸润和转移,在参与多种器官纤维化过程中起重要作用。EGF 和 TGF 通过结合相同的表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)刺激细胞发生有丝分裂,在创伤修复、肿瘤发生等过程中具有重要功能^[12-13]。膀胱黏膜修复和愈合需要依靠各类细胞生长因子的相互作用,其过程是极为复杂的。EGF 具有刺激黏膜上皮细胞的蛋白质和 DNA 合成,促进上皮细胞增生,改善黏膜血循环和增强黏膜屏障,在黏膜的损伤修复过程中及维持黏膜的完整性发挥着重要作用。TGF 属于炎症细胞趋化因子,可促进炎症细胞和成纤维细胞向伤口聚集,促进创面小血管的生成、肉芽组织生长和表皮形成。TGF- β 1 与 EGF- β 相互作用,可调控机体局部炎症发生、发展的趋势,促进创面的愈合。在炎症发生发展期间,TGF- β 1、EGF- β 大量释放,参与炎症组织的修复。

腺性膀胱炎属中医学“淋证”范畴,多由湿热之邪下注膀胱,膀胱气化失司,或热结于下焦,致尿频、

尿急、小腹胀痛、尿血等诸证。根据“久病致虚、久病致瘀”理论,结合长期的临床观察,发现湿热蕴结、气虚血瘀在腺性膀胱炎中较为常见,治疗应以清热利湿、益气活血为法^[3]。本课题采用的自制中药马归液具有“清热利湿通淋、益气活血化瘀、消肿散结抗癌”之功效,由马鞭草、当归、赤芍、黄芪四味中药经先进工艺制成,诸药合用,具有抗菌消炎、止痛止血、抗癌抗肿瘤、促进愈合等作用^[3,14]。

本实验研究结果显示,与模型组比较,马归液治疗后的大鼠模型 TGF- β 1、EGF- β 平均吸光度值、蛋白表达均明显升高($P<0.05$),结合病理学结果,马归液治疗后的腺性膀胱炎大鼠模型的膀胱黏膜恢复正常,说明马归液具有调节腺性膀胱炎大鼠模型 TGF- β 1、EGF- β 蛋白表达,从而促进膀胱组织修复,提高腺性膀胱炎的愈合率的效果。马归液 2 组的 TGF- β 1、EGF- β 蛋白表达明显高于马归液 1 组,说明马归液 2 组疗效更佳。

综上所述,马归液能促进腺性膀胱炎大鼠膀胱炎性组织的修复,其机制可能与马归液对 TGF- β 1、EGF- β 的调控作用有关。但是腺性膀胱炎的病理机制尚十分复杂,马归液对腺性膀胱炎的相关信号通路的影响还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 冯 强.腺性膀胱炎术后不同药物膀胱灌注的疗效比较[J].河南医学研究,2016,25(5):890-891.

- [2] 蔡奕川,姚友生,李迎东.Caveolin-1 在腺性膀胱炎、膀胱移行细胞癌中的表达及其与细胞增殖、新生血管的关系及意义[J].中国医学创新,2016,13(34):16-19.
- [3] 谢海平,蔡 蔚,龙 鑫,等.马归液膀胱灌注治疗腺性膀胱炎的临床疗效分析[J].湖南中医药大学学报,2016,36(10):60-63.
- [4] 蔡 蔚,谢海平,龙 鑫,等.腺性膀胱炎大鼠模型建立的实验研究[J].中外医疗,2016,2(6):28-29,31.
- [5] 蔡 蔚,谢海平,龙 鑫,等.马归液对腺性膀胱炎大鼠膀胱组织 Bcl-2、Bax 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(6):38-42.
- [6] 徐 浩,杨 华,孙根喜.腺性膀胱炎与膀胱癌关系及腺性膀胱炎癌变率调查[J].现代仪器与医疗,2017,23(4):36-38.
- [7] 张桂贤,刘洪斌,刘大卫.非可控性炎症与肿瘤相关性研究[J].中国中西医结合外科杂志,2015,4(2):197-201.
- [8] 田同德,岳立云,田同良,等.肿瘤炎症微环境与免疫的关系及中医药干预策略[J].中医杂志,2017,2(3):209-213.
- [9] 丁 艳,陈 婧,陶 然,等.TGF- β /Smad 途径在肿瘤进展中的研究进展[J].河北北方学院学报(自然科学版),2017,33(12):55-60.
- [10] 叶福增,张心男,徐智慧.白介素-8 和表皮生长因子在大鼠膀胱黏膜损伤中表达[J].安徽医科大学学报,2011,46(10):1101-1102.
- [11] 傅玉琼,周 伟.转化生长因子 β 1 及成纤维细胞生长因子基因敲除对尘肺小鼠肺纤维化的影响[J].解放军医药杂志,2017,29(1):27-30.
- [12] 尤耀东,黄晓朋,陈晓洋,等.基于腺性膀胱炎模型大鼠探讨八正散对 IL-6、IL-17、TGF- β 1 表达的影响[J].中国男科学杂志,2015,29(12):26-31.
- [13] 陈 亮,景 姗,孙 蓓,等.健脾化痰解毒中药复方对溃疡性结肠炎患者血清细胞因子 EGF、TGF- β 1 及 TNF- α 的影响[J].天津中医药大学学报,2017,36(5):352-355.
- [14] 蔡 蔚,贺菊乔,谢 晓,等.马归液对女性腺性膀胱炎的尿动力学影响[J].中国医药指南,2013,11(30):3-5.

(本文编辑 李 杰)