

美洲大蠊提取物与透明质酸钠对大鼠膀胱黏膜损伤后修复影响的对比研究

谢 波 舒 彦 梁 臻 陈建和 程一宁 张心男

摘 要 **目的** 观察美洲大蠊提取物对大鼠膀胱黏膜损伤后修复的影响,并与透明质酸钠进行比较。**方法** 将大鼠随机分为对照组、模型组、美洲大蠊提取物治疗组和透明质酸钠治疗组,每组 70 只;再按灌注后 2、6、12h、1、2、3 和 5 天 7 个时间点分设 7 个亚组,每亚组均为 10 只。用盐酸损伤大鼠膀胱黏膜,分别用 0.25ml 美洲大蠊提取物和 0.25ml 透明质酸钠膀胱内灌注修复受损膀胱黏膜。在各个时间点留取大鼠尿液,然后处死大鼠取得膀胱,用 ELISA 法检测尿白介素-8 浓度,用常规病理染色技术观察膀胱黏膜损伤范围及炎症浸润情况,用免疫组织化学法检测热休克蛋白 60、70 在黏膜中的表达情况。**结果** 美洲大蠊提取物和透明质酸钠均可明显减少大鼠膀胱上皮缺损和炎性细胞浸润($P < 0.01$),亦可显著降低大鼠膀胱组织热休克蛋白 60、70 表达($P < 0.01$),同时降低尿中白介素-8 浓度($P < 0.01$);两种药物作用比较差异未见统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 美洲大蠊提取物可修复损伤的膀胱黏膜,加强膀胱壁的屏障作用,阻止炎症反应,其干预作用与透明质酸钠相似。

关键词 膀胱黏膜损伤 美洲大蠊提取物 透明质酸钠 修复作用

Comparition of Effect of Periplaneta Americana Extraction with Sodium Hyaluronate on Post-injury Healing of Rat Bladder Mucosa. Xie Bo, Shu Yan, Liang Zhen, Chen Jianhe, Cheng Yining, Zhang Xinnan. Department of Urinary Surgery, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 310012, China

Abstract Objective To investigate the effect of Periplaneta Americana extraction and sodium hyaluronate on post-injury healing of bladder mucosa in the rats. **Methods** The rats were divided randomly into control group, model group, Periplaneta Americana extraction group and sodium hyaluronate treatment group, with 70 rats in each group respectively. According to seven time-points including 2h, 6h, 12h, 1day, 2days, 3days and 5days after instillation, each group was again divided to 7 subgroups which had 10 rats respectively. The injury of bladder mucosa was made using hydrochloric acid. Bladders were instilled with 0.25ml periplaneta Americana extraction and 0.25ml sodium hyaluronate for the healing of injured mucosa respectively. At designated time-points, urine was obtained, and then, bladder was taken after rats' scarification. Interleukin-8 concentration in urine was measured using ELISA, and pathological bladder mucosal injury and inflammatory infiltration were observed using conventional staining techniques, and the expressions of heat shock protein 60 and 70 in the mucosa were analyzed by immunohistochemistry. **Results** Both periplaneta Americana extraction and sodium hyaluronate obviously diminished the defect of rat bladder epithelium and lessened inflammatory cellular infiltration into rat bladder epithelium ($P < 0.01$), markedly decreased expressions of heat shock protein 60 and 70 in rat bladder tissue ($P < 0.01$), and lowered the interleukin-8 concentration in rat urine ($P < 0.01$). There was no statistical difference ($P > 0.05$) in their effects on post-injury healing of bladder mucosa in the rat. **Conclusion** Periplaneta Americana extraction may repair injured bladder mucosa, strengthen the wall of bladder, and inhibit inflammatory response. And its effects are similar to those of sodium hyaluronate.

Key words Bladder mucosal injury; Periplaneta Americana extraction; Sodium hyaluronate; Restoration

因膀胱黏膜损伤导致的顽固性膀胱刺激症临床上并非少见,其中化疗药物所导致的膀胱黏膜损伤,引起一些并发症,明显降低了患者依从性^[1]。透明质酸钠广泛用于修复受损的膀胱黏膜,治疗费用高

昂,尽管短期可一定程度地改善临床症状,但持久性不确切,很多患者在3个月至半年内又复发^[2]。美洲大蠊属昆虫纲,蜚蠊目,蜚蠊科,俗称蟑螂^[3]。美洲大蠊提取物对于恶性血液病口腔溃疡、胃十二指肠溃疡、溃疡性结肠炎、皮肤皲裂、糖尿病皮肤溃疡、顽固性鼻出血、鼻中隔糜烂均有良好疗效,并得到广泛应用,与膀胱黏膜损伤的相关研究较少^[4-6]。本研究旨在揭示美洲大蠊提取物对膀胱黏膜损伤后上皮愈合

基金项目:2011年浙江省中医药科技计划基金资助项目(2011ZA001)

作者单位:310012 杭州,浙江省立同德医院泌尿外科

的影响,并与透明质酸钠进行比较,从而为临床应用提供依据。

材料与方法

1. 实验材料:健康雄性 Wistar 大鼠购于浙江中医药大学实验动物中心,美洲大蠊提取物(商品名康复新)购于四川好医生攀西药业有限责任公司,高分子量透明质酸钠购于杭州协合医疗用品有限公司,热休克蛋白-60 和热休克蛋白-70 兔抗鼠多克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司,免疫组织化学超敏 SP 试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司,白介素-8 ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D systems 公司。

2. 动物及分组:选用体重相当(200~250g)健康雄性 Wistar 大鼠 280 只,应用随机数字表进行完全随机化的分组,将大鼠分成对照组、模型组和美洲大蠊提取物治疗组和透明质酸钠治疗组,每组 70 只大鼠,再按 2、6、12h,1、2、3、5 天 7 个时间点分设 7 个亚组,每亚组均为 10 只。

3. 动物处理:用 2% 戊巴比妥钠腹腔内注射法麻醉大鼠(30mg/kg),把 3F 导管经尿道插入大鼠膀胱,妥当固定后连接好 1ml 注射器,抽空膀胱尿液;各组大鼠均用生理盐水 0.25ml 冲洗膀胱 3 次,并抽空膀胱;对照组再被注入生理盐水 0.25ml,模型组和两个治疗组则各注入 0.1mol/L 盐酸 0.25ml,保留 2min 后抽空;各组再用生理盐水 0.25ml 冲洗膀胱 3 次后并抽空;对照组和模型组注入 0.25ml 生理盐水,两个治疗组则分别注入 0.25ml 康复新液和 0.25ml 0.2% 大分子量透明质酸钠稀释液,均保留 30min 后拔管,常规饲养。大鼠均在灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,收集大鼠 3h 尿液,然后处死大鼠,取下新鲜膀胱标本,10% 甲醛固定,制备石蜡切片。

4. HE 染色:组织切片 HE 染色,光镜下观察膀胱黏膜的

形态变化和炎性细胞浸润情况。依据膀胱黏膜的形态变化和炎性细胞浸润情况计算组织学损伤评分。其中黏膜完好 1 分,黏膜小部分消失 2 分,黏膜大部分消失 3 分,黏膜完全消失 4 分;炎症细胞无或极少量浸润 1 分,浸润固有层 2 分,浸润浅肌层 3 分,浸润深肌层 4 分。

5. 免疫组化法染色:组织切片免疫组化法染色制片后显微镜下观察。采用高压锅法修复抗原,SP 法免疫组化染色,DAB 显色,苏木精衬染,以胞质、胞核出现棕黄色为阳性,以细胞无棕黄色或与背景一致的浅棕色为阴性,在 400 倍光镜下观察,随机挑选 10 个视野,计算热休克蛋白-60 和热休克蛋白-70 阳性细胞和总细胞数,并计算出阳性细胞率。

6. ELISA 检测:留取的尿液立即在 20℃、1000r/min、离心 15min 后收集上清液,储存在-70℃环境中待检。ELISA 法测定尿白介素-8 浓度。

7. 统计学方法:使用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用方差分析,两组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠膀胱黏膜组织学损伤评分:灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,模型组大鼠膀胱黏膜组织学损伤评分均较对照组显著增高;灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,美洲大蠊提取物治疗组和透明质酸钠治疗组大鼠膀胱黏膜组织学损伤评分均较模型组显著降低;灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,美洲大蠊提取物治疗组大鼠膀胱黏膜组织学损伤评分与透明质酸钠治疗组比较差异均无统计学意义(表 1)。

表 1 各组大鼠膀胱黏膜组织学损伤评分的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	2h	6h	12h	1 天	2 天	3 天	5 天
对照组	2.0±0.0**	2.0±0.0**	2.0±0.0**	2.0±0.0**	2.0±0.0**	2.0±0.0**	2.0±0.0**
模型组	4.6±0.5	5.6±0.5	6.6±0.5	7.6±0.5	6.4±0.5	5.5±0.5	5.0±0.7
美洲大蠊提取物治疗组	4.2±0.4*	4.6±0.5**	5.6±0.5**	5.8±0.4**	5.5±0.5**	4.6±0.5**	4.2±0.4**
透明质酸钠治疗组	4.1±0.3**	4.4±0.5**	5.4±0.5**	5.5±0.5**	5.2±0.4**	4.5±0.5**	4.1±0.3**

与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2. 大鼠膀胱组织热休克蛋白-60 的表达情况:灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,模型组大鼠膀胱组织热休克蛋白-60 的表达均较对照组显著增高;灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,美洲大蠊提取物治疗组和透明质酸钠治疗组大鼠膀胱组织热休克蛋白-60 的

表达均较模型组显著降低;灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,美洲大蠊提取物治疗组大鼠膀胱组织热休克蛋白-60 的表达与透明质酸钠治疗组比较差异均无统计学意义(表 2)。

表 2 各组大鼠膀胱组织热休克蛋白-60 表达的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	2h	6h	12h	1 天	2 天	3 天	5 天
对照组	22.8±2.1*	22.2±2.3*	21.4±1.5*	21.5±2.0*	22.1±1.8*	22.0±2.3*	21.4±2.1*
模型组	31.0±3.2	33.8±3.1	36.7±3.6	44.5±4.2	40.0±4.1	36.5±4.4	34.3±3.7
美洲大蠊提取物治疗组	26.7±3.2*	28.8±3.9*	31.6±3.5*	38.8±5.0*	35.8±4.7*	30.3±3.1*	28.7±3.4*
透明质酸钠治疗组	26.2±2.8*	28.0±3.0*	30.6±3.8*	38.2±4.1*	34.6±4.4*	29.9±4.2*	27.1±3.3*

与模型组比较,* $P < 0.01$

3. 大鼠膀胱组织热休克蛋白-70 的表达情况:灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,模型组大鼠膀胱组织热休克蛋白-70 的表达均较对照组显著增高;灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,美洲大蠊提取物治疗组和透明质酸钠治

疗组大鼠膀胱组织热休克蛋白-70 的表达均较模型组显著降低;灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,美洲大蠊提取物治疗组大鼠膀胱组织热休克蛋白-70 的表达与透明质酸钠治疗组比较差异均无统计学意义(表 3)。

表 3 各组大鼠膀胱组织热休克蛋白-70 表达的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	2h	6h	12h	1 天	2 天	3 天	5 天
对照组	23.8 ± 2.3 *	25.1 ± 2.2 *	24.1 ± 2.5 *	23.6 ± 2.6 *	24.6 ± 2.8 *	24.5 ± 2.9 *	23.3 ± 2.7 *
模型组	32.3 ± 3.6	35.7 ± 3.7	38.6 ± 3.9	46.9 ± 4.4	41.5 ± 4.3	38.8 ± 4.1	36.4 ± 3.9
美洲大蠊提取物治疗组	27.1 ± 3.3 *	29.2 ± 3.5 *	32.2 ± 3.6 *	40.8 ± 4.0 *	37.7 ± 3.7 *	33.6 ± 3.6 *	30.9 ± 3.3 *
透明质酸钠治疗组	27.0 ± 2.9 *	29.1 ± 3.1 *	31.8 ± 3.5 *	39.8 ± 3.4 *	36.7 ± 3.2 *	31.6 ± 3.5 *	29.5 ± 3.2 *

与模型组比较, * $P < 0.01$

4. 大鼠尿白介素-8 浓度:灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,模型组大鼠尿白介素-8 浓度均较对照组显著增高;灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,美洲大蠊提取物治疗组和透明质酸钠治疗组大鼠尿白介素-8

浓度均较模型组显著降低;灌注后 2、6、12h,1、2、3 和 5 天,美洲大蠊提取物治疗组大鼠尿白介素-8 浓度与透明质酸钠治疗组比较差异均无统计学意义(表 4)。

表 4 各组大鼠尿白介素-8 的比较($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

分组	2h	6h	12h	1 天	2 天	3 天	5 天
对照组	432.3 ± 52.4 *	436.5 ± 50.4 *	442.4 ± 48.9 *	437.5 ± 47.9 *	433.7 ± 52.9 *	451.8 ± 49.9 *	439.9 ± 51.1 *
模型组	687.6 ± 69.8	843.7 ± 73.4	1047.5 ± 77.8	1282.7 ± 90.4	1054.6 ± 99.3	887.9 ± 84.6	782.4 ± 75.6
美洲大蠊提取物治疗组	518.2 ± 55.4 *	638.4 ± 56.5 *	842.6 ± 74.3 *	1021.5 ± 98.1 *	873.6 ± 78.8 *	624.5 ± 73.4 *	587.6 ± 65.4 *
透明质酸钠治疗组	512.4 ± 51.6 *	624.7 ± 54.1 *	833.4 ± 71.0 *	1002.9 ± 90.2 *	859.5 ± 71.2 *	611.8 ± 68.9 *	574.5 ± 61.5 *

与模型组比较, * $P < 0.01$

讨 论

膀胱黏膜损伤是化学性膀胱炎、放射性膀胱炎、腺性膀胱炎、慢性细菌性难治性膀胱炎和间质性膀胱炎等多种膀胱炎症的病理基础,可引起尿急、尿频和膀胱充盈后耻骨上方或会阴部持续疼痛等症状,严重影响患者的生活质量和身心健康^[1]。膀胱黏膜表面葡萄糖氨基聚糖的缺陷是导致膀胱黏膜损伤的病理基础。葡萄糖氨基聚糖缺陷导致膀胱黏膜通透性增高,减弱了膀胱壁对化学物质的抵御力及修复能力,导致尿液中有毒有害物质进入到膀胱壁内,引发膀胱壁损害^[7,8]。透明质酸钠广泛用于修复受损的膀胱黏膜,治疗费用高昂,尽管短期可一定程度地改善临床症状,但持久性不确切,很多患者在 3 个月至半年内又复发^[2]。目前认为修复膀胱上皮,保护黏膜完整性才是疗效能够持久的根本原因,但仍缺乏疗效明确的上皮修复药。

近年来,医学昆虫的药用价值逐渐被认知。美洲大蠊属昆虫纲,蜚蠊目,蜚蠊科,俗称蟑螂。其作为药用的最早记载见于《神农本草经》,以蜚蠊名列为中品,“味咸,寒,生川泽,治血瘀症坚、寒热,破积聚,喉

咽痹,内寒无子”。历代重要本草典籍《新修本草》、《本草纲目》亦有记载^[3]。根据文献报道,美洲大蠊提取物含有多元醇类、表皮生长因子、黏氨酸、黏糖氨酸及多种氨基酸等活性物质,具有抗炎、消肿、促进细胞增殖和新生肉芽组织增长,加速病损组织修复,加快坏死组织脱落,提高机体免疫功能等作用,对于恶性血液病口腔溃疡、胃十二指肠溃疡、溃疡性结肠炎、皮肤皲裂、糖尿病皮肤溃疡、顽固性鼻出血、鼻中隔糜烂均有良好疗效,并得到广泛应用^[4-6]。

美洲大蠊提取物用于修复各类溃疡及创伤创面的作用机制复杂,可通过:① 促进胞基质表达,调节细胞因子分泌量,提高中性粒细胞数量和巨噬细胞吞噬能力;② 诱导血管内皮细胞迁移,促进血管新生;③ 增加黏膜中氨基己糖及前列腺素 E₂ 等从而达到修复受损黏膜的作用。目前,美洲大蠊提取物在膀胱黏膜损伤中的应用研究少见报道。热休克蛋白又称应激蛋白,是细胞受各种应激原刺激后诱导产生的一组蛋白,具有维持细胞蛋白稳定、促进细胞生存等功能,其中热休克蛋白-60、热休克蛋白-70 分布广泛,在应激后产生最为显著^[9,10]。白介素-8 是一种

重要的炎症因子,膀胱黏膜损伤后,尿中白介素-8 浓度明显升高,其水平可反映膀胱黏膜炎症反应状况^[11]。本研究因此借助热休克蛋白-60、热休克蛋白-70 在炎症中的表达情况及尿白介素-8 浓度来反映美洲大蠊提取物对受损膀胱黏膜炎症减轻的作用。本研究证实,美洲大蠊提取物不仅可以从组织病理上减少膀胱黏膜损伤,减轻炎症浸润,也可减少膀胱黏膜热休克蛋白-60 和热休克蛋白-70 的表达,同时可降低尿白介素-8 浓度。既往研究发现,大分子高浓度透明质酸钠对受损的膀胱黏膜具有最大修复作用^[2]。本研究进一步与透明质酸钠进行对比研究,发现美洲大蠊提取物与透明质酸钠可同样程度修复大鼠受损膀胱黏膜及减少膀胱黏膜热休克蛋白-60、热休克蛋白-70 的表达同时降低尿白介素-8 浓度。因此,美洲大蠊提取物可修复损伤的膀胱黏膜,加强膀胱壁的屏障作用,阻止炎症反应,其干预作用与透明质酸钠相似。

参考文献

- 1 Parsons CL. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis [J]. *Urology*, 2007, 69 (4 Suppl):9-16
- 2 宋家木,张心男,徐智慧,等. 透明质酸钠对膀胱黏膜损伤后修复的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2009, 44(6):691-694

- 3 焦春香,刘光明,周萍. 天然药物康复新的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(11):2623-2624
- 4 高黎黎,王鲁平,李光辉. 康复新的临床新用途 [J]. *中国误诊学杂志*, 2006, 6(7):1390-1393
- 5 丁娟英,高金星,李德芳. 康复新液加维生素 E 胶丸治疗复发性口腔溃疡疗效观察 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2010, 20(8):497-498
- 6 段阳日. 康复新液联合奥美拉唑治疗消化性溃疡 96 例 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2011, 21(9):619-620
- 7 Soler R, Bruschini H, Truzzi JC, *et al.* Urinary glycosaminoglycans excretion and the effect of dimethyl sulfoxide in an experimental model of non-bacterial cystitis [J]. *Int Braz J Urol*, 2008, 34(4):503-511
- 8 Soler R, Bruschini H, Martins JR, *et al.* Urinary glycosaminoglycans as biomarker for urothelial injury: is it possible to discriminate damage from recovery [J]. *Urology*, 2008, 72(4):937-942
- 9 Multhoff G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance [J]. *Methods*, 2007, 43(3):229-237
- 10 Grundtman C, Kreutmayer SB, Almanzar G, *et al.* Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5):960-968
- 11 叶福增,张心男,徐智慧. 白介素-8 和表皮生长因子在大鼠膀胱黏膜损伤中表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(10):1101-1102

(收稿日期:2012-05-27)

(修回日期:2012-06-18)

胶原蛋白寡肽在肺癌患者化疗期间的营养价值评价

邹丽芳 胡晓斐 陈志军 颜波儿 吴丽萍

摘要 **目的** 探索深海鱼皮胶原蛋白寡肽(简称鱼皮寡肽)在肺癌患者化疗期间增效减毒的作用。**方法** 选择住院非小细胞肺癌患者 60 例,随机均分为干预组和对照组,每组各 30 例。干预组和对照组均接受 TP 化疗方案和其他常规治疗与护理。干预组在此基础上于化疗第 1 天开始加服用鱼皮寡肽。于化疗前后评价两组化疗骨髓抑制情况、消化道不良反应以及体力状况 Karnofsky 评分。**结果** 干预组化疗后白细胞总体下降率为 60.00%,对照组为 83.33%;血红蛋白下降率干预组为 30%、对照组为 60%;干预组均低于对照组,两组比较有统计学差异($P < 0.05$);消化道不良反应两组比较无统计学差异;Karnofsky 评分化疗后干预组得分高于对照组,两组比较有统计学差异($P < 0.05$)。**结论** 鱼皮胶原蛋白寡肽能有效改善肺癌患者化疗期间骨髓抑制情况,提高患者生活质量,有很高的营养价值。

关键词 胶原蛋白寡肽 非小细胞肺癌 化学治疗 不良反应 研究

Assesment of the Nutritive Value of Fishskin Collagen-Peptide during the Chemotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer.

Zou Lifang, Hu Xiaofei, Chen Zhijun, Yan Boer, Wu Liping. Zhoushan Hospital, Zhejiang 316004, China

Abstract Objective To explore the effect of fishskin collagen-peptide of decreasing side effects during the chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Totally 60 patients of NSCLC were recruited and randomly divided into in-

基金项目:浙江省科技厅基金资助项目(2011C23034)

作者单位:316004 浙江省舟山医院

通讯作者:胡晓斐,电子信箱:hxf801@126.com