

仙甲汤对前列腺增生模型大鼠膀胱胶原沉积的影响

孙洁¹ 李秋芬² 田代志³ 江少波¹ 郭贤德¹ 裘顺安¹ 任小刚¹ 李玉兵¹

1 浙江中医药大学附属第一医院泌尿外科 310006; 2 浙江省杭州市中医院肾内科 310000;

3 湖北中医药大学中心实验室 430061

良性前列腺增生(BPH)是老年男性最常见泌尿系统疾病之一。随着年龄的增长,组织学前列腺增生发生率明显上升,到90岁时,100%男性均出现组织学前列腺增生^[1]。近年来的研究发现,BPH患者的下尿路症状(LUTs)并不完全与增大的前列腺体积导致的膀胱出口梗阻(BOO)直接相关。由BOO引起的膀胱改变也是引起LUTs,尤其是储尿期症状的重要原因。为了明确中药对BPH所致膀胱改变的影响,我们用免疫组织化学染色方法分析仙甲汤对BPH大鼠模型膀胱组织胶原沉积的影响,报道如下。

1. 材料及方法:

1.1. 动物:3月龄清洁级雄性Wistar大鼠48只。

1.2. 分组:随机分为正常组、模型组、模型加仙甲汤组、模型加坦索罗辛组四组。

1.3. 造模:除正常组外,其它实验大鼠在戊巴比妥钠麻醉后,常规消毒皮肤,经阴囊摘除双侧睾丸,残端处结扎,以确保止血,缝合皮肤。去势后,将去势大鼠随机分为模型组、模型加仙甲汤组、模型加坦索罗辛组。并于去势后第8天起,每只大鼠皮下注射丙酸睾酮1mg/300g.d,连续30天,造模结束。

1.4. 给药:自由饮食。于去势第一天起,各组大鼠分别给予相应药物灌胃。模型+仙甲汤按1ml/100g/日体重予仙甲汤(由淫羊藿、枸杞子、穿山甲、丹参、菟丝子等组成,含生药量2.34g/ml)灌胃,模型加坦索罗辛组按1.8μg/100g/日体重予坦索罗辛灌胃。其余各组予等体积生理盐水灌胃。均每日1次,连续38天。

2. 检测方法:

给药38天后,处死各组大鼠,快速取出前列腺组织和膀胱,称重后,膀胱以4%多聚甲醛溶液固定。石蜡包埋切片后行HE染色,并以免疫组织化学染色法检测大鼠膀胱胶原I及胶原III。200光镜下观察并摄片,以Imagepro plus6.0分析各样本阳性区域面积率(阳性面积/总面积),总IOD。

3. 结果

3.1. 各组大鼠体重、前列腺、膀胱称重及脏器指数

各组大鼠实验结束后称重,然后予颈椎脱臼法处死后取前列腺及膀胱,分别称取重量,并计量脏器指数。结果显示:与空白组比较,模型组大鼠体重明显下降,有非常显著的差异($P<0.01$)。与空白组比较,各组前列腺重量均明显较重($P<0.01$),而模型组前列腺增大尤为明显,有非常显著的差异,这一变化在脏器指数上表现也很明显,各组前列腺脏器指数均明显高于空白组($P<0.01$)。但仙甲汤、坦索罗辛组前列腺湿重及脏器指数均明显小于模型组($P<0.01$)。

模型组的膀胱重量也明显增加了,与空白组相比有显著差异($P<0.01$)。仙甲汤、坦索罗辛等组虽

然膀胱重量有所增加，但与空白组比较，膀胱重量和脏器指数均无统计学意义。仙甲汤、坦索罗辛组膀胱重量明显较模型组减轻 ($P<0.01$)，换算成脏器指数后，各组与模型组比较有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表格 4 各组大鼠体重、前列腺、膀胱称重及脏器指数比较

组 别	体重 (g)	前列腺重 (g)	膀胱重 (mg)	脏器指数 (脏器/体重*1000)	
				前列腺	膀胱
空白组	354.4±28.51	0.97±0.22	104.3±18.51	2.75±0.67	0.30±0.05
模型组	290.0±30.80※※	2.15±0.46※※	133.3±14.13※※	7.43±1.39※※	0.46±0.06※※
坦索罗辛组	339.3±29.67★★	1.86±0.28※※★	114.6±13.42★	5.55±0.98※※	0.34±0.04★★
仙甲汤组	336.4±40.70★★	1.67±0.28※※★★	103.8±12.3★★	5.03±0.95※※★★	0.31±0.05★★

注：※ 与空白组比较有显著性差异， $P<0.05$ ，※※ 与空白组比较有显著性差异， $P<0.01$ ；

★ 与模型组比较有显著性差异， $P<0.05$ ，★★ 与模型组比较有非常显著差异， $P<0.01$ 。

3.2. 各组大鼠膀胱微观改变

在光镜下可见空白组大鼠膀胱尿路上皮细胞排列整齐，逼尿肌平滑肌细胞修长、紧凑，排列整齐，细胞间质适中。模型组大鼠膀胱尿路上皮细胞排列紊乱，逼尿肌平滑肌细胞肥大，不规则，排列紊乱。仙甲汤组膀胱尿路上皮细胞及平滑肌细胞排列整齐，未见明显逼尿肌肥大及形态不规则。坦索罗辛组镜下表现与仙甲汤类似，逼尿肌平滑肌细胞呈梭形而修长，排列较为整齐。详见图 1—4。

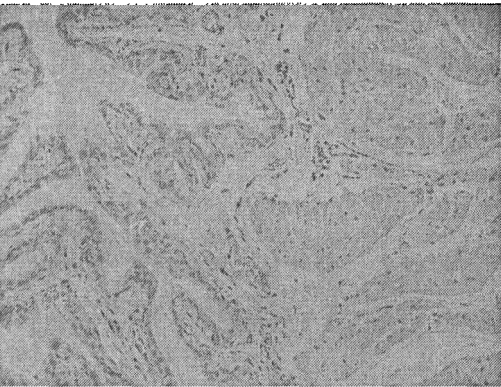


图 1 正常组膀胱组织 HE 染色

图 2 模型组膀胱组织 HE 染色

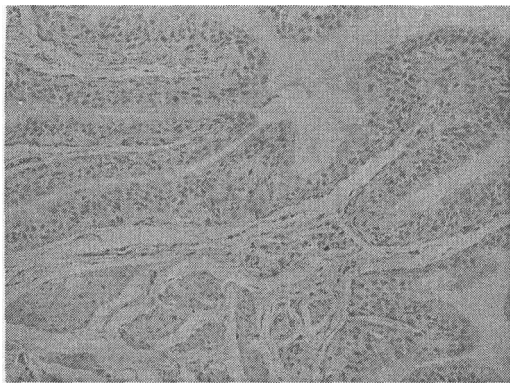


图 3 坦索罗辛组膀胱组织 HE 染色

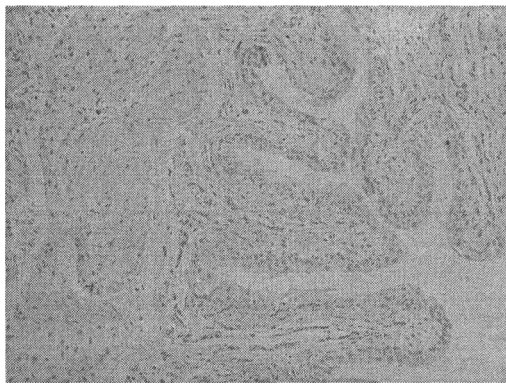


图 4 仙甲汤组膀胱组织 HE 染色

3.3. 各组大鼠膀胱胶原组织含量

取出膀胱组织并称重后, 立即予 4%多聚甲醛溶液固定。按前述方法进行免疫组织染色。200 倍光镜下观察, 染为棕黄色颗粒的为阳性, 以 Imagepro plus6.0 分析各样本阳性区域面积率 (阳性面积/总面积), 总 IOD。结果显示: 模型组膀胱胶原III阳性面积率、总 IOD 等均明显高于空白组 ($P<0.01$)。仙甲汤、坦索罗辛组膀胱胶原III阳性面积率及总 IOD 均明显较模型组低 ($P<0.01$)。膀胱胶原 I 沉积情况与胶原III类似: 模型组阳性面积率明显上升, 仙甲汤、坦索罗辛组膀胱胶原III阳性面积率及总 IOD 虽较空白组高, 但除坦索罗辛组外 ($P<0.05$) 均无统计学差异, 而它们与模型组膀胱胶原 I 沉积率相比, 无论是阳性细胞率还是总 IOD 均明显较低 ($P<0.01$)。膀胱内胶原沉积以胶原III为主, 模型组膀胱这一趋势尤其明显, 胶原 I /胶原III总 IOD 可降至 0.28, 与空白组相比有非常显著的差异 ($P<0.01$), 仙甲汤组则明显高于模型组 ($P<0.01$), 与空白组相比无统计学差异。详见表格 2, 图 7-16。

表格 5 各组大鼠膀胱胶原组织含量比较 (阳性面积率)

组别	胶原 I		胶原 III		I / III
	阳性面积率(%)	总 IOD	阳性面积率 (%)	总 IOD	总 IOD
空白组	0.063±0.010	65446±10041	5.34±2.12	64903±27806	1.30±0.77
模型组	0.087±0.008**	103455±12350*	24.26±2.06**	359408±26260**	0.28±0.40*
坦索罗辛组	0.097±0.028**	78735±14361	12.17±7.85***	170381±132127*	0.79±0.63
仙甲汤组	0.063±0.085**	69160±7362**	8.51±4.53**	149070±126041*	1.41±1.33*

注: * 与空白组比较有显著性差异, $P<0.05$, ** 与空白组比较有显著性差异, $P<0.01$;

★ 与模型组比较有显著性差异, $P<0.05$, ★★ 与模型组比较有非常显著差异, $P<0.01$,

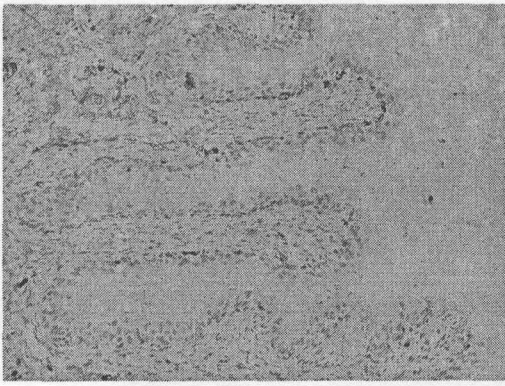


图 5 正常组膀胱组织胶原 I 表达

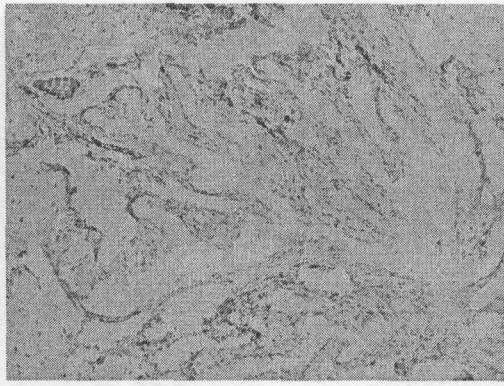


图 6 模型组膀胱组织胶原 I 表达

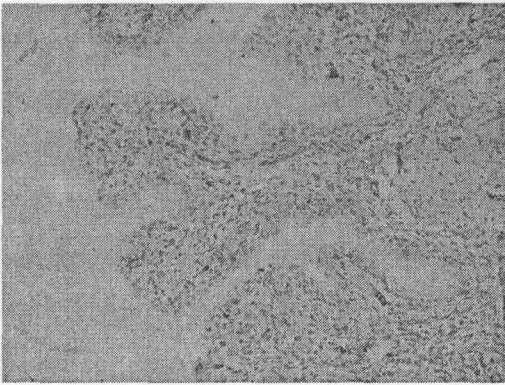


图 7 坦索罗辛组膀胱组织胶原 I 表达

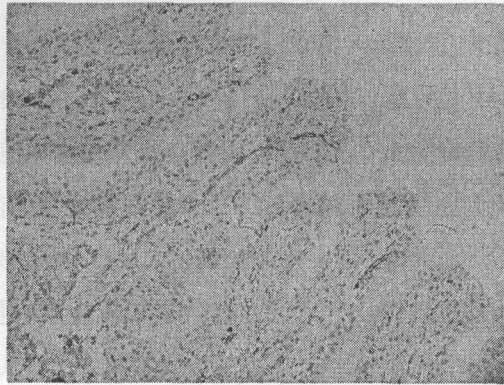


图 8 仙甲汤组膀胱组织胶原 I 表达

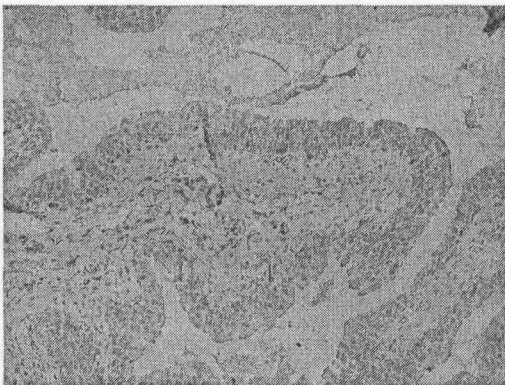


图 9 正常组膀胱组织胶原 III 表达

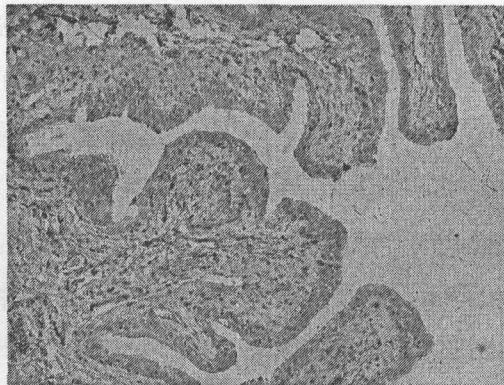


图 10 模型组膀胱组织胶原 III 表达

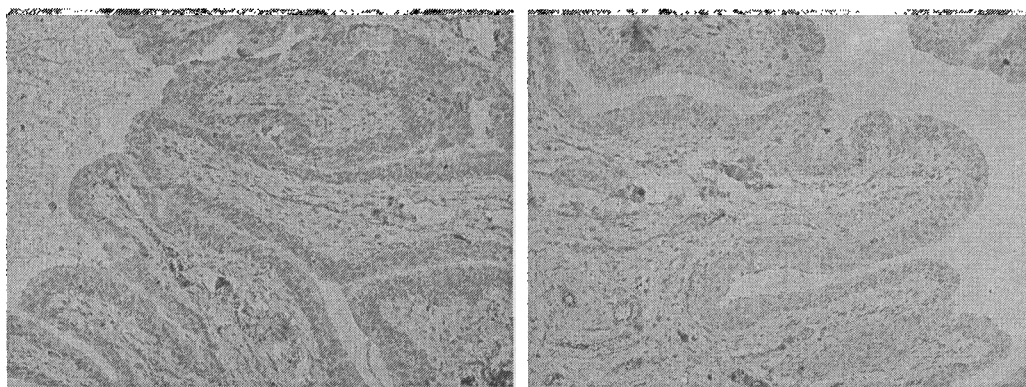


图 11 坦索罗辛组膀胱组织胶原Ⅲ表达

图 12 仙甲汤组膀胱组织胶原Ⅲ表达

4. 讨论

良性前列腺增生是老年男性最常见泌尿系统疾病之一。症状性 BPH 使患者睡眠变差、性能力下降，拒绝社交，甚至引起焦虑、忧郁，严重影响了老年男性的生活质量。而就 LUTS 而言，储尿期症状对患者生活质量的影响更大^[2]。因此，近些年来对储尿期症状的治疗越来越引起人们的重视。

虽然所有前列腺增生引起的 LUTS 无疑都与增生的前列腺所导致的膀胱出口梗阻（BOO）有关，但越来越多的证据表明，前列腺增生患者的 LUTS 还与 BOO 继发的膀胱改变有关。BPH 通过 BOO 引起膀胱逼尿肌功能的改变，早期引起膀胱逼尿肌肥厚，收缩力增强，中期逼尿肌兴奋性增高，可产生不稳定膀胱，引起逼尿肌收缩、痉挛，晚期膀胱扩张，逼尿肌发生退行性变化及纤维化，变薄收缩力下降，甚至逼尿肌无力。

胶原纤维是膀胱组织细胞外基质的主要成分。膀胱组织胶原含量的多少及构成决定了膀胱的弹性和顺应性。膀胱壁的胶原纤维主要为 I 型和 III 型，其中弹性较差的胶原 III 含量是膀胱顺应性的决定因素^[3]。BPH 引起的 BOO 可以引起膀胱组织胶原沉积增加^[4]，胶原 I/胶原 III 明显下降^[5]。膀胱间质沉积的胶原不仅使其弹性下降，还会影响逼尿肌的收缩力，最终使得膀胱顺应性下降，收缩力减弱。

仙甲汤是导师临床应用多年治疗前列腺增生的经验方。方中熟地黄、枸杞子、淫羊藿、巴戟天等平补肾中阴阳以益肾气，穿山甲、丹参、川芎、莪术等活血化瘀以消瘀散结。丹参、川芎还兼有养血补血作用，与穿山甲、莪术同用，既能活血破瘀，又能养血生新，使之祛邪而不伤正，扶正而不助邪，全方共奏补肾活血之功。经多年临床验证，对 BPH 确有疗效^[6]。我们发现 BPH 模型大鼠增宽的逼尿肌平滑肌细胞间隙中出现大量胶原增生。这种胶原沉积以胶原 III 为主，并最终导致胶原 I/III 明显下降。仙甲汤组膀胱组织胶原 III 沉积明显下降，而胶原 I/III 则明显上升，接近空白组水平，这可能是仙甲汤有效改善 BPH 继发膀胱改变的机制之一。

参考文献

- 1 Alan J. Wein. 坎贝尔—沃尔什泌尿外科学. 第 1 版. 北京:北京大学医学出版社,2009.2221.
- 2 Sountoulides P, van Dijk MM, Wijkstra H, et al. Role of voiding and storage symptoms for the quality of life before and after treatment in men with voiding dysfunction. World J Urol, 2010,28(1):3-8.
- 3 孙小兵, 卜照耘, 张维东, 张圣军, 李宜生. TGF- β 1 对膀胱逼尿肌 III 型胶原表达的调节作用. 中华

小儿外科杂志, 2005,26(3):148-150.

- 4 Azadzo KM, Chen BG, Radisavljevic ZM, et al. Molecular reactions and ultrastructural damage in the chronically ischemic bladder. J Urol, 2011,186(5):2115-22.
- 5 刘南,宋波,金锡御,熊恩庆. RT-PCR 检测大鼠低顺应性膀胱组织中 I 型、III型胶原蛋白和弹性蛋白基因的表达. 重庆医学, 2003,32(11):1499-1511.
- 6 曹继刚,周安方. 仙甲汤加减治疗前列腺增生 57 例临床观察. 云南中医中药杂志, 2008,29(7):31—32.