

# 前列通利汤对慢性非细菌性前列腺炎大鼠模型前炎性基因表达的影响

周晓辉<sup>1</sup> 韩 蕾<sup>2</sup> 周智恒<sup>3</sup> 刘忠德<sup>2</sup> 杨吉相<sup>2</sup>

(1. 中国药科大学临床药理学教研室, 江苏省南京市童家巷 24 号, 210009;

2. 辽宁中医药大学; 3. 上海中医药大学)

**[摘要]** **目的** 研究补肾通络法对实验性慢性非细菌性前列腺炎(CAP)动物模型前炎性基因表达的影响。**方法** 60 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组, 模型对照组, 前列通利汤高、低剂量组及阳性药物对照组; 前列通利汤高、低剂量组及阳性药物对照组分别于造模后 45 天连续给药 1 个月, 观察各组大鼠前列腺组织的整体、光镜、电镜病理形态学以及炎性基因表达产物肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ 、白细胞介素-1 $\beta$  IL-1 $\beta$ 、白细胞介素-2(IL-2) 和诱导型一氧化氮合成酶(iNOs) 的变化。**结果** 前列通利汤高剂量组 CAP 大鼠血清或前列腺组织的 TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  IL-2、iNOs 趋于正常, 组织学及电镜检测出的炎性病理变化明显减轻或恢复正常, 与模型对照组比较差异有统计学意义。**结论** 以“补肾通络”为指导原则的前列通利汤能够通过抑制炎性基因的表达, 调节免疫功能, 从而对实验性 CAP 大鼠模型产生治疗作用。

**[关键词]** 慢性非细菌性前列腺炎; 补肾通络法; 前炎性基因; 前列通利汤

**Effect of Qianlie Tongli Decoction on Expression of Proinflammatory Cytokine Genes of Chronic Abacterial Prostatitis Model Rats**  
ZHOU Xiao-hui<sup>1</sup>, HAN Lei<sup>2</sup>, ZHOU Zhi-heng<sup>3</sup>, et al.

(1. Department of Clinical Pharmacology of China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; 2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 3. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine)

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effect of benefiting kidney and dredging meridian method on expression of proinflammatory cytokine genes of Chronic abacterial prostatitis(CAP) model rats. **Methods** The 60 Wistar rats were randomized into normal control group, model control group, high and low dosage groups of Qianlie Tongli Decoction, and positive control group. The high and low dosage groups of Qianlie Tongli Decoction were administered herbal medicine for one month in succession 45 days after making models. The pathological changes in the prostate tissue of all groups were observed with light microscope and electron microscope, and the expression of TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  IL-2, and iNOs of inflammatory gene was tested. **Results** In the high dosage group, TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  IL-2 and iNOs tended to be normal, the pathological inflammatory changes of histology were greatly relieved or restored to normal state. Compared with the model control group, the difference was significant. **Conclusion** Qianlie Tongli Decoction with the principle of benefiting kidney and dredging meridian is therapeutically effective for the experimental CAP rats through inhibiting the expression of proinflammatory cytokine genes to regulate the immune function.

**Key Words** Chronic abacterial prostatitis; Benefiting kidney and dredging meridian; Proinflammatory cytokine gene

慢性非细菌性前列腺炎(Chronic Abacterial Prostatitis, CAP)多发于 20~40 岁青壮年男性, 中医称为“精浊”, 多由所欲不遂, 心肾不交等因素所致<sup>[1]</sup>。现代医学对其病因的解释不一, 但免疫原性因素日益受到重视。本研究是在我们前期建立的免疫性 CAP 动物模型的基础上研究以“补肾、通络”立法的中药复方的前列通利汤药理作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

3 月龄 Wistar 种大鼠, 雄性, 体重 180~220g, 共 60 只, 由中国医科大学实验动物中心提供, 实验动物使用

许可证号: SYXK(辽) 2003-0013/9。

### 1.2 主要药物与试剂

前列通利汤组成: 淫羊藿 30g, 续断 10g, 知母 10g, 黄柏 10g, 白花蛇舌草 10g, 王不留行 20g, 水蛭 10g, 穿山甲 10g, 蒲公英 10g, 败酱草 20g。传统水煎剂。前列舒乐颗粒剂: 由贵州东伟药业有限公司生产, 批号: 20061230, 规格: 6g/袋; 福氏完全佐剂(FCA): 将液体石蜡与羊毛脂按 2:1 比例共热至 70℃ 混匀, 高温灭菌后按 5mg/ml 加入佐剂用卡介苗(购于中国药品生物制品检定所), 无菌乳化后使用; 百白破疫苗注射液: 沈阳市皇姑区卫生防疫站提供; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  TNF- $\alpha$  酶联免疫测定试剂盒: 由北京邦定泰克生物有限公司提供, 批号: 200211-15; 诱导型一氧化氮合成酶(iN-

Os) 原位杂交检测试剂盒:购自武汉博士德生物工程有限公司;BcaBEST RNA PCR Kit Ver. 1. 1:购自宝生物(大连)生物技术有限公司,批号:RR023CA;3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH):由辽宁中医药大学附属第一医院临床检验中心病毒实验室提供;DL-2000 DNA Marker 及X<sup>174</sup>-Hae<sup>III</sup> Digest DNA Marker:购自宝生物(大连)生物技术有限公司;PCR 引物序列:白细胞介素-1β(IL-1β)上游引物:5'-GTCAACTATGTC-CCGACCATT-3',下游引物:5'-ATAGCAGCTTTC-GACAGTGAG-3',引物碱基对:416;白细胞介素-2(IL-2)上游引物:5'-CTCTGAGCCCCAGCCTACCA-3',下游引物:5'-AAAGCGGCTCCGAACACGAA-3',引物碱基对:405;GAPDH 上游引物:5'-GACAT-CAAGAAGGTGGTGAAG-3',下游引物:5'-TG-GAAATTGTGAGGGAGATGC-3',引物碱基对:336。

1.3 主要仪器

分析天平(瑞士 B6-E METTLER);透射电镜(日本 JEM-100CX II 型);酶标仪(美国 Bio-RAD Bench-mark);电动玻璃匀浆机(宁波新芝科器研究所 DY 89-I);超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所 JY 92-II);蛋白核酸分析仪(美国贝克曼公司 DU-600);PCR 扩增仪(美国 PE 公司 PE 9600);洗板机(美国 Bio-RAD 1575)。

1.4 分组及给药

将 60 只大鼠根据随机数字表法分为正常对照组、模型对照组、前列通利汤高、低剂量组以及阳性药物(前列舒乐颗粒剂)对照组各 12 只。大鼠前列腺蛋白提纯液的制作及造模方法参照文献<sup>[2~4]</sup>。前列通利汤高、低剂量组及阳性药物对照组的给药剂量按动物体表面积折算,分别为前列通利汤高剂量组 24g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(生药)、前列通利汤低剂量组 16g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(生药)、阳性药物对照组 1.11g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(成药)。采取灌胃给药方式,于第 1 次造模给药后 45 天给药,连续给药 1 个月。

1.5 观察指标及方法

各组大鼠于末次给药当天取样,观察各组大鼠前列腺组织的大体、光镜、电镜病理形态学以及炎性基因表达产物 TNF-α、IL-1β、IL-2、iNOS 的改变,方法均参照文献<sup>[4]</sup>。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。大鼠前列腺组织平均湿重、前列腺湿重/体重比等数据进行多组间方差分析;TNF-α 值组间差异性检验采用独立样本组间 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠前列腺组织平均湿重、前列腺湿重/体重比值比较

表 1 示,模型对照组大鼠前列腺湿重、前列腺湿重/体重比值与正常对照组比较有明显增加。前列通利汤高、低剂量组,阳性药物对照组与模型对照组相比均有降低,但以前列通利汤高剂量组明显。

表 1 各组大鼠前列腺组织平均湿重及前列腺湿重/体重比值比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 鼠数 | 前列腺组织平均湿重(mg) | 前列腺湿重/体重比值(%)  |
|-----------|----|---------------|----------------|
| 正常对照组     | 12 | 333.8±31.1    | 0.085±0.008    |
| 模型对照组     | 11 | 429.0±33.1*   | 0.110±0.010*   |
| 阳性药物对照组   | 12 | 380.3±29.1*△  | 0.098±0.009*△  |
| 前列通利汤低剂量组 | 12 | 380.7±33.2*△  | 0.096±0.009*△  |
| 前列通利汤高剂量组 | 12 | 347.3±28.9△▲  | 0.087±0.010△▲▲ |

与正常对照组比较,\**P*<0.01;与模型对照组比较,△*P*<0.01;与阳性药物对照组比较,▲*P*<0.05,▲▲*P*<0.01;模型对照组中有 1 只大鼠的前列腺组织与周围组织粘连严重,无法准确称取其湿重,故在本项目中予以剔除,但正常进行其他指标检测

2.2 各组大鼠的组织病理学改变

正常对照组大鼠前列腺组织结构完整,无炎性细胞浸润或水肿;模型对照组大鼠的前列腺局部组织结构遭到不同程度的破坏,不均匀的组织增生或萎缩,导管不均匀扩张或损毁,部分基底膜被破坏,腔内分泌物不均匀的增多或减少;阳性药物对照组及前列通利汤低剂量组也有较为明显的腺体组织结构改变及慢性炎症表现,但炎症有所减轻;前列通利汤高剂量组与正常对照组的病理表现相近,组织结构比较完整,无明显的炎性细胞浸润及水肿。

2.3 各组大鼠前列腺组织的透射电镜表现

模型对照组大鼠的前列腺细胞呈明显的高反应表现,与正常对照组间存在着明显差异。阳性药物对照组及前列通利汤低剂量组仍表现出高反应腺体细胞的超微结构改变,与正常对照组比较仍然存在明显差异。前列通利汤高剂量组与正常对照组比较其超微结构表现则相差不多,粗面内质网无重度扩张成池的现象,部分线粒体体积扩张,但无空泡性改变。

2.4 ELISA 法测定大鼠血清 TNF-α 含量实验结果

表 2 示,模型对照组明显高于正常对照组;前列通利汤高、低剂量组均与模型对照组比较差异有统计学意义,并且前列通利汤高剂量组在降低 TNF-α 含量优于阳性药物对照组。

2.5 IL-1β 实验结果

2.5.1 RT-PCR 定性结果及分析 模型对照组的条带强度高于其他各组;同时模型对照组、阳性药物对照

组、前列通利汤低剂量组、前列通利汤高剂量组、正常对照组的条带强度有递减趋势。

2.5.2 RT-PCR 半定量比值(样品/内参)结果及分析  
表 3 示,模型对照组的半定量比值高于其他各组;同时模型对照组、阳性药物对照组、前列通利汤低剂量组、前列通利汤高剂量组、正常对照组的半定量比值有递减趋势。

| 表 2 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 含量比较 (pg/ml·x $\pm$ s) |    |                                              |
|-------------------------------------------------|----|----------------------------------------------|
| 组别                                              | 鼠数 | TNF- $\alpha$ 含量                             |
| 正常对照组                                           | 12 | 43.5 $\pm$ 10.8                              |
| 模型对照组                                           | 12 | 78.3 $\pm$ 7.8*                              |
| 阳性药物对照组                                         | 12 | 71.3 $\pm$ 12.2*                             |
| 前列通利汤低剂量组                                       | 12 | 66.4 $\pm$ 13.8* $\Delta$                    |
| 前列通利汤高剂量组                                       | 12 | 50.4 $\pm$ 11.9 $\Delta\Delta\blacktriangle$ |

与正常对照组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与模型对照组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与阳性药物对照组比较,  $\Delta\blacktriangle P < 0.01$

| 表 3 各组大鼠前列腺组织 IL-1 $\beta$ 的 RT-PCR 半定量比值 |                 |        |         |
|-------------------------------------------|-----------------|--------|---------|
| 组别                                        | 条带<br>(检测组/内参组) | 半定量比值  | 半定量比值均值 |
| 正常对照组                                     | 10/20           | 0.9471 | 0.8473  |
|                                           | 11/21           | 0.7476 |         |
| 模型对照组                                     | 2/12            | 1.0097 | 1.0024  |
|                                           | 3/13            | 0.9952 |         |
| 阳性药物对照组                                   | 8/18            | 0.9951 | 0.9660  |
|                                           | 9/19            | 0.9369 |         |
| 前列通利汤<br>低剂量组                             | 6/16            | 0.9415 | 0.9417  |
|                                           | 7/17            | 0.9420 |         |
| 前列通利汤<br>高剂量组                             | 4/14            | 0.9034 | 0.9180  |
|                                           | 5/15            | 0.9327 |         |

## 2.6 IL-2 的 RT-PCR 定性结果及分析

模型对照组的条带强度高于其他各组;同时模型对照组、阳性药物对照组、前列通利汤低剂量组、前列通利汤高剂量组、正常对照组的条带强度有递减趋势。

## 2.7 iNOs 原位杂交检测结果

模型对照组表现为胞浆内棕红色颗粒较粗大,数量明显增多,弥漫分布于胞浆内,与正常对照组相比呈现出强阳性的表达反应。阳性药物对照组、前列通利汤低剂量组的表达强度与模型对照组比较虽有所减轻,但远未达到正常。而前列通利汤高剂量组的 iNOs 表达却明显低于阳性药物对照组与前列通利汤低剂量组,而趋近于正常对照组的表现。

## 3 讨论

虽然造成 CAP 的病因至今仍未明确,但目前认为最有可能导致 CAP 的病因是机体全身或局部原因所导致的免疫机能紊乱,这是目前 CAP 研究的热点,也为大多数学者所接受<sup>[5]</sup>。其中,可以引发免疫性炎症反

应的前炎症基因与 CAP 发病关系的研究日益受到重视。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、iNOs 这些前炎症基因的表达产物,连同 NO,在机体的免疫调节以及 CAP 的发病过程中起着非常重要的作用<sup>[5,6]</sup>。

结果表明,以补肾通络法为治则的前列通利汤对 CAP 动物模型的炎症基因产物的表达存在着有益的影响,即可以降低免疫状态亢进的 CAP 大鼠模型的 IL-1 $\beta$ 、IL-2 基因表达的强度;并降低 TNF- $\alpha$  由炎症基因表达为 mRNA 的转录过程或由该 mRNA 合成 TNF- $\alpha$  蛋白的翻译过程的活性;还能够降低机体 iNOs/NO 的含量,从而在一定程度上阻止了前列腺局部炎症反应的发展,促使其向正常状态转化。前列通利汤可提高机体免疫调节能力(本研究结果显示对亢进的免疫状态呈负性调节)、对 CAP 动物模型疗效比较确切。方中淫羊藿为君药,有益肾祛湿的功用。续断、白花蛇舌草、黄柏、知母、王不留行为臣药,具有清热解毒、活血通络、止痛消肿等功能,从而达到“通则不痛”的治疗效果。水蛭、穿山甲为佐药,以行通络、活血化瘀之功效。蒲公英、败酱草为使药,行解毒、祛瘀之功,起到一定的对抗炎症反应的作用。

本研究是基于免疫调节作用来研究中药方剂对 CAP 的治疗作用机制的,但中药方剂起效的多靶点多机制的作用特点决定了本研究的内容可能只是前列通利汤起效的一个方面,其他可能的作用机制有待于深入研究。

## 参考文献

[1] 陆德铭主编. 中医外科学. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 204~206.

[2] 叶伟成, 薛慈民, 徐兆东, 等. 免疫佐剂法制作慢性非细菌性前列腺炎小鼠模型的方法. 中国男科学杂志, 2001, 15(1): 29~32.

[3] Rivero V, Carnaud C, Riera CM. Prostatein or steroid binding protein (PSBP) induces experimental autoimmune prostatitis (EAP) in NOD mice. Clin Immunol, 2002, 105(2): 176~184.

[4] 周晓辉, 韩蕾, 周智恒, 等. 免疫性慢性非细菌性前列腺炎大鼠模型的形态学与分子生物学特性. 中华男科学杂志, 2005, 11(4): 290~295.

[5] 周晓辉, 周智恒, 刘忠德. 自身免疫因素导致慢性非细菌性前列腺炎的研究进展. 中国中西医结合外科杂志, 2003, 9(3): 240~242.

[6] 周晓辉, 周智恒, 刘忠德. 中西医对慢性细菌性前列腺炎的阐述辨识. 中医药学刊, 2003, 21(5): 715~717.