

丹蒲胶囊对自身免疫性前列腺炎模型 COX-2 表达的影响*

尹学来, 宋竖旗, 韩 兵, 刘咏梅, 张亚强[△]

(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

摘要: **目的** 探讨丹蒲胶囊治疗慢性前列腺炎盆腔疼痛的分子机制。**方法** 采用改良的实验性自身免疫性前列腺炎(EAP)法对大鼠造模,将造模后大鼠随机分为丹蒲胶囊高剂量组、中剂量组、低剂量组、前列泰组、模型组,给药 8 周后处死大鼠,取血清及前列腺组织,光镜下观察各组动物前列腺组织形态学变化,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清及前列腺组织 COX-2 水平、实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法测定前列腺中 COX-2-mRNA 表达。**结果** ELISA 结果显示:模型组 COX-2 表达水平高于正常对照组,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$),高、中剂量组表达水平较模型组降低,差异均有统计学意义($P<0.01$);RT-PCR 结果显示:模型组 COX-2-mRNA CT 值较正常对照组降低,两者比较差异有统计学意义($P<0.01$),高、中剂量的 CT 值较模型组比较升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 1. 改良的 EAP 模型成功。2. 丹蒲胶囊治疗 CPPS 的作用机制可能与其抑制 COX-2 表达有关。

关键词: 丹蒲胶囊; 慢性前列腺炎; 自身免疫; COX-2; 疼痛

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)03-0016-05

环氧合酶-2 (COX-2) 是引起慢性前列腺炎 (Chronic Prostatitis, CP) 疼痛的原因之一,丹蒲胶囊是中国中医科学院广安门医院著名中西医结合泌尿外科专家刘猷枋教授治疗 CP 的经验方,本实验通过 ELISA 法测定改进的实验性自身免疫性前列腺炎 (Experimental autoimmune prostatitis EAP) 大鼠模型的血清及前列腺组织中 COX-2 的表达水平及 RT-PCR 测定前列腺的 COX-2-mRNA 的表达,探讨丹蒲胶囊治疗慢性盆腔疼痛综合征 (Chronic pelvic pain syndrome CPPS) 的可能机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠 70 只,体重 250~300 g,3~4 月龄。购于中国医学科学院动物繁育中心。动物许可证号是 SCXK 京 2011-0007。大鼠购进后于室温 20~26℃,相对湿度 40%~70%,光照 12 h,黑暗 12 h,自由饮水、摄食,饲养观察 1 周无异常后进行实验。

1.2 试剂

完全弗氏佐剂(批号 F5854)和不完全弗氏佐剂

(批号 F5531),美国 Sigma 公司;Trizol 试剂,Invitrogen 公司,批号 14105;水合氯醛(上海试剂一厂白鹤分厂产,批号 111027);Fermentas K1622 RT 逆转录试剂盒购自 MBI 公司,批号:00044977;SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒购自美国应用生物公司,批号:1108401;大鼠环氧合酶-2 酶联免疫分析试剂盒产品编号:ISC10330EIA-2315R。采用 primier5.0 软件设计引物,BLAST 相似序列(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)搜索来证明所选择的扩增序列与其他的序列无明显相同。引物序列 GAPDH: 上游 5' cctctatgccacacagtgct 3', 下游 5' gtactcctgcttgct-gatcc 3'; COX-2 上游 5' gccatgcagcaaatcctt3', 下游 5' tg-gtgggctgtcaatcaa3'。

1.3 器材

乳化匀浆器 F6/10,德国 FLUKO 公司;光学显微镜,OLYMPUS 公司;7900HT 型荧光定量 PCR 仪,美国应用生物公司;Thermo NanoDrop 2000 分光光度计,基因有限公司;紫外分光光度计 DU-640 美国 Beckman 公司;高速冷冻离心机,CFI5D2 日本 HITACHI 公司。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(NO:81250032/H2709);北京市自然科学基金项目(NO:7112119,7112118)

收稿日期: 2013-04-27 修回日期: 2013-05-12

作者简介: 尹学来(1985~),男,江苏盐城人,住院医师,主要从事中医药防治前列腺疾病的研究。

[△]通信作者: 张亚强, E-mail: ssqle123@126.com

1.4 药物

丹蒲胶囊(由丹参、赤芍、蒲公英、败酱草、枸杞子、薏苡仁组成),中国中医科学院广安门医院制剂室生产(批号:京药制字 Z20113258,规格 0.4g×60 粒);对照药物:前列泰片(由益母草、篇蓄、红花、油菜蜂花粉、知母、黄柏组成),甘肃河西制药厂生产(批号:Z10100373,规格 0.44g×60 粒)。

2 方法

2.1 动物模型制备

2.1.1 提取大鼠前列腺抗原

按体重随机取出 10 只大鼠脱颈椎处死,腹部消毒,下腹正中切口,打开腹腔,分离前列腺腹叶及背叶(凝固叶),剪除周围脂肪组织,在无菌条件下取出前列腺组织,称重,用冷盐水洗净,加入预先高温灭菌的 0.5% TritonX-100 等重的生理盐水溶液用超声匀浆器制成匀浆。将匀浆液置入高速离心机中以 10000r/min 离心 30 min,取上清液。

2.1.2 测定蛋白含量

以双缩脲法测定上清液的蛋白含量。在紫外分光光度计中测定 OD 值,根据试剂盒提供的公式:蛋白含量(mg/mL)=(测定管 OD 值/标准管 OD 值)×蛋白标准浓度(mg/mL)。

2.1.3 乳化前列腺抗原

将前列腺蛋白稀释至 40mg/mL。然后将完全弗氏佐剂按 1:1 的比例加入前列腺蛋白稀释液中,用乳化匀浆机乳化。

2.1.4 免疫造模

将大鼠按体重随机取出 10 只为正常对照组,采用 10%水合氯醛按 0.35mL/100g 麻醉,腹部消毒,打开腹腔后找到左侧前列腺的背叶注射 0.1mL 的 0.9%的氯化钠注射液,然后缝合局部皮肤。将剩余大鼠麻醉后,腹部消毒,打开腹腔,找到前列腺,将 0.1mL 的乳化的前列腺抗原注射至相同侧前列腺的背叶。然后缝合局部皮肤。每只按 30 万单位/100g 的青霉素皮下注射 1 周。4 周后于大鼠腹侧 2 点及背侧 2 点皮下注射不完全弗氏佐剂 0.1mL 以加强免疫。

2.2 动物分组

将造模后的动物按体重随机分为正常对照组、丹蒲胶囊高剂量组、中剂量组、低剂量组、前列泰组 5 组,共 6 组,每组 10 只。

2.3 给药方法

各组大鼠在注射前列腺提纯蛋白抗原液 48h 后开始灌胃给药。丹蒲胶囊组给药剂量 2 g/(kg·d)、1.5g/(kg·d)、1g/(kg·d),分别相当于临床用量的 20 倍、15 倍、10 倍;前列泰组为 2g/(kg·d),相当于临床用量的 20 倍;模型组、正常对照组分别给予等量生理盐水灌胃。灌胃每日 1 次,持续 8 周。

2.4 动物取材

根据既往研究发现造模后 8 周炎症比较稳定,故在 8 周后腹主动脉取血及取大鼠前列腺^[1]。取 1/2 左侧前列腺背叶及 1/2 腹叶分别放入福尔马林瓶中。剩余 1/2 左侧背叶及右侧背叶 1/2 及腹叶 1/4 的放置装有 0.1mL Trizol 试剂的 EP 管,剩余 1/2 右侧半叶及腹叶的 1/4 放置 EP 管然后放入-80℃冰箱。

2.5 观测指标及方法

取前列腺放置在福尔马林溶液中固定,石蜡包埋切片,HE 染色,在 Olympus 光镜下观察前列腺组织中腺体、血管和间质的变化及 COX-2 表达的变化。ELISA 法检测大鼠前列腺组织及外周血的血清 COX-2 水平,按试剂盒说明书在专业实验人员指导下进行。RT-PCR 法检测大鼠前列腺组织 COX-2 基因 mRNA 表达:按照 Trizol 试剂说明书提取各组大鼠前列腺组织总 RNA。所提取的总 RNA 用紫外分光光度计测 A280、A260,定量并检测其纯度。提取的总 RNA 用 Fermentas K1622RT 试剂盒反转录为 cDNA,RT-PCR 检测前列腺组织基因表达。反应体系:20μL 反应体系中含:2×SYBR green PCR-mix 10μL, c10μmol/L 上游引物 1μL, 10μmol/L 下游引物 1μL, DNA 1μL, 加 DEPC 水至 20μL。反应条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 50s, 共 40 个循环;72℃后延伸 8min。实验中同步进行对照管家基因 GAPDH 的定量检测,以 COX-2 与 GAPDH 阈值(CT)之比作为 COX-2 基因的相对表达量。扩增反应在 7900HT 型荧光定量 PCR 仪上进行,每个循环电脑自动记录反应管中的荧光信号值,并描绘曲线。

2.6 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据的统计分析,计量资料采用单因素方差分析法(One-way ANOVA)。经方差分析,符合正态性和方差齐性时,两两比较用 LSD 法;方差不齐选用 Dunnett's 法。结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,标准水平取 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 光镜下各组病理组织学改变

正常对照组:前列腺组织结构正常,腺体排列及分布正常,间质内未见炎细胞浸润(见图 1)。模型组:部分前列腺的腺体遭到破坏,少量腺腔内有分泌物,间质组织变宽,间质充满大量弥散的淋巴细胞、单核细胞(见图 2)。阳性对照组:前列腺腺体排列及分布基本正常,部分腺腔内有分泌物,可见少量炎性细胞浸润,与模型组比较,间质内淋巴

细胞浸润明显减少(见图 3)。丹蒲胶囊高剂量组:前列腺大部分腺泡结构正常,部分腺腔内有分泌物,无间质水肿,与模型组比较,间质内淋巴细胞明显减少(见图 4)。丹蒲胶囊中剂量组:前列腺大部分腺泡结构正常,间质内可见炎性细胞浸润,但与模型组比较,间质内淋巴细胞明显减少,部分腺腔内有分泌物,(见图 5)。丹蒲胶囊低剂量组:前列腺腺体遭到破坏,部分腺腔内有少量分泌物,间质充满大量弥散的淋巴细胞、单核细胞,间质增宽(见图 6)。

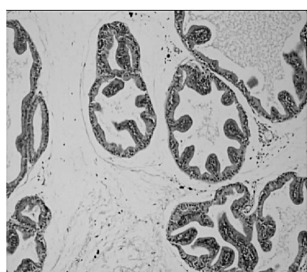


图 1 正常对照组 HE ×100

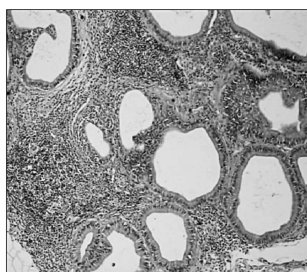


图 2 模型组 HE ×100

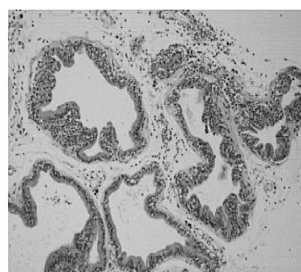


图 3 阳性对照组 HE ×100

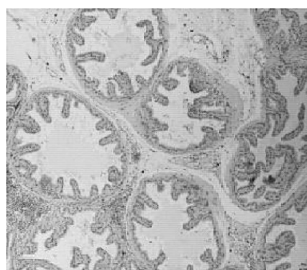


图 4 高剂量组 HE ×100

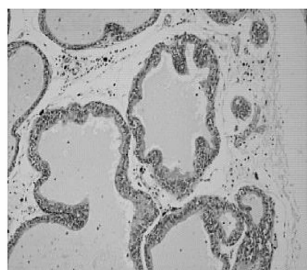


图 5 中剂量组 HE ×100

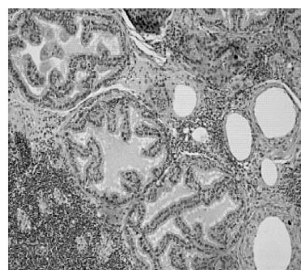


图 6 低剂量组 HE ×100

3.2 ELISA 测定大鼠血清及前列腺组织 COX-2 变化

模型组血清和前列腺组织 COX-2 水平明显增高,与正常对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);丹蒲胶囊高、中剂量组、阳性对照组明显低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。丹蒲胶囊

低剂量组与模型组之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 1。

3.3 各组 RT-PCR 测定 COX-2-mRNA 表达变化

模型组前列腺组织 COX-2 基因的 CT 值明显高于正常对照组,两组比较有统计学意义($P<0.01$);丹蒲胶囊高、中剂量组、阳性对照组明显低于模型组,

表 1 各组血清及前列腺组织 COX-2 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 COX-2/(u/L)	组织 COX-2/(u/L)
正常对照组	10	23.414±0.810	24.829±1.382
模型组	10	35.629±0.9065 ^{△△}	34.429±3.990 ^{△△}
阳性对照组	10	29.329±0.761**	27.743±2.294**
高剂量组	10	30.029±1.633**	27.343±1.727**
中剂量组	10	33.271±1.334**	30.371±1.410**
低剂量组	10	34.714±1.076	33.529±1.451

注:与正常对照组比较,^{△△} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

表 2 各组前列腺组织 COX-2 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	COX-2-mRNA(CT 值)
正常对照组	10	0.804±0.0893
模型组	10	0.160±0.0600 ^{△△}
阳性对照组	10	0.593±0.0573**
高剂量组	10	0.628±0.1036**
中剂量组	10	0.452±0.1016**
低剂量组	10	0.217±0.0809

注:与正常对照组比较,^{△△} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

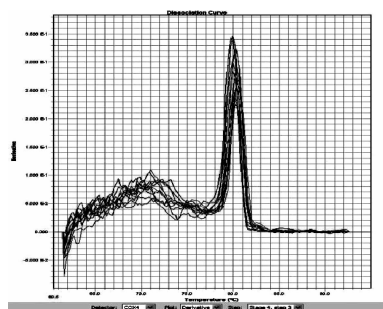


图7 COX-2 熔解曲线

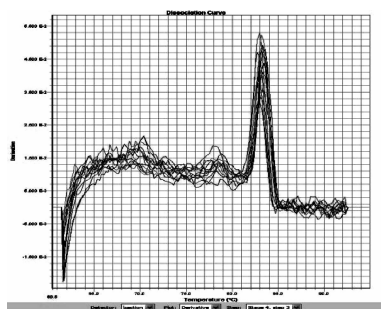


图8 GAPDH 基因熔解曲线

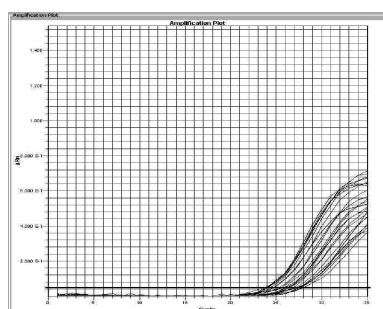


图9 COX-2 扩增曲线

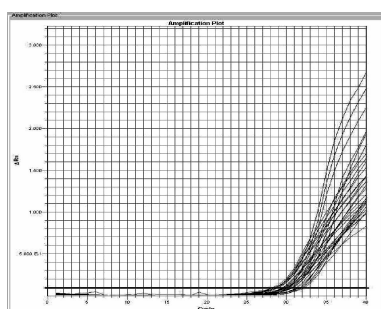


图10 GAPDH 扩增曲线

差异均有统计学意义($P < 0.05$);丹蒲胶囊低剂量组与模型组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图7、图8、图9、图10、表2。

4 讨论

CP患者主要临床症状表现为盆腔疼痛或不适,如何缓解或解除疼痛是当前研究的难点。其形成机制有多种学说,目前多认为:感染、损伤、免疫、内分泌和异常的盆底神经肌肉活动的共同作用引起慢性盆腔疼痛^[2]。其中,免疫因素在CP的发生及发展中起着重要作用,而COX-2在这一过程中扮演着关键角色,COX-2在炎症反应刺激作用下,局部合成增多,并刺激前列腺素2(PEG2)的合成,促进炎症细胞聚集,释放自由基和多种蛋白水解酶,造成前列腺局部组织细胞的损伤。此途径是形成慢性盆腔疼痛的一个机制^[3-4]。目前西药治疗CPPS方法主要是应用非甾体类消炎药(NSAIDS),Nickel等人的一项随机、安慰剂对照、多中心研究表明NSAIDS治疗CP的慢性盆腔疼痛有一定疗效,进一步证实了COX-2在CPPS过程中的作用及重要意义^[5]。但是这种药物远期疗效欠佳,并且常伴见胃肠道不良反应。

本实验采用纯化大鼠前列腺蛋白与完全弗氏佐剂的匀浆注射前列腺联合不完全弗氏佐剂皮下注射加强免疫法建立EAP大鼠模型,光镜下见:模

型组前列腺腺体遭到破坏,部分腺腔内有分泌物,间质中充满大量弥散的淋巴细胞、单核细胞,间质组织明显变宽,符合前列腺炎的病理改变,表明模型制作成功。此造模方法为EAP大鼠模型的改进方法。既往一般是通过单纯采用前列腺蛋白匀浆或前列腺甾体结合蛋白(prostatic steroid binding protein PSBP)来制取EAP模型,这种造模方法特异性不强,不仅仅会产生自身免疫性前列腺炎,而且有时还会对其他脏器也可形成自身免疫炎症,如对胰腺作用产生糖尿病或者影响其他特异性器官形成自身免疫疾病^[6]。本实验采取直接注射的方法以期减少对其他器官的影响。

慢性前列腺炎属于中医“淋证”、“精浊”、“白淫”等范畴,丹蒲胶囊有活

血化瘀,清热利湿的作用。病理及实验结果显示,丹蒲胶囊能明显减轻大鼠的前列腺组织炎症,模型组血清及前列腺组织COX-2升高、COX-2基因mRNA出现高表达;而丹蒲胶囊能抑制COX-2,降低COX-2基因mRNA表达,为丹蒲胶囊的临床疗效提供病理学及免疫学依据。由此推论,丹蒲胶囊治疗CPPS的镇痛机制可能与抑制前列腺组织的COX-2表达有关。

参考文献

- [1] 张亚强,王炎,李敏,等. 大鼠前列腺组织抗原蛋白诱导自身免疫性前列腺炎模型的建立[J]. 中国中西医结合外科杂志,2008,14(6):584-587.
- [2] MA Pontari,MR Ruggieri. Mechanisms in prostatitis/chronic pelvic pain syndrome [J]. The Journal of Urology,2004,172(3):839-845.
- [3] 郭应禄,李宏军. 前列腺炎[M]. 2版. 北京:人民军医出版社,2007:108-110.
- [4] Hirata A,Murakamiy,Shoj iM,et al. Kinetics of radical-cavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression[J]. Anticancer Res, 2005,25(5):3367-3374.
- [5] Nickel JC,Pontari M,Moon T,et al. A randomized,placebo controlled,multicenter Study to evaluate the safety and efficacy of rofecoxib in the treatment of chronic nonbacterial prostatitis[J]. The Journal of Urology,2003,169(4):1401-

1405.
[6] Vykhoynets EV, Resnick MI, MacLennan GT, et al. Experimental rodent models of prostatitis: limitations and potential

- [J]. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2007, 10 (2): 15-29.

(编辑:迟越)

Influence of Danpu Capsules on COX-2 Expression in Model of Autoimmune Prostatitis

YIN Xue-lai, SONG Shu-qi, HAN Bing, LIU Yong-mei, ZHANG Ya-qiang

(Guang An Men Hospital, China Academy of Sciences of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the molecular mechanism of Danpu Capsules in treating chronic prostatitis pelvic pain. **Methods** The rat model of improved experimental autoimmune prostatitis was established, then the rats were randomly divided into large-dosage, medium-dosage and low-dosage Danpu Capsules groups, Qianleilai group, model group. After 8-week medicine administration the rats were killed and the prostate tissue was taken for the observation of histomorphological changes of prostate with the light microscope in all groups. The COX-2 level of prostate tissue and serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the expression of COX-2-mRNA in prostate was determined by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The result of ELISA showed that the COX-2 level of the model group was higher significantly than that of the normal group ($P < 0.01$). After large and medium doses of medicine administration the COX-2 level of the Danpu Capsules group was decreased significantly ($P < 0.01$). The result of RT-PCR showed that the rat model of autoimmune prostatitis had higher expression of COX-2-mRNA, while in the large and medium doses of Danpu Capsules group this expression was inhibited ($P < 0.01$). **Conclusion** 1 The improved EAP rat model is successful. The mechanism of treating autoimmune prostatitis with Danpu Capsules may be related to that Danpu Capsules can inhibit COX-2 expression.

KEY WORDS: Danpu capsules; chronic prostatitis; autoimmune; COX-2; pain

(原文见第 8 页)

Effect of Nrf2 Protein Pathway in Rat's Hippocampus with Vascular Dementia and Atherosclerosis Treated by Wu zang Wen yang Hua yu Tang

ZHANG Hai-yan, TANG Nong, GE Jin-wen, LIAO Jun, YI Ya-qiao

(Hunan University of TCM, Changsha Hunan 410208, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a vascular dementia (VaD) model in rats based on atherosclerosis and To observe the treatment of vascular dementia rats with different doses of wu zang wen yang hua yu tang. Explore the mechanism of The decoction of wu zang wen yang hua yu tang from the aspects of oxidative stress response. **Methods** The rats in experimental groups were injected with a single dose of vitamin D (70U/kg) and loaded with high fat diet, The VaD model was established by repeatedly clipping the rat's common carotid artery. Four weeks later, these rats were divided randomly into a sham-operated group, a sedentary control group, a low-doses group, a middle-dose group, a high-dose group, and a Piracetam treated group. the rats were administered orally by gastric intubation from the fourth week. Spatial learning and memory were assessed using the Morris water maze after the drug were given for 4 weeks. Following behavioral testing, The protein levels of the rats hippocampus Nrf2 in the nucleus and cytoplasm and HO-1 were examined in Western blotting. **Results** Beginning on day 3, the escape latencies in the Morris water maze of VD rats treated with High dose group and middle dose group were than the VD rats, compared with sham-operated group and sedentary control group $P < 0.01$, which had Statistical differences. The rats treated by High dose with two kinds of dosage spent more time staying in the platform than rats with normal saline in the probe trials. The oxidative stress response of Nrf2-ARE pathway in VD rats' hippocampus were induced. Western blot detection shows wu zang wen yang hua yu tang can remove Nrf2 protein from cytoplasm to nucleus, and activate the HO-1 proteins, enhancing the proteins expression. The proteins expression of nrf2 which in the cytoplasm and then nucleus and HO-1, compared with sham-operated group and sedentary control group $P < 0.01$, which had Statistical differences. **Conclusion** The decoction of wu zang wen yang hua yu tang can improve the cognitive impairment after Atherosclerosis and chronic cerebral hypoperfusion in rats, which may be related to prevent oxidative stress response and enhance the antioxidant mechanism. The high dosage and middle dosage have the significant effects.

KEY WORDS: atherosclerosis; vascular dementia; wu zang wen yang hua yu tang; Nrf2 pathway experimental studies