

# 油茶蒲提取物对人前列腺增生 BPH-1 细胞的抑制作用研究

沈骏, 郑茜茜, 吴晓琴, 沈建福

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058)

**摘要:** 良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)在中老年男性中高发, 5 $\alpha$ -还原酶对其形成起重要作用。为考察油茶蒲提取物中 5 $\alpha$ -还原酶抑制活性组分对 BPH 的作用, 本研究采用 MTT 法测定细胞增殖、Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡, 通过给予不同的给药浓度和作用时间, 比较各活性组分对人前列腺增生 BPH-1 细胞的作用。试验结果表明, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下阳性对照非那雄胺、组分 Fr5 及 Fr6 的细胞增殖抑制率分别为 47.20% $\pm$ 1.02%、48.60% $\pm$ 1.56%、55.23% $\pm$ 0.58%; 组分 Fr6 在各作用浓度下抑制率均显著高于非那雄胺, Fr5 与非那雄胺活性相当。活性组分对 BPH-1 细胞增殖的抑制率与对 5 $\alpha$ -还原酶的抑制率测定结果趋势相近, 两种方法相互印证。时效性试验表明活性组分 Fr6 药效较非那雄胺持久, 细胞凋亡试验表明 Fr6 在低剂量 (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 时诱导细胞凋亡率即可达 12.40% $\pm$ 3.78%, 与非那雄胺相近(13.68% $\pm$ 1.02%), 极具开发潜力。

**关键词:** 油茶蒲提取物; 良性前列腺增生; 5 $\alpha$ -还原酶, BPH-1 细胞

文章编号: 1673-9078(2015)7-6-11

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.002

## Effect of Oil Tea *Camellia* Extract on BPH-1 Cells

SHEN Jun, ZHENG Xi-xi, WU Xiao-qin, SHEN Jian-fu

(School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** Benign prostatic hyperplasia (BPH) is associated with high morbidity in older men and 5 $\alpha$ -reductase plays an important role in BPH pathogenesis. To confirm the effect of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors (Fr5 and Fr6) purified from oil tea *Camellia* extract (OCE) on BPH (with finasteride as positive control), cell proliferation was measured by the thiazolyl blue tetrazolium blue (MTT) assay and apoptosis was detected by the Annexin V/PI double-staining method using the benign prostate hyperplastic epithelial cell line (BPH-1). The effects of different drug concentrations and action times on BPH-1 cells were compared. Our results showed that at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the positive control as well as active components, Fr5 and Fr6 showed cell proliferation inhibition rates of 47.20%  $\pm$  1.02%, 48.60%  $\pm$  1.56%, and 55.23%  $\pm$  0.58%, respectively. Fr6 showed stronger inhibition than the positive control at all the concentrations tested, while Fr5 showed effects similar to those of the control. The rate of cell proliferation inhibition for OCE was similar to that for 5 $\alpha$ -reductase; thus, both methods were mutually confirming. The effect shown by the active component Fr6 also lasted longer than that by positive control. Additionally, the apoptosis rate for low-dose Fr6 (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was 12.40%  $\pm$  3.78%, which was close to that for finasteride at 13.68%  $\pm$  1.02%. These results indicate a potential for OCE active components to inhibit BPH, especially Fr6, which warrants further study.

**Key words:** oil tea *Camellia* extract; benign prostatic hyperplasia; 5 $\alpha$ -reductase; BPH-1 cell

良性前列腺增生症 (Benign prostatic hyperplasia, BPH) 在中老年男性中高发, 51~60 岁和 80 岁以上男性的发病率可达 50% 和 90%<sup>[1]</sup>, 严重影响患者生活质量。其发生机制较为复杂, 主流观点认为, 5 $\alpha$ -还原酶催化雄激素睾酮生成活性更强的双氢睾酮, 通过间接调控相关生长因子及其受体导致腺体增生<sup>[2]</sup>。目前临床上应用较广的非那雄胺 (Finasteride)、度他雄胺

(Dutasteride)<sup>[3]</sup>等都是 5 $\alpha$ -还原酶抑制剂。但这些合成抑制剂不仅价格昂贵且有一定副作用, 如导致性欲减退、男女性型乳房症等<sup>[4]</sup>。故从天然植物中寻找高效低毒的 5 $\alpha$ -还原酶抑制剂日益成为关注热点, 锯叶提取物 (伯泌松)、非洲臀果木提取物 (通尿灵)、油菜花粉提取物 (前列康)、黑麦提取物 (舍尼通)<sup>[5]</sup>等均已临床上得到广泛应用。

油茶(*Camellia oleifera* Abel.) 是山茶科(Theaceae) 山茶属 (*Camellia*) 木本植物, 为我国特有的木本油料作物。油茶蒲是油茶果的外壳, 约占油茶果总重量的 2/3, 为茶油加工废弃物<sup>[6]</sup>。前期研究证实油茶蒲提

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31270722)

作者简介: 沈骏 (1990-), 男, 硕士, 主要从事天然产物与功能食品研究

通讯作者: 沈建福 (1964-), 男, 教授, 主要从事粮油加工与食品安全研究

取物对 5 $\alpha$ -还原酶具有极强的抑制活性,动物实验也证实其能有效改善大鼠前列腺增生症状<sup>[7]</sup>,毒理学评价试验表明油茶蒲提取物是一种安全、无致突变性的资源<sup>[8]</sup>。

BPH-1 细胞从经尿道前列腺手术切除的人前列腺组织中分离,于 1995 年首次由 S.W. Hayward<sup>[9]</sup>等分离鉴定得到,被广泛应用于人前列腺上皮细胞的增生和分化以及由前列腺上皮细胞到肿瘤表型的转化研究<sup>[10]</sup>。

前期研究本课题组以对 5 $\alpha$ -还原酶的抑制率为指针从油茶蒲提取物中分离得到 7 个活性组分<sup>[11]</sup>,本文以油茶蒲各活性组分为研究对象,研究其对 BPH-1 细胞增殖的影响及其诱导细胞凋亡的作用,探索体外 5 $\alpha$ -还原酶抑制模型和 BPH-1 细胞抑制模型两种评价体系的关联性,为油茶的综合利用及前列腺增生相关药品或保健品的开发提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

油茶蒲提取物 OCE (实验室自制),组分 Fr2~Fr6 参照郑茜茜<sup>[11]</sup>的方法用聚酰胺柱层析纯化 OCE 制备得到;雌性 SD 大鼠,8 周龄,体重 250~300 g,由浙江大学紫金港动物中心提供(生产许可 SCXK(沪)2012-0002);人良性前列腺增生细胞 BPH-1 细胞:长沙赢润生物技术有限公司。

### 1.2 主要试剂和仪器设备

#### 1.2.1 实验试剂

乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯),美国 Merck 公司;睾酮(T)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH):Sigma 公司;1,4-二硫代苏糖醇(DTT):国药集团化学试剂有限公司;考马斯亮兰蛋白测定试剂盒:南京建

$$\text{蛋白质浓度}(g/L) = \frac{\text{测定管OD值} - \text{空白管OD值}}{\text{标准管OD值} - \text{空白管OD值}} \times \text{标准管浓度} \times \text{样品稀释倍数} \quad (1)$$

标准管为试剂盒中蛋白标准液,空白管为双蒸水,测定管为粗微粒体提取液。

以总蛋白质含量表示粗微粒体提取物中 5 $\alpha$ -还原酶含量,测得大鼠肝脏粗微粒体提取液中 5 $\alpha$ -还原酶浓度为 2.60 mg/mL。

#### 1.3.2 5 $\alpha$ -还原酶体外抑制活性的测定

5 $\alpha$ -还原酶抑制活性测定参考 Thapana K<sup>[12]</sup>的 HPLC 方法方法,色谱条件:Unitary Luna C18 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m);柱温:40  $^{\circ}$ C;进样量:10  $\mu$ L;流速:1 mL/min;流动相:65% 甲醇,检测波长:242 nm。

成科技有限公司;非那雄胺(保列治):杭州默沙东制药有限公司;其它试剂均为国产分析纯。

提酶缓冲液:0.32 mol/L 蔗糖,0.1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L 磷酸钠, pH 6.5;

磷酸缓冲液:20  $\mu$ mol/L 磷酸钠, pH 6.5。

高糖 DMEM 培养基、胰酶 trypsin:美国 GIBCO 公司;新生牛血清(无菌、无支原体、无嗜菌体):杭州四季青生物工程有限公司;PBS 缓冲液、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、碘化丙啶(PI):Sigma 公司;细胞凋亡试剂盒:联科生物 Multiscience。

#### 1.2.2 仪器设备

FD-1-50 真空冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;Waters 2695 高效液相色谱仪(配有 2996 PDA 检测器):美国沃特世公司;Labconco CentriVap 离心浓缩仪:美国 Labconco 公司。

Himac CP-80 $\beta$  超高速离心机:日本日立公司;T10BS25 匀浆机:德国 IKA 公司;TU-1810 型紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司。

Forma 3111 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱:美国 Thermo 公司;BIO-RAD 680 酶标仪:美国 BIO-RAD 公司;Sorvall Legend Mach 1.6R 离心机:美国 Thermo 公司;十万分之一电子天平:美国奥豪斯公司;6HT 流式细胞仪:美国 Guave 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 5 $\alpha$ -还原酶的制备

清洁级雌性 SD 大鼠 3 只,禁食不禁水过夜后脱颈椎处死,取出肝脏冰台上剪碎。用预冷的提酶缓冲液制成 1:5 的匀浆,在 4  $^{\circ}$ C 下,10,000 g 离心力下离心 15 min,取胞浆部分 100,000 g 离心力下离心 1 h,倒掉上清,沉淀即为粗微粒体提取物。粗微粒体提取液与生理盐水按 1:9 稀释,充分混匀,利用考马斯亮兰试剂盒测定粗微粒体的蛋白质含量,计算公式如式 1:

在 1.5 mL 测活体系中,依次加入 0.5 mL pH 6.5 的磷酸缓冲液、0.1 mL 50% 乙醇、150  $\mu$ L 0.5 mg/mL T、250  $\mu$ L 2.0 mg/mL NADPH、0.5 mL 2.60 mg/mL 酶提取物,37  $^{\circ}$ C 反应 30 min,加入 2.5 mL 二氯甲烷终止反应,再加入 0.25 mL 100  $\mu$ g/mL 丙基羟苯酸酯作为内标,振荡使其充分混匀,400 g 离心 10 min。取 1 mL 下层有机相,离心浓缩并蒸干,残留物溶于 1.5 mL 甲醇,取 10  $\mu$ L 进样,将残留 T 与内标峰面积的比值记为 r<sub>反应</sub>,r<sub>反应</sub> 越大说明酶活性越低。

按照上述相同方法分别测定空白管(反应前加入二氯甲烷使酶失活)的  $r_{\text{空白}}$  和样品管(将 50%乙醇替换为样品)的  $r_{\text{样品}}$ 。

样品对 5 $\alpha$ -还原酶的抑制活性计算公式如下:

$$\text{酶抑制率}(\%) = \frac{r_{\text{样品}} - r_{\text{反应}}}{r_{\text{空白}} - r_{\text{反应}}} \times 100\%$$

### 1.3.3 BPH-1 细胞抑制活性检测

取生长良好、对数生长期的 BPH-1 细胞用 0.25% 胰酶消化接种于 96 孔培养板, 每孔加入细胞  $1 \times 10^5$  个, 培养液 100  $\mu\text{L}$ , 放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。细胞贴壁 24 h 后更换培养液。每孔加入含试样的培养液 100  $\mu\text{L}$ , 设置空白组、非那雄胺阳性对照组和样品组(Fr2、Fr3、Fr4、Fr5、Fr6), 每组 6 个复孔, 培养 48h。样品组设置 6 个浓度, 分别为 12.5、25、50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$ ; 阳性对照组也设置 6 个浓度, 分别为 6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{g/mL}$ 。终止反应前 4 h, 每孔加入 5 g/L MTT 20  $\mu\text{L}$  继续培养 4 h, 吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 置微孔振荡器上振荡 10 min 待紫色结晶完全溶解后, 于 570 nm 测定吸光度(A), 并计算细胞生长抑制率(IR)。

根据油茶蒲样品组的 MTT 测定结果, 选取其中细胞增殖抑制作用较强的 Fr5 和 Fr6 做 MTT 的时效实验, 并设空白组与非那雄胺阳性对照组。样品组剂量设置为 12.5、25、50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$ ; 阳性对照组剂量设置为 6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{g/mL}$ ;

时间选择 24 h、48 h 和 72 h。计算细胞生长抑制率(IR)。

$$\text{细胞存活率}(\%) = A_{\text{实验}}/A_{\text{空白}} \times 100\%$$

$$\text{IR}(\%) = (1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

### 1.3.4 Annexin V/PI 双染色法测定细胞凋亡

每孔加入处于对数生长期的细胞  $1 \times 10^5$  个, 细胞贴壁 24 h 后, 加入不同剂量的待测样品, 同时设置空白组和阳性对照组。经过 48 h 后流式细胞仪检测细胞凋亡情况。检测方法: 将收集的细胞离心去除培养液, 经 PBS 洗涤、离心后, 加入 500  $\mu\text{L}$  Annexin-binding 缓冲液重悬细胞后, 再加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 10  $\mu\text{L}$  PI, 室温避光染色 5 min, 流式细胞仪检测。

### 1.3.5 统计学分析

实验结果数据采用 Excel 2007 软件处理, 计算数值以均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示, 显著性差异采用 t 检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 油茶蒲活性成分对 BPH-1 细胞增殖作用分析

#### 2.1.1 油茶蒲活性成分对 BPH-1 细胞增殖的抑制率

不同浓度下 OCE、Fr2、Fr3、Fr4、Fr5 及 Fr6 对 BPH-1 细胞增殖的抑制率见表 1。

表 1 油茶蒲活性成分对 BPH-1 细胞增殖 48 小时的抑制率(%)

Table 1 Inhibitory effect of OCE and its fractions on BPH-1 cell growth after 48h (%)

试样	浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )						
	6.25	12.5	25	50	100	200	400
非那雄胺	14.51 $\pm$ 1.38	17.57 $\pm$ 0.82	27.62 $\pm$ 1.59	45.53 $\pm$ 1.18 <sup>d</sup>	47.20 $\pm$ 1.02	42.13 $\pm$ 1.32 <sup>d</sup>	-
OCE	-	15.89 $\pm$ 2.56	26.28 $\pm$ 1.61	34.89 $\pm$ 1.59 <sup>b</sup>	49.20 $\pm$ 3.56	62.91 $\pm$ 1.89 <sup>b</sup>	62.92 $\pm$ 2.17
Fr2	-	2.54 $\pm$ 1.67 <sup>b,d</sup>	13.62 $\pm$ 4.01 <sup>b,d</sup>	28.56 $\pm$ 1.82 <sup>b,d</sup>	44.60 $\pm$ 2.21 <sup>a,c</sup>	55.18 $\pm$ 0.89 <sup>b,d</sup>	70.01 $\pm$ 0.84 <sup>d</sup>
Fr3	-	19.02 $\pm$ 3.16	26.23 $\pm$ 4.78	40.42 $\pm$ 3.56 <sup>d</sup>	46.01 $\pm$ 4.67	49.28 $\pm$ 1.45 <sup>b,d</sup>	58.89 $\pm$ 2.10 <sup>d</sup>
Fr4	-	11.50 $\pm$ 2.38 <sup>b,c</sup>	25.27 $\pm$ 2.78	39.21 $\pm$ 3.36 <sup>b,c</sup>	47.14 $\pm$ 2.36	50.52 $\pm$ 2.01 <sup>b,d</sup>	57.52 $\pm$ 0.78 <sup>d</sup>
Fr5	-	25.72 $\pm$ 1.56 <sup>b,d</sup>	35.94 $\pm$ 1.22 <sup>b,d</sup>	43.68 $\pm$ 2.10 <sup>d</sup>	48.60 $\pm$ 1.56	50.78 $\pm$ 2.44 <sup>b,d</sup>	58.22 $\pm$ 1.56 <sup>d</sup>
Fr6	-	24.54 $\pm$ 1.58 <sup>b,d</sup>	39.22 $\pm$ 2.44 <sup>b,d</sup>	50.02 $\pm$ 0.67 <sup>b,d</sup>	55.23 $\pm$ 0.58 <sup>b,d</sup>	59.92 $\pm$ 1.42 <sup>b,d</sup>	65.89 $\pm$ 2.41 <sup>b,c</sup>

注: OCE 为油茶蒲提取物, Fr 组分为其聚酰胺柱层析纯化组分。上标 <sup>a</sup> 和 <sup>b</sup> 表示样品与非那雄胺相比细胞增殖抑制率有显著性差异 (分别在  $p < 0.05$  和  $p < 0.01$  水平), 粗体表示其抑制率显著增加; 上标 <sup>c</sup> 和 <sup>d</sup> 表示样品与 OCE 相比细胞增殖抑制率有显著性差异 (分别在  $p < 0.05$  和  $p < 0.01$  水平)。

结果显示, 阳性对照非那雄胺对 BPH-1 细胞增殖的抑制作用在一定浓度范围内呈剂量依赖性, 当非那雄胺在浓度低于 50  $\mu\text{g/mL}$  时抑制率随浓度的增加而迅速增大, 50  $\mu\text{g/mL}$  到 100  $\mu\text{g/mL}$  时抑制率增速平缓, 浓度在大于 100  $\mu\text{g/mL}$  时抑制率有下降趋势。OCE 及

其分级组分在试验浓度范围内对细胞增殖的抑制率与浓度均呈正相关, 当试样浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  时, OCE 及分级组分均表现出对 BPH-1 细胞增殖很强的抑制活性, Fr6 的细胞增殖抑制率显著高于非那雄胺 ( $p < 0.01$ ), 除 Fr2 外, 其余组分的抑制率均与非那雄胺

相当；在给药浓度小于 50 μg/mL 时，Fr5 和 Fr6 的抑制活性显著高于非那雄胺(p<0.01)。

在上述作用 48 h 的实验条件下，各个给药浓度下组分 Fr6 对 BPH-1 细胞增殖的抑制率均显著高于非那雄胺(p<0.01)，组分 Fr5 的细胞增殖抑制率与非那雄胺相当，在前列腺增生药物开发中显示出良好的前景，因此选择 Fr5 和 Fr6 进一步考察其抑制率与浓度和作用时间的关系。

### 2.1.2 活性成分对 BPH-1 细胞增殖及对 5α-还原酶的抑制作用的比较

选取与体外 5α-还原酶评价模型实际给药浓度 (66.67 μg/mL) 最接近的 50 μg/mL 时细胞增殖抑制结果进行比较，如图 1 所示，可知各活性组分对 BPH-1 细胞增殖的抑制率与对 5α-还原酶抑制率的测定结果趋势相近。

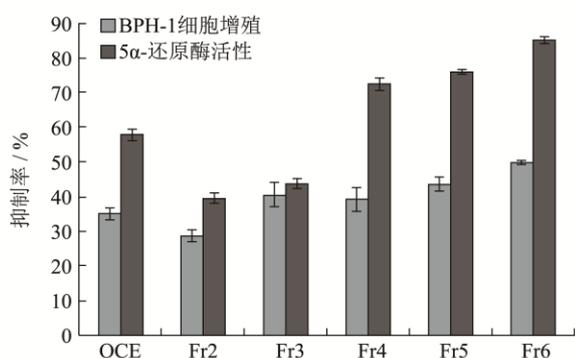


图 1 活性组分对 BPH-1 细胞增殖 (浓度 50 μg/mL) 及对 5α-还原酶的抑制 (浓度 66.67 μg/mL) 作用的比较

Fig.1 Comparison of the inhibiting effect of OCE and its fractions on BPH-1 and 5α-reductase evaluation systems

5α-还原酶催化睾酮(T)生成活性更强的双氢睾酮(DHT)，双氢睾酮-雄激素受体复合物能结合特异性抗原反应元件，产生前列腺特异性抗原和调节蛋白，调节细胞生长和功能，其作用于上皮细胞，可刺激上皮细胞增殖<sup>[3]</sup>。油茶蒲活性组分作为 5α-还原酶抑制剂，可能通过降低 5α-还原酶的活性，抑制睾酮(T)转化为 DHT，从而抑制 BPH-1 细胞增殖。两种评价体系的结果互相印证，进一步肯定了油茶蒲活性成分作为 5α-还原酶抑制剂改善前列腺增生的作用。

### 2.1.3 各活性组分对 BPH-1 细胞增殖抑制率与总酚含量的关系

油茶蒲提取物 OCE 及其纯化活性组分中含较高含量酚类物质，各组分中总酚含量与其对 BPH-1 细胞增殖抑制率的关系如图 2。

由图 2 可知，总酚含量与活性组分对 BPH-1 细胞

增殖抑制率的相关系数可达 0.885，推测油茶蒲提取物活性组分中抑制 BPH-1 细胞增殖的活性成分可能是某种酚类物质。

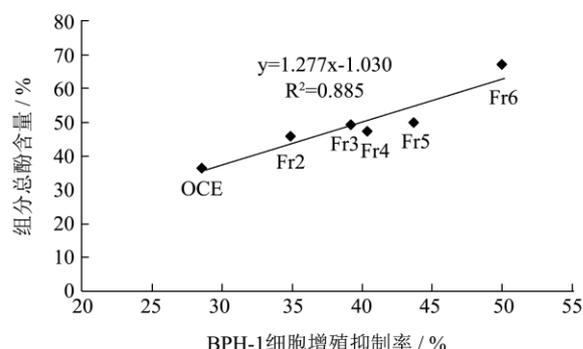


图 2 各活性组分对 BPH-1 细胞增殖抑制率 (浓度 50 μg/mL) 与总酚含量的关系

Fig.2 Correlation between content of polyphenol and the inhibition rate of OCE and its fractions on BPH-1 cells

### 2.2 活性部位对 BPH-1 细胞增殖抑制率与给药浓度、时间相关性分析

Fr5 和 Fr6 对 BPH-1 细胞增殖的抑制率与时间和剂量呈相关性见图 3。

结果显示 Fr5、Fr6 及非那雄胺对细胞增殖的抑制率随着时间的增加而升高，其中非那雄胺的药效发挥较快，浓度在 6.25~50 μg/mL 作用 24 h 时即有较强的抑制作用，48 h 时抑制作用最强，72 h 时抑制作用略有下降。而 Fr5、Fr6 药效发挥较慢，在作用 48 h 后，Fr5 和 Fr6 浓度大于 50 μg/mL 时的抑制作用开始增强并逐渐超过非那雄胺，在 72 h 时抑制作用最强，这与中药材通常药效发挥较慢的一般观点相一致。

Fr6 相较 Fr5，在 3 个作用时间、各个给药浓度下都具有更高的抑制活性；且当给药浓度超过 100 μg/mL 时，作用 24 h 其抑制活性高于非那雄胺，作用 48 及 72 h、较低浓度下 (50 μg/mL) Fr6 也显示出强于非那雄胺的抑制作用。实验结果表明，Fr6 药效较非那雄胺持久，在较低浓度下有很强的抑制细胞增殖的能力，值得进一步的分离纯化深入研究。

### 2.3 油茶蒲活性成分诱导 BPH-1 细胞凋亡的作用

不同浓度 Fr5 和 Fr6 对 BPH-1 细胞的诱导凋亡作用见表 2。

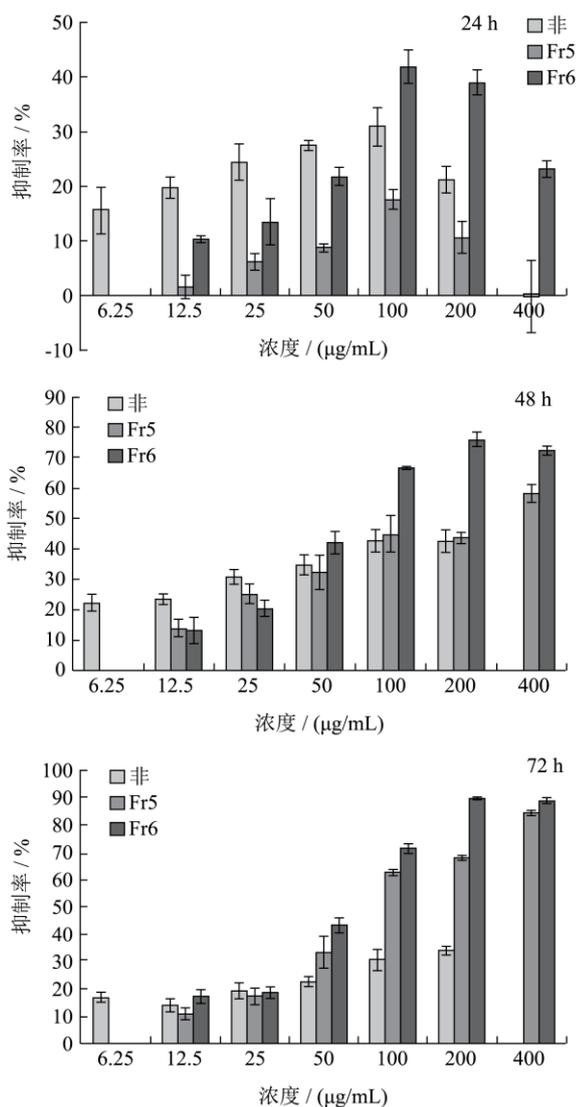


图3 Fr5、Fr6 及非那雄胺作用不同时间对 BPH-1 细胞增殖的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effect of Fr5, Fr6, and finasteride on BPH-1 cell proliferation

表 2 不同浓度的 Fr5 和 Fr6 对 BPH-1 细胞的诱导凋亡作用

Table 2 Effect of Fr5 and Fr6 on induction apoptosis of BPH-1 cells after 48 h

	早期凋亡 细胞/%	晚期凋亡和 坏死细胞/%	总凋亡 细胞/%	药物诱导的 凋亡细胞/%
空白对照	31.67±2.78	14.06±0.68	45.72±2.66	0
非那雄胺-25	47.62±0.72	11.78±1.08	59.40±1.02	13.68±1.02
Fr5-25	39.78±1.31	9.45±0.56	49.23±1.67	3.51±1.67**
Fr5-50	43.31±5.66	14.71±1.02	58.02±4.77	12.30±4.77
Fr5-100	49.74±0.22	10.09±1.31	59.83±1.12	14.11±1.12
Fr6-25	48.40±4.38	9.72±0.69	58.12±3.78	12.40±3.78
Fr6-50	57.74±2.89	8.27±1.42	66.01±1.63	20.29±1.63**
Fr6-100	49.64±3.02	8.54±1.44	58.18±1.73	12.46±1.73

注: \*\*表示组分的细胞诱导凋亡率与非那雄胺相比

p<0.01。

诱导细胞凋亡实验的结果基本与细胞增殖抑制实验一致,非那雄胺在 25 µg/mL 低剂量下即具有较高诱导细胞凋亡率(13.68%±1.02%)。组分 Fr5 在 50µg/mL 剂量下具有较高诱导凋亡率 (12.30%±4.77%); Fr6 低剂量时(25 µg/mL)诱导的细胞凋亡率即可达 12.40%±3.78%, 与非那雄胺诱导的细胞凋亡率相近,说明 Fr6 在低剂量浓度范围即可发挥较好的诱导细胞凋亡作用。

M. Tandy Sutton 等<sup>[10]</sup>通过 TUNEL 法测定了非那雄胺对 BPH-1 的诱导细胞凋亡的作用。结果显示非那雄胺可以提高 BPH-1 细胞凋亡指数(5.59、9.31 µg/mL 浓度下作用 24 h 诱导的细胞凋亡率分别为 5.10%、5.50%), 并进一步证实非那雄胺对良性和恶性前列腺疾病有显著的诱导凋亡和抗血管生成作用。本研究中 25 µg/mL 低剂量时 Fr6 的诱导细胞凋亡作用与非那雄胺相当, 进一步证实 Fr6 极具研究和开发价值。

### 3 结论

3.1 本研究表明油茶蒲提取物各活性组分可有效抑制 BPH-1 细胞增殖, 其在一定浓度范围内呈剂量依赖性, 且作用 48 h 时组分 Fr6 的增殖抑制活性强于阳性对照非那雄胺(p<0.01), 组分 Fr5 的活性与非那雄胺基本相当。

3.2 各组分对 BPH-1 细胞增殖的抑制率与其总酚含量相关系数达到 0.885, 推测活性成分可能是某酚类物质。且细胞增殖抑制率与对 5α-还原酶抑制率的测定结果趋势相近, 两种评价模型的相似结果进一步证实了油茶蒲活性成分改善前列腺增生的潜力。

3.3 Fr6 相较其它活性成分显示了更高的 BPH-1 细胞增殖抑制活性, 时效性实验表明其药效较非那雄胺更持久, 且其在低剂量(25 µg/mL)时诱导细胞凋亡率即可达 12.40%±3.78%, 与非那雄胺相近(13.68%±1.02%), 显示了极大的开发价值, 值得进一步深入研究。

### 参考文献

[1] Dhingra Neelima, Bhagwat Deepak. Benign prostatic hyperplasia: An overview of existing treatment [J]. Indian Journal of Pharmacology, 2011, 43: 6-12

[2] 赵品婷, 卢少平, 梁军. 前列腺增生症的病因学和发病机制研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(9): 1872-1875

ZHAO Pin-ting, LU Shao-ping, LIANG Jun. Research progress on etiology and pathogenesis of benign prostatic hyperplasia [J]. Journal of Modern Oncology, 2010, 18(9):

- 1872-1875
- [3] Stephen S C, John M F. Medical treatment of benign prostatic hyperplasia [J]. Postgrad Med. J., 2007, 83: 73-78
- [4] Warintorn R, Jiradej M, Masahiko Abe, et al. 5 $\alpha$ -Reductase type 1 inhibition of *Oryza sativa* bran extract prepared by supercritical carbon dioxide fluid [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2011, 59:61-71
- [5] Cho C H, Bae J S, Kim Y U. 5 $\alpha$ -reductase inhibitory components as antiandrogens from herbal medicine [J]. J. Acupuncture and Meridian Studies, 2010, 3:116 -118
- [6] 范康福,吴雪辉.油茶果壳制备活性炭的工艺研究[J].现代食品科技,2013,29(2):339-342  
FAN Kang-fu, WU Xue-hui. Preparation of activated carbons from *Camellia* nutshell [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(2): 339-342
- [7] 罗晓伟.油茶蒲醇提取物抑制 5 $\alpha$ -还原酶及对前列腺疾病的作用[D].杭州:浙江大学,2011  
LUO Xiao-wei. The effects of ethanol extracts from fruit shell of *Camellia oleifera* Abel. on inhibiting 5 $\alpha$ -reductase and preventing prostate diseases [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011
- [8] 陈秋平.油茶蒲减肥降脂功能因子研究[D].杭州:浙江大学,2011  
CHEN Qiu-ping. Effects of functional factors in the hull of *Camellia oleifera* Abel. on obesity and dyslipidemia [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011
- [9] S W Hayward, R Dahiya, G R Cunha, et al. Establishment and Characterization of an Immortalized but Non-Transformed Human Prostate Epithelial Cell Line: BPH-1 [J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1995, (31A): 14-24
- [10] M Tandy Sutton, Melissa Yingling, Ash Vyas, et al. Finasteride Targets Prostate Vascularity by Inducing Apoptosis and Inhibiting Cell Adhesion of Benign and Malignant Prostate Cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14: 14301-14320
- [11] 郑茜茜,夏博能,沈骏,等.聚酰胺色谱法分离油茶蒲提取物中抑制 5 $\alpha$ -还原酶的活性部位[J].食品科学, 2014, 35(13): 20-25  
ZHENG Xi-xi, XIA Bo-neng, SHEN Jun, et al. Separation on active sites of *Oiltea Camellia* Extracts on inhibition of 5 $\alpha$ -reductase by polyamide chromatography[J]. Food Science, 2014, 35(13): 20-25
- [12] Thapana K, Chaiyavat C, Vandee R, et al. Screening of steroid 5 $\alpha$ -reductase inhibitory activity and total phenolic content of Thai plants [J]. Journal of Medicinal Plants Research. 2011, 5(7): 1265-1271
- [13] Carson C, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia [J]. Urology, 2003,61(4A):2-7