

# 黄酮哌酯对前列腺增生模型大鼠的保护作用机制研究<sup>Δ</sup>

杜丽芬\*, 陈镜楼<sup>#</sup>(华中科技大学同济医学院附属普爱医院药学部, 武汉 430033)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4357-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.11

**摘要** 目的:研究黄酮哌酯对前列腺增生(BPH)模型大鼠的保护作用机制。方法:将大鼠随机分为假手术组、模型组和黄酮哌酯高、低剂量组(80、40 mg/kg),每组8只。除假手术组外,其余各组大鼠通过去势和注射丙酸睾酮复制BPH模型,丙酸睾酮注射1 h后每组大鼠ig相应药物,每日1次,连续4周。末次给药后,考察前列腺指数;采用天狼星红和Masson染色检测前列腺胶原沉积;免疫组化检测前列腺I型胶原、纤维连接蛋白(FN)和上皮钙黏着蛋白(E-cadherin)的表达;酶联免疫吸附法检测前列腺组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、丙二醛(MDA)、表皮生长因子(EGF)和血管内皮生长因子(VEGF)的水平;实时荧光定量聚合酶链反应法检测微小RNA21(miR-21)和转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠前列腺胶原沉积增多,前列腺指数、FN表达、MDA含量和VEGF、EGF、miR-21、TGF- $\beta_1$ 水平均升高( $P < 0.05$ ),E-cadherin表达、SOD和GPx活力均降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较,黄酮哌酯高、低剂量组大鼠前列腺胶原沉积减少,前列腺指数、FN表达、MDA含量和VEGF、EGF、miR-21、TGF- $\beta_1$ 水平均降低( $P < 0.05$ ),E-cadherin表达、SOD和GPx活力均升高( $P < 0.05$ )。结论:黄酮哌酯抗BPH的机制可能与下调miR-21和TGF- $\beta_1$ 表达,抑制氧化应激和血管生成,改善上皮-间质转化有关。

**关键词** 黄酮哌酯;前列腺增生;氧化应激;血管生成;上皮-间质转化;大鼠

## Study on the Protective Mechanism of Flavoxate on Prostatic Hyperplasia in Model Rats

DU Lifan, CHEN Jinglou (Dept. of Pharmacy, Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430033, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the protective mechanism of flavoxate on prostatic hyperplasia in model rats. METHODS: The rats were randomly divided into sham operation group, model group and flavoxate high-dose and low-dose groups (80, 40 mg/kg), with 8 rats in each group. Except for sham operation group, those groups were emasculated and given sterandryl to induce BPH model. They were given relevant medicine intragastrically 1 h after administration of sterandryl, once a day, for consecutive 4 weeks. Sirius red and Masson staining were used to detect the precipitation of collagen in prostate; immunohistochemistry was used to detect the expressions of prostatic type I collagen, FN and E-cadherin; ELISA assay was used to determine the levels of SOD, GPx, MDA, EGF and VEGF in prostate. qPCR assay was used to detect the levels of miR-21 and TGF- $\beta_1$ . RESULTS: Compared with the sham operation group, the prostatic collagen was accumulated; prostatic index, the expression of FN, MDA content and levels of VEGF, EGF, miR-21 and TGF- $\beta_1$  were increased ( $P < 0.05$ ); the expression of E-cadherin, and the activity of SOD and GPx were decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the precipitation of prostatic collagen was decreased; prostatic index, the expression of FN, MDA content, the levels of VEGF, EGF, miR-21 and TGF- $\beta_1$  were decreased in flavoxate high-dose and low-dose groups ( $P < 0.05$ ); while the expression of E-cadherin and the activity of SOD and GPx were increased ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: Flavoxate can inhibit BPH, the mechanism of which may associated with down-regulating the expressions of miR-21 and TGF- $\beta_1$ , inhibiting oxidative stress and angiogenesis and improving epithelial-mesenchymal transition.

**KEYWORDS** Flavoxate; Benign prostatic hyperplasia; Oxidative stress; Angiogenesis; Epithelial-mesenchymal transition; Rats

下尿路症状(Lower urinary tract symptoms, LUTS)在男性常见,其发病率正快速上升,20~80岁的男性发病率约为20%、80岁以上男性发病率约为70%,其最主要的诱因则是良性前列腺增生(Benign prostatic hyperplasia, BPH)<sup>[1]</sup>。BPH发病时前列腺局部环境的慢性炎症易诱导组织发生纤维化病变,被认为是BPH导致LUTS形成的核心关键<sup>[2-3]</sup>。主流的抗BPH药物包括 $\alpha$ 受体阻滞药和5 $\alpha$ -还原酶抑制剂(5 $\alpha$ -reductase inhibitors, 5 $\alpha$ -RIs)等,但是老年患者使用 $\alpha$ 受体阻滞药容易引发体位性低血压,5 $\alpha$ -RIs则会导致患者性欲降低和勃起功能障碍等<sup>[4]</sup>;更重要的是, $\alpha$ 受体阻滞药和5 $\alpha$ -RIs长期使用存在因胶原沉积导致的前列腺纤维化变性的风险<sup>[1]</sup>。黄酮哌酯是一种

<sup>Δ</sup> 基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(No.2015CFB250);武汉市中青年医学骨干人才培养工程(武卫生计生通[2015]9号)

\* 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:027-68831324。E-mail: shanghuchuan@126.com

<sup>#</sup> 通信作者:主管药师,博士。研究方向:黄酮在泌尿生殖系统中的作用研究。电话:027-68831991。E-mail: jinglouchen@126.com

不同于 $\alpha$ 受体阻滞药和5 $\alpha$ -RIs的药物,收录于2015年版《中国药典》(二部)<sup>[5]</sup>。黄酮哌酯具有抑制腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶、拮抗钙离子以及弱的抗毒蕈碱作用,在临床上用于缓解LUTS症状和抑制BPH<sup>[6-7]</sup>。本研究拟探讨黄酮哌酯对BPH模型大鼠的影响和作用机制。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

BA310显微镜(福建省厦门市麦克奥迪事业有限公司);ABI Stepone Plus实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)仪(美国应用生物系统公司);3K15离心机(德国Sigma公司,离心半径:8.2 cm)。

#### 1.2 药品与试剂

盐酸黄酮哌酯片(深圳海王药业有限公司,批号:20150301,规格:每片0.2 g);丙酸睾酮注射液(天津金耀药业有限公司,批号:1508221,规格:1 ml:25 mg);天狼星红染色剂(湖北百奥斯生物科技有限公司);Masson染色剂(珠海贝索生物技术有限公司);免疫组化试剂盒(丹麦Dako公司);超氧化物歧化酶

(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和丙二醛(MDA)测试盒(南京建成生物工程研究所);表皮生长因子(EGF)和血管内皮生长因子(VEGF)酶联免疫吸附(ELISA)测试盒(武汉博士德生物有限公司);其余试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

SPF级SD大鼠,♂,体质量(200±20)g,6周龄,购于华中科技大学实验动物中心,合格证号为SCXK(鄂)2010-0009。实验大鼠于温度为(22±3)℃、湿度为(50±10)%、昼夜节律(12h光照:12h黑暗)的环境下饲养,自由饮食。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组与给药

取大鼠手术切除双侧睾丸去势,手术1周后,将大鼠随机分为模型组和黄酮哌酯高、低剂量组(80、40 mg/kg),每组8只;另取8只大鼠行假手术(切开腹部后随即缝合)作为假手术组。模型组和给药组大鼠每天ih 10 mg/kg的丙酸睾酮(溶于橄榄油)诱导BPH模型,假手术组大鼠ih等体积的橄榄油<sup>[8]</sup>。每日注射1h后,给药组大鼠分别ig相应剂量的黄酮哌酯[其中高剂量是按照黄酮哌酯临床常用口服日剂量(0.8 g/70 kg)通过体表面积换算法换算而得],模型组和正常组大鼠ig等体积的生理盐水,均连续给药4周。

### 2.2 前列腺指数的检测

给药4周后,处死大鼠,分离前列腺组织,称质量后计算前列腺指数:前列腺指数=前列腺质量(mg)/大鼠体质量(g)。

### 2.3 前列腺病理学观察

取部分前列腺,石蜡包埋、组织切片,通过天狼星红和Masson染色后镜下观察前列腺组织胶原沉积情况。

### 2.4 免疫组化检测

取部分前列腺组织,通过免疫组化法检测前列腺I型胶原、纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)和上皮钙黏着蛋白(E-cadherin)表达。

### 2.5 前列腺氧化应激、血管生成水平检测

前列腺氧化应激水平通过检测组织中抗氧化酶SOD和GPx的活力,以及脂质过氧化产物MDA的水平来评价。前列腺血管生成情况通过ELISA法检测组织中EGF和VEGF水平来评价。取各组大鼠前列腺组织用冰冷的生理盐水制备成10%的组织匀浆,然后根据各试剂盒说明书操作步骤检测相应指标。

### 2.6 前列腺微小RNA(miR)-21和转化生长因子(TGF)-β<sub>1</sub>水平检测

取新鲜前列腺组织提取总RNA,进行逆转录合成cDNA。20 μl的逆转录体系包括1 μg的总RNA、12.5 μl的混合引物、0.5 μl的RNA酶抑制剂、2 μl的dNTPs和1 μl的逆转录酶,双蒸水定容;逆转录参数为35℃×10 min、42℃×60 min和70℃×10 min。随后20 μl的qPCR反应体系包括5 μl的cDNA、10 μl的qPCR混合液、0.4 μl的上游引物和下游引物,双蒸水定容;反应参数为95℃反应10 min后进行40个循环,循环条件为95℃×10 s、60℃×20 s和72℃×20 s。相对表达量通过2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法(C<sub>t</sub>为目标扩增产物达到设定阈值所需的循环数)计算,以假手术组表达水平归一。各引物由Primer 5.0软件设计,其中miR-21(92 bp)的上游引物为5'-GGGGCCTAGCTTATCAGACTGA-3'、下游引物为5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'、逆转录引物为5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-TTCGCACTGGATACGACTCAACA-3',内参为U6(85 bp);TGF-β<sub>1</sub>(219 bp)上游引物为5'-TATAGCAACAATTCCTGGC-GTTACCT-3'、下游引物为5'-GTCACCTCGACGTTTGGGACTGA-3',内参为磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH, 201 bp)。

### 2.7 统计学方法

采用SPSS 11.5软件对数据进行方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 前列腺指数变化

与假手术组[(1.00±0.14) mg/g]比较,模型组大鼠前列腺指数[(1.96±0.21) mg/g]明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,黄酮哌酯高、低剂量组大鼠前列腺指数[(1.31±0.11)、(1.55±0.14) mg/g]明显降低( $P < 0.05$ )。

### 3.2 前列腺组织胶原沉积情况

前列腺组织胶原沉积情况通过天狼星红和Masson染色,以及免疫组化检测组织I型胶原表达来综合评价。与假手术组比较,模型组大鼠前列腺组织胶原沉积增多,I型胶原表达增强。与模型组比较,黄酮哌酯低、高剂量组大鼠前列腺组织胶原沉积减少,I型胶原表达减弱。这表明黄酮哌酯有效地减轻了前列腺组织的胶原沉积和I型胶原的表达。各组大鼠前列腺切片的天狼星红、Masson染色图见图1,I型胶原表达的免疫组化图见图2。

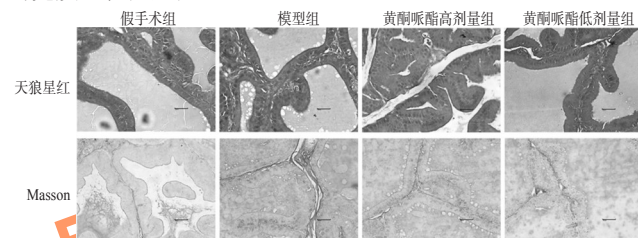


图1 各组大鼠前列腺切片的天狼星红、Masson染色图(×400)

Fig 1 Sirius red and masson staining of prostatic sections of rats in each group(×400)

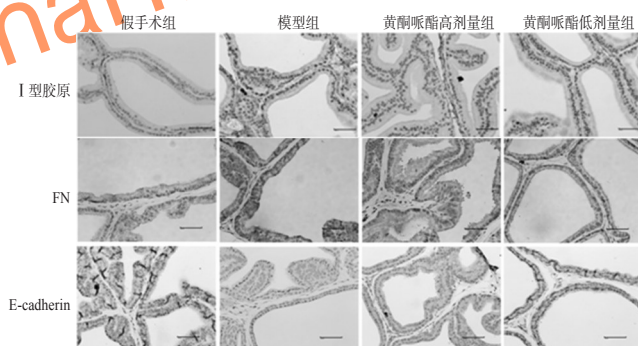


图2 各组大鼠前列腺中I型胶原、FN和E-cadherin表达的免疫组化图(×400)

Fig 2 Immunohistochemistry plot for type I collagen, FN and E-cadherin in prostate of rats in each group(×400)

### 3.3 前列腺中E-cadherin和FN表达情况

大鼠前列腺上皮-间质转换(EMT)通过免疫组化检测EMT特征性事件上皮标记物E-cadherin的缺失情况和间质标记物FN的过表达现象来评价。与假手术组比较,模型组大鼠前列腺中E-cadherin表达明显缺失, FN呈现过表达。与模型组比较,黄酮哌酯低、高剂量组大鼠前列腺中E-cadherin表达明显增加, FN的过表达被抑制。各组大鼠前列腺中E-cadherin和FN表达的免疫组化图见图2。

### 3.4 前列腺氧化应激和血管生成情况

与假手术组比较,模型组大鼠前列腺组织中的SOD和GPx活力均明显降低,MDA含量和VEGF、EGF水平均升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,黄酮哌酯低、高剂量组大鼠前列腺

组织中的SOD和GPx活力均升高,MDA含量和VEGF、EGF水平均降低( $P < 0.05$ )。各组大鼠前列腺中SOD、GPx、MDA、VEGF、EGF水平的检测结果见表1。

表1 各组大鼠前列腺中SOD、GPx、MDA、VEGF、EGF水平的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 1 The levels of SOD, GPx, MDA, VEGF, EGF in prostate of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	SOD,U/mg	GPx,U/mg	MDA,nmol/mg	VEGF,pg/ml	EGF,pg/ml
假手术组	79.41±7.08	104.44±17.35	7.01±1.20	35.21±4.84	66.68±8.00
模型组	31.94±7.71*	37.40±6.43*	17.14±1.48*	84.32±9.77*	190.89±10.25*
黄酮哌酯低剂量组	42.76±6.04*	59.05±8.25*	15.00±1.14*	67.60±5.91*	124.88±10.20*
黄酮哌酯高剂量组	60.25±7.28*	70.38±9.30*	12.35±1.22*	56.36±6.24*	98.49±10.84*

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note:vs. sham operation group,\* $P < 0.05$ ;vs. model group,# $P < 0.05$

### 3.5 前列腺中miR-21和TGF- $\beta_1$ 水平变化

与假手术组比较,模型组大鼠前列腺组织中miR-21和TGF- $\beta_1$ 水平升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,黄酮哌酯低、高剂量组大鼠前列腺组织中miR-21和TGF- $\beta_1$ 水平降低( $P < 0.05$ )。各组大鼠前列腺中miRNA-21和TGF- $\beta_1$ 水平的检测结果见表2。

表2 各组大鼠前列腺中miRNA-21和TGF- $\beta_1$ 水平的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 2 The levels of miR-21 and TGF- $\beta_1$  in prostate of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	miR-21/U6	TGF- $\beta_1$ /GAPDH
假手术组	1.00±0.16	1.00±0.13
模型组	4.34±0.87*	1.36±0.10*
黄酮哌酯低剂量组	3.07±0.59*	1.23±0.11*
黄酮哌酯高剂量组	2.04±0.47*	1.10±0.08*

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note:vs. sham operation group,\* $P < 0.05$ ;vs. model group,# $P < 0.05$

## 4 讨论

BPH是一种常见的男性疾病,发病率随年龄递增而升高。黄酮哌酯是一种不同于5 $\alpha$ -RIS和 $\alpha$ 受体阻滞剂的治疗药物,随机对照临床研究显示连续4周的黄酮哌酯治疗BPH的有效率为82.1%,且其在改善前列腺症状方面的效果与 $\alpha$ 受体阻滞剂特拉唑嗪差异无统计学意义<sup>[7]</sup>。

近年来研究显示,前列腺疾病与多种生长因子的异常表达有关,包括VEGF和EGF等,其同为BPH时促进前列腺间质和上皮细胞增生的关键因子<sup>[9]</sup>。其中VEGF是最强力的促血管生成因子之一,BPH作为一种实体瘤已经证实其生长与转移依赖于新生血管的产生,VEGF在BPH中的表达明显比在正常前列腺细胞中的表达高;而EGF作为一种前列腺上皮细胞有丝分裂的促进调节子,在体内和体外试验中均被证实能够有力地促进VEGF的表达<sup>[9]</sup>。另一方面,BPH患者常带有氧化应激特征,其体内抗氧化酶SOD等的活力被抑制而MDA含量显著增加,使氧化-抗氧化平衡态被打破<sup>[10]</sup>。EMT是一种上皮细胞向间质细胞转化的现象,是纤维化进程的核心关键之一,以上皮标记物E-cadherin等的表达缺失和间质标记物FN等的表达增多为特征<sup>[11]</sup>。有证据表明,BPH的发生受到前列腺细胞外基质沉积和EMT的共同调控,胶原蛋白和FN等的表达量与BPH密切相关<sup>[12]</sup>。当机体处于氧化应激状态时,将促进EMT的发生<sup>[13]</sup>。miR作为表观遗传调控的重要组成部分通常由21~24个核苷酸组成,是一种短链非编码单链RNA,参与细胞发育、增生、凋亡等生理过程。其中miR-21具有参与TGF- $\beta_1$ 介导EMT调控过程的功能。当TGF- $\beta_1$ 表达增强时,miR-21将显著活跃并明显促进EMT发生<sup>[14]</sup>。

综上所述,本文通过检测前列腺组织氧化应激水平指标

SOD、GPx和MDA,血管生成调节因子EGF和VEGF,EMT标记物E-cadherin和FN,以及miR-21和TGF- $\beta_1$ 的水平,探索黄酮哌酯可能的药理作用机制。研究结果表明,黄酮哌酯能够有效改善丙酸睾酮诱导的大鼠BPH,其作用机制与调控miR-21和TGF- $\beta_1$ 表达,抑制氧化应激和血管生成,改善EMT有关。该生理活性很有可能是黄酮哌酯改善BPH患者LUTS症状的机制之一,更具体、确切的作用机制探讨将在下一步的研究中深入展开。

## 参考文献

- [1] Bauman TM, Nicholson TM, Abler LL, et al. Characterization of fibrillar collagens and extracellular matrix of glandular benign prostatic hyperplasia nodules[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e109 102.
- [2] Wong L, Hutson PR, Bushman W. Prostatic inflammation induces fibrosis in mouse model of chronic bacterial infection[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e100 770.
- [3] 陈鸿杰,王民三.慢性前列腺炎前列腺组织纤维化的研究进展[J].中国医师进修杂志,2014,37(26):72.
- [4] Ali MI, Kondreddi HD, Veeresh B. Protective effect of 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid on testosterone induced benign prostatic hyperplasia in Wister rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1/2/3):397.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1 070-1 072.
- [6] 潘锋君,吴小芬.坦洛新联合黄酮哌酯治疗良性前列腺增生症的疗效观察[J].海峡药学,2013,25(6):63.
- [7] 陈剑文.特拉唑嗪片治疗良性前列腺增生症的临床观察[J].数理医药学杂志,2011,24(4):414.
- [8] Wei H, Wu G, Shi D, et al. Total flavan glycoside from *Abacopteris penangiana* rhizomes and its acid hydrolysate: characterisation and anti-benign prostatic hyperplasia potential[J]. *Food Chem*, 2012, 134(4):1 959.
- [9] Yu HS, Wang SW, Chang AC, et al. Bradykinin promotes vascular endothelial growth factor expression and increases angiogenesis in human prostate cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(2):243.
- [10] Li YF, Tang LP, He RR, et al. Anthocyanins extract from bilberry enhances the therapeutic effect of pollen *Brassica napus* L. on stress-provoked benign prostatic hyperplasia in restrained mice[J]. *J Funct Foods*, 2013, 5(3):1 357.
- [11] 李星霞,李婕,王绍展,等.木犀草素对肝纤维化进程中肝细胞上皮间质转化的抑制作用[J].中国药房,2014,25(19):1 729.
- [12] 陈其华,刘慧,凌智,等.前癉通对前列腺间质细胞Fibronectin和CollagenIV基因表达的影响[J].中医学报,2015,30(204):719.
- [13] Park SA, Kim MJ, Park SY, et al. EW-7197 inhibits hepatic, renal, and pulmonary fibrosis by blocking TGF- $\beta$ /Smad and ROS signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(10):2 023.
- [14] Zhao X, Lu Y, Nie Y, et al. MicroRNAs as critical regulators involved in regulating epithelial-mesenchymal transition[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9):935.

(收稿日期:2016-01-29 修回日期:2016-04-25)

(编辑:邹丽娟)