

南瓜籽甾醇对大鼠前列腺增生 及抗氧化能力的影响

解双瑜¹, 孙波¹, 张宇¹, 高峰², 刘东傲¹, 彭媛¹, 赵子伟¹

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 宝清县科技促进中心, 黑龙江 双鸭山 155600)

摘要:将提取纯化的南瓜籽甾醇作用于丙酸睾酮诱导构建的前列腺增生大鼠模型, 研究其对大鼠前列腺增生及抗氧化能力的影响。将 50 只雄性 SD 大鼠分为对照组, 模型组, 南瓜籽甾醇高、中、低剂量组, 实验结束后分别测定其前列腺湿重、前列腺指数 (PI)、前列腺酸性磷酸酶 (PACP) 活性及抗氧化指标中的总抗氧化能力 (T-AOC) 水平、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量, 同时对前列腺组织形态进行切片观察。结果表明: 与模型组相比, 南瓜籽甾醇高剂量组的前列腺湿重、PI、PACP 活性与 MDA 含量显著降低, 并且南瓜籽甾醇中、高剂量组的 T-AOC 水平、SOD 活性显著升高。以上指标的变化均呈现出南瓜籽甾醇高剂量组优于中剂量组的趋势。同时, 与模型组相比, 南瓜籽甾醇中、高剂量组大鼠前列腺组织细胞受损状况均有所改善, 南瓜籽甾醇高剂量组的改善效果更明显。因此, 南瓜籽甾醇在一定程度上具有改善大鼠前列腺增生及提高大鼠前列腺组织的抗氧化能力的作用。

关键词:南瓜籽甾醇; 大鼠; 前列腺增生; 抗氧化能力

中图分类号: R588.1; TS229

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2022)03-0060-05

Effect of pumpkin seed sterol on benign prostatic hyperplasia and antioxidant capacity of rats

XIE Shuangyu¹, SUN Bo¹, ZHANG Yu¹, GAO Feng²,
LIU Dong'ao¹, PENG Yuan¹, ZHAO Ziwei¹

(1. Food College, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China; 2. Baoqing County Science and Technology Promotion Center, Shuangyashan 155600, Heilongjiang, China)

Abstract: The extracted and purified pumpkin seed sterol was used to feed the rats with benign prostate hyperplasia induced by testosterone propionate to study its effect on the benign prostate hyperplasia and antioxidant capacity of rats. 50 Male SD rats were divided into control group, model group, high, medium and low dose groups of pumpkin seed sterol. After the experiment, the prostate wet weight, prostate index (PI), and levels of prostatic acid phosphatase (PACP), total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured, the morphology of prostate tissue was observed simultaneously. The results showed that compared with the model group, the wet weight, PI, PACP activities, and MDA content of the high dose group of pumpkin seed sterol significantly decreased, and the T-AOC level and SOD activity in the medium and high dose groups of

pumpkin seed sterol significantly increased. All of the above changes showed a trend of high dose group of pumpkin seed sterol better than medium dose group. At the same time, the prostate tissue cell damages of rats in medium and high dose groups of the pumpkin seed sterol were improved compared with the model group, and high dose

收稿日期: 2021-04-27; 修回日期: 2021-12-13

基金项目: 黑龙江省宝清县人民政府科研项目 (SYSBQXZF-20171101)

作者简介: 解双瑜 (1994), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工及贮藏工程 (E-mail) xiesy12345@163.com。

通信作者: 孙波, 副教授, 硕士生导师 (E-mail) bosun1962@163.com。

group of the pumpkin seed sterol had the most obvious effect. This indicated that pumpkin seed sterol improved the prostate hyperplasia in rats to some extent and improved the antioxidant capacity of rat prostate tissue.

Key words: pumpkin seed sterol; rat; benign prostatic hyperplasia; antioxidant capacity

前列腺增生是老年男性常见疾病之一,为前列腺的一种良性病变。近年来,南瓜籽因具有缓解前列腺增生的功效而受到国内外的广泛关注,而南瓜籽甾醇是南瓜籽中重要的活性成分。研究表明,植物甾醇对前列腺组织具有保护作用,如:对慢性非细菌性前列腺炎有明显的抑制作用^[1];松花粉总甾醇^[2]和油菜花粉甾醇^[3]对由丙酸睾酮诱导的大鼠前列腺增生具有明显的改善作用。体外实验也证实^[4],植物甾醇可以通过调节体内两种关键酶的活性,促进鞘磷脂循环,抑制细胞生长,从而改善前列腺增生。植物甾醇能够通过阻止细胞周期G0向G1阶段转化从而抑制细胞分裂,并且能够促进细胞凋亡^[5-6],以此改善前列腺增生的症状^[7]。植物甾醇还具有调节蛋白质表达抑制5- α 还原酶的活性,进而阻止睾酮转化为活性更强的双氢睾酮的作用^[8]。此外,植物甾醇还具有抗氧化、抗癌、抗炎症及抗菌等功效^[9-11]。

大鼠前列腺增生症状的变化常常伴随着体内抗氧化能力的变化^[12-14]。有学者提出前列腺增生的发生和发展可能与机体抗氧化能力有关^[15-16]。研究表明,前列腺增生患者体内的各种抗氧化酶活性明显降低,机体处于氧化应激状态。由于机体内抗氧化能力的降低,导致·OH的积累,·OH结合并氧化DNA、脂质和蛋白质,造成氧化损伤。氧化损伤可能导致细胞突变,增加癌变的风险^[17]。目前国际上常用的代表生物体内抗氧化能力的指标主要包括总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)等。其中T-AOC代表生物体的总抗氧化能力,是生物体内酶与非酶抗氧化能力的总和^[18]。SOD则是生物体内存在的一种超氧自由基清除因子,可以将有害的超氧自由基转化为过氧化氢,进而消除自由基对组织细胞的氧化攻击^[19-20]。而MDA是自由基作用于不饱和脂肪酸使脂质发生过氧化反应的终产物之一,其具有细胞毒性,会破坏细胞膜结构,导致细胞肿胀、坏死^[21]。

因此,本文将提取纯化的南瓜籽甾醇作用于丙酸睾酮诱导后构建的前列腺增生大鼠模型,研究其对大鼠前列腺增生及抗氧化能力的影响,以期为今

后南瓜籽深加工以及南瓜籽功能性食品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

清洁级雄性SD大鼠50只,体重为140~160g,由黑龙江省医学实验动物供应基地提供。

1.1.2 原料与试剂

宝清大白板南瓜籽,由黑龙江省双鸭山市宝清县白瓜籽交易大市场提供。

丙酸睾酮注射液(25 mg/mL),宁波第二激素厂;实验鼠专用粮,辽宁省沈阳市前民动物实验饲料厂;前列腺酸性磷酸酶(PACP)测试盒、总抗氧化能力(T-AOC)测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒,南京建成生物工程研究所。甾醇标准品(纯度99%)与桦木醇内标,美国Sigma公司;无水乙醇,天津市康科德科技有限公司;氢氧化钠,天津市大陆化学试剂厂;正己烷,天津市富宇精细化工有限公司;考马斯亮蓝G250,合肥博美生物技术有限责任公司。

1.1.3 仪器与设备

GC-2010pro气相色谱仪(配有氢火焰离子化检测器),日本岛津公司;CZR 309型榨油机,广州万彪通用设备有限公司;Sigma 3-18K低温高速离心机,德国Sigma公司;HWS-24电热恒温水浴锅,上海齐欣科学仪器有限公司;FA 2004型电子天平,上海横平仪器仪表厂;XW-80A旋涡混合器,上海弛唐电子有限公司;RE-301旋转蒸发仪,河南省泰斯特仪器有限公司;101-0A鼓风干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 南瓜籽甾醇的制备

1.2.1.1 南瓜籽甾醇的提取与纯化

南瓜籽甾醇的提取与纯化参照张宇等^[22]的方法进行。

1.2.1.2 南瓜籽甾醇组分测定

南瓜籽甾醇组分测定参照GB/T 25223—2010《动植物油脂 甾醇组成和甾醇总量的测定 气相色谱法》进行。

1.2.2 大鼠前列腺增生模型的建立

将大鼠适应性饲养7 d,期间大鼠自由饮水与进食。适应性饲养后随机分为5组,每组10只,并编号分笼。其中1组为对照组,另外4组构建前列腺增生模型。

造模方法:每天按5 mg/kg的剂量对所有需要造模的大鼠皮下注射丙酸睾酮注射液,连续注射28 d,对照组注射同等剂量生理盐水^[23]。造模期间大鼠自由饮水与进食。

1.2.3 大鼠分组与给药

将造模后的4组大鼠分为模型组,南瓜籽甾醇低剂量组、中剂量组、高剂量组;南瓜籽甾醇低、中、高剂量组分别按每天80、160、320 mg/kg剂量灌胃南瓜籽甾醇,模型组和对照组按160 mg/kg的剂量灌胃生理盐水,每天灌胃1次,连续28 d。给药期间大鼠自由饮水与进食。

1.2.4 大鼠指标测定

1.2.4.1 前列腺指数的测定

所有大鼠在末次给药后断食24 h,称重后立即处死,摘取其眼球采全血,解剖并摘取前列腺组织。将前列腺组织用冰生理盐水洗净并吸干表面水分,用精密天平(0.000 1 g)称取前列腺组织质量,计算前列腺指数^[24]。

$$P_1 = \frac{m}{M} \quad (1)$$

式中: P_1 为前列腺指数; m 为前列腺组织质量,mg; M 为大鼠体重,g。

1.2.4.2 前列腺组织切片观察

取大鼠前列腺组织左叶用10%的中性福尔马林固定液固定,石蜡包埋后切片,HE染色,并用光学显微镜观察其细胞形态学变化。

1.2.4.3 前列腺 PACP、T-AOC、SOD、MDA 的测定

将大鼠全血在4℃、8 000 r/min条件下离心10 min制备血清,测定其PACP活性。取大鼠前列腺组织右叶加入9倍预冷后的生理盐水置于匀浆机中匀浆,然后将匀浆液在4℃、2 500 r/min条件下离心10 min制备上清液,测定其蛋白质含量、T-AOC水平、SOD活性、MDA含量。上清液蛋白质含量采用考马斯亮蓝法进行测定^[25],PACP活性、T-AOC水平、SOD活性、MDA含量参照测试盒说明书采用比色法进行测定。

1.2.5 数据统计

利用SPSS Statistics 22.0软件对数据进行统计分析,结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 南瓜籽甾醇的组分

表1为南瓜籽甾醇各组分在总甾醇中的所占比例。

表1 南瓜籽甾醇各组分及所占比例

甾醇	所占比例/%
菜油甾醇	7.73
豆甾醇	4.17
β -谷甾醇	71.80
豆甾烷醇	5.35
盐藻甾醇	5.52
环阿屯醇	1.34
γ -谷甾醇	2.98
其他	1.11

由表1可知,在南瓜籽甾醇中共检测出7种组分,其中 β -谷甾醇所占比例最高,为71.80%,其次为菜油甾醇,所占比例为7.73%。

2.2 大鼠前列腺湿重及前列腺指数

南瓜籽甾醇对大鼠前列腺湿重及前列腺指数的影响见表2。

表2 南瓜籽甾醇对大鼠前列腺湿重及前列腺指数的影响

组别	前列腺湿重/mg	前列腺指数
对照组	55.3 ± 5.8 ^a	0.126 0 ± 0.010 2 ^a
模型组	142.1 ± 44.0 ^e	0.307 0 ± 0.076 8 ^e
低剂量组	138.5 ± 28.2 ^c	0.303 2 ± 0.058 8 ^c
中剂量组	124.3 ± 27.2 ^{bc}	0.286 0 ± 0.057 6 ^{bc}
高剂量组	103.0 ± 19.0 ^b	0.246 6 ± 0.051 9 ^b

注:不同小写字母代表同列数据间差异显著($p < 0.05$)。下同

由表2可以看出,模型组的前列腺湿重与前列腺指数显著高于对照组($p < 0.05$)。从前列腺湿重和前列腺指数数值来看,南瓜籽甾醇高剂量组 < 南瓜籽甾醇中剂量组 < 南瓜籽甾醇低剂量组。南瓜籽甾醇高剂量组的前列腺湿重、前列腺指数与模型组相比具有显著性差异($p < 0.05$)。

2.3 大鼠 PACP 活性

南瓜籽甾醇对大鼠前列腺酸性磷酸酶(PACP)的活性影响见表3。

表3 南瓜籽甾醇对大鼠 PACP 活性的影响

组别	PACP活性/(U/L)
对照组	9.96 ± 1.65 ^a
模型组	32.16 ± 7.03 ^d
低剂量组	28.98 ± 4.31 ^{cd}
中剂量组	26.95 ± 1.23 ^{bc}
高剂量组	24.55 ± 2.32 ^b

由表3可以看出:模型组的PACP活性显著高于对照组($p < 0.05$);南瓜籽甾醇低剂量组的PACP活性与模型组相比无显著性差异($p > 0.05$);南瓜籽甾醇中、高剂量组的PACP活性均显著低于模型组($p < 0.05$)。PACP是由成熟的前列腺上皮细胞合成及分泌的一种糖蛋白,经前列腺管道进入精囊,由尿道排出。当前列腺发生病变时,病变的细胞产生的PACP由于无导管或腺体导管被破坏,故直接被吸收入血循环,而导致血清PACP活性升高,常用于诊断前列腺癌和预估后期治疗效果^[26]。由上述实验结果可知,大鼠前列腺增生模型建立成功,前列腺组织细胞受到损伤,南瓜籽甾醇则有改善这种损伤的作用。

2.4 大鼠前列腺组织抗氧化能力

南瓜籽甾醇对大鼠前列腺组织抗氧化能力的影响见表4。

由表4可以看出,模型组的T-AOC水平、SOD活性显著低于对照组($p < 0.05$),MDA含量显著高于对照组($p < 0.05$)。南瓜籽甾醇中、高剂量组的

T-AOC水平、SOD活性均显著高于模型组($p < 0.05$)。南瓜籽甾醇高剂量组的T-AOC水平、SOD活性显著高于中剂量组($p < 0.05$)。南瓜籽甾醇高剂量组的MDA含量显著低于模型组($p < 0.05$)。实验结果表明,在大鼠前列腺增生模型的建立过程中,不仅降低了其组织的抗氧化能力而且还有大量的细胞被损伤,导致细胞内过氧化反应加剧;而南瓜籽甾醇在一定程度上具有提高其抗氧化能力、缓解细胞损伤的作用。

表4 南瓜籽甾醇对大鼠前列腺组织抗氧化能力的影响

组别	T-AOC水平/ (U/mg)	SOD活性/ (U/mg)	MDA含量/ (nmol/mg)
对照组	3.29 ± 0.24 ^a	1 839.41 ± 170.77 ^a	2.41 ± 0.15 ^c
模型组	1.13 ± 0.29 ^d	991.64 ± 196.37 ^d	5.10 ± 0.73 ^a
低剂量组	1.20 ± 0.19 ^{cd}	1 104.08 ± 121.60 ^d	4.91 ± 0.56 ^a
中剂量组	1.40 ± 0.19 ^c	1 372.16 ± 140.76 ^c	4.62 ± 0.61 ^a
高剂量组	1.88 ± 0.27 ^b	1 548.02 ± 156.56 ^b	3.96 ± 0.85 ^b

2.5 大鼠前列腺组织切片

大鼠前列腺组织石蜡切片HE染色图片见图1。

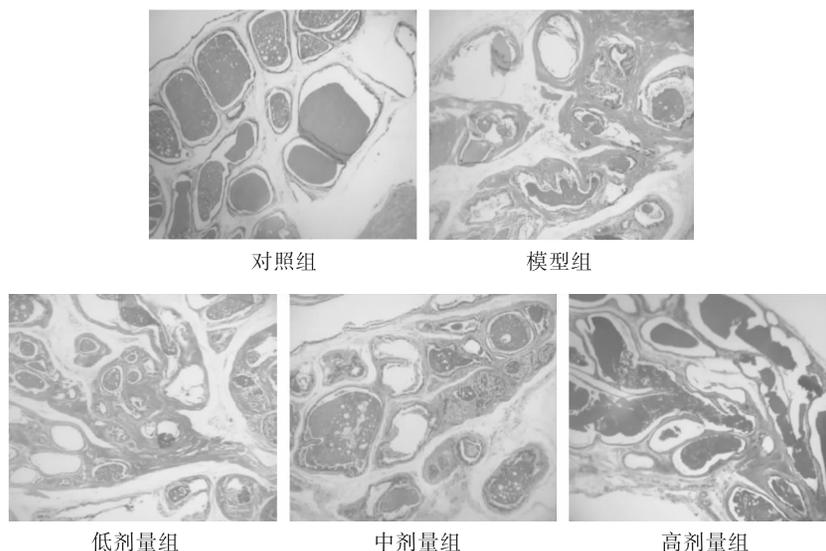


图1 大鼠前列腺组织石蜡切片HE染色图片

由图1可以看出,对照组的前列腺组织细胞呈立方整齐排列,表面光滑无褶皱,腺腔没有扩张现象,腺上皮与间质细胞组织未见增生。模型组、南瓜籽甾醇低剂量组中,前列腺组织细胞呈现不规则排列,细胞内出现乳头状突出,表面褶皱,腺腔扩张,腔内积存大量液体,腺上皮增厚,伴随间质纤维结缔组织增生。南瓜籽甾醇中、高剂量组中,前列腺组织细胞呈不规则排列,表面褶皱,但乳头状突出减少,腺腔扩张程度缩小,腔内积存液体量减少,腺上皮增厚及间质纤维结缔组织增生程度均有所减轻,且高剂量组的效果更明显。

3 结论

南瓜籽甾醇在一定程度上具有改善大鼠前列腺增生及提高大鼠前列腺组织抗氧化能力的作用。结合本研究中南瓜籽甾醇组分的检测分析结果,推测 β -谷甾醇可能是南瓜籽甾醇中发挥主要作用的成分,因为 β -谷甾醇的抗氧化能力阻止了大鼠前列腺组织中细胞的自由基损伤,间接起到了改善前列腺增生的作用。然而,迄今为止前列腺增生的发病机制仍未阐述清楚,所以南瓜籽甾醇对前列腺增生的改善作用是否与其抗氧化能力有关仍有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 史红, 程丽艳, 郑晓亮, 等. 植物甾醇对慢性非细菌性前列腺炎的保护作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 3033-3037.
- [2] 朱宝安, 张军要. 松花粉总甾醇对大鼠前列腺良性增生的影响[J]. 现代预防医学, 2016, 43(4): 623-626.
- [3] WANG R W, KOBAYASHI Y, LIN Y, et al. A phytosterol enriched refined extract of *Brassica campestris* L. pollen significantly improves benign prostatic hyperplasia (BPH) in a rat model as compared to the classical TCM pollen preparation Qianlie Kang Pule' an Tablets[J]. Phytomedicine, 2015, 22(1): 145-152.
- [4] HOLTZ R V, FINK C S, AWAD A B. β -Sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells [J]. Nutr Cancer, 1998, 32(1): 8-12.
- [5] GABRIEL L, ANTONIO C, REYES B, et al. Antiproliferative effect of plant sterols at colonic concentrations on Caco-2 cells[J]. J Funct Foods, 2017, 39: 84-90.
- [6] IFERE G O, BARR E, EQUAN A, et al. Differential effects of cholesterol and phytosterols on cell proliferation, apoptosis and expression of a prostate specific gene in prostate cancer cell lines[J]. Cancer Detect Prev, 2009, 32(4): 319-328.
- [7] 牛远杰, 马腾骧. 良性前列腺增生症的病因及发病机制[J]. 新医学, 2000, 31(9): 521-522.
- [8] SEO Y K, ZHU B, JEON T I, et al. Regulation of steroid 5- α reductase type 2 (Srd5a2) by sterol regulatory element binding proteins and statin [J]. Exp Cell Res, 2009, 315(18): 3133-3139.
- [9] MANAL M A, NASEER A, MANAL A A, et al. Naringenin potentiated β -sitosterol healing effect on the scratch wound assay[J]. Res Pharm Sci, 2019, 14(6): 566-573.
- [10] 孙玉成, 刘晓巍, 片光哲. β -谷甾醇诱导人胃癌细胞自噬与凋亡的作用及机制研究[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(6): 866-871.
- [11] BABU S, KRISHNAN M, RONNULAKSHMI R, et al. Beta-sitosterol attenuates insulin resistance in adipose tissue via IRS-1/Akt mediated insulin signaling in high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic rats [J/OL]. Eur J Pharm Sci, 2020, 873: 173004[2021-04-27]. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173004>.
- [12] 车璐, 吴晓琴, 郑茜茜, 等. 香水莲花抑制大鼠前列腺增生的试验研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2): 28-33.
- [13] 吴顺理, 李世文, 郑新民, 等. 酒精对大鼠前列腺抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响[J]. 中国男科学杂志, 2005, 19(6): 4-7.
- [14] 姜伟伟, 任国峰, 杨爱青, 等. 大豆异黄酮对良性前列腺增生大鼠抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 233-235.
- [15] ARYAL M, PANDEYA A, GAUTAM N, et al. Oxidative stress in benign prostate hyperplasia[J]. Nepal Med Coll J, 2007, 9(4): 222-224.
- [16] AYDIN A, ARSOVA-SARAFINOVSKA Z, SAYAL A, et al. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia [J]. Clin Biochem, 2006, 39(2): 176-179.
- [17] COOKE M S, EVANS M D, HERBERT K E, et al. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine - source, significance and supplements[J]. Free Radic, 2000, 32(5): 381-397.
- [18] 刘贵珊, 杨博, 张泽生, 等. 白藜芦醇对D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力和脑组织抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(5): 204-207.
- [19] MATES J M, SEGURA J A, ALONSO F J, et al. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update[J]. Arch Toxicol, 2012, 86(11): 1649-1665.
- [20] JIANG Y, BRYNSKIKH A M, DEVIKA S, et al. SOD1 nanozyme salvages ischemic brain by locally protecting cerebral vasculature[J]. J Control Release, 2015, 213: 36-44.
- [21] 闫磊, 胡江平, 孙晓东, 等. 肉苁蓉多糖对D-半乳糖致衰老小鼠抗疲劳作用及机制研究[J]. 河北中医, 2019, 41(1): 96-100.
- [22] 张宇, 孙波, 赵晓, 等. 南瓜籽甾醇对SD大鼠体内抗氧化作用的影响[J]. 中国油脂, 2019, 44(7): 94-97.
- [23] 程林凤. 去势与非去势对睾酮诱导的大鼠前列腺增生的影响[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2009.
- [24] 徐薇, 庄田畋, 刘杨, 等. 黄芪抗大鼠前列腺增生的实验研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2018, 40(1): 18-22.
- [25] 余冰宾. 基础生物化学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004: 131-141.
- [26] 张妮, 席笑谈, 文豪, 等. 前列腺酸性磷酸酶镇痛机制与研究现状[J]. 中国疼痛医学杂志, 2013, 19(11): 693-695.