

本文引用:涂雅玲,陈其华.益肾通癥胶囊对前列腺增生模型大鼠雌雄激素比及缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(1):14-17.

## 益肾通癥胶囊对前列腺增生模型大鼠雌雄激素比及缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 的影响

涂雅玲<sup>1</sup>,陈其华<sup>2\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

**[摘要]** **目的** 探讨益肾通癥胶囊对前列腺增生(benign prostatic hyperplasia,BPH)模型大鼠雌雄激素比及缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ,HIF-1 $\alpha$ )的影响。**方法** 对SD雄性大鼠皮下注射丙酸睾酮 5 mg/(kg·d),连续4周。造模成功后将大鼠随机分为4组:正常组、模型组、中药对照组和实验组,每组7只。实验组大鼠灌服 0.365 g/kg 益肾通癥胶囊混悬液;中药对照组灌服 0.183 g/kg 癥闭舒胶囊混悬液;正常组及模型组给予同等容量的生理盐水灌胃,连续灌胃8周后,光镜下观察前列腺组织病理学变化;称取前列腺湿重并计算前列腺指数;检测大鼠血清 E<sub>2</sub>、T、DHT水平及 E<sub>2</sub>/T;测定前列腺组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达。**结果** 与模型组比较,实验组大鼠前列腺腺体轻微增生,少数呈乳头状增生,腺腔基本恢复正常。与模型组比较,实验组大鼠前列腺体积、前列腺湿重、前列腺指数及前列腺组织中的HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平均降低( $P<0.01$ );大鼠血清中的 DHT、E<sub>2</sub>、T水平降低,E<sub>2</sub>/T比值升高( $P<0.01$ )。**结论** 益肾通癥胶囊可能通过降低 BPH 模型大鼠血清中的 DHT、E<sub>2</sub>、T水平,升高 E<sub>2</sub>/T比值,抑制 HIF-1 $\alpha$  的表达起治疗 BPH 的作用。

**[关键词]** 前列腺增生;益肾通癥胶囊;雌雄激素比;缺氧诱导因子

**[中图分类号]**R285.5

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.01.004

### Effects of Yishen Tonglong Capsules on Estrogen and Androgen Ratio in Rat Model of Benign Prostatic Hyperplasia and Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$

TU Yaling<sup>1</sup>, CHEN Qihua<sup>2\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of Yishen Tongzhi Capsules on the estrogen and androgen ratio in rat model of benign prostatic hyperplasia and the effects on hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). **Methods** SD male rats were injected subcutaneously with testosterone propionate 5 mg/(kg·d) for 4 weeks. After successful modeling, the rats were randomly divided into 4 groups: a normal group, a model group, a Chinese medicine control group and an experimental group, with 7 rats in each group. Rats in the experimental group were administrated with 0.365 g/kg Yishen Tonglong Capsules Suspension; the Chinese medicine control group was administrated with 0.183 g/kg Longbishu Capsules Suspension; the normal group and the model group were given

**[收稿日期]**2019-10-29

**[基金项目]**湖南省科技厅科技创新平台与人才计划-男性疾病中医临床医学研究中心(2018SK4012);2018年湖南省研究生科研创新项目(CX2018B494)。

**[作者简介]**涂雅玲,女,在读硕士研究生,研究方向:中医外科疾病。

**[通讯作者]**\*陈其华,男,教授,博士研究生导师,E-mail:1105165868@qq.com。

the same volume of saline. After 8 weeks of continuous intragastric administration, the histopathological changes of prostate were observed under light microscope; The prostate wet weight was measured and the prostate index was calculated; The rat serum  $E_2$ , T, DHT levels, and  $E_2/T$  were detected; HIF-1 $\alpha$  protein expression in prostate tissue was measured. **Results** Compared with the model group, the prostate glands of the experimental group had a slight hyperplasia, and a few showed papillary hyperplasia. The glandular cavity returned to normal. Compared with the model group, rats in the experimental group had reduced prostate volume, wet prostate weight, prostate index, and HIF-1 $\alpha$  protein expression levels in prostate tissue ( $P<0.01$ ); DHT,  $E_2$ , and T levels in rat serum were reduced.  $E_2/T$  ratio increased ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Yishen Tonglong Capsules may treat BPH by reducing the levels of DHT,  $E_2$ , T in the serum of BPH model rats, increasing the  $E_2/T$  ratio and inhibiting the expression of HIF-1 $\alpha$ .

[**Keywords**] prostatic hyperplasia; Yishen Tonglong Capsules; estrogen and androgen ratio; hypoxia-inducible factor

前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)是中老年男性常见疾病之一<sup>[1]</sup>,是以排尿不畅、夜尿增多、尿频、排尿费力、尿线中断为主要临床症状的一种疾病,属中医学“精癃”范畴<sup>[2]</sup>。该病的发病率随年龄增长而增高,50岁以上发病率大于50%,80岁以上发病率达83%,关于BPH的病因和发病机制的研究颇多,主要有雌雄激素协同学说、生长因子学说以及细胞凋亡与基因调控学说等,但至今其发病机制仍未完全阐明<sup>[3-4]</sup>。研究发现大鼠前列腺组织及血清中缺氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )水平与BPH发生有密切关联<sup>[5]</sup>。笔者导师根据多年临床经验,创制了治疗BPH疗效较好的益肾通癥胶囊<sup>[6]</sup>,本研究通过观察益肾通癥胶囊对雌雄激素比及HIF-1 $\alpha$ 表达的影响,以深入探讨益肾通癥胶囊治疗BPH的机制,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

36只健康雄性SD大鼠,体质量200~220g,8周龄。由湖南中医药大学第一附属医院动物实验室提供,许可证号:SCXK(湘)2016-0002。

### 1.2 药品与试剂

益肾通癥胶囊,规格为0.4g/粒,人用量为6粒/次,2次/d,由湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供。癃闭舒胶囊,规格:0.3g/粒,人用量为3粒/次,2次/d,石家庄科迪药业有限公司。丙酸睾酮注射液:25mg/mL,天津金耀药业有限公司。睾酮(T)检测试剂盒(货号CSB-E05100r)、大鼠雌二醇( $E_2$ )检测试剂盒(货号CSB-E05110r)、大鼠双氢睾酮(DHT)检测试剂盒(货号CSB-E07879r)均购自武汉华美生物工程有限公司。抗 $\beta$ -肌动蛋白抗体(货号bs-0061R)、缺氧诱导因子1 $\alpha$ /低氧诱导因子-1抗体(货号bs-0737R)均购自北京博奥森生物技术有限公司。

### 1.3 主要仪器

酶标仪(型号:Multiskan Sky,赛默飞世尔科技公司);离心机(型号:SCIOLOGEX CF1524R,美国赛洛捷克公司);电子天平(型号:Scout STX,武汉集思仪器设备有限公司);电泳仪(型号:DYCZ-40K,北京六一生物技术有限公司)。

### 1.4 造模与给药<sup>[7-8]</sup>

36只健康雄性SD大鼠,8周龄,适应性喂养1周后,将大鼠随机取11只作为正常组,其余25只作为造模组,每天予以皮下注射5mg/(kg·d)丙酸睾酮,连续注射4周后,随机取正常组和造模组各4只大鼠,比较两组大鼠的前列腺体积、前列腺湿重和前列腺指数,光镜下评价大鼠前列腺组织形态结构的变化,判断模型是否制备成功。将造模组剩下的21只大鼠随机分模型组、中药对照组和实验组,每组各7只。造模成功后开始给药,大鼠实验用剂量采用人与动物的体表面积计算法来换算得大鼠益肾通癥胶囊的灌胃剂量为0.365g/(kg·d),癃闭舒胶囊的灌胃剂量为0.183g/(kg·d)。每天给实验组大鼠灌服“益肾通癥胶囊”0.365g/(kg·d);中药对照组灌服“癃闭舒胶囊”0.183g/(kg·d);正常组及模型组予以生理盐水灌胃,连续灌胃8周,灌胃结束后进行相关检测。

### 1.5 检测指标

1.5.1 各组大鼠前列腺组织形态变化 取大鼠前列腺组织固定于10%福尔马林溶液中,之后予以乙醇脱水、石蜡包埋、切片、常规HE染色,光学显微镜下观察各组大鼠前列腺组织形态结构的变化。

1.5.2 各组大鼠前列腺体积、湿重及前列腺指数 将大鼠称重后迅速处死,剖取前列腺组织,用水取代法测量前列腺体积,称取大鼠前列腺湿重,计算前列腺指数。

前列腺指数=前列腺湿重/大鼠体质量 $\times 100\%$

1.5.3 大鼠血清 $E_2$ 、T、DHT及 $E_2/T$ 指标检测 剖腹

后采腹主动脉血,以 3 000 r/min 4 ℃离心 15 min 后,取上清液装入普通试管,存放于-70 ℃冷冻箱中,按照试剂盒说明书进行相关测定。

**1.5.4 大鼠前列腺组织 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达量** 取大鼠前列腺组织,置于匀浆器球状部位,用剪刀尽量剪碎组织块后,加入 800  $\mu$ L 含 PMSF 的裂解液冰上进行匀浆,重复碾转数次尽量碾碎组织,冰上裂解 30 min, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min 后,取上清分装于 1.5 mL 离心管中,保存于-80 ℃冰箱。实验时,取 100  $\mu$ L 不同处理的组织蛋白样本,BCA 法测蛋白浓度,随后加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,沸水中煮 10 min 后,取 20  $\mu$ g 进行电泳分析。电泳结束后,按照“三明治”模式,300 mA 2 h 将凝胶上的蛋白转印到 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,使用 HIF-1 $\alpha$  一抗,并 4 ℃孵育过夜。随后用 1% TBST 洗膜 3 次后,使用 HRP 二抗在室温孵育 1.5 h,再用 1% TBST 洗膜 3 次。最后用 ECL 化学发光试剂盒进行显影,使用 Image-Pro Plus 图像分析管理软件进行灰度扫描,以特异性条带平均光密度与面积的乘积为有效值,来反映蛋白表达水平。

## 1.6 统计学方法

所有数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行处理,数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

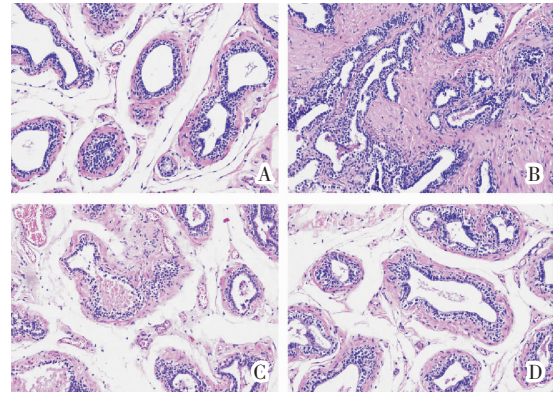
## 2 结果

### 2.1 大鼠前列腺组织形态变化

正常组(图 1A)见大鼠前列腺腺体排列均匀,腺体间质明显,腺上皮细胞呈单层柱状;模型组(图 1B)见大鼠前列腺腺体显著增生,腺腔变大,大小不一,多数腺上皮呈乳头状增生向腺腔内突出,间质内炎性细胞浸润伴纤维组织增生,说明造模成功。中药对照组(图 1C)见大鼠前列腺腺体和部分纤维组织仍增生明显,较模型组有一定改善;实验组(图 1D)见大鼠前列腺腺体轻微增生,腺上皮多为柱状单层,少数呈乳头状增生,腺腔基本恢复正常,较模型组有很大改善。

### 2.2 各组大鼠前列腺体积、湿重及前列腺指数

与正常组相比,模型组大鼠前列腺体积、前列腺湿重和前列腺指数均显著增加( $P<0.01$ ),说明造模成功。与模型组相比,实验组和中药对照组 BPH 模型大鼠前列腺体积、前列腺湿重和前列腺指数均降低( $P<0.01$ )。见表 1。



注:A.正常组;B.模型组;C.中药对照组;D.实验组

图 1 各组大鼠前列腺组织形态变化观察(HE, $\times 200$ )

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

组别	n	体积/mL	湿重/g	前列腺指数/%
正常组	7	0.60 $\pm$ 0.26	0.81 $\pm$ 0.21	0.25 $\pm$ 0.06
模型组	7	1.28 $\pm$ 0.47 <sup>▲</sup>	1.32 $\pm$ 0.37 <sup>▲</sup>	0.41 $\pm$ 0.11 <sup>▲</sup>
中药对照组	7	0.70 $\pm$ 0.32*	1.11 $\pm$ 0.22*	0.34 $\pm$ 0.09*
实验组	7	0.67 $\pm$ 0.18**	1.08 $\pm$ 0.18**	0.32 $\pm$ 0.17**

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

### 2.3 各组大鼠血清雌雄激素水平

与正常组相比,模型组大鼠血清 DHT、E<sub>2</sub>、T 明显升高( $P<0.01$ ),E<sub>2</sub>/T 明显降低( $P<0.01$ )。与模型组相比,中药对照组和实验组大鼠血清 DHT、E<sub>2</sub>、T 均降低( $P<0.01$ ),E<sub>2</sub>/T 明显升高( $P<0.01$ )。见表 2。

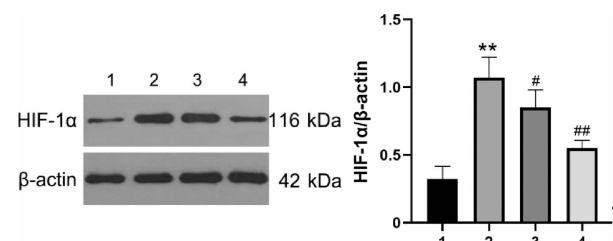
表 2 各组大鼠血清 DHT、E<sub>2</sub>、T 及 E<sub>2</sub>/T 水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	DHT/(nmol·L <sup>-1</sup> )	E <sub>2</sub> /(pg·mL <sup>-1</sup> )	T/(ng·mL <sup>-1</sup> )	E <sub>2</sub> /T
正常组	7	68.23 $\pm$ 12.37	17.31 $\pm$ 1.69	20.72 $\pm$ 1.86	0.84 $\pm$ 0.23
模型组	7	135.06 $\pm$ 15.73*	41.58 $\pm$ 1.92*	59.84 $\pm$ 3.25*	0.67 $\pm$ 0.49*
中药对照组	7	112.94 $\pm$ 18.11 <sup>#</sup>	31.65 $\pm$ 4.73 <sup>#</sup>	43.20 $\pm$ 2.76 <sup>#</sup>	0.73 $\pm$ 0.18 <sup>#</sup>
实验组	7	93.78 $\pm$ 16.44 <sup>##</sup>	26.46 $\pm$ 2.87 <sup>##</sup>	33.69 $\pm$ 4.16 <sup>##</sup>	0.78 $\pm$ 1.55 <sup>##</sup>

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

### 2.4 各组大鼠前列腺组织中 HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平

与正常组比较,模型组大鼠 HIF-1 $\alpha$  水平显著增高( $P<0.01$ );与模型组相比,中药对照组和实验组 HIF-1 $\alpha$  水平均降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。见图 2。



注:1.正常组,2.模型组,3.中药对照组,4.实验组;与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

图 2 各组大鼠前列腺组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达量



### 3 讨论

BPH是临床常见的中老年男性良性疾病,该病病机复杂,病程较长,严重影响患者生活质量,西医治疗该病以药物和手术治疗为主,常用药物有 $\alpha$ 1受体阻断剂和5 $\alpha$ -还原酶抑制剂,其作用是缓解尿路症状,解除梗阻,延缓进程,抑制并缩小前列腺体积、降低远期并发症等<sup>[9]</sup>。对于具备手术指征而无手术禁忌症,且药物治疗效果不明显的患者,则采取手术治疗,但手术治疗有一定风险。中医学认为本病基本病机为肾虚血瘀,治疗以补肾益气,活血化瘀为主<sup>[6]</sup>。精癥的发生关键在于肾气亏虚,气虚则肾与膀胱气化无力,统摄失权,夜尿频多;气虚至血行无力,气虚瘀阻,引起局部组织器官增生。因此,以补肾益气,活血化瘀为基本治法,并创制益肾通癥胶囊,其药物组成有:黄芪、补骨脂、水蛭、枸杞子、山药、熟地黄、山茱萸、金樱子、茯苓、甘草等。方中补骨脂、黄芪共为君药以补益肾气;水蛭破血逐瘀;山药、山茱萸、熟地黄、枸杞滋补肾阴,寓阳中有阴,阴中有阳之意;金樱子酸涩收敛,固精缩尿;茯苓益气健脾,甘草调和诸药;全方共奏补肾益气,化瘀缩尿之功效。

前列腺是雄激素依赖性器官,雄激素是调控前列腺生长、结构维持及功能完整的重要激素。但雄激素并不是引起BPH发生的唯一性激素,雌激素在BPH发生中也发挥重要作用,但雌激素在BPH中发挥作用需以雄激素存在为前提,在一定雌/雄激素比例范围内时,可协同雄激素促进前列腺增生<sup>[10]</sup>。因此调节雌/雄激素比对于治疗前列腺增生有重要作用。本研究发现,与模型组比较,益肾通癥胶囊可显著降低大鼠血清中的DHT、E<sub>2</sub>、T水平,升高E<sub>2</sub>/T比值( $P < 0.01$ ),说明益肾通癥胶囊可能通过降低血清中DHT、E<sub>2</sub>、T水平,升高E<sub>2</sub>/T比值,从而达到抑制前列腺增生作用。

近期研究发现,HIF-1 $\alpha$ 可能是激活“血管生成开关”的关键信号因子,其能够导致各种血管生长因子的表达增加,包括VEGF和碱性成纤维生长因子(bFGF)<sup>[9]</sup>。周鹏等<sup>[11]</sup>发现前列腺内注射A型肉毒毒素可以通过抑制HIF-1 $\alpha$ 和VEGF的表达,从而抑

制前列腺组织的血管形成,使前列腺体积缩小;并探讨其可能机制是随着前列腺体积不断增大,导致血供不足出现缺氧坏死,缺氧会诱导HIF-1 $\alpha$ 过度表达,从而增加VEGF的过表达,进而诱导新生血管的形成,导致前列腺增生的发生。本研究也发现模型组大鼠前列腺组织中HIF-1 $\alpha$ 水平显著增高( $P < 0.01$ ),而益肾通癥胶囊能显著降低大鼠前列腺组织中的HIF-1 $\alpha$ 水平( $P < 0.01$ ),说明益肾通癥胶囊可能是通过抑制HIF-1 $\alpha$ 的表达,达到治疗前列腺增生的作用。

### 参考文献

- [1] PARK H J, WON J E, SORSABURU S, et al. Urinary tract symptoms (LUTS) secondary to benign prostatic hyperplasia (BPH) and LUTS / BPH with erectile dysfunction in Asian men: A systematic review focusing on tadalafil[J]. World Journal of Mens Health, 2013,31(3):193-207.
- [2] 杨伟,赵红.良性前列腺增生症的中医治疗研究进展[J].中西医结合心血管病电子杂志,2019,7(5):84-85.
- [3] 李拔森,王良.良性前列腺增生介入治疗的现状和进展[J].影像诊断与介入放射学,2017,26(3):230-235.
- [4] 徐广驰,刘涛,董波,等.大豆异黄酮抑制大鼠前列腺增生及其作用机制[J].解剖学报,2018,49(2):185-190.
- [5] ATAWIA R T, MOSLI H H, TADROS M G, et al. Modulatory effect of silymarin on inflammatory mediators in experimentally induced benign prostatic hyperplasia: emphasis on PTEN, HIF-1 $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology,2014,38,7(12):1131-1140.
- [6] 陈其华,赵丹,王大进,等.自拟方药益肾通癥胶囊治疗前列腺增生症疗效观察[J].中国性科学,2016,25(2):90-92.
- [7] 楚元奎,杨文,冉林武,等.前列腺增生大鼠模型的建立[J].贵阳医学院学报,2014,39(5):657-659,663.
- [8] 胡金辉,周青,黄艳茹,等.前癥通胶囊抑制良性前列腺增生基质细胞TGF- $\beta$ 1表达的体外实验研究[J].湖南中医药大学学报,2012,32(7):12-14.
- [9] 王斌,肖明艳. $\alpha$ 1<sub>A</sub>阻滞剂与5 $\alpha$ -还原酶抑制剂治疗BPH疗效观察[J].中国继续医学教育,2019,11(5):129-131.
- [10] 刘臻伟.雌雄激素与良性前列腺增生关系[J].中西医结合研究,2012,4(2):105-106.
- [11] 周鹏,张心男,徐智慧.A型肉毒毒素对大鼠前列腺增生组织中缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 及血管内皮细胞生长因子表达的影响[J].浙江医学,2014,36(5):401-404.

(本文编辑 苏维)