

基于NF- κ B信号通路研究前列闭尔通栓对大鼠慢性非细菌性前列腺炎的影响

欧文静¹, 张天睿¹, 黄日康¹, 伍永鸿¹, 刘 闯¹, 高佳慧¹, 贾占红¹, 刘晓凤², 董瑞娟^{1*}, 张硕峰^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 黑龙江济仁药业有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150000

摘要: 目的 探讨前列闭尔通栓对自身免疫性前列腺炎(EAP)大鼠的影响及作用机制。方法 50只SD大鼠采用前列腺蛋白提纯液联合完全弗氏佐剂制备EAP大鼠模型,另取10只作为对照组,造模成功大鼠随机分为模型组、前列通栓(0.42 g·只⁻¹)组和前列闭尔通栓低、中、高剂量(0.33、0.66、0.99 g·只⁻¹)组,直肠给药28 d。压力换能器测定膀胱内压变化速率,显微镜计数测定前列腺液中卵磷脂小体、白细胞数量,ELISA法检测前列腺组织炎症因子,HE染色观察前列腺组织病理变化,Western blotting检测前列腺组织核因子 κ B(NF- κ B) p65、磷酸化 κ B抑制因子激酶(p-IKK- α)/IKK- α 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、磷酸化I κ B激酶- α (p-I κ B- α)/I κ B- α 、环氧合酶-2(COX-2)蛋白表达;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测重组人趋化因子配体5(CXCL5)、白细胞介素-6(IL-6)、TNF- α 、COX-2基因表达。结果 与对照组比较,模型组大鼠膀胱内压变化速率显著降低($P<0.01$);白细胞数量显著增加、卵磷脂小体数量显著减少($P<0.01$);前列腺组织TNF- α 、IL-8水平显著升高($P<0.01$),IL-10水平显著降低($P<0.01$);前列腺组织炎症反应明显,病理评分显著升高($P<0.01$);前列腺组织NF- κ B p65、p-IKK- α 、p-I κ B- α 、TNF- α 、COX-2蛋白表达显著升高($P<0.05$ 、0.01);前列腺组织CXCL5、COX-2、TNF- α 基因表达升高($P<0.05$)。与模型组比较,前列闭尔通栓中剂量组膀胱内压变化速率显著升高($P<0.01$);各剂量组白细胞数量显著减少、卵磷脂小体数量显著增加($P<0.01$);中、高剂量组TNF- α 、IL-8水平显著降低($P<0.05$ 、0.01);各剂量组前列腺组织炎症反应明显减轻,病理评分显著降低($P<0.01$);各剂量组前列腺组织p-I κ B α /I κ B α 、COX-2蛋白表达显著降低($P<0.01$);低剂量组前列腺组织p-IKK- α /IKK- α 蛋白表达显著降低($P<0.05$);低、高剂量组前列腺组织NF- κ B p65蛋白表达显著降低($P<0.05$);中剂量组前列腺组织TNF- α 蛋白表达显著降低($P<0.05$);各剂量组前列腺组织CXCL5、IL-6、COX-2基因表达显著降低($P<0.05$)。结论 前列闭尔通栓可有效改善EAP大鼠前列腺组织病理形态,减轻炎症反应,其作用机制可能与抑制NF- κ B信号通路相关蛋白NF- κ B p65、p-IKK- α 、TNF- α 、p-I κ B- α 表达相关。

关键词: 前列闭尔通栓;前列腺炎;白细胞;炎症因子;NF- κ B信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)07-1488-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.07.012

Effect of Qianlie-Biertong Suppository on chronic nonbacterial prostatitis in rats based on NF- κ B signal pathway

OU Wenjing¹, ZHANG Tianrui¹, HUANG Rikang¹, WU Yonghong¹, LIU Chuang¹, GAO Jiahui¹, JIA Zhanhong¹, LIU Xiaofeng², DONG Ruijuan¹, ZHANG Shuofeng¹

1. College of traditional Chinese Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, College of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Heilongjiang Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Harbin 150000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of Qianlie-Biertong Suppository (QBS) on autoimmune prostatitis (EAP) rats. **Methods** Totally 50 SD rats were used to prepare EAP rat model with prostate protein purification solution and complete Freund's adjuvant, and the other 10 rats were used as control group. The 50 EAP rats that were successfully modeled were randomly divided into model group, low, middle and high dose (0.33, 0.66, and 0.99 g·piece⁻¹) groups of QBS, and Qianlie-tong

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 西藏自治区科技计划项目(XZ201801-GA-16)

第一作者: 欧文静,女,甘肃人,硕士研究生,研究方向为中药治疗临床常见病药效评价及作用机制研究。E-mail:2739751483@qq.com

*共同通信作者: 张硕峰,男,博士,教授。E-mail:shuofengzhang@sina.com

董瑞娟,中级实验师,研究方向为中药的免疫调节作用。E-mail:drjdongruijuan@126.com

Suppository (0.42 g·piece⁻¹) group. After 28 days of rectal administration, rate of changes in bladder internal pressure, the number of lecithin corpuscles and white blood cells were measured, the inflammatory factors of prostate tissue were detected by ELISA, the pathological changes of prostate tissue were observed by HE staining, and the prostate tissue NF- κ B p65, p-IKK- α , p-I κ B- α , TNF- α , COX-2 protein expression was detected by Western blotting, *CXCL5*, *IL-6*, *TNF- α* , *COX-2* gene expression detection by qRT-PCR. **Results** Compared with control group, rate of changes in bladder internal pressure in the model group decreased ($P < 0.01$), the number of white blood cells increased and the number of lecithin bodies decreased ($P < 0.01$), the content of IL-8, TNF- α in prostate tissue increased ($P < 0.01$), and the content of IL-10 decreased ($P < 0.01$). The inflammatory reaction of prostate tissue were obvious, and the pathological score of model group compared with control group significantly increased ($P < 0.01$). The prostate tissue NF- κ B p65, p-IKK- α , p-I κ B- α , TNF- α , and COX-2 protein expression of model group compared with control group increased significantly ($P < 0.05$ and 0.01). Prostate tissue *CXCL5*, *TNF- α* , and *COX-2* gene expression of model group compared with control group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, rate of changes in bladder internal pressure in the middle dose group of QBS increased significantly ($P < 0.01$), the number of white blood cells decreased significantly and the number of lecithin corpuscles increased significantly in each dose group of QBS ($P < 0.01$), the content of IL-8, TNF- α in middle and high dose groups of QBS was decreased significantly ($P < 0.05$ and 0.01). Compared with the model group, the inflammatory response of prostate tissue in each dose group of QBS was significantly reduced, and the pathological score was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, the protein expression p-I κ B α /I κ B α , COX-2 in each dose group, p-IKK- α /IKK- α in low-dose group, NF- κ B p65 in low and high dose group, TNF- α in medium dose group were significantly reduced ($P < 0.05$). The expression of *CXCL5*, *IL-6*, and *COX-2* genes in prostate tissue was significantly reduced in each dose group of QBS compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** QBS can effectively improve the pathological morphology of prostate tissue and reduce inflammatory reaction in EAP rats, and its mechanism may be related to the inhibition of NF- κ B signal pathway related protein NF- κ B p65, p-IKK- α , TNF- α , p-I κ B- α express relevance.

Key words: Qianlie-Biertong Suppository; prostatitis; white blood cells; inflammatory factors; NF- κ B signal pathway

慢性前列腺炎(CP)为中青年男性常见的生殖系统疾病,其中慢性非细菌性前列腺炎(CNP)约占前列腺炎的90%以上。CNP主要症状表现为下腹部、会阴部疼痛或盆腔不适,伴随尿频、尿急、尿痛、下尿路阻塞、性功能障碍、抑郁等^[1]。目前CNP可能是多种发病机制和多种因素综合作用的结果,常见的病因包括精神心理因素、尿液返流、基因易感性、神经内分泌因素、盆腔静脉性因素、自身免疫因素^[2]等。研究表明,前列闭尔通栓能降低慢性前列腺炎病理评分,减少患者前列腺液中炎症因子表达^[3],但其作用机制尚未完全明确。目前认为CNP发病与自身免疫具有密切关系,自身免疫性前列腺炎(EAP)大鼠模型是研究CNP的标准动物模型之一,基于此,本研究应用前列腺蛋白提纯液联合弗氏完全佐剂建立EAP大鼠模型,观察前列闭尔通栓对EAP大鼠前列腺组织病理变化、炎症反应等方面的影响,并探讨其治疗CNP的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠60只,雄性,体质量200~220 g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0010,合格证号110324211105651232。于北京中医药大学屏障级动

物房饲养,大鼠均采用无菌颗粒饲料饲养,自由饮水,环境温度稳定在20~25℃,室内通风良好,定时更换垫料。所有操作符合实验动物伦理学要求,已通过北京中医药大学实验动物中心伦理审查,伦理审查编号BUCM-4-202102507-4055。

1.2 药品与主要试剂

前列闭尔通栓(黑龙江省济仁药业有限公司,批号200801,规格每粒2.2 g);前列通栓(马应龙药业集团股份有限公司,批号210101,规格每粒2.5 g);弗氏完全佐剂(生产批号SLCH4887, Sigma公司);BCA试剂盒(生产批号20210902,南京建成生物工程研究所);大鼠白细胞介素-8(IL-8)酶联免疫试剂盒(生产批号20220710.60024R)、大鼠白细胞介素10(IL-10)酶联免疫试剂盒(生产批号20220710.60026R)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫试剂盒(生产批号20220710.60080R)、总蛋白试剂盒(生产批号20230118.30002)、DEPC-Treated Water(批号SL311437100),北京瑞格博科技发展有限公司;RIPA裂解液[批号Z2111K,艾旗(深圳)科技有限公司];蛋白磷酸酶抑制剂混合物(批号20210401,苏州新赛美科技有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号092921220222,上海碧云天生物技术有限公司);4 $\times$ SDS-PAGE分离胶缓冲液(pH=8.8)(批

号 SL31151898)、4×SDS-PAGE 浓缩胶缓冲液(pH 6.8)(批号 SL31143640H)、30% Acr/Bis Solution(29:1,批号 SL321412100)、10% APS(批号 SL3214315000)、TEMED(批号 CT312114236),北京酷来搏科技有限公司;10×电泳缓冲液 Tris-Gly(批号 2022R1EB1005,北京普利莱基因技术有限公司);PageRuler™ Prestained Protein Ladder(批号 91227189,美国 Thermo 公司);Immobilon-P Transfer Membrane(批号 0000167004,美国 Millipore 公司);10×WB Transfer Buffer(批号 20220103)、10×TBST 缓冲液(批号 20220310),北京索莱宝科技有限公司;甲醇(批号 2205090523)、乙醇(批号 20150918),北京化学试剂公司;Non-fat Powdered Milk(批号 r5071811,美国 BioRuler 公司);NcmECL Ultra Stabilized Peroxide Reagent(批号 20220511)、通用抗体稀释液(批号 20220309)、NCM Western blotting Stripping Buffer(批号 20210507),苏州新赛美生物科技有限公司;HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(批号 20000373,Proteintech);Trizol(批号 94604, Ambion);CHCl₃(批号 20150282,北京化学试剂公司);Isopropyl alcohol(批号 C12499815, Macklin);逆转录试剂盒:NovoScriptPlus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix(gDNA Purge)(批号 05227808)、实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒:NovoStartSYBR qPCR SuperMix Plus(批号 05229413),苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;0.9%氯化钠溶液(生产批号 2205242005,石家庄四药有限公司)。

1.3 实验仪器

HistoCore PEARL 自动组织脱水机、HistoCore Arcadia C 石蜡包埋机、RM2255 轮转式切片机、HI1220 烘片机[徕卡显微系统(上海)有限公司];LH-M100CB-1 生物显微镜[尼康仪器(上海)有限公司];Centrifuge5810 低温高速离心机(德国 EppendorfAG 公司);B612231295 分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];0556928B 输液泵(浙江大学医学仪器有限公司);LANYI-GTM 匀浆仪(上海兰仪实业有限公司);UniCel DxC 600 Synchron 全自动生化分析仪(美国 Beckman Coulter 公司);Multiskan MK3 酶标仪(芬兰 Thermo 公司);BL-4201 集成化信息化信号采集与处理系统(成都泰盟软件有限公司);PCR 仪(ABI, StepOnePlus)。

2 方法

2.1 前列腺蛋白液的制备

SD 雄性大鼠 ip 1.5% 戊巴比妥钠麻醉处死,取出前列腺组织,加冷却的 0.9% 氯化钠溶液,制备组织匀浆,4℃、15 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清液,BCA 法测定蛋白含量,并将蛋白质量浓度调至约 20 mg·mL⁻¹,将匀浆液与等量弗氏完全佐剂制成的乳化液,即前列腺蛋白液备用。

2.2 动物分组、模型的制备及给药

60 只 SD 雄性大鼠适应性饲养 3 d,随机分为对照组、模型组、前列通栓组和前列闭尔通栓低、中、高剂量组。

除对照组外,各组大鼠造模第 1、8 天分别皮内多点注射前列腺蛋白液 1 mL,第 30 天 ip 前列腺蛋白液 0.5 mL,第 45 天成模^[4]。

模型制备完成后,大鼠 ip 1.5% 戊巴比妥钠 30 mg·kg⁻¹ 麻醉,前列闭尔通栓组大鼠直肠给予前列闭尔通栓每只 0.33、0.66、0.99 g;前列通栓组大鼠直肠给予前列通栓每只 0.42 g;对照组与模型组给予栓剂基质;均连续给药 28 d。

2.3 膀胱内压变化速率的测定

大鼠取材前 12 h 将大鼠禁食不禁水,取材前称鼠的体质量,ip 1.5% 戊巴比妥钠麻醉后,打开腹腔,挤压膀胱,排空残尿,剪开膀胱,用细线以荷包缝合法缝合造瘘口,将连接压力换能器的导管固定于膀胱,并使用注射泵向膀胱内缓慢注射 0.9% 氯化钠溶液,速度为 24 mL·h⁻¹,并测定膀胱内压变化速率。

膀胱内压变化速率=(最大压力值-最小压力值)/时间

2.4 卵磷脂小体、白细胞检测

测完膀胱内压变化速率后,于膀胱括约肌处结扎,经尿道,将外径 1 mm 的 PC 管插入至前列腺处,轻轻挤压前列腺,收集前列腺液,将取出的前列腺液用移液枪取出 10 μL,然后加 190 μL 的 0.9% 氯化钠溶液,即得稀释的前列腺液。取稀释的前列腺液在显微镜 400 倍视野下观察,并计数卵磷脂小体、白细胞。

2.5 前列腺组织中 TNF-α、IL-8、IL-10 水平检测

处死动物,取出前列腺组织。一部分装入冻存管,置于-80℃冰箱备用。另一部分用 0.9% 氯化钠溶液制备成 10% 组织匀浆,采用 ELISA 法,按说明书测定 TNF-α、IL-8、IL-10 水平。

2.6 前列腺组织病理观察

一部分前列腺组织使用 4% 多聚甲醛固定,进行 HE 染色,置于 100 倍镜观察大鼠前列腺组织病理

损伤情况。评分方法:(1)观察前列腺组织有无炎细胞浸润,整个前列腺组织切片中无淋巴细胞浸润记0分,轻微淋巴细胞聚集记1分,少量淋巴细胞聚集记2分,较多淋巴细胞聚集3分,大量炎细胞浸润记4分;(2)观察前列腺组织有无出血,整个前列腺组织切片中无出血记0分,轻微出血记1分,少量出血记2分,较多出血记3分,大量出血记4分。以上2项评分累计总和即为病理学总评分。

2.7 Western blotting 实验

RIPA 裂解液中加入 PMSF(100:1),每组随机取大鼠前列腺组织3个,将研磨的组织粉末加入含有 RIPA 裂解液(组织质量:裂解液体积为 20 mg:150~250 μL)的 1.5 mL 离心管中,将离心管放于冰上 30 min,30 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,即得到蛋白原液。BCA 法进行蛋白定量,以 RIPA 裂解液调整蛋白浓度,加入 5 $\times$ 上样缓冲液,使蛋白终质量浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,100 $^{\circ}\text{C}$

煮沸变性 5 min。10% 浓缩胶电泳,恒压 80 V、15 min,10% 分离胶,恒压 120 V、50 min,通过预染蛋白 Marker 确定电泳停止时间。100 V、75 min 转至 PVDF 膜。5%BSA 封闭 1.5 h,加入核因子- κB (NF- κB)p65 一抗(1:5 000)、磷酸化 κB 抑制因子激酶(p-IKK- α)一抗(1:1 000)、TNF- α 一抗(1:2 000)、磷酸化 I κB 激酶- α (p-I κB - α)一抗(1:1 000)、环氧化酶-2(COX-2)一抗(1:2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗膜后,HRP-山羊抗兔 IgG(1:5 000)孵育 1 h,洗膜,ECL 显影。以 GAPDH 为内参,Image J 软件进行灰度分析。

2.8 实时荧光定量(qRT-PCR)实验

每组随机取3个大鼠前列腺组织,使用 Trizol 提取总 RNA,并使用 gDNA purge 试剂盒将总 RNA 逆转录成单链 cDNA。在实时荧光定量 PCR 仪中使用 SYBR Green Master Mix 染料检测前列腺组织中相关基因含量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物序列上游(5'→3')	引物序列下游(5'→3')
<i>TNF-α</i>	GCCTCTTCTCATTCCTGCTT	TGGGAAGTCTCTCATCCCTTTG
<i>COX-2</i>	ATTACTGCTGAAGCCCCACCC	TGTGATCTGGACGTCAACACG
<i>IL-6</i>	TTCCTACCCCAACTTCCAATG	ATGAGTTGGATGGTCTTGGTC
重组人趋化因子配体5(<i>CXCL5</i>)	GCATTCTGCTGCTGTTCACT	GGTTAAGCAAACACAGCGTAGCT
<i>GAPDH</i>	GTGGAGAAACCTGCCCAAGTATG	GGTGAAGAATGGGAGTTGCT

2.9 统计学方法

运用 SPSS 20.0 进行数据统计分析,数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,作正态分布及方差齐性检验,组间比较采用 ANOVA 分析。

3 结果

3.1 前列闭尔通栓对 EAP 大鼠膀胱内压变化速率的影响

与对照组比较,造模后模型组大鼠膀胱内压变化速率显著降低($P<0.01$);与模型组比较,前列闭尔通栓各剂量组膀胱内压变化速率升高,其中中剂量组差异显著($P<0.01$),提示前列闭尔通栓可明显改善前列腺炎导致的排尿困难的症状。结果见表2。

3.2 前列闭尔通栓对 EAP 大鼠前列腺液中白细胞、卵磷脂小体数量的影响

与对照组比较,模型组大鼠前列腺液中白细胞数目显著增加($P<0.01$)、卵磷脂小体数量显著减少($P<0.01$);与模型组比较,前列闭尔通栓各剂量

表2 前列闭尔通栓对 EAP 大鼠膀胱内压变化速率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of QBS on rate of changes in intravesical pressure in EAP rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ ($\text{g}\cdot\text{只}^{-1}$)	<i>n</i>	膀胱内压变化速率/ ($\text{mm Hg}\cdot\text{s}^{-1}$)
对照	—	7	1.44 $\pm$ 0.37
模型	—	10	0.43 $\pm$ 0.22**
前列闭尔通栓	0.33	9	0.47 $\pm$ 0.30
	0.66	10	1.33 $\pm$ 1.28 ^{##}
	0.99	10	0.85 $\pm$ 0.35
前列通栓	0.42	10	1.12 $\pm$ 0.54 [#]

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$;
1 mm Hg=0.133 kPa

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group;
1 mm Hg = 0.133 kPa

组前列腺液中白细胞数量显著降低($P<0.01$)、卵磷脂小体数量显著升高($P<0.01$)。结果见表3。

表3 前列闭尔通栓对EAP大鼠前列腺液中白细胞、卵磷脂小体数量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 3 Effect of QBS on number of white blood cells and lecithin bodies in prostatic fluid of EAP rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·只 ⁻¹)	白细胞数量	卵磷脂小体数量
对照	—	0.00±0.00	45.80±4.05
模型	—	4.50±2.68**	4.60±1.78**
前列闭尔	0.33	1.30±0.48 ^{##}	25.90±4.73 ^{##}
通栓	0.66	1.40±0.52 ^{##}	30.80±5.90 ^{##}
	0.99	0.80±0.42 ^{##}	38.70±4.00 ^{##}
前列通栓	0.42	0.30±0.48 ^{##}	39.30±6.08 ^{##}

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:^{##} $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs model group

3.3 前列闭尔通栓对EAP大鼠前列腺组织TNF- α 、IL-8、IL-10水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠前列腺组织中IL-8、TNF- α 水平显著升高,IL-10水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,前列闭尔通栓各剂量组前列腺组织中IL-8、TNF- α 水平降低,其中中、高剂量组差异显著($P<0.05, 0.01$);前列闭尔通栓各剂量可不同程度升高模型动物前列腺组织中IL-10水平,但无统计学差异。结果见表4。

3.4 前列闭尔通栓对EAP大鼠前列腺组织病理评分的影响

镜检发现对照组前列腺整体形态结构未见明显异常,其中前列腺腹侧叶、背侧叶结构未见明显异常,输精管、尿道和凝固腺未见明显异常。

模型组主要病变包括炎细胞(淋巴细胞)浸润、腺泡上皮增生和腺泡囊性扩张,此外1例可见巨大的肉芽组织,表现为炎细胞浸润和纤维组织增生,可见多核巨噬细胞。炎细胞浸润组内发病率为9/10,程

表4 前列闭尔通栓对EAP大鼠前列腺组织TNF- α 、IL-8、IL-10水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 4 Effect of QBS on TNF- α , IL-10, and IL-8 level of prostate tissue in EAP rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·只 ⁻¹)	IL-8/(ng·g ⁻¹)	IL-10/(ng·g ⁻¹)	TNF- α /(ng·g ⁻¹)
对照	—	7.01±1.57	8.75±1.68	6.19±2.33
模型	—	9.86±2.78**	6.11±1.77**	8.90±2.14**
前列闭尔	0.33	8.13±2.19	6.78±2.23	7.54±1.50
通栓	0.66	7.67±1.91 [#]	7.63±1.09	6.30±1.28 [#]
	0.99	7.43±2.61 [#]	7.72±1.67	6.06±2.66 ^{##}
前列通栓	0.42	7.29±2.15 [#]	8.63±2.46 ^{##}	6.60±3.05 [#]

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

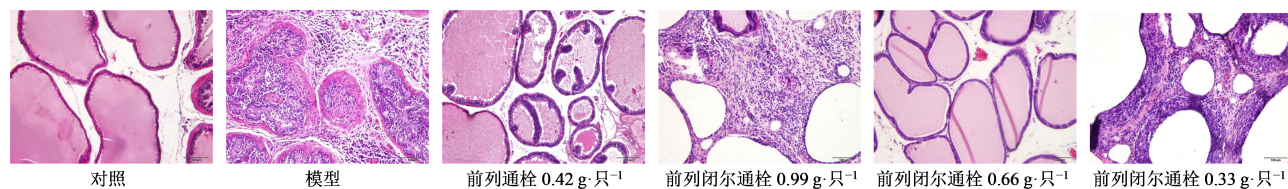
度包括轻度、中度,镜检表现为淋巴细胞聚集在前列腺腺泡间叶组织中;腺泡上皮增生组内发病率为5/10,程度以轻度为主,镜检表现为前列腺腺腔上皮增厚。

前列通栓组病变程度较低,病变仅见炎细胞(淋巴细胞)浸润,炎细胞浸润组内发病率为5/10,程度包括轻度和轻微。

前列闭尔通栓高剂量组病变程度较低,包括炎细胞(淋巴细胞)浸润和腺泡上皮增生,1例可见炎性肉芽肿。炎细胞浸润组内发病率为3/10,包括中度和轻度;2例可见腺腔上皮增厚,程度为轻微和轻度。

前列闭尔通栓中剂量组病变程度较低,仅2例可见炎细胞(淋巴细胞)浸润,程度为轻微和轻度。

前列闭尔通栓低剂量组病变包括炎细胞(淋巴细胞)浸润和腺泡上皮增生。炎细胞浸润组内发病率为5/10,程度以中度为主;仅1例可见腺泡上皮增生。结果见图1、表5。

图1 各组大鼠前列腺组织HE染色($\times 200$)Fig. 1 HE staining of prostate tissue in each group of rats ($\times 200$)

3.5 前列闭尔通栓对EAP大鼠前列腺组织NF- κ B通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠前列腺组织p-IKK- α /IKK- α 、p-I κ B α /I κ B α 、NF- κ B p65、TNF- α 、COX-2蛋白表达显著升高($P<0.05, 0.01$)。与模型组比

较,前列闭尔通栓各剂量组前列腺组织p-I κ B α /I κ B α 、COX-2蛋白表达显著降低($P<0.01$);前列闭尔通栓低剂量组前列腺组织p-IKK- α /IKK- α 蛋白表达显著降低($P<0.05$);前列闭尔通栓低、高剂量组前列腺组织NF- κ B p65蛋白表达显著降低($P<$

表5 前列闭尔通栓对EAP大鼠前列腺组织病理评分的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 5 Effect of QBS on prostate histopathological score in EAP rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·只 ⁻¹)	病理评分
对照	—	0.00±0.00
模型	—	3.70±1.06**
前列闭尔	0.33	1.50±2.01 [#]
通栓	0.66	0.30±0.68 ^{##}
	0.99	1.40±1.90 ^{##}
前列通栓	0.42	0.90±1.20 ^{##}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

0.05); 前列闭尔通栓中剂量组前列腺组织TNF- α 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。结果见图2和表6。

3.6 前列闭尔通栓对EAP大鼠前列腺组织炎症基因表达的影响

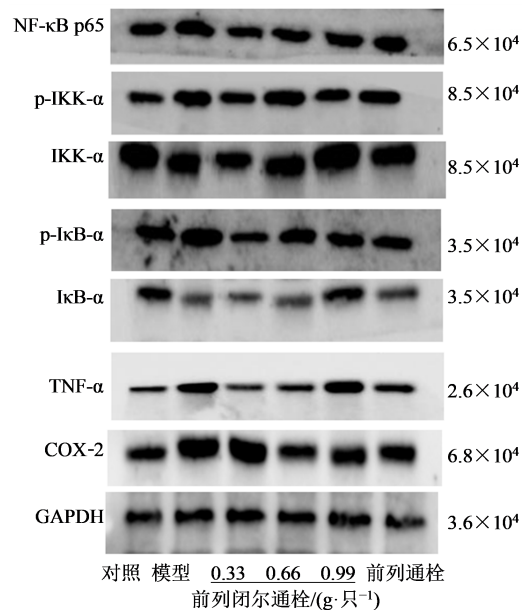
与对照组比较, 模型组大鼠前列腺组织CXCL-5、TNF- α 、COX-2 mRNA表达显著增加($P<0.01$); 与模型组比较, 前列闭尔通栓各剂量组前列腺组织CXCL-5、IL-6、COX-2 mRNA表达显著降低($P<0.05, 0.01$)。结果见表7。

表6 前列闭尔通栓对EAP大鼠前列腺组织蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 6 Effect of QBS on prostate tissue protein expression in EAP rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/(g·只 ⁻¹)	p-IKK- α /IKK- α	p-IkB α /IkB α	NF- κ B p65/GAPDH	TNF- α /GAPDH	COX-2/GAPDH
对照	—	1.36±0.26	0.44±0.06	0.28±0.09	0.34±0.07	0.37±0.12
模型	—	2.39±0.54*	1.51±0.42**	0.52±0.17*	0.49±0.05*	0.64±0.09**
前列闭尔	0.33	1.36±0.35 [#]	0.64±0.52 ^{##}	0.27±0.08 [#]	0.40±0.11	0.37±0.16 ^{##}
通栓	0.66	1.96±0.59	0.39±0.09 ^{##}	0.36±0.16	0.31±0.03 [#]	0.27±0.09 ^{##}
	0.99	1.80±0.75	0.44±0.09 ^{##}	0.29±0.04 [#]	0.51±0.09	0.33±0.06 ^{##}
前列通栓	0.42	1.98±0.73	0.47±0.12 ^{##}	0.31±0.03 [#]	0.31±0.08 [#]	0.29±0.10 ^{##}

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group表7 前列闭尔通栓对EAP大鼠前列腺组织基因表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 7 Effect of QBS on gene expression of prostate tissues in EAP rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/(g·只 ⁻¹)	CXCL-5/GAPDH	IL-6/GAPDH	COX-2/GAPDH	TNF- α /GAPDH
对照	—	1.00±0.12	1.00±0.27	1.00±0.79	1.00±0.33
模型	—	20.37±1.57**	1.11±0.28	7.03±3.98**	7.99±1.06**
前列闭尔	0.33	3.03±0.24 ^{##}	0.26±0.07 ^{##}	1.11±0.78 ^{##}	7.17±4.86
通栓	0.66	1.19±0.38 ^{##}	0.54±0.20 ^{##}	0.96±0.57 ^{##}	4.84±0.87
	0.99	0.19±0.03 ^{##}	0.36±0.01 ^{##}	2.64±0.88 [#]	4.88±0.65
前列通栓	0.42	4.13±1.07 ^{##}	0.05±0.06 ^{##}	4.15±2.24	3.72±0.93 [#]

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group图2 各组大鼠前列腺组织NF- κ B p65、p-IKK- α 、p-IkB- α 、TNF- α 、COX-2蛋白条带Fig. 2 NF- κ B p65, p-IKK- α , p-IkB- α , TNF- α , and COX-2 protein bands in prostate tissue of rats in each group

4 讨论

中医中虽无“前列腺炎”病名, 但根据其症状表现, 多属于中医“白浊”“精浊”“劳淋”等范畴^[5], 辨证

多为湿热下注、肾气亏虚等,治疗包括内服中药或中成药,辅以针灸等外治法,疗效明显且不良反应少^[6]。目前,慢性前列腺炎的用药方式主要以直肠黏膜下给药、尿道灌注和前列腺穿刺给药为主。直肠黏膜下给药虽然操作复杂,但治愈率较高^[7]。前列闭尔通栓主要由10种中药组成:马鞭草、黄连、黄柏清热利湿,有广谱抑菌杀菌作用,对支原体、衣原体有效,并能抑制环氧化酶的转录活性,阻断炎症介质生成,减少组织炎症;王不留行、琥珀能松弛膀胱颈及尿道平滑肌,降低尿道阻力,改善尿频、尿不尽、小腹疼等症状;白花蛇草、三七能调节或增强免疫功能;蜈蚣、土鳖虫、穿山甲有软坚散结、化瘀消症功效,消除前列腺组织纤维化、钙化^[8]。

本研究结果表明,EAP模型动物的膀胱内压降低,前列腺组织卵磷脂小体数量减少、白细胞数量增加,病理评分升高。排尿异常是前列腺炎患者最典型、最常见的临床表现:如尿频、尿急、尿痛等下尿路症状以及尿液的反流、尿量减少等症状。膀胱逼尿肌、尿道平滑肌痉挛以及顺应性的改变,是引发这些症状的主要因素^[9]。本实验结果显示,相比于模型组,前列闭尔通栓给药组膀胱内压变化速率升高,说明前列闭尔通栓可以缓解尿道平滑肌痉挛,恢复其肌肉顺应性,改善排尿症状,对EAP大鼠有明显的治疗作用。白细胞、卵磷脂小体计数是判断炎症反应的主要参考指标之一,也是前列腺炎的常规前列腺液检查中重要的判断指标^[10]。相比于模型组,前列闭尔通栓给药组白细胞数量降低、卵磷脂小体数量升高,说明前列闭尔通栓对EAP大鼠有明显的治疗作用。前列腺组织病理观察是评价EAP模型的主要指标;组织学检查显示,前列闭尔通栓对前列腺病变程度具有明显的改善作用,使病理形态明显好转。细胞因子与慢性前列腺炎密切相关,其主要包括2大类:IL-8、TNF- α 促炎因子和IL-10抗炎因子,二者相互平衡,共同作用影响前列腺组织炎症程度^[11]。本实验结果显示:与模型组相比,前列闭尔通栓可升高EAP大鼠前列腺组织IL-10水平,降低IL-8和TNF- α 水平,提示前列闭尔通栓治疗EAP作用可能与其抗炎作用有关。

炎症反应受多条信号通路的调控,NF- κ B信号通路则是其中之一。NF- κ B信号通路激活可导致一系列炎症反应相关基因表达增加,NF- κ B是多种炎症反应的中心环节^[12]。生理状态下,在细胞浆中NF- κ B以p50/p65二聚体形式存在,并伴随I κ B抑制蛋白结合形成三聚体并丧失生理学活性。当机体

出现炎症反应后包括IL-1、TNF- α 会有效激活I κ B激酶复合物,促进其泛素化和磷酸化降解,进而释放NF- κ B p50/p65,后在核转位过程中与靶基因位点结合启动下游基因表达。当NF- κ B激活后会加速刺激体内多种信号因子表达和转录,升高体内的炎症因子水平,是重要且可靠的评估疾病严重程度指标^[13]。国内外的相关研究表明,诸如TNF- α 、IL-6、IL-8、COX-2、黏附分子、趋化因子、集落刺激因子等均参与了早期的免疫反应以及炎症反应各阶段的众多分子均受NF- κ B的调控^[14]。本实验结果表明:与对照组比较,模型组NF- κ B p65、p-IKK- α 、p-I κ B- α 、TNF- α 、COX-2蛋白表达显著增多;与模型组比较,前列闭尔通栓给药后可明显下调NF- κ B p65、p-IKK- α 、p-I κ B- α 、TNF- α 、COX-2蛋白的表达。因此,考虑前列闭尔通栓可能通过调节NF- κ B信号通路来抑制促炎细胞因子的表达,从而减轻前列腺组织的炎症反应。

TNF- α 参与免疫反应和炎症反应各个阶段。TNF- α 在临床中属于炎症因子的典型标志物,机体出现炎症反应后才会被释放,使得TNF- α 水平异常上升^[14]。IL-6在机体中属于最强的炎症因子,是炎症反应和机体组织损伤程度的特异性指标^[15]。CXCL5属于CXC型趋化因子家族成员之一,作为炎症中介因子,CXCL5能通过趋化中性粒细胞参与炎症反应,通过与其受体结合募集T/B淋巴细胞和嗜酸性粒细胞,调控先天及后天性免疫应答^[16-17]。CXCL5已被证明是一种强大的趋化剂,可在体外和体内引发嗜中性粒细胞的积累,在导致中性粒细胞积累的炎症反应过程中可能起关键作用^[18]。在机体处于病理状态下或者细胞组织损伤时,COX-2可以被快速激活,从而参与细胞炎症反应,抑制患者免疫机制^[19]。qRT-PCR结果显示,与模型组相比,前列闭尔通栓能够显著降低EAP大鼠前列腺组织中IL-6、CXCL5、COX-2等炎症基因表达水平,说明前列闭尔通栓能减轻模型组前列腺组织炎症反应,具有抗炎作用。

前列闭尔通栓可改善EAP大鼠前列腺炎,其机制可能是抑制NF- κ B信号通路,下调NF- κ B p65、p-IKK- α 、p-I κ B- α 、TNF- α 、COX-2表达。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李斌,黄德亮,郑慧澜,等. 泌尿清丸对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠的影响及作用机制探讨[J]. 广西中医

- 药, 2022, 45(3): 58-63.
- Li B, Huang D L, Zheng H L, et al. Urinary clearing pill on chronic non-bacterial prostatitis model rats and its action mechanism [J]. Guangxi J Tradit Chin Med, 2022, 45(3): 58-63.
- [2] 臧春柳, 韩福谦, 余妙华, 等. 从"虚、瘀、毒"论治III型慢性非细菌性前列腺炎 [J]. 中医临床研究, 2022, 14(23): 95-97.
- Zang C L, Han F Q, She M H, et al. Treating III type chronic non-bacterial prostatitis from "deficiency, blood stasis and toxicity" [J]. Clin J Chin Med, 2022, 14(23): 95-97.
- [3] 欧文静, 曹馨月, 张天睿, 等. 前列闭尔通栓对慢性非细菌性前列腺炎的治疗作用研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(12): 1988-1994.
- Ou W J, Cao X Y, Zhang T R, et al. Therapeutic effects of Qianlie Bi'ertong Suppository on chronic nonbacterial prostatitis [J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan, 2022, 42(12): 1988-1994.
- [4] 李天赋, 李卫巍, 吴秋月, 等. 自身免疫性前列腺炎大鼠模型的建立 [J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(5): 414-418.
- Li T F, Li W W, Wu Q Y, et al. Establishment of a rat model of autoimmune prostatitis [J]. Chin J Androl, 2014, 20(5): 414-418.
- [5] 孙松, 厉将斌, 赵琦, 等. 李海松教授运用少腹逐瘀汤治疗男科疾病经验 [J]. 环球中医药, 2022, 15(5): 815-817.
- Sun S, Li J B, Zhao Q, et al. Professor Li Haisong's experience in treating male diseases with Shaofu Zhuyu Decoction [J]. Glob Tradit Chin Med, 2022, 15(5): 815-817.
- [6] 郭雪梅, 朱艳, 陈柯村, 等. 中医药治疗慢性前列腺炎研究概述 [J]. 山东中医杂志, 2020, 39(10): 1130-1134.
- Guo X M, Zhu Y, Chen K C, et al. Study summary on treatments of chronic prostatitis with traditional Chinese medicine [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2020, 39(10): 1130-1134.
- [7] 张培培, 刘绍然. 正确选择治疗慢性前列腺炎的药物探讨 [J]. 科学咨询(教育科研), 2020(5): 33-34.
- Zhang P P, Liu S R. Discussion on the correct choice of drugs to treat chronic prostatitis [J]. Sci Consult (Educat Res), 2020(5): 33-34.
- [8] 郇成民, 王家琛, 张家伟. 前列闭尔通栓联合左氧氟沙星治疗慢性前列腺炎 [J]. 实用医药杂志, 2009, 26(5): 23.
- Huan C M, Wang J C, Zhang J W. Treatment of chronic prostatitis with Qianlie Shuertong suppository and levofloxacin [J]. Pract J Med Pharm, 2009, 26(5): 23.
- [9] Franco J V A, Turk T, Jung J H, et al. Pharmacological interventions for treating chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: A Cochrane systematic review [J]. BJU Int, 2020, 125(4): 490-496.
- [10] 叶绿萍, 李德钢, 刘素春, 等. 普乐士泰胶囊对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠的改善作用 [J]. 中国药房, 2017, 28(22): 3057-3060.
- Ye L P, Li D G, Liu S C, et al. The improvement effect of Proxetine capsule on chronic non-bacterial prostatitis model rats [J]. China Pharm, 2017, 28(22): 3057-3060.
- [11] 卢娜, 王旭初, 王琰, 等. 加减知柏地黄汤治疗慢性前列腺炎合并不育症患者的临床效果 [J]. 世界中医药, 2021, 16(11): 1734-1737.
- Lu N, Wang X C, Wang Y, et al. Modified Zhibai Dihuang decoction in the treatment of chronic prostatitis with infertility [J]. World Chin Med, 2021, 16(11): 1734-1737.
- [12] 黄鹤鸣, 刘彦君, 付荣, 等. BET抑制剂(+) - JQ1通过调节NF-KB信号通路保护小鼠急性肝衰竭实验研究 [J]. 实用肝脏病杂志, 2020, 23(6): 781-784.
- Huang H M, Liu Y J, Fu R, et al. Experimental study on the protection of BET inhibitor (+) - JQ1 against acute liver failure in mice by regulating NF-KB signal pathway [J]. J Pract Liver Dis, 2020, 23(6): 781-784.
- [13] 张玲, 李明, 林红. 蛇床子素对糖尿病肾病大鼠NF-κB信号通路介导的炎症反应的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 201-205, I0043.
- Ling Z, Ming L, Hong L. Effects of osthole on inflammatory response mediated by NF-κB signaling pathway in diabetic nephropathy rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(1): 201-205, I0043.
- [14] 罗清, 刘萌, 廖俊城. NF-kB信号通路影响慢性阻塞性肺疾病进展的研究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(6): 124-126.
- Luo Q, Liu M, et al. Study on the influence of NF-kB signaling pathway on the progress of chronic obstructive pulmonary disease [J]. World Latest Med Inf, 2019, 19(6): 169-171.
- [15] 杨琦, 林英, 李慧萍, 等. 老年心力衰竭患者血清TNF-α、IL-8、IL-10水平对病情的评估意义 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(13): 3126-3128.
- Yang Q, Lin Y, Li H P, et al. Significance of serum TNF-α, IL-8 and IL-10 levels in elderly patients with heart failure in evaluating their condition [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(13): 3126-3128.
- [16] 曾晓川. 口腔种植修复术在牙列缺损中的治疗效果及对患者龈沟液中TNF-α、IL-6水平的影响 [J]. 医学创新, 2022, 19(33): 42-46.
- Zeng X C. Therapeutic effect of oral implant repair in dentition defect and its effect on the levels of TNF-α and

- IL-6 in gingival crevicular fluid of patients [J]. Med Innov China, 2022, 19(33): 42-46.
- [17] 袁帅, 毕兴, 牛越, 等. 术前预后营养指数联合血清 CXCL5、YKL-40 对非肌层浸润性膀胱癌患者经尿道膀胱肿瘤电切术后复发的预测价值 [J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(20): 3912-3916, 3940.
- Yuan S, Bi X, Niu Y, et al. Predictive value of preoperative prognostic nutritional index combined with serum CXCL5 and YKL-40 for recurrence after transurethral resection of bladder tumor of non-muscular invasive bladder cancer [J]. Prog Mod Biomed, 2022, 22(20): 3912-3916, 3940.
- [18] 杨春, 殷宇岗, 徐恒, 等. 冠心病患者血清 CXCR3、CXCL5、CXCL12 水平与冠脉病变程度和预后的关系研究 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(24): 4713-4718.
- Yang C, Yin Y G, Xu H, et al. Study on the relationship between serum CXCR3, CXCL5, CXCL12 levels and the severity of coronary artery disease and prognosis in patients with coronary heart disease [J]. Prog Mod Biomed, 2021, 21(24): 4713-4718.
- [19] 刘芳, 骈晓亮, 朱飞. 慢性阻塞性肺疾病患者急性加重期血清 IL-29、CXCL5 水平变化及意义 [J]. 吉林医学, 2021, 42(10): 2329-2332.
- Liu F, Pian X L, Zhu F. The changes and significance of serum IL-29 and CXCL5 levels in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Jilin Med, 2021, 42(10): 2329-2332.
- [20] 张辉, 王朝晖. COX-2 和 CEA 在大肠癌中的表达及其与临床病理学特征的关联 [J]. 中国实验诊断学, 2022, 26(11): 1615-1619.
- Zhang H, Wang Z H. Expression of COX-2 and CEA in colorectal cancer and their correlation with clinicopathological features [J]. Chin J Lab Diagn, 2022, 26(11): 1615-1619.

[责任编辑 兰新新]