

补肾活血方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,邬贤德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,浙江 杭州 310006; 2. 浙江省杭州市中医院肾内科,浙江 杭州 310000;
3. 湖北中医药大学中心实验室,湖北 武汉 430061)

摘要:目的:观察补肾活血方对前列腺增生大鼠膀胱组织胶原沉积的影响。方法:清洁级雄性Wistar大鼠48只,随机分为正常组、模型组、模型加补肾活血方组、模型加坦索罗辛组4组。除正常组外,其它实验大鼠以去势加睾酮注射法复制大鼠BPH模型。于去势第一天起,各组大鼠分别给予相应药物灌胃。模型+补肾活血方按1 mL/100 (g·d)体重予补肾活血方(由淫羊藿、枸杞子、穿山甲、丹参、菟丝子等组成,含生药量2.34 g/mL)灌胃,模型加坦索罗辛组按1.8 μg/100 (g·d)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 d后检测各组大鼠前列腺、膀胱湿重及脏器指数,免疫组织化学法观察膀胱组织内胶原沉积。结果:模型组膀胱胶原Ⅲ阳性面积率、总IOD等均明显高于空白组($P < 0.01$)。补肾活血方、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。模型组膀胱胶原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($P < 0.01$),补肾活血方组则明显高于模型组($P < 0.01$),与空白组相比无统计学差异;结论:补肾活血方组可以明显降低BPH模型大鼠膀胱组织胶原Ⅲ沉积,提高胶原Ⅰ/胶原Ⅲ比率,这可能是补肾活血方有效改善BPH继发膀胱改变的机制之一。

关键词:前列腺增生;膀胱;胶原;补肾活血方

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1673-7717(2013)02-0315-03

Effect of Bushen Huoxue Recipe on Bladder Collagen Deposition Prostate Hyperplasia in Rats

SUN Jin¹, LI Qiufen², TIAN Daizhi³, JIANG Shaobo¹, WU Xiande¹, QIU Shunan¹, REN Xiaogang¹, LI Yubing¹

参考文献

- [1] 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-329.
- [2] Ohta Y, Kongo M, Kishikawa T. Effect of melatonin on changes in hepatic antioxidant enzyme activities in rats treated with alpha-naphthylisothiocyanate [J]. J Pineal Res, 2001, 31(4): 370-377.
- [3] Park HJ, Oh JH, Park SM, et al. Identification of biomarkers of chemically induced hepatocarcinogenesis in rasH2 mice by toxicogenomic analysis [J]. Arch Toxicol, 2011, 85(12): 1627-1640.
- [4] Corpechot C, Ping C, Wendum D, et al. Identification of a novel 974C → G nonsense mutation of the MRP2/ABCC2 gene in a patient with Dubin-Johnson syndrome and analysis of the effects of rifampicin and ursodeoxycholic acid on serum bilirubin and bile acids [J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101(10): 2427-2432.
- [5] Yoshizaki K. Pathogenic role of IL-6 combined with TNF-α or IL-1 in the induction of acute phase proteins SAA and CRP in chronic inflammatory diseases [J]. Adv Exp Med Biol, 2011, 691: 141-150.
- [6] Zhao L, Tang Y, You Z, et al. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18909.
- [7] Faiola B, Peterson RA, Kimbrough CL, et al. Acute ANIT toxicity in male IL-10 knockout and wild-type mice [J]. Toxicol Pathol, 2010, 38(5): 745-755.
- [8] Miller AM, Wang H, Bertola A, et al. Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice [J]. Hepatology, 2011, 54(3): 846-856.
- [9] Kodali P, Wu P, Lahiji PA, et al. ANIT toxicity toward mouse hepatocytes in vivo is mediated primarily by neutrophils via CD18 [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291(2): G355-363.
- [10] Fierro NA, Roman S, Realpe M, et al. Multiple cytokine expression profiles reveal immune-based differences in occult hepatitis B genotype H-infected Mexican Nahua patients [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011, 106(8): 1007-1013.
- [11] Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation [J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(4): 339-350.
- [12] Luyendyk JP, Flanagan KC, Williams CD, et al. Tissue factor contributes to neutrophil CD11b expression in alpha-naphthylisothiocyanate-treated mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 250(3): 256-262.

收稿日期: 2012-10-08

基金项目: 浙江省中医药管理局普通项目(2008CB006)

作者简介: 孙洁(1975-), 男, 湖北孝感人, 副主任医师, 博士, 研究方向: 中医男科诊治规律。E-mail: sjde008@tom.com。

- (1. First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China;
2. Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310000, Zhejiang, China;
3. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei, China)

Abstract: *Objective:* To observe the effect of BushenHuoxue Fang of deposition of collagen in rat bladder tissue. *Materials and methods:* Clean grade 48 male Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, the model plus BushenHuoxue Fang group, model plus Tamsulosin group of four groups. Except the normal group, the other rats received castration plus testosterone injection to make model of BPH. On the first day of castration, the rats were given the appropriate medication orally. Model cents a soup by 1 mL/100 g/day for body weight cents a soup (from the Epimedium, Wolfberry, pangolins, Salvia, dodder seed, etc., including Health and dose 2.34 g/mL) fed group model plus tamsulosin by 1.8 μ g/100 g/day body weight for tamsulosin orally. Other groups to an equal volume of normal saline. Were 1 day, 38 consecutive days to detect the rat prostate, bladder wet weight and organ index, immunohistochemical observation of bladder tissue collagen deposition. *Results:* The model group III collagen positive area rate of the bladder, the total IOD etc significantly higher than the control group ($P < 0.01$). Cents a soup, bladder tamsulosin group III collagen positive area rate and the total IOD were significantly lower than model group ($P < 0.01$). Bladder collagen deposition and collagen III I similar. Model group, the bladder collagen I / total IOD can be reduced collagen III 0.28, compared with the control group there was a significant difference ($P < 0.01$), cents a soup group was significantly higher than model group ($P < 0.01$), with the control group no significant difference; *Conclusion:* Sin a decoction group of rats can significantly reduce BPH bladder tissue deposition of collagen III, improve collagen I / III collagen ratio, which may be effective in improving BPH cents a soup to change the mechanism of secondary bladder one.

Key words:

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补肾活血方对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、模型加补肾活血方组、模型加坦索罗辛组4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、模型加补肾活血方组、模型加坦索罗辛组。并于去势后第8d起,每只大鼠皮下注射丙酸睾酮1 mg/300 (g·d),连续30 d,造模结束。

1.4 给药 自由饮食。于去势第1天起,各组大鼠分别给予相应药物灌胃。模型+补肾活血方按1 mL/100 (g·d)体重予补肾活血方(由淫羊藿、枸杞子、穿山甲、丹参、菟丝子等组成,含生药量2.34 g/mL)灌胃,模型加坦索罗辛组按1.8 μ g/100 (g·d)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 d。

2 检测方法

给药38 d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($P < 0.01$)。但补肾活血方、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($P < 0.01$)。补肾活血方、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。补肾活血方、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。

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。补肾活血方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补肾活血方类似,逼尿肌平滑肌细胞呈梭形而修长,排列较为整齐。详见插页XI图1~6。

表1 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**
补肾活血方组	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,* $P<0.05$;与空白组比较有非常显著性差异,** $P<0.01$;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性差异,** $P<0.01$ 。

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($P<0.01$)。补肾活血方、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,

补肾活血方、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($P<0.01$),补肾活血方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2,插图7~12。

表2 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 总IOD
	阳性面积率(%)	总IOD	阳性面积率(%)	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
补肾活血方组	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,* $P<0.05$,与空白组比较有非常显著性差异,** $P<0.01$;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性差异,** $P<0.01$ 。

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^[1]。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^[2]。BPH引起的BOO可以引起膀胱组织胶原沉积增加^[3],胶原Ⅰ/胶原Ⅲ明显下降^[4]。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。

补肾活血方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。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。补肾活血方组膀胱组织胶原Ⅲ沉积明显下降,而胶原Ⅰ/Ⅲ则明显上升,接近空白组水平,这可能是补肾活血方有效改善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[M]. 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[J]. World J Urol, 2010,28(1):3-8.
- [3] 孙小兵,卜照耘,张维东,等. TGF- β 1对膀胱逼尿肌Ⅲ型胶原表达的调节作用[J]. 中华小儿外科杂志,2005,26(3):148-150.
- [4] Azadzi KM, Chen BG, Radisavljevic ZM, et al. Molecular reactions and ultrastructural damage in the chronically ischemic bladder[J]. J Urol, 2011,186(5):2115-2122.
- [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[J]. 重庆医学,2003,32(11):1499-1511.

补肾活血方对前列腺增生模型大鼠膀胱胶原沉积的影响

(正文见 315 - 317 页)

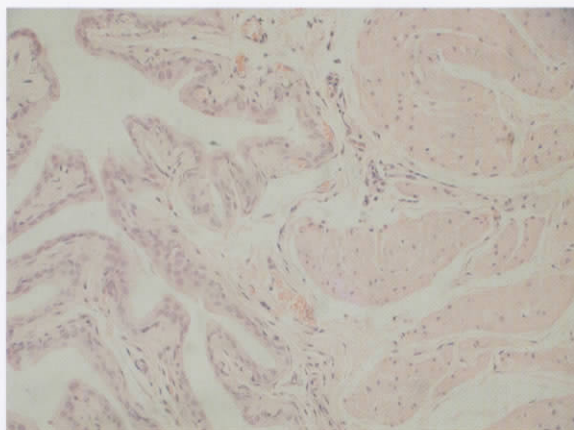


图1 正常组膀胱组织 HE 染色

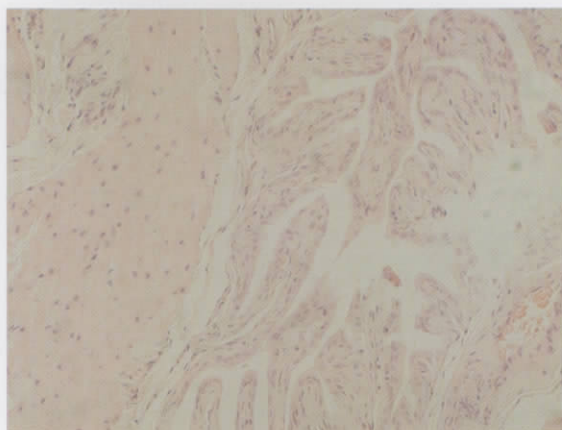


图2 模型组膀胱组织 HE 染色

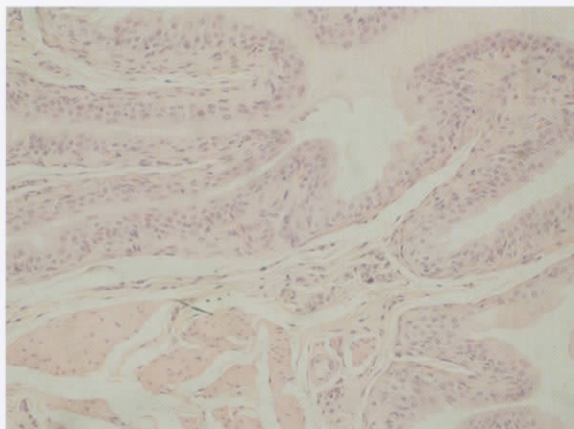


图3 坦索罗辛组膀胱组织 HE 染色

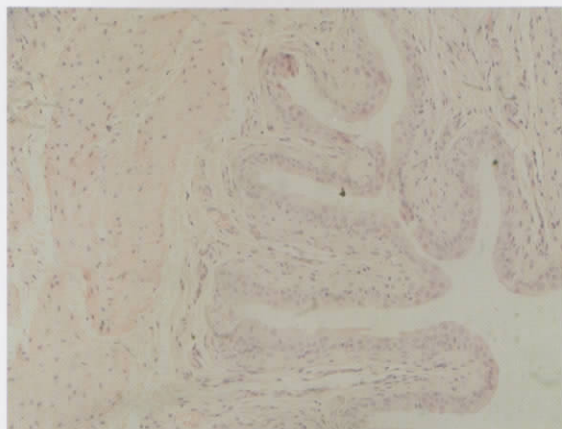


图4 补肾活血方组膀胱组织 HE 染色

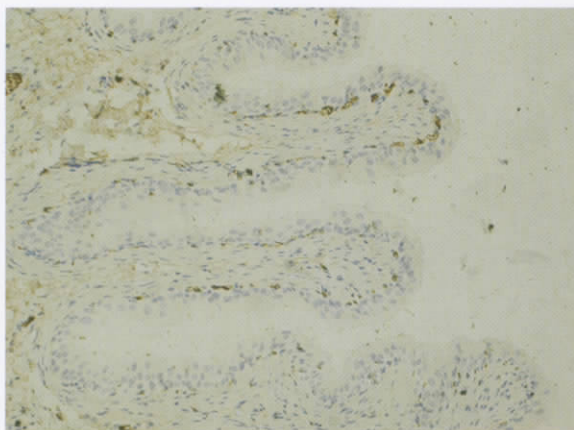


图5 正常组膀胱组织胶原 I 表达

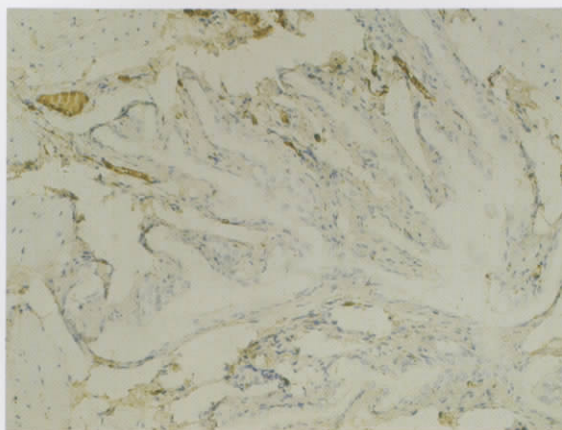


图6 模型组膀胱组织胶原 I 表达

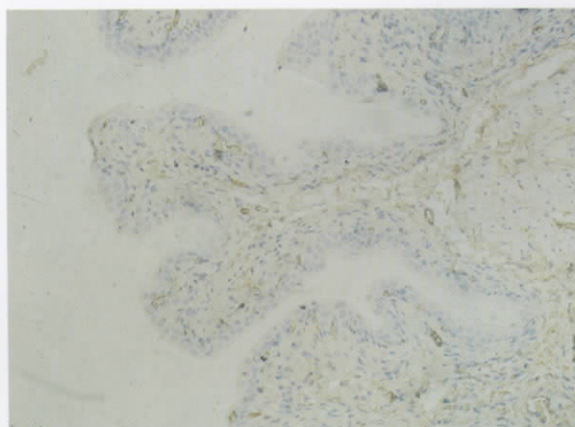


图7 坦索罗辛组膀胱组织胶原Ⅰ表达

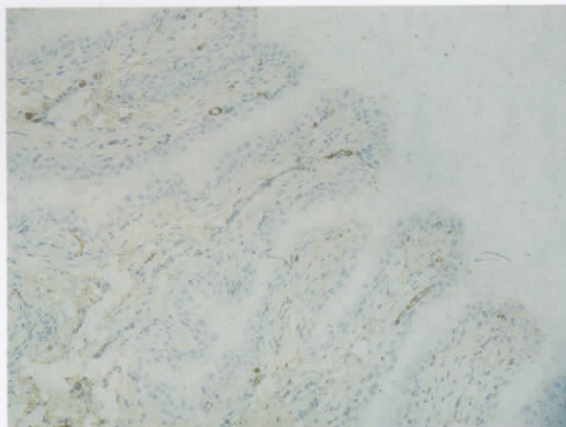


图8 补肾活血方组膀胱组织胶原Ⅰ表达



图9 正常组膀胱组织胶原Ⅲ表达

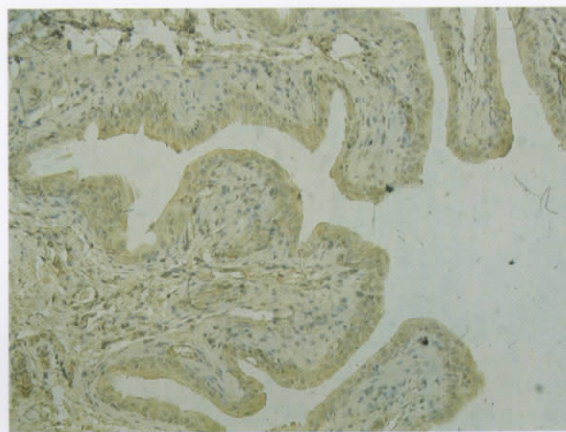


图10 模型组膀胱组织胶原Ⅲ表达



图11 坦索罗辛组膀胱组织胶原Ⅲ表达

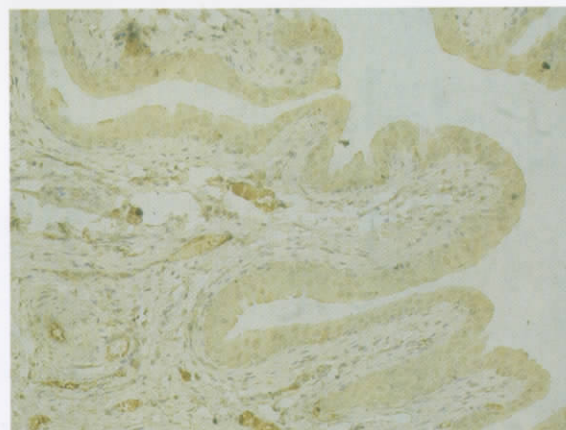


图12 补肾活血方组膀胱组织胶原Ⅲ表达