

• 实验研究 •

从对 PKC 与 VEGF 表达的影响探讨麝香-乳香 对慢性非细菌性前列腺炎的治疗作用机制

贺勇凯, 杜新建*, 陈 波, 唐 亮, 黄志伟, 刘 圳, 陈雅琴

(株洲市人民医院泌尿外科, 湖南 株洲 412000)

摘要: **目的** 设计实验从麝香配伍乳香对蛋白激酶-C(PKC)、血管内皮生长因子(VEGF)表达水平的影响来探讨其对治疗慢性非细菌性前列腺炎的作用机制。**方法** 选取 SD 大鼠 4 只,用于大鼠前列腺蛋白提纯液的制备;48 只 6 周龄雄性 NoD 小鼠,除去空白对照组外的所有 NoD 小鼠均建立慢性非细菌性前列腺炎模型,再随机分为 7 组:模型组、佛波酯(PMA)、高剂量麝香-乳香组、麝香-乳香组、低剂量麝香-乳香组、麝香组、乳香组。灌胃后脱颈处死,分离出前列腺组织,采用 HE 染色法观察前列腺组织病理改变;采用蛋白质免疫印迹(Western Blot, WB)检测前列腺组织中 PKC、VEGF 的表达情况。以病理学检查、PKA、VEGF 水平变化等作为评价指标综合评价,探讨麝香+乳香治疗慢性非细菌性前列腺炎的作用机制。**结果** 各组炎症浸润程度比较从高到低依次为模型组>PMA 组>麝香-乳香组>低剂量麝香-乳香组>麝香-乳香组>高剂量麝香-乳香组>空白组($P<0.05$);与模型组比较,PKC 表达水平由低到高依次为 PMA 组<空白组<模型组<麝香-乳香组<低剂量麝香-乳香组<麝香-乳香组<高剂量麝香-乳香组($P<0.05$);VEGF 的表达水平由低到高依次为空白组<模型组<麝香-乳香组<低剂量麝香-乳香组<麝香-乳香组<高剂量麝香-乳香组($P<0.05$)<PMA 组($P<0.05$)。**结论** 非细菌性慢性炎症病理状态下,麝香+乳香可通过上调 PKC 表达水平,起到治疗作用;虽然其对下游 VEGF 表达水平有影响,但并未在治疗起到调控作用,相关作用机制有待进一步研究。

关键词: 麝香-乳香;蛋白激酶-C;血管内皮生长因子;慢性非细菌性前列腺炎

中图分类号: R285.5; R277.5

文献标志码: A **文章编号:** 1000-2723(2023)06-0081-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.06.018

To Explore the Therapeutic Mechanism of Musk-frankincense on Chronic Nonbacterial Prostatitis from the Effects of PKC and VEGF Expression

HE Yongkai, DU Xinjian, CHEN Bo, TANG Liang, HUANG Zhiwei, LIU Zhen, CHEN Yaqin

(Department of Urology, Zhuzhou Municipal People's Hospital, Zhuzhou 412000, China)

ABSTRACT: Objective To study the effect of musk and frankincense on the expression levels of protein kinase-C (PKC) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the treatment of chronic nonbacterial prostatitis. **Methods** 4 SD rats were selected for the preparation of purified prostatic protein solution. A chronic nonbacterial prostatitis model was established in 48 male NoD mice in 6-week-old except blank control group, and then randomly divided into 7 groups: model group, Phorbolate (PMA), high-dose musk-frankincense group, musk-frankincense group, low-dose musk-frankincense group, musk-frankincense group, musk-frankincense group, and frankincense group. The prostatic tissue was isolated and the pathological changes of prostatic tissue were observed by HE staining. Western Blot (WB) was used to detect the expression of PKC and VEGF in prostate tissue. The mechanism of musk + frankincense in the treatment of chronic nonbacterial prostatitis was investigated by pathological examination, PKA and VEGF levels. **Results** The degree of inflammatory invasion among all groups was compared from high to low as model group > PMA group > Musk and

基金项目: 株洲市 2022 年度创新型城市建设专项化资助项目

作者简介: 贺勇凯(1992-),男,主治医师,E-mail: 806289678@qq.com

* **通信作者:** 杜新建(1965-),男,副主任医师,研究方向:中医药男性病防治,E-mail: 1722435958@qq.com

Frankincense group > low-dose musk-Frankincense group > high-dose musk-Frankincense group > blank group. Compared with model group ($P<0.05$), the PKC expression levels in PMA group < blank group < model group < Musk group, frankincense group < low-dose musk-frankincense group < musk-frankincense group < high-dose musk-frankincense group ($P<0.05$); The expression levels of VEGF were successively from low to high in blank group < model group < Musk group, frankincense group < low-dose musk-Frankincense group < musk-Frankincense group < high-dose musk-frankincense group ($P<0.05$) < PMA group ($P<0.05$). **Conclusion** Musk + frankincense can up-regulate the expression level of PKC in the pathological state of non-bacterial chronic inflammation. Although it has an effect on the expression level of downstream VEGF, it also plays a regulatory role in treatment, and the relevant mechanism of action needs to be further studied.

KEY WORDS: Musk-frankincense; protein kinase -C; vascular endothelial growth factor; chronic nonbacterial prostatitis

慢性前列腺炎(chronic prostatitis, CP)是指前列腺在病原体(或)某些非感染因素作用下,患者出现以盆腔区域疼痛或不适、排尿异常等症状为特征的疾病^[1]。目前国内报道的慢性前列腺炎发病率为 6.0%~32.9%,高于国外的文献报道^[2],其中慢性非细菌性前列腺炎(CAP)按照美国国立卫生研究院(National Institute of Health, NIH)制定的分类标准属于 III 型,在临床多见^[3]。III 型慢性前列腺炎的发病机制较为复杂,发病原因尚不明确,且严重影响到患者的生活质量及身心健康,但目前对于此类型前列腺炎尚无根治的办法,容易反复发作^[4-5]。而反复发作的原因与前列腺上皮屏障功能障碍有着密切的关系^[6-7],因此,研究如何修复病理状态下前列腺上皮屏障对于治疗慢性非细菌性前列腺炎有重要意义。

针对慢性非细菌性前列腺炎病理状态下前列腺上皮屏障的功能调节,前期研究利用相须使用的麝香-乳香“芳香透窍”功效特点,证实对于慢性非细菌性前列腺炎小鼠模型,其可通过下调蛋白激酶 A(PKA)、上调蛋白激酶 C(PKC)的表达,对病理状态下前列腺上皮屏障产生促通透作用^[8-10]。同时,有研究证实,PKC 的激活可以诱导肾小管上皮细胞中血管内皮生长因子(VEGF)的表达,产生修复作用^[11-12]。为了研究在 CP 病理状态下相须使用的麝香-乳香在上调 PKC 后,是否对前列腺上皮屏障产生同样的作用及对前列腺上皮屏障修复的影响,特设计此实验,从麝香-乳香对 PKC 与 VEGF 表达的影响,研究麝香-乳香对慢性非细菌性前列腺炎上皮屏障的修复作用及机制,为中医药防治慢性非细菌性前列腺炎提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 NoD 小鼠 48 只,雄性,6 周龄;SD

大鼠 4 只,雄性,均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(实验单位使用许可证编号:SYXK(湘)2019-0017)。

1.1.2 主要试剂及药品 荧光一抗、二抗(武汉谷歌生物技术公司,中国);磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量检测试剂盒(武汉 Servicebio 公司,中国);CFA 完全弗氏佐剂(Sigma 公司,美国);百白破疫苗(湖南省疾病预防控制中心,批号:202211068-2);佛波酯(PMA)(北京索莱宝科技有限公司);麝香(拉萨藏族麝香养殖中心);乳香(湖南康宝林药业有限公司,批号:20230216)。

1.1.3 主要仪器 酶标检测仪(Rayto 公司,美国);脱色摇床、匀浆仪(武汉 Servicebio 公司,中国);双垂直电泳仪、转印电泳仪(北京六一仪器厂,中国);扫描仪(EPSON 公司,日本);灰度分析软件(Alpha Innotech 公司,美国);图像分析软件(Adobe 公司,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 前列腺蛋白提纯液制备 参照文献方法^[13]制备慢性非细菌性前列腺炎抗原。4 只 SD 雄性大鼠脱颈处死,分离出前列腺组织。洗净后剪碎,加入 PBS 溶液、内含蛋白酶抑制剂的和 0.5% TritonX-100。制成匀浆,离心后取上清液,测定蛋白含量,根据对应浓度,将蛋白提纯液再次用 PBS 溶液稀释至 1.0 mg/mL 的浓度。

1.2.2 动物模型的制备 参照相关文献用 NoD 小鼠制备慢性非细菌性前列腺炎模型^[14]。除去空白对照组外,其余全部使用前期已经制备好的浓度为 1.0 mg/mL 的大鼠前列腺蛋白提纯液,加入 CFA 完全弗氏佐剂乳化,在小鼠左脚垫皮下、右脚垫皮下、尾根部皮下、左肩胛皮下、右肩胛皮下进行多点注射,每个点注射 0.1 mL,最后百白破疫苗 0.1 mL 腹腔注射。

1.2.3 动物分组及给药 将 48 只造模完成的 NoD

小鼠随机分为 8 组:麝香组、乳香组、麝香-乳香组、高剂量麝香-乳香组、低剂量麝香-乳香组、PMA 阳性对照组、模型组、空白对照组。根据人和小鼠表面积折算的等效计量计算,人适用量根据药典确定为:麝香 0.1 g/d、乳香 6 g/d,小鼠按体质量 30 g 计算得出各组小鼠给药剂量如下:麝香组:每天灌胃量为 0.38 mg/d;乳香组:每天灌胃量为 22.8 mg/d;麝香+乳香组:每天灌胃量为 0.38 mg/d 麝香+22.8 mg/d;高剂量麝香+乳香组:1.52 mg/d 麝香+91.2 mg/d 乳香;低剂量麝香+乳香组:0.19 mg/d 麝香+11.4 mg/d 乳香;阳性对照组(PMA 组):6 μg/d,腹腔注射;空白对照组及模型组给与等量生理盐水灌胃。每天 1 次,连续 30 d。

1.2.4 样本取材 连续灌胃 30 d 后将 NoD 小鼠予以脱颈处死,然后在无菌超净台下,迅速解剖分离前列腺组织,用冰生理盐水漂洗干净后分成 2 部分,一部分用于常规 HE 染色后在光镜下观察每组小鼠前列腺上皮组织病理学改变,主要观察其炎症浸润及上皮修复情况,根据前列腺炎组织学诊断标准^[15],病理学分级标准制定病变情况分级标准^[16];一部分前列腺组织立即剪碎、离心后收取蛋白溶液,再采用蛋白免疫印迹法(WB)检测小鼠前列腺组织中 PKC、VEGF 表达情况。

1.2.5 HE 染色观察前列腺组织 使用模具包埋固定组织,切片。切片温水浸泡后放于二甲苯中,充分反复浸泡再放入无水乙醇中浸泡,再依次置于乙醇中浸泡水化。水化后切片使用 PBS 溶液浸泡清洗。之后每个组织切片滴加苏木素染色液染色,完毕后使用蒸馏水洗去多余的苏木素染色液。再使用盐酸乙醇分化,再用双蒸水将切片冲洗,反蓝后再次清洗。再加入伊红染液染色后进行梯度脱水,后使用二甲苯浸泡,待干后使用中性树胶封片。最后在显微镜下观察并拍照。

1.2.6 PKA、VEGF 蛋白免疫印迹法检测 组织块洗涤,匀浆。将匀浆完成的样本冰浴、震荡、离心,收集上清,即为总蛋白溶液,加入蛋白上样缓冲液,沸水浴变性。将样品加入电泳孔中,电泳后转膜。将转膜的蛋白面朝上放在曝光匣两层薄膜之间,充分反应后去尽残液,开始曝光。曝光后的胶片用显影、定影试剂进行显影和定影。

1.3 统计方法 采用 SPSS 20.0 进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观测 空白组小鼠前列腺组织容易剥离,跟周围组织无明显粘连,表面光滑,质地柔软,颜色基本呈现粉红色;模型组小鼠前列腺组织难以剥离,跟周围组织有严重粘连,可见前列腺肿大伴充血,治疗组可见前列腺红肿及粘连程度有不同程度的减轻,阳性对照组(PMA 组)并未见明显炎症减轻反应。

2.2 病理学观测结果 模型组:腺泡数量减少,未见凝固体,腺上皮表现为局灶性坏死和脱落,腺腔内可见大量炎性细胞和脱落的腺上皮细胞;空白组:腺泡数量多,腺腔内可见即前列腺凝固体,未见明显炎细胞浸润,细胞排列有序;PMA 组:前列腺实质内腺泡数量减少,未见凝固体,腺泡周围细胞完整结构破坏,腺腔内可见较多炎性细胞及脱落的腺上皮细胞;从高剂量麝香+乳香组到乳香组,可将前列腺腺泡数量呈减少趋势,腺体分布及排列基本正常,形态尚规则,炎症浸润逐渐明显,提示抗炎作用逐渐减弱,上皮组织恢复水平下降(图 1)。

根据病理分级标准分级标准,对各组病变程度进行打分统计比较。模型组评分最高,PMA 组评分与模型组接近,炎症反应未见减轻,从高剂量麝香+乳香组到乳香组,评分逐渐升高,提示抗炎修复作用逐渐减弱(表 1),具有统计学意义(表 2)。

表 1 麝香-乳香治疗慢性前列腺炎 NoD 小鼠
前列腺病变程度比较

组别	动物数 (n)	前列腺组织病变程度记分				
		0 分	1 分	2 分	3 分	总评
模型组	6	0	0	1	5	17
空白组	6	5	1	0	0	1
PMA 组	6	0	0	2	4	16
高剂量麝香-乳香组	6	1	4	1	0	6
麝香-乳香组	6	0	3	3	0	9
低剂量麝香乳香组	6	0	2	3	1	11
麝香组	6	0	1	4	1	12
乳香组	6	0	1	3	2	13

注:与模型组组比较, $P < 0.05$

2.3 WB 结果

2.3.1 各组 WB 检测对比 图 2。

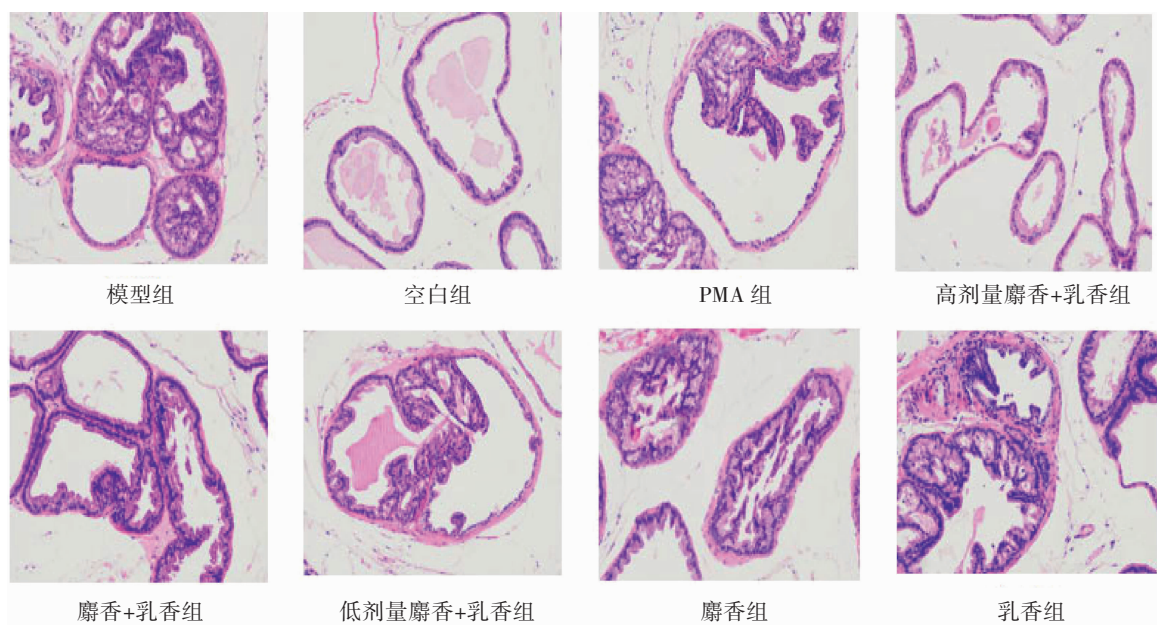


图 1 各组小鼠前列腺组织病理改变(HE,×200)

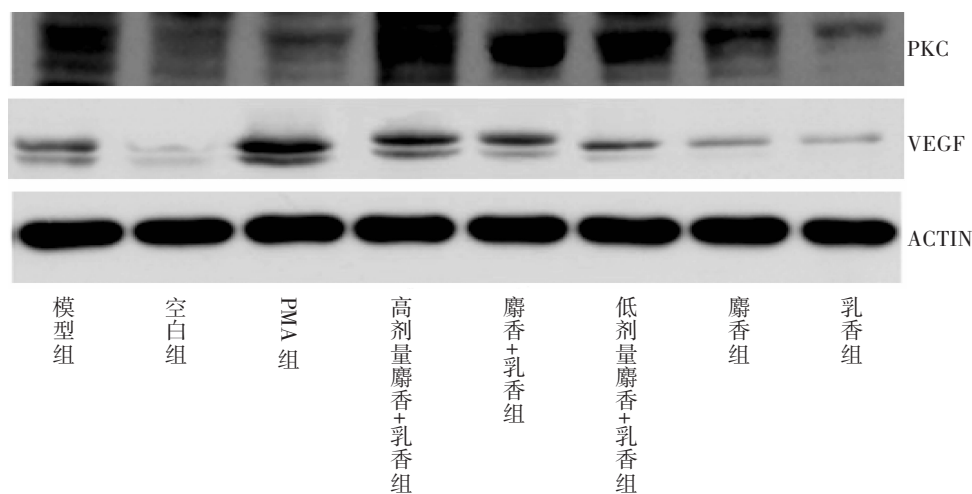


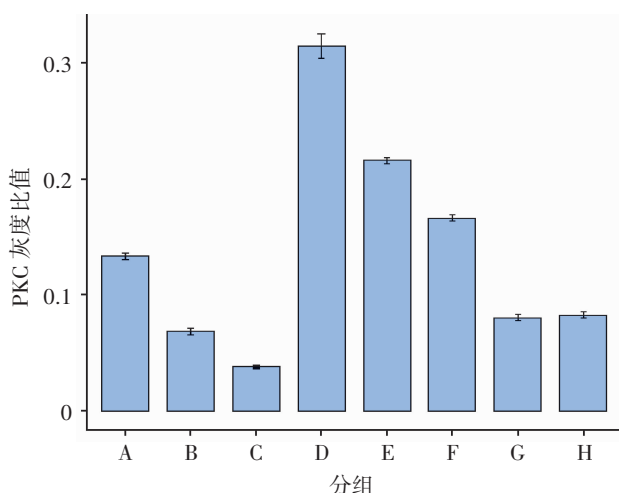
图 2 各组 WB 检测结果

2.3.2 检测结果量化统计 以 AlphaEase FC 灰度分析软件获得各组灰度值,计算与内参的比值得出各组最终数据(保留至小数点后三位),分析数据符合正态分布,采用方差分析的方法计算各组均数及方差,得出结果。

与模型组比较,各治疗组 PKC 表达均呈现上升,上升水平依次为高剂量麝香+乳香组>麝香+乳香组>低剂量麝香+乳香组>麝香组、乳香组($P<0.05$),与各组前列腺炎症改善水平逐渐下降相对应,提示麝香、乳香具有治疗慢性非细菌性前列腺炎的作用,这种作用可通过上调 PKC 的表达而实现,同时麝香、乳香联

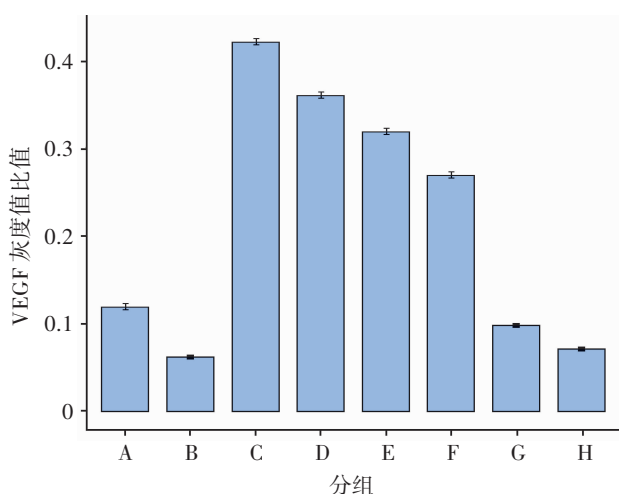
合使用时较单独使用时上升水平更明显,提示麝香、乳香同时使用时存在增效的“相须”作用,且存在一定的剂量相关性(图 3)。

但当治疗组与阳性对照时,我们发现各治疗组虽然通过上调 PKC 的表达同时提升下游 VEGF 的表达,但其上调水平较阳性对照组低($P<0.05$),同时结合病理情况,阳性对照组前列腺炎症情况并未得到明显改善,提示 PKC 的上调虽然导致了 VEGF 水平上调,但这并未对慢性非细菌性前列腺的治疗修复起到明显作用(图 4)。



注:A:模型组 B:空白组 C:PMA 组 D:高剂量麝香+乳香组 E:麝香+乳香组 F:低剂量麝香+乳香组 G:麝香组 H:乳香组(下同);与模型组比较,各组 $P<0.05$;麝香组与乳香组比较, $P>0.05$,余各组组间比较, $P<0.05$ 。

图3 各组 PKC 灰度比值



注:与模型组比较,各组 $P<0.05$;各组组间比较 $P<0.05$ 。

图4 各组 VEGF 灰度比值

3 讨论

麝香属于芳香药物,味辛,性温,具有开窍醒神、活血散结、止痛消肿、催生下胎的功效,被誉为“开窍醒神第一要药”^[17],现代研究发现其具有抗炎、抗肿瘤、改善心脑血管循环等作用^[18];乳香属于活血药,味苦、辛,性温,具有活血止痛、消肿生肌的功效,现代研究发现其具有具有抗炎、抗病毒、抗菌、抗肿瘤、抗溃疡、胃保护、神经保护、肝肾保护等作用^[19]。有研究证明前列腺上皮屏障的存在,既为前列腺组织提供强有力的保护,也因高选择性通透成为药物渗透的障碍^[20-21],同

时慢性非细菌性前列腺炎存在迁延难愈,反复疼痛等疾病特点,按中医“久病成瘀,痛则不通”理论,考虑其存在“瘀”的病机,因此尝试运用麝香芳香开窍、乳香活血止痛的特点,同时增加透药性及治疗作用,起到“相须”之用,起到治疗慢性非细菌性前列腺炎的作用。结合本次实验结果,证实了麝香-乳香“相须”使用时可起到明显的抗炎修复作用,且存在剂量相关性,而这种作用的实现与药物提高了 PKC 的表达水平有关。

PKC 是一种丝氨酸/苏氨酸的蛋白激酶,由 Nishizuka 于 1977 年在小鼠脑胞质中首次发现^[22],是信号转导途径的主要介质,介导多种信号通路,如丝裂原活化蛋白激酶和应激活化蛋白激酶级联反应、核因子- κ B(nuclear factor, NF- κ B)信号转导、糖原合成酶激酶信号转导、蛋白激酶 B 信号转导以及信号转换器和转录激活因子调控的基因表达等^[23-24]。而血管内皮生长因子(VEGF)是其下游因子,可促进血管内皮细胞生长,增加血管通透性,实现血管内皮细胞迁移及增殖,有高度特异性,对血管形成起诱导作用^[25-26]。那么,麝香-乳香是否是通过激活 PKC 来调控 VEGF 水平,促进血管新生,到达修复前列腺上皮,从而起到其治疗作用?实验发现,虽然麝香-乳香能进一步上调 VEGF 的表达,但这种水平的变化与药物治疗的病理改变并不关联,提示麝香-乳香在治疗慢性非细菌性前列腺炎中存在其他起作用的因子,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中国中西医结合学会男科专业委员会. 慢性前列腺炎中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(8): 933-941.
- [2] 米华, 陈凯, 莫曾南. 中国慢性前列腺炎的流行病学特征[J]. 中华男科学杂志, 2012, 18(7): 579-582.
- [3] 罗琦, 张天德, 刘云兴, 等. 慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征相关发病危险因素分析[J]. 中国医师进修杂志, 2013, 36(8): 65-68.
- [4] ZHANG R, SUTCLIFFE S, GIOVANNUCCI E, et al. Lifestyle and risk of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome in a cohort of united states male health professionals[J]. J Urol, 2015, 194(5): 1295-1300.
- [5] LIANG C Z, LI H J, WANG Z P, et al. The prevalence of

- prosta-titis-like symptoms in China[J]. J Urol, 2009, 182(2):558-563.
- [6] 孙爱国,刘东升. 慢性前列腺炎难治原因分析及提高疗效途径探讨[J]. 中国医疗前沿,2010,5(14):7,11.
- [7] 夏学斌,高焯. 慢性前列腺炎的难治性与对策探讨[J]. 中国社区医师,2012,25(15):65-68.
- [8] 周青,何清湖,田雪飞,等. 麝香配伍乳香促前列腺上皮屏障通透性作用的实验研究[J]. 中华中医药杂志,2014,29(5):1448-1453.
- [9] 林群芳,黄培. 麝香配伍乳香对大鼠前列腺上皮细胞紧密连接结构相关蛋白表达的影响[J]. 中华男科学杂志,2015,21(12):1110-1115.
- [10] 贺勇凯. 麝香—乳香对慢性非细菌性前列腺炎小鼠蛋白激酶—C、蛋白激酶—A 表达影响的研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2019.
- [11] TANG S C, CHAN L Y, LEUNG J C, et al. Bradykinin and high glucose promote renal tubular inflammation[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(3):698-710.
- [12] PANCHAPAKESAN U, SUMUAL S, POLLOCK C A, et al. PPARgamma agonists exert antifibrotic effects in renal tubular cells exposed to high glucose[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 289(5):F1153-F1158.
- [13] 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[J]. 中国男科学杂志, 2001(1):29-32.
- [14] MOTRICH R D, MACCIONI M, MOLINA R, et al. Presence of INFgamma-secreting lymphocytes specific to prostate antigens in a group of chronic prostatitis patients[J]. Clin Immunol, 2005, 116(2):149-157.
- [15] KARAZANASHVILI G. Editorial comment on: the relationship between prostate inflammation and lower urinary tract symptoms: examination of baseline data from the REDUCE trial[J]. European Urology, 2008, 54(6): 1383-1384.
- [16] BUFFIE C G, PAMER E G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(11):790-801.
- [17] 王丹,王心雨,卢烽,等. 基于本草考证的麝香功能主治及用法用量挖掘[J]. 中成药,2022,44(4):1239-1243.
- [18] 周文杰,李宁,谢兴文,等. 天然麝香的化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药,2022,33(1):185-188.
- [19] 哈瑞雯,周海燕,詹志来,等. 乳香化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2021,39(11):94-107.
- [20] KRAJEWSKA M, OLSON A H, MERCOLA D, et al. Claudin-1 immunohistochemistry for distinguishing malignant from benign epithelial lesions of prostate[J]. Prostate, 2007, 67(9):907-910.
- [21] MARTIN T A, MASON M D, JIANG W. HGF and the regulation of tight junctions in human prostate cancer cells[J]. Oncol Rep, 2014, 32(1):213-224.
- [22] NISHIZUKA Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation[J]. Nature, 1988, 334(6184):661-665.
- [23] YANG C, KAZANIETZ M G. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC[J]. Trends Pharmacol Sci, 2003, 24(11):602-608.
- [24] MACKAY H J, TWELVES C J. Targeting the protein kinase C family: are we there yet?[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(7):554-562.
- [25] JALEEL Z, BLASBERG E, TROIANO C, et al. Association of vaping with decreased vascular endothelial growth factor expression and decreased microvessel density in cutaneous wound healing tissue in rats[J]. Wound Repair Regen, 2021, 29(6):1024-1034.
- [26] LIU K, ZHAO M, LI Y, et al. VEGF loaded porcine decellularized adipose tissue derived hydrogel could enhance angiogenesis in vitro and in vivo[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2022, 33(5):569-589.

(收稿日期:2023-10-12)