

● 论 著 ●

前癥通胶囊对人前列腺组织 bcl-2、bax 表达的影响

蔡蔚¹ 袁轶峰¹ 贺菊乔¹ 伍参荣²

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

摘要:目的:检测前癥通对前列腺组织 bcl-2、bax 表达的影响。方法:(1)免疫组化法检测前癥通对体外培养 BPH 患者前列腺组织 bcl-2、bax 蛋白表达的影响。(2)RT-PCR 法检测前癥通对体外培养 BPH 患者前列腺组织块细胞 bcl-2 mRNA、bax mRNA 基因表达的影响。结果:前癥通高、中剂量组对前列腺组织 bcl-2 蛋白、bcl-2 mRNA 基因的表达有不同程度的抑制作用,对 bax 蛋白、bax mRNA 基因的表达有不同程度的增强作用。结论:前癥通对前列腺组织能抑制 bcl-2 的基因表达,增强 bax 的基因表达,从而抑制前列腺增生。

关键词:良性前列腺增生症;前癥通胶囊;前列腺组织;bcl-2;bax

Abstract:Objective:To explore the influence of Qian-long-tong capsule on the expressions of bax, bcl-2 in prostatic tissue. Methods:(1)Immunity histochemistry analysis was used to explore the influence of Qian-long-tong capsule on the expressions of bcl-2 protein and bax protein in prostatic tissue mass.(2)RT-PCR was used to examine the effect of Qian-long-tong capsule on expressions of bcl-2 mRNA gene and bax mRNA gene.Results:During high and medium dose groups of Qian-long-tong capsule,there were different degree of inhibitory action on the expressions of bcl-2 protein and bcl-2 mRNA gene, while enhancement action on the expression of bax protein and bax mRNA gene.Conclusion:Qian-long-tong capsule can inhibit the expression of bcl-2 gene, enhance the expression of bax gene thus inhibit the hyperplasia of prostate tissue.

Key words:Benign Prostate Hyperplasia (BPH);Qian-long-tong capsule;Prostatic tissue mass;bcl-2 gene;bax gene

中图分类号:R 697.3

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2011.01.001

前癥通胶囊是我们根据气虚血瘀理论,临床应用多年治疗良性前列腺增生症(BPH)的经验方,在多年的临床运用中取得了较好的疗效。本研究旨在前期工作的基础上,借助现代分子生物学技术,进一步探讨前癥通胶囊对 BPH 患者体外培养前列腺组织细胞 bcl-2、bax 表达的影响,为前癥通胶囊的疗效评价进一步提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 前列腺组织的培养 在手术室无菌条件下,经耻骨上前列腺摘除术切除的新鲜前列腺标本迅速放入在 4℃冰箱中预冷的组织洗涤液内,冰浴状态下带回实验室。在 2 h 内开始组织消化。参照文献^[1-2],经前列腺组织处理、培养液润洗、接种,逐日观察培养组织,至组织块之间的细胞互相融合,即可直接用于实验研究。

1.2 实验药物及分组

1.2.1 实验药物及制备 前癥通胶囊:由黄芪、丹参、三七、穿山甲、王不留行等药物组成,由湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供,批号 000605,每粒 0.5 g(含生药 0.5 g)。取前癥通胶囊 50 g,加入 Hank's 液溶解,用组织培养液配制成 1 g/mL,1 500 rpm 离心去除沉淀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌,4℃保存备用。他莫昔芬(口服片):由山东健康药业有限公司生产,批号:1210016,10 mg/片。取他莫昔芬 20 g,用 Hank's 液溶解,用组织培养液稀释配制成 1 ng/mL,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌,4℃保存备用。

1.2.2 药物对培养组织的毒作用 取上述制备好的前癥通胶囊药液,用 1 640 培养液几何比稀释成 25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78 mg/L 浓度,生物光学倒置显微镜下观察前癥通胶囊对培养的前列腺组织的毒性作用。结果 6.25、3.13、1.56 mg/L 组对细胞的毒性作用小于制定标准,因此选择作为试验用药浓度。

1.2.3 实验分组 依据上述实验结果,选择形态良好、长满单层的组织培养物随机分为:模型对照组(即空白组)、他莫昔芬组、前癥通高剂量组(6.25 mg/L)、前癥通中剂量组(3.13 mg/L)和前癥通低剂量组(1.56 mg/L)。

1.3 SABC 法检测各组 bcl-2、bax 蛋白表达

1.3.1 实验材料 (1)bcl-2 试剂盒(湖南丽欣生物公司);(2)bax 试剂盒(湖南丽欣生物公司);(3)DAB 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);(4)即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);(5)鼠抗人 bcl-2 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);(6)鼠抗人 bax 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);(7)山羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司);(8)PBS(湖南丽欣生物公司)。

1.3.2 实验方法 (1)载玻片防脱片处理:选择 APES,捞片后置烤箱 60℃30~60 min 以使切片紧密粘附。(2)切片脱蜡至水,30% H_2O_2 1 份+蒸馏水 10 份混合,室温 5~10 min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次。(3)微波修复抗原:将切片浸入 0.01 M 枸橼

酸盐缓冲液,PH 6.0,电炉或微波炉加热至沸腾后断电,间隔 5~10 min,重复 1~2 次,冷却后进行下一步。(4)滴加山羊血清封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,不洗。(5)滴加鼠抗 bcl-2 抗体,37℃ 1~2 h。PBS(PH 7.2~7.6)洗 2 min× 3 次。(6)滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20~37℃ 20 min,PBS(PH 7.2~7.6)洗 2 min× 3 次。(7)滴加试剂 SABC,20~37℃ 20 min,PBS(PH 7.2~7.6)洗 5 min× 4 次。(8)DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒。取 1 mL 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片。室温显色,镜下控制反应时间,一般 5~30 min,蒸馏水洗涤。(9)苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。显微镜观察。观察方法:在 10× 40 倍视野下随机计数 5 个视野的 bcl-2 阳性细胞数(棕黄色颗粒),取其均值。bax 具体操作步骤同 bcl-2。

1.4 RT-PCR 法测定各组 bcl-2 mRNA、bax mRNA 基因表达

1.4.1 主要试剂 (1)Trizol 试剂盒:上海生工生物工程技术有限公司提供。(2)β-actin、bcl-2、bax 引物:由上海生工生物工程技术有限公司合成。(3)逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒:上海生工生物工程技术有限公司提供。

1.4.2 主要仪器 (1)PCR 基因扩增仪:TC-48/T/H(a) 杭州大和株式会社;(2) 天能凝胶成像系统(Tanon GISgel in aging system):上海天能生物有限公司;(3)TGL16 台式高速冷冻离心机:湖南湘仪;(4)电泳仪:杭州大和株式会社。

1.4.3 β-actin、Bcl-2 和 Bax 引物序列 β-actin mRNA:sense:5'-TTGGCACCACACTTTCTACA-3'; antisense:5'-TCACGCACGATTTCCCTCTCA-3'; 扩增片段长度 442 bp。β-actin 作为“看家基因”监控 RNA 使用量,以消除不同样本间加样误差。Bcl-2 mRNA:sense:5'-CCATGTGTCCATCTGACC-3'; antisense:5'-GCCATATAGTTCCACAAA-3'; 扩增片段长度 330 bp。Bax mRNA:sense:5'-CTAGCA AACTGGTGCTCAAGG-3'; antisense:5'-CGAAGT AGGAGAGGAGGCCT-3'; 扩增片段长度 147 bp。

1.4.4 总 RNA 的提取 参考文献^[3]。(1)取 10 mg 低温保存的前列腺组织块加 1 mL 酚和异硫氰酸胍的均相溶液(Trizol),机械匀浆,吹打混匀;(2)将匀浆液转至 1.5 mL 灭菌管中,室温静置 15 min;(3)加入 0.2 mL 氯仿,轻摇震荡 15 s,室温静置 2 min;(4)4℃、12 000 rpm 离心 15 min,取上清;(5)将上清水相(约 1 mL)移入新的 EP 管,加入异丙醇 0.5 mL,将

管内液体轻轻混匀,室温静置 10 min;(6)4℃、12 000 rpm 离心 10 min,倾倒弃上清;(7)加入 75%乙醇 1 mL,清洗 EP 管,吹打混匀,4℃、7 500 rpm 离心 5 min,弃上清,重复 1 次;(8)所得 RNA 用紫外分光光度法定量,并于-70℃保存备用。

1.4.5 PCR 扩增 50 mL 反应体系中含有 2× RT-PCR Buffer 25 μL,模板 RNA X μL(含量为 1 μg),β-actin、bcl-2 和 bax 上下游引物各 1 μL,RT/Taq Mix 1 μL,其余体积为 DEPC 水。循环参数:(1)β-actin 为 94℃ 2 min,94℃ 50 s,55℃ 50 s,72℃ 1 min,35 个循环,72℃ 5 min;(2)bcl-2 为 94℃ 2 min,94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环,72℃ 5 min;(3)bax 为 94℃ 2 min,94℃ 30 s,59℃ 45 s,72℃ 45 s,30 个循环,72℃ 5 min。以上均采用热启动方式,预变性后,于 72℃ 条件下加入 Taq DNA 聚合酶。

1.4.6 PCR 产物电泳鉴定 RT-PCR 后的 DNA 产物加入染料后离心 1 000 rpm× 30 s,充分振荡,取 10 μL 于 115% 琼脂糖凝胶电泳,100 V,1 h,EB 染色,紫外灯下拍照。

1.4.7 图像分析 采用天能凝胶成像系统测定 PCR 产物电泳密度。各基因 mRNA 表达强度以其 PCR 产物电泳密度值与看家基因 β-actin 的比值(bcl-2/β-actin、bax/β-actin)来表示。

1.5 统计方法 结果以均数± 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 q 检验(用 SPSS 软件统计分析)。

2 结果

2.1 各组 bcl-2 蛋白表达的结果 他莫昔芬组和前癌通高、中剂量组对 bcl-2 蛋白的表达有不同程度的抑制作用,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),低剂量组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);高、中剂量组与他莫昔芬组比较,无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 免疫组化法检测 bcl-2 蛋白表达的指数 ($\bar{X} \pm S$)		
组别	n	bcl-2
模型组	5	11.60± 2.07
他莫昔芬组	5	9.20± 1.48°
低剂量组	5	10.40± 1.52*▲
中剂量组	5	8.80± 0.84°▲☆
高剂量组	5	7.80± 1.79△▲★

注:与模型组比较:° $P < 0.05$,* $P > 0.05$,△ $P < 0.01$;与他莫昔芬组比较:▲ $P > 0.05$;与低剂量组比较:☆ $P > 0.05$,★ $P < 0.05$;与中剂量组比较:△ $P > 0.05$ 。

2.2 各组 bax 蛋白表达的结果 他莫昔芬组和前癌通高、中剂量组对 bax 蛋白的表达有不同程度的增强作用,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),低剂量组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);高剂量组与他莫昔芬组比较,差异无统

实用中西医结合临床 2011 年 1 月第 11 卷第 1 期
计学意义 ($P>0.05$), 与中剂量组比较有统计学意义 ($P<0.05$)。结果见表 2。

表 2 免疫组化法检测 bax 蛋白表达的指数 ($\bar{X} \pm S$)		
组别	n	bax
模型组	5	9.20± 0.84
他莫昔芬组	5	13.80± 1.48 [▲]
低剂量组	5	10.60± 0.55 [°] *
中剂量组	5	11.20± 1.48 [▲] **
高剂量组	5	13.00± 0.71 [▲] △□■

注: 与模型组比较: [▲] $P<0.01$, [°] $P>0.05$; 与他莫昔芬组比较: * $P<0.01$, ** $P>0.05$; 与低剂量组比较: [°] $P>0.05$, [■] $P<0.01$; 与中剂量组比较: * $P<0.05$ 。

2.3 各组 bcl-2 mRNA 基因表达的结果 他莫昔芬组和前癥通高、中剂量组对 bcl-2 mRNA 的表达有不同程度的抑制作用, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$ 、 $P<0.05$), 低剂量组与模型组比较, 对 bcl-2 mRNA 作用不明显, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 高、中剂量组与他莫昔芬组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果见表 3。

表 3 前癥通对前列腺组织 bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{X} \pm S$)		
组别	n	bcl-2 mRNA
模型组	5	17.46± 3.18 ^{△△■}
他莫昔芬组	5	13.35± 2.64 ^{**}
低剂量组	5	15.74± 4.23
中剂量组	5	14.25± 3.86 ^{*△}
高剂量组	5	12.76± 3.31 ^{**} △ ■

注: 与模型组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与他莫昔芬组比较: [△] $P>0.05$, ^{△△} $P<0.01$; 与低剂量组比较: [°] $P>0.05$, [■] $P<0.05$ 。

2.4 各组 bax mRNA 基因表达的结果 他莫昔芬组和前癥通高、中剂量组对 bax mRNA 的表达有不同程度的增强作用, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$), 低剂量组与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 高剂量组与他莫昔芬组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 与低剂量组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结果见表 4。

表 4 前癥通对前列腺组织细胞 bax mRNA 表达的影响 ($\bar{X} \pm S$)		
组别	n	bax mRNA
模型组	5	14.12± 2.92 ^{△△■}
他莫昔芬组	5	17.85± 3.51 ^{**}
低剂量组	5	15.43± 2.13 [△]
中剂量组	5	17.42± 4.22 ^{**} △■
高剂量组	5	18.82± 3.58 ^{***} △■

注: 与模型组比较: * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$; 与他莫昔芬组比较: [△] $P>0.05$, ^{△△} $P<0.05$; 与低剂量组比较: [°] $P>0.05$, [■] $P<0.05$ 。

3 讨论

前癥通胶囊是我们临床应用多年治疗良性前列腺增生的经验方, 具有益气利水、活血散结之功效。经临床应用证实^[4], 该药疗效确切, 实验研究显示, 该药对大鼠前列腺基底细胞凋亡有影响。本实验通过观察该药对 BPH 患者体外培养前列腺组织 bcl-2、bax 表达的影响, 进一步从细胞分子水平探讨前癥通胶囊的作用机制。

以往的研究发现增生前列腺组织的细胞凋亡水平明显低于正常前列腺组织, 引起前列腺细胞凋

亡的调控基因有 bcl-2、bax、fax、C-myc、P 53 等。在参与调控细胞凋亡的基因中 bcl-2 蛋白家族是最重要的凋亡调节因子, bcl-2 和 bax 又分别是其中主要的抗凋亡和促凋亡成员。研究表明^[5], bcl-2 基因主要在前列腺基底上皮细胞中表达, 说明前列腺增生时由于 bcl-2 对上皮细胞发挥凋亡作用, 可使前列腺上皮细胞寿命延长, 凋亡数目减少。Colombel 等^[6]通过免疫组化研究发现, bcl-2 表达于前列腺移行带、外周带和中央带的基底上皮细胞, 在 BPH 中强阳性表达。bcl-2 的抗凋亡作用使前列腺基底细胞增殖与凋亡失衡而引起前列腺增生。谢庆祥等^[7]研究表明 BPH 中 bcl-2 异常高表达, 提示 bcl-2 表达增强而导致细胞凋亡的减少在 BPH 的发生过程中起重要作用, 与本研究结果一致。

bax 是一个水溶性蛋白, 与 bcl-2 蛋白大约有 21% 的同源性, 其过量表达可抑制 bcl-2 功能而促进细胞凋亡。研究表明^[8], 前列腺上皮和间质中见 bax 表达, 提示 bax 对上皮和间质细胞凋亡均有调控功能, BPH 上皮细胞 bax 表达减少, 提示其促进上皮细胞凋亡的功能亦降低, 从而导致上皮细胞凋亡减少, 引起上皮细胞聚集、增生, 表明 bax 参与 BPH 的上皮增生形成过程, 而 BPH 间质细胞中 bax 表达与正常者无明显差异, 甚至呈增加趋势, 推测 bax 在 BPH 的间质增生过程中作用并不重要。

本实验结果表明, 前癥通胶囊能抑制体外培养前列腺组织 bcl-2 的蛋白及其基因表达, 同时又能增强 bax 蛋白及其基因的表达, 促进细胞凋亡。其治疗前列腺增生症的机理可能是通过对凋亡因子的调控, 调节 bcl-2 和 bax 基因, 促使细胞凋亡而起作用。

参考文献

[1] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 2001. 35-38
[2] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 兴界图书出版社, 2003. 22-77
[3] 刘文革, 林佳俊, 王锋, 等. RT-PCR 检测 bFGF 对脊髓损伤后 bcl-2、bax 基因的表达式[J]. 福建医科大学学报, 2005, 39(3): 281-283
[4] 蔡蔚, 朱闽, 周青, 等. 前癥通胶囊治疗良性前列腺增生症 36 例临床观察[J]. 中医导报, 2008, 14(6): 74-76
[5] 祝海, 孙小庆, 周荣祥, 等. 凋亡抑制基因 bcl-2 在前列腺组织中的表达[J]. 中华泌尿外科杂志, 2002, 23(5): 301-303
[6] Colombel M, Vacherot F, Diez SG, et al. Zonal variation of apoptosis and protiferation in the mormal prostase and in benign prostatic hyperpla-Sia[J]. Br J urol, 1998, 82: 380-385
[7] 谢庆祥, 汪鸿, 缪友仁, 等. 细胞凋亡相关基因 bcl-2 和 bax 在前列腺增生组织中表达的意义[J]. 中华泌尿外科杂志, 1998, 19(2): 98-100
[8] 邓方明, 顾方六, 夏同礼, 等. 人良性前列腺增生细胞增殖和凋亡状态的研究[J]. 中华外科杂志, 1996, 34(10): 620

(收稿日期: 2010-07-21)