

马尾松花粉提取物对小鼠前列腺肥大的预防作用

马 玉¹, 吕建云¹, 孙丰霞¹, 耿 越^{1*}, 杨长军², 王 桐²

(1. 山东师范大学生命科学学院山东省动物抗性生物学重点实验室, 济南 250014;

2. 烟台新时代健康产业(集团)有限公司, 烟台 264006)

摘 要: **目的** 探究马尾松花粉提取物对小鼠前列腺肥大(benign prostatic hyperplasia, BPH)的影响。**方法** 雄性昆明小鼠随机分为6组, 分别为空白对照组、BPH模型组、20 mg/kg·d 低剂量、40 mg/kg·d 中剂量、80 mg/kg·d 高剂量马尾松花粉提取物组和非那雄胺(0.8 mg/kg·d)组。预先灌胃松花粉提取物2周之后, 在腹腔注射丙酸睾酮建模的同时连续灌胃3种剂量的马尾松花粉提取物或非那雄胺4周。实验结束后, 用试剂盒测定IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、DHT、NO、NOS以及PACP的水平; 另外剖取前列腺和脾脏, 测定前列腺指数和脾脏指数。**结果** 3种剂量的松花粉处理均降低了BPH小鼠的前列腺指数、炎症细胞因子、DHT浓度及PACP、NOS的活性, 并减少了NO的生成。**结论** 马尾松花粉提取物可以明显降低BPH病理症状及相关生化指标, 对BPH起到一定的保护作用, 其作用机制可能与其抗炎抗氧化活性有关。

关键词: 马尾松花粉; 提取物; 良性前列腺肥大; 炎症反应; 氧化应激

Preventive effect of *Pinus massoniana* pollen extract on benign prostate hyperplasia in mice

MA Yu¹, LV Jian-Yun¹, SUN Feng-Xia¹, GENG Yue^{1*}, YANG Chang-Jun², WANG Tong²

(1. Provincial Key Laboratory of Animal Resistant Biology, College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; 2. Yantai New Era Health Industry (Group) Co., Ltd., Yantai 264006, China)

ABSTRACT: Objective To explore the influences of masson pine pollen extract on benign prostate hyperplasia (BPH) in mice. **Methods** Kunming male mice were randomly divided into 6 groups, which were normal control group, BPH model group, 20 mg/kg (low), 40 mg/kg (middle), 80 mg/kg (high) masson pine pollen extract groups and Finasteride group (0.8 mg/kg·d). Mice of 3 pollen groups were intragastrically administrated with pollen extract for 2 weeks in advance. Using testosterone propionate to build the BPH mice model meanwhile pollen extract and finasteride were intragastrically administrated respectively for 4 weeks continuously. At the end of experiment, the prostate gland and spleen were dissected for determination of prostate index (PI) and spleen index (SI), and IL-6, IL-1 β , TNF- α , PACP, DHT, NO, NOS and PACP were measured by test kits. **Results** Three doses of masson pine pollen extract all decreased PI, cytokines, DHT concentration, the activities of PACP and NOS, and reduced the generation of NO. **Conclusion** Masson pine pollen extract can significantly reduce the pathological symptoms and biochemical parameters of BPH so as to protect BPH in some extent, and the mechanism may be related to the inhibition of inflammation and antioxidant activity.

KEY WORDS: masson pine pollen; extract; benign prostatic hyperplasia; inflammatory response; oxidative stress

*通讯作者: 耿越, 教授, 主要研究方向为营养学与食品功能因子。E-mail: gengy@sdnu.edu.cn

*Corresponding author: GENG Yue, Professor, Department of Food Science and Technology, Shandong Normal University, Jinan 250014, China. E-mail: gengy@sdnu.edu.cn

1 引言

前列腺肥大, 又称良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH), 是老年男性的常见疾病, 其发病率随着年龄的增长而增长, 严重影响老年男性的生活质量。在治疗 BPH 的药物中, 首选是 5α -还原酶抑制剂^[1], 如非那雄胺和度他雄胺, 随后是 $\alpha 1$ -肾上腺素受体阻滞剂^[2], 但均存在一定的副作用^[3]。与之相对的天然植物药剂在治疗 BPH 方面有许多显而易见的优势, 如疗效稳定、作用温和持久, 且毒性和不良反应小^[4]。因此, 研究开发高效、无毒副作用的天然药物成为 BPH 的研究热点之一。

20 世纪 80 年代以来, 花粉营养药理学作用研究和作为保健品与药品的开发应用得到迅速发展^[5]。丛涛等^[6]研究发现, 松花粉可以通过调节机体雌、雄两种激素水平, 发挥治疗前列腺增生的作用。杜学志等^[7]研究发现, 花粉还可以改善前列腺组织的血液循环, 减轻水肿并缓解前列腺肥大引起的尿道梗阻。本研究以马尾松花粉提取物作为材料, 对雄性昆明小鼠采用腹腔注射丙酸睾酮法建立小鼠前列腺增生动物模型, 预先灌胃松花粉提取物, 观察对模型小鼠前列腺增生的预防作用, 研究灌胃马尾松花粉提取物对模型小鼠的预防作用, 初步探究其作用机理, 以期为临床治疗提供依据。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

马尾松花粉提取物(masson pine pollen extract, MPPE), 由烟台新时代健康产业(集团)有限公司提供。主要提取步骤: 破壁马尾松花粉(*Pinus massoniana*)加水分散, 超声提取, 离心, 滤液调 pH 为弱酸性, 沉淀去掉蛋白质、鞣质等成分, 过滤后冷冻干燥, 冷藏备用。

4 周龄雄性昆明种小鼠(20 ± 2 g, 购自山东中医药大学 SPF 级动物中心; 非那雄胺(艾世列), 购自杭州康恩贝制药有限公司(L/N:20130201); 丙酸睾酮注射液, 购自上海通用药业股份有限公司(L/N:121203); Elisa 试剂盒(IL-1 β IL-6、TNF- α 、PACP、DHT)、R&D 分装(L/N:201312)、NO/NOS 试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所(L/N:20131215)。

Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2.2 分组设计与方法

小鼠自由饮水饮食, 适应性喂养一周。随机分为 6 组: 空白对照组(Normal control)、前列腺肥大模型组(BPH model)、20 mg/kg·d (Low MPPE)、40 mg/kg·d (Middle MPPE) 和 80 mg/kg·d (High MPPE) 马尾松花粉提取物组以及非那雄胺(Finasteride, 0.8 mg/kg·d)组, 实验周期为 6 周。

实验前 2 周, 3 个松花粉组按体重每日灌胃相应剂量的 MPPE, 其余各组每天灌胃生理盐水, 灌胃量均为 0.2 mL/天。隔天称重, 根据体重随时调节给药剂量。第 3 周开始, 除空白组外, 每组腹腔注射丙酸睾酮 5 mg/kg·d, 空白组每天灌胃生理盐水, 非那雄胺组和松花粉组每天灌胃相应的非那雄胺和 MPPE。

2.3 样品收集与处理

第 6 周末, 取实验小鼠经乙醚麻醉, 摘眼球取血收集于 EP 管中, EP 管室温放置 1 h, 然后在 4 °C 冰箱放置过夜, 第 2 天取出离心, 取上层血清-20 °C 保存, 待测。用 ELISA 试剂盒依次检测血清中的 IL-1 β IL-6、TNF- α 、双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)、NO 和 NOS 以及前列腺酸性磷酸酶(prostatic acid phosphatase PACP)水平。另外, 解剖分离前列腺组织和脾脏后立即称重, 计算前列腺指数(prostate index, PI)和脾脏指数(spleen index, SI)。制作前列腺组织石蜡切片, HE 染色后镜检。

前列腺指数($10 \times \text{mg/g}$) = $10 \times$ 前列腺平均重量(mg)/平均体重(g);

脾脏指数(mg/g) = 脾脏平均重量(mg)/平均体重(g)。

2.4 数据分析

数据用 $\bar{X} \pm S$ 表示, 统计分析使用 SPSS 单因素方差分析, 并进行多重比较。

3 结果与分析

3.1 小鼠前列腺指数和脾脏指数的变化

经过 4 周的丙酸睾酮注射, 模型组动物的 PI 显著增大($P < 0.01$)(见图 1), 表明模型建立成功。非那雄胺处理 4 周后 PI 显著下降, 松花粉也明显地降低了增大的 PI($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 与剂量正相关。另外, 模型组动物的 SI 也有明显增大($P < 0.01$), 3 个剂量的松花粉及非那雄胺处理均可以降低这种增大的趋势。

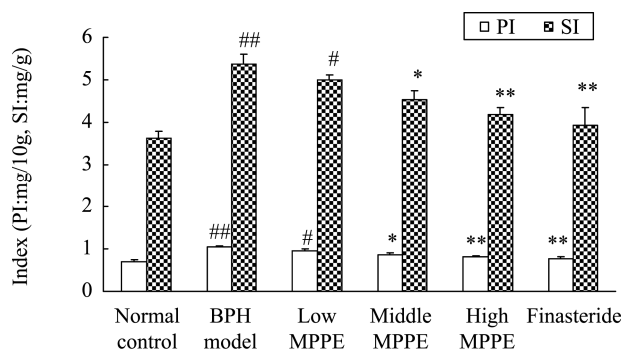


图 1 各组小鼠 PI 及 SI 的变化($n=6$)

Fig. 1 Changes of PI and SI in mice of each group ($n=6$)

注: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 空白组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 模型组

3.2 血清中细胞因子含量(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)测定

与空白组相比, 模型组小鼠血清中的 3 种前炎性细胞因子含量均明显增加(图 2), 3 种剂量的 MPPE 降低程度有一定差异, 总体呈现剂量依赖效应关系。

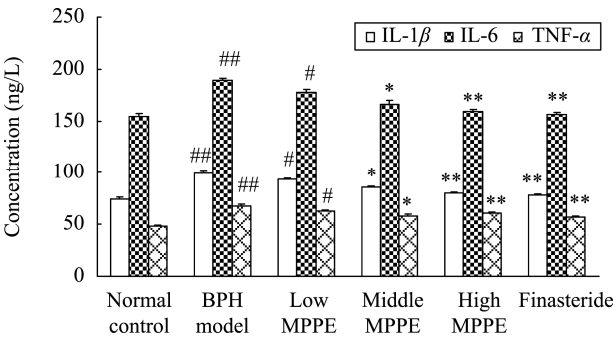


图 2 小鼠血清中细胞因子的含量($n=6$)
Fig. 2 Content of cytokines in mice serum ($n=6$)
注: # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs 空白组; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 模型组

3.3 小鼠前列腺组织形态学检查

小鼠前列腺组织形态学结果见图 3。正常对照组腺泡上皮细胞呈单层, 形状规则、核圆, 排列整齐(见图 3A)。BPH 组小鼠前列腺腺泡形状不规则, 上皮细胞绒毛状突起

到腺泡腔, 形成增生结节。上皮细胞呈柱状, 细胞排列不规则(见图 3B)。20 mg/kg MPPE 组的前列腺增生情况较重, 上皮增生明显(见图 3C), 40 mg/kg(见图 3D)、80 mg/kg(见图 3E) MPPE 组的前列腺增生得到明显改善, Finasteride 组的腺泡结构基本正常(见图 3F)。

3.4 小鼠血清中 DHT 的含量变化

实验结束时, 模型组小鼠血清的 DHT 含量升高($P<0.01$), 见图 4。非那雄胺($P<0.01$)以及中($P<0.05$)、高剂量($P<0.01$)的 MPPE 均降低了血清中 DHT 的含量; 但与模型组相比, 低剂量 MPPE 组 DHT 含量变化不明显, MPPE 的作用有一定的剂量依赖性。

3.5 小鼠前列腺组织中 PACP 活性的变化

如图 5 所示, 与正常小鼠相比, BPH 组($P<0.01$)和低剂量 MPPE 组($P<0.05$)小鼠前列腺组织中的 PACP 活性都显著增加。与低剂量 MPPE 不同的是, 中($P<0.05$)、高剂量($P<0.01$)MPPE 发挥了明显的保护作用, 非那雄胺的保护是最有效的。

3.6 血清中 NO, NOS (iNOS, TNOS)的含量

如图 6 所示, 与空白组相比, 模型组小鼠血清中的 NO 含量显著增加($P<0.01$), 2 种 NOS 的活性同样明显增强。经过 4 周的干预, 非那雄胺起到了显著的效果($P<0.01$), 3 个松花粉组 NO 含量及 NOS 活性也明显降低($P<0.01$), 并且 3 个剂量之间无显著性差异。

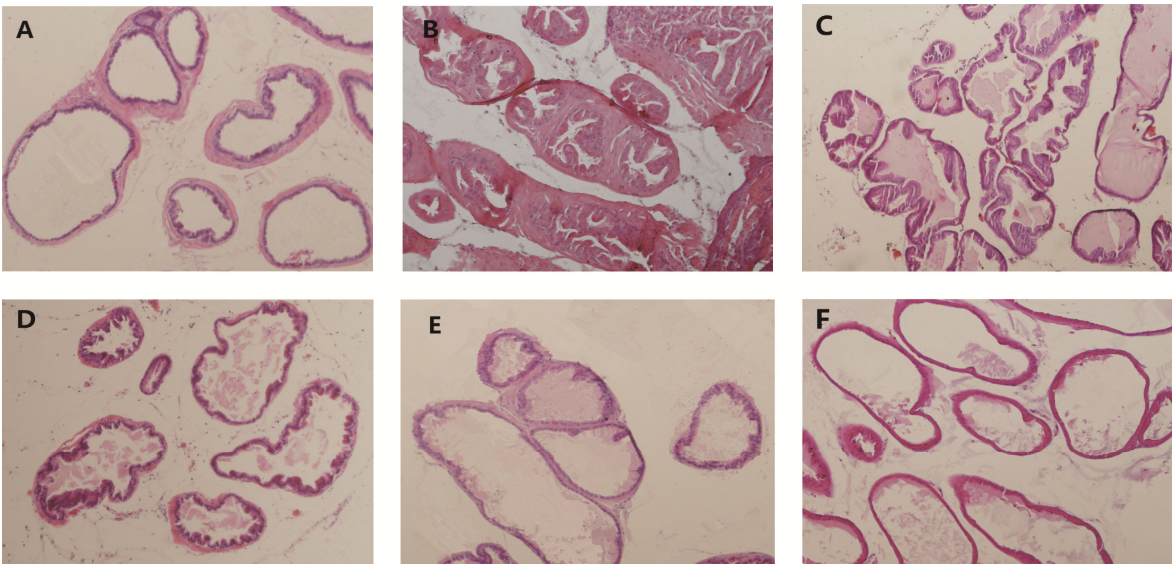
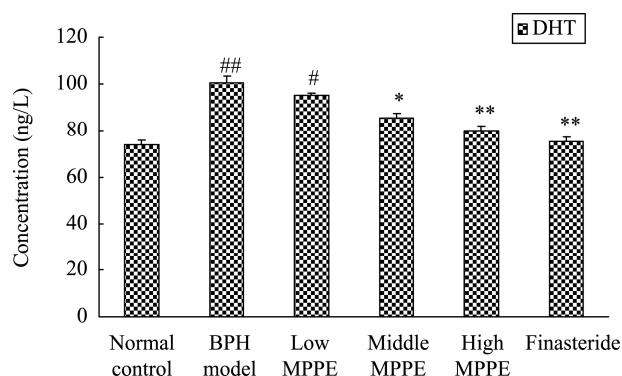
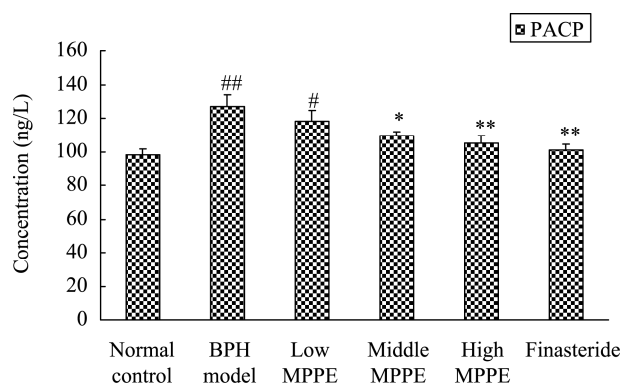
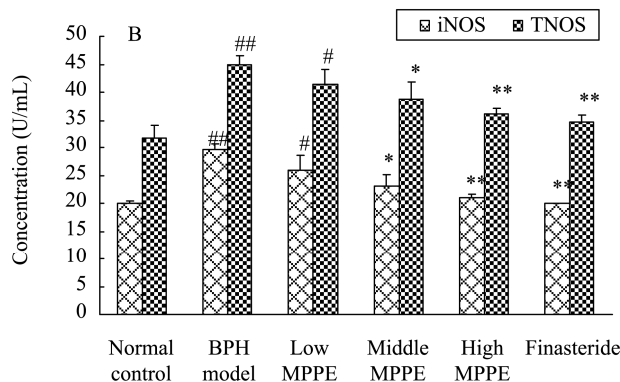
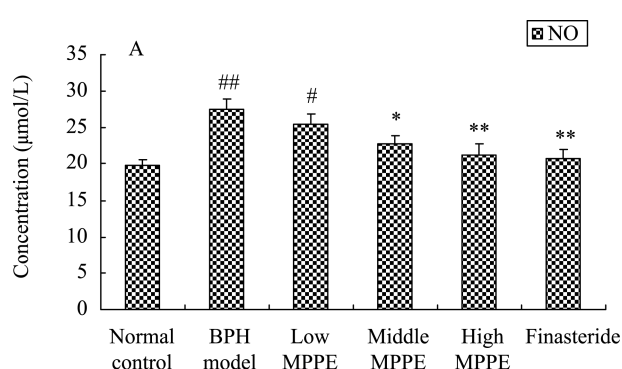


图 3 各组小鼠前列腺组织形态学检查(HE, 200 $\times$)
Fig. 3 Morphology results of prostate tissue in different groups of mice
A: Normal control; B: BPH model; C: Low MPPE; D: Middle MPPE; E: High MPPE; F: Finasteride

图 4 各组小鼠血清中 DHT 含量的变化($n=6$)Fig. 4 Changes of DHT concentration in mice serum of each group($n=6$)注: # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs 空白组; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 模型组图 5 各组前列腺组织中 PACP 活性的变化($n=6$)Fig.5 Changes of PACP activities in mice prostate tissue of each group ($n=6$)注: # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs 空白组; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 模型组图 6 各组小鼠血清中 NO、NOS 含量的变化($n=6$)Fig. 6 Concentration changes of NO and NOS in mice serum of each group ($n=6$)

A.NO; B. iNOS, TNOS

注: # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs 空白组; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 模型组

4 讨 论

正常小鼠上皮细胞呈单层, 形状规则、核圆, 排列整齐。而 BPH 疾病小鼠前列腺上皮细胞会过度增殖, 绒毛状突起到腺泡腔, 形成增生结节导致腺泡形状不规则。MPPE 可以改善前列腺增生症状, 上皮细胞过度增殖被抑制。80 mg/kg MPPE 效果最佳, Finasteride 组的组织形态基本恢复到正常。

很多研究发现, BPH 发生过程中伴随着炎症反应的进行^[8-11], 夏延平等^[12]发现不同剂量的 EPA 和 DHA 可以降低炎症因子 PGE2 和 IL-6 的分泌, 进而改善前列腺增生。而 Mirnikjoo 等^[13]研究也指出, 含有花粉成分的临床药物舍尼通可以剂量依赖性抑制 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 的升高, 该作用可能与抑制第二信使调节蛋白激酶有关, 图 2 模型

组小鼠血清相关炎症因子水平显著增高的结果可能正是因为这一点。本研究数据表明, 非那雄胺和松花粉提取物可以降低前炎症细胞因子的升高, MPPE 在小鼠 BPH 调节过程中涉及炎症反应。

雄激素对于正常前列腺的生长和发育是非常必要的。在诱导氧化应激导致前列腺增生的启动或进展中, 雄激素可广泛增强前列腺细胞的新陈代谢, 导致线粒体自由基的损坏, 即介导氧化损伤^[14]。前列腺组织的增生、成长和发展依赖于雄激素, 通过强烈的雄激素受体激动剂 DHT 来完成。睾酮(T)通过 5 α -还原酶转换形成 DHT, 上调雄激素受体及其表达产物。DHT 对雄激素受体的激发效果是 T 的 5 倍; Ali 等^[15]研究发现雄激素受体的过度刺激增加了前列腺中线粒体的活性, 导致过多的自由基诱导氧化损伤进而导致前列腺增生。而非那雄胺可抑制 T 向 DHT 的转化, 从

而抑制随后由 DHT 介导的细胞代谢和自由基线粒体损伤。在本研究中, 灌胃松花粉提取物和非那雄胺均降低了血清 DHT 的含量, 显著抑制了 T 诱导的小鼠 BPH 的发展。

血清中 PACP 主要来自前列腺组织, 故血清 PACP 活性的变化可以反映前列腺的状态^[16]。前列腺组织增生加强, 血清中 PACP 活性升高, 而本研究结果显示中、高剂量 MPPE 可以显著抑制血清中 PACP 的升高, 由此说明, MPPE 对前列腺组织生长有一定抑制作用。

大量研究表明, 氧化应激介导和诱发细胞增殖与脂质过氧化反应, 从而影响血管的正常生理状态, 诱导细胞突变及增殖分化, 促进前列腺细胞的增殖及重塑, 与前列腺增生的发病有关^[17]。NO 是引起氧化性细胞毒性作用的关键物质^[18]。病理情况下前列腺细胞的胞质中 iNOS 表达增强, 合成大量 NO, 可促进细胞有丝分裂和增殖, 促进肿瘤组织内血管新生, 加速肿瘤的生长及浸润^[19,20]。高表达 NO 还可抑制多种与线粒体电子传递系统及柠檬酸循环有关的酶, 最终抑制线粒体的呼吸链引起细胞损伤^[21]。林学廷^[22]研究显示, 前列腺增生小鼠的细胞 NO 水平明显高于正常小鼠细胞, 表明氧化应激和前列腺增生密切相关。本研究结果显示模型组的 NO 水平高于空白组, 也进一步印证了 NO 在前列腺增生发病中的作用。马尾松花粉提取物预防前列腺增生并呈剂量依赖, 这种效果可能是由于其抗氧化潜力, 它能抑制睾酮诱导的氧化应激, 从而抑制上皮细胞增殖。

综合各项指标分析, 马尾松花粉提取物可以有效地降低 BPH 发生过程中炎症因子的升高, 有效改善增生状况, 调节标志代谢物的水平, 且有一定的剂量依赖效应。因此, 马尾松花粉提取物可作为保健品预防 BPH 的发生。

参考文献

- [1] Carson CR, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia [J]. Urology, 2003, 61(4 Suppl 1): 2–7.
- [2] Ripple MO, Henry WF, Rago RP, *et al.* Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells [J]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89(1): 40–48.
- [3] Veeresh BS, Veeresh B, Patil AA, *et al.* Lauric acid and myristic acid prevent testosterone induced prostatic hyperplasia in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 626(2–3): 262–265.
- [4] 张琳, 冯年平, 吴春兰. 中西药物治疗良性前列腺增生的比较[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, (02): 3–5.
Zhang L, Feng NP, Wu CL. Comparison of Chinese and western medicine in the treatment of benign prostatic hyperplasia [J]. Chin J Inf Tradit Med, 2003, (02): 3–5.
- [5] 钱伯初. 花粉营养药理学研究新进展[J]. 中西医结合杂志, 1989, (02): 125–128.
Qian BC. New progress in research on nutrition and pharmacology of pollen [J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med, 1989, (02): 125–128.
- [6] 丛涛, 赵霖, 鲍善芬. 松花粉对大鼠前列腺增生治疗作用的研究[J]. 军医进修学院学报, 2005, (05): 395–396.
- [7] Cong T, Zhao L, Bao SF. The effect of pine pollen on the treatment of benign prostatic hyperplasia in rats [J]. Acad J PLA Postgrad Med Sch, 2005, (05): 395–396.
- [7] 杜学志, 张建瑛, 王桂兰. 治疗前列腺增生症药物的现状与进展[J]. 中国药业, 1998, (11): 33–34.
Du XZ, Zhang JY, Wang GL. Current status and progress of drugs for the treatment of benign prostatic hyperplasia [J]. China Pharm, 1998, (11): 33–34.
- [8] Penna G, Mondaini N, Amuchastegui S, *et al.* Seminal plasma cytokines and chemokines in prostate inflammation: interleukin 8 as a predictive biomarker in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and benign prostatic hyperplasia [J]. Eur Urol, 2007, 51(2): 524–533, 533.
- [9] Wang W, Bergh A, Damber JE. Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, Bcl-2, and cell proliferation in the glandular epithelium [J]. Prostate, 2004, 61(1): 60–72.
- [10] 孙国华, 宁方霞, 夏玉军. IL-10、TNF- α 在前列腺增生及前列腺癌组织中的表达及意义[J]. 泌尿外科杂志(电子版), 2012, (01): 25–28.
Sun GH, Ning FX, Xia YJ. Expression and significance of IL-10 and TNF- α in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer [J]. J Urol Clin (ElectrVer), 2012, (01): 25–28.
- [11] 张伟, 韩瑞发. 良性前列腺增生组织中 CD8、CD20、IL-6 和 IL-23 的表达[J]. 天津医药, 2011, (08): 711–713.
Zhang W, Han RF. Expression and Significance of CD8, CD20, IL-6 and IL-23 in tissue of benign prostatic hyperplasia [J]. Tianjin Med J, 2011, (08): 711–713.
- [12] 夏延平, 苏宜香, 冯翔. EPA、DHA 对人单核细胞 PGE₂、IL-6 分泌及 IL-6 mRNA 表达的影响[J]. 营养学报, 2006, (04): 364–366.
Xia YP, Su YX, Feng X. Effects of EPA, DHA on secretion of PGE₂, IL-6 and Expression of IL-6m RNA in human monocytes [J]. Acta Nutr Sin, 2006, (04): 364–366.
- [13] Mirnikjoo B, Brown SE, Kim HF, *et al.* Protein kinase inhibition by omega-3 fatty acids [J]. J Biol Chem, 2001, 276(14): 10888–10896.
- [14] Hobisch A, Eder I E, Putz T, *et al.* Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor [J]. Cancer Res, 1998, 58(20): 4640–4645.
- [15] 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 Pharm, 2013, 698(1–3): 397–403.
- [16] 廖泽云, 姜锦林. 前列冲剂对前列腺增生大鼠血清酸性磷酸酶及 T 和 E₂ 的影响[J]. 实用医药杂志, 2006, (03): 335–337.
Liao ZY, Jiang JL. The effect of Qianlie granule on serum PAP and T & E₂ in model of prostatic hyperplasia rats [J]. Prac J Med Pharm, 2006, (03): 335–337.
- [17] Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation [J]. Mol Aspects Med, 1993, 14(3): 191–197.
- [18] 罗景慧, 杨迎暴. 白藜芦醇影响一氧化氮途径对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2010, (09): 772–777.
Luo JH, Yang YB. Protective effects of resveratrol on alcohol-induced hepatic injury through nitric oxide pathway in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2010, (09): 772–777.
- [19] Rikitake Y, Hirata K, Kawashima S, *et al.* Involvement of endothelial

- nitric oxide in sphingosine-1-phosphate-induced angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(1): 108–114.
- [20] 田原瑾, 曾昭毅, 陈伟伟, 等. 聚肌胞对小鼠前列腺癌内微血管的影响[J]. *中国药理学通报*, 2009, (11): 1449–1452.
- Tian YT, Zeng ZY, Chen WW, *et al*. The influence of polyIC on blood capillary in mouse prostate carcinoma [J]. *Chin Pharm Bull*, 2009, (11): 1449–1452
- [21] 匡荣, 孙意国, 郑筱祥, 等. 硫辛酸通过抑制 NF- κ B-iNOS-NO 信号保护氧化应激诱导的 PC12 细胞损伤[J]. *中国现代应用药学*, 2009, (07): 538–541.
- Kuang R, Sun YG, Zheng XX, *et al*. Lipoic acid protected PC12 cells from oxidative stress-induced damage by inhibiting the NF- κ B-iNOS-NO signal pathway [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2009, (07): 538–541.
- [22] 林学廷. 探讨氧化应激在良性前列腺增生和前列腺癌发病中的价值[J]. *中国医药指南*, 2013, (12): 474–475.
- Lin XT. Objective to investigate the value of oxidative stress in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer [J]. *Guide*

China Med, 2013, (12): 474–475.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



马 玉, 硕士研究生, 主要研究方向为食品科学。
E-mail: m88y0701@sina.com



耿 越, 教授, 主要研究方向为食品科学。
E-mail: gengy@sdnu.edu.cn