论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2266-03

完全弗氏佐剂诱导前列腺炎模型大鼠尿道腺分泌异常的研究

吴爱宁,熊恩庆,宋 波,张 恒 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 观察前列腺炎对大鼠尿道腺分泌的影响。**方法** 20只Sprague-Dawley大鼠随机分为前列腺炎组和对照组,前列腺炎组侧叶内给予注射完全弗氏佐剂0.1 ml,对照组给予注射生理盐水0.1 ml,2周后取尿道腺组织做AB-PAS黏液染色和分泌型粘蛋白MUC5AC免疫组化染色。**结果** ①前列腺炎组前列腺内大量淋巴细胞、单核细胞浸润,对照组阴性,前列腺炎动物模型建立成功。②AB-PAS黏液特殊染色提示:前列腺炎组大鼠尿道腺细胞的黏液面积、直径、光密度均比对照组高,且差异有统计学意义($P<0.05$)。③分泌型粘蛋白MUC5AC免疫组化染色结果提示前列腺炎组粘蛋白面积、平均光密度与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 前列腺炎可以导致尿道腺合成和分泌黏液功能增强,这可能是前列腺患者尿道分泌物增多的原因之一。

关键词: 前列腺炎;尿道腺;分泌

中图法分类号: R-332;R695;R697.33 **文献标识码:** A

Secretory alterations of urethral glands in complete Freund's adjuvant-induced prostatitis in rats

WU Ai-ning, XIONG En-qing, SONG Bo, ZHANG Heng (Urinary Surgery Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of prostatitis on secretory alterations of urethral glands in rats. **Methods** Twenty adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into prostatitis group and control group. The prostatitis group ($n=10$) was injected with 0.1 ml Freund's complete adjuvant at each lateral lobe while the control group ($n=10$) with 0.1 ml 0.9% physiological saline. Two weeks later the rats were killed and the urethral glands were harvested for pathologic examination and immunohistochemical staining. **Results** ① There was a great quantity of lymphcells and mononuclear cells infiltrating the prostate gland in prostatitis group while there was no inflammatory cells in control group. ② AB-PAS pathologic examination results in urethral glands showed that the grume area, diameter, optical density in control group were significantly less than those of the prostatitis group ($P<0.05$). ③ MUC5AC immunohistochemical staining results in urethral glands suggested that masculine particle area and average optical density of the urethral gland cells in control group were significantly less than that of the prostatitis group ($P<0.05$). **Conclusion** Prostatitis may strengthen the synthesis and secretion of mucus in the urethral glands, which might be the reason why prostatitis patients have more urethral secretion.

Key words: prostatitis; urethral glands; secretion

慢性前列腺炎(chronic prostatitis, CP)是泌尿外科的常见疾病,占泌尿外科门诊的8%~25%,全球9%~14%的男性受其困扰[1]。美国每年就诊的CP患者有200万例[2],在泌尿外科50岁以下就诊患者中占第1位。慢性前列腺炎患者的临床表现多种多样,症状和体征差异较大。目前慢性前列腺炎临床无特效药物,许多患者治疗效果不佳而反复就诊,导致了患者的经济和心理负担。临床观察发现"尿道口滴白"是许多患者的主要症状,以往的解释是由于前列腺局部炎症导致分泌物增多造成前列腺液从尿道溢出,是前列腺的一种功能性改变,然而文献[3]报道组织学见慢性前列腺炎有腺体结构的破坏,腺上皮减少和灶性破坏,上皮细胞分泌活性降低:基础研究与临床解释相矛盾。由此推测尿道口滴白另有来源,可能与尿道腺分泌的异常有关。本研究通过大鼠动物模型探索前列腺炎和尿道腺体分泌改变之间的关系,旨在为慢性前列

作者简介:吴爱宁,男,湖南省常宁市人,硕士研究生,医师,主要从事前列腺炎症状产生机制方面的研究。E-mail:wuaining2007@163.com

通信作者:熊恩庆,电话:(023)68754332

收稿日期:2009-04-30;修回日期:2009-07-10

腺炎发病机制的研究和相关治疗提供一些新的思路。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及仪器

完全弗氏佐剂(CFA)购自 Sigma 公司,0.9% 生理盐水购自本院药房,粘蛋白抗体(MUC5AC)购自 Santa Cruz 公司,辣根酶标(HRP)的山羊抗小鼠抗体购自北京中杉金桥公司,DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,AB-PAS 肠化生黏液染色液购自厦门迈威生物科技有限公司。

1.2　方法

1.2.1　实验动物及分组　　健康清洁级成年雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠 20 只,体质量为 280 ~ 340 g,由本校实验动物中心提供,按体质量大小排序后,按随机数字表法分为前列腺炎组和对照组,每组 10 只。

1.2.2　大鼠准备　　大鼠分笼饲养 3 ~ 5 d 后,1% 的戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉成功后,置大鼠于恒温超净工作台上仰卧位(20°),妥善固定四肢,常规下腹部消毒铺单,取下腹部正中切口长约 2.0 cm,依次剪开皮肤、肌肉、腹膜组织进入腹腔。前列腺炎组于前列腺腹侧叶内注入完全弗氏佐剂 0.1 ml[4],对照组于前列腺腹侧叶注入 0.9% 生理盐水 0.1 ml,可吸收线缝合伤口,腹腔注射青霉素钠 40 000 U/只,连续 3 d。2 周后处死。

1.3　检测指标

1.3.1　前列腺组织学观察　　选取前列腺炎组和对照组 SD 大鼠各 1 只,处死后迅速打开腹腔,取前列腺腹侧叶,生理盐水轻轻冲洗后置于 10% 的甲醛磷酸缓冲液中固定,用于常规 HE 染色,以便证实前列腺炎模型是否成功。

1.3.2　尿道腺的组织学观察　　SD 大鼠处死后迅速打开腹腔,切断分离耻骨联合,取尿道球部膨大处长约 1.0 cm,生理盐水轻轻冲洗后置于 10% 的甲醛磷酸缓冲液中固定,用于常规 HE 染色、AB-PAS 黏液染色。

1.3.3　黏液分泌量的测定　　黏液组织化学染色(AB-PAS 法):石蜡切片常规脱蜡、水化,1% AB(阿利新蓝,pH 2.5)染色 10 min,0.5% 的 PA(高碘酸)染色 5 min,Schiff 氏试剂染色 10 min,苏木精复染 2 min,水洗,透明,封片。将 AB-PAS 染色的切片置于显微镜下,通过真彩色图像分析仪的摄像机将放大数十倍的图像输入电脑。每个标本各取 2 张切片,每张切片选取 2 个视野,每个视野顺时针方向每隔 2 个细胞选取的方法随机测定 5 个黏液细胞,运用 Ipp6.0 图像分析软件测定单细胞黏液的面积、直径、光密度值。

1.3.4　粘蛋白的定量测定(间接酶标法染色)　　石蜡切片常规脱蜡水化,3% 的双氧水室温封闭 15 min,磷酸盐缓冲液漂洗,0.1% 的胰蛋白酶溶液 37 ℃行抗原修复 30 min,磷酸盐缓冲液漂洗,0.3% Triton X-100 和 2% 正常山羊血清封闭液湿盒内孵育室温 30 min 封闭,MUC5AC(1∶50)湿盒内孵育 4 ℃过夜,HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1∶500)湿盒内孵育 37 ℃1 h,DAB + 硫酸镍铵显色[5],脱水、透明、封片。通过真彩色图像分析仪的摄像机将放大数十倍的图像输入电脑,每个标本各取 2 张切片,运用 Ipp6.0 图像分析软件测定各切片粘蛋白表达的阳性率(阳性颗粒总面积/尿道腺面积)及阳性强度(平均光密度:阳性颗粒总光密度/阳性颗粒总面积)。

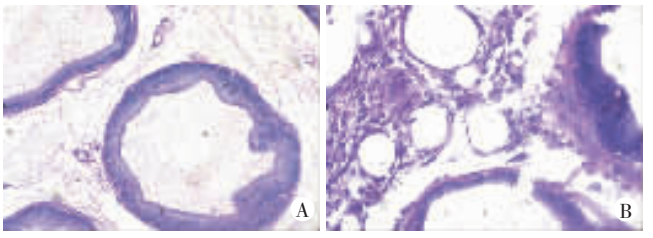
1.4　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计分析软件行 t 检验。

2　结果

2.1　前列腺组织学观察

前列腺炎组的前列腺间质内可见大量淋巴细胞、单核细胞等炎细胞浸润,有的淋巴细胞浸润明显,集中成簇状;而对照组的前列腺组织无白细胞浸润,提示前列腺炎动物模型建立成功。见图 1。

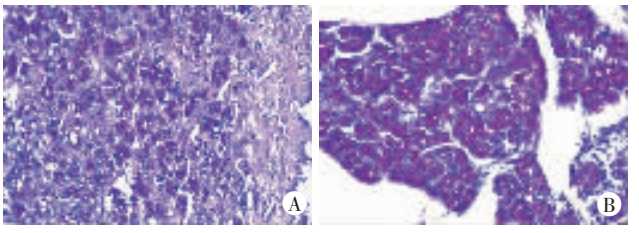


A:对照组　间质无白细胞浸润;B:前列腺炎组　间质大量白细胞浸润

图 1　2 组前列腺组织病理学观察　(HE ×400)

2.2　前列腺炎对尿道腺黏液分泌的影响

2.2.1　黏液细胞相关指标测定　　黏液组织化学染色(AB-PAS 法)结果提示尿道腺腺细胞内黏液染色呈红色,细胞核呈蓝色(图 2)。利用 Ipp6.0 图像分析软件将像素转化为几何单位,测量结果提示前列腺炎组尿道腺腺细胞内黏液的面积、直径、平均光密度均较对照组大,且 2 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。



A:对照组 黏液着色紫红,分布稀疏,面积小;B:前列腺炎组 黏液着色深红,分布密集,面积大

图 2　2 组尿道腺组织黏液组织化学染色观察　(AB-PAS ×400)

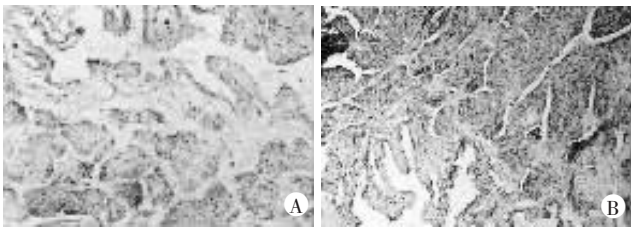
表 1　2 组 AB-PAS 染色单细胞黏液面积、直径和光密度的变化($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	面积(μm²)	直径(μm)	光密度
前列腺炎组	8.05 ± 2.67[a]	3.04 ± 0.52[a]	4.66 ± 1.67[a]
对照组	6.63 ± 2.14	2.78 ± 0.48	3.17 ± 1.18

a:$P < 0.05$,与对照组比较

2.2.2　黏液的蛋白质含量测定　　免疫组织化学染色结果提示 MUC5AC 粘蛋白在尿道腺的免疫组化切片中呈点状阳性颗粒,主要分布于尿道腺腺体组织中,间质组织、尿道腺管腔及黏膜组织均未见阳性颗粒(图 3)。且前列腺炎组单位面积腺体内 MUC5AC 阳性颗粒总面积(阳性率)及阳性颗粒平均光密度

值(阳性强度)均较对照组大,且差异有统计学意义($P<0.05$,表2)。



A:对照组 阳性颗粒(小黑点)稀疏;B:前列腺炎组 阳性颗粒(小黑点)密集

图3 2组前列腺组织中 MUC5AC 蛋白的表达 (间接酶标法×100)

表2 MUC5AC 免疫组化染色尿道腺阳性率及阳性强度变化 ($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	阳性率	阳性强度
前列腺炎组	0.072 ± 0.001^a	1.045 ± 0.021^a
对照组	0.044 ± 0.006	0.658 ± 0.056

a: $P<0.05$,与对照组比较

3 讨论

尿道口滴白现象是慢性前列腺炎的一种常见症状,常常在患者晨起或便后尿道口出现稀薄清亮的分泌物。孙中明等[6]报道"尿道口滴白"占慢性前列腺炎患者19.36%,且缠绵难愈,容易反复发作,病程迁延2年以上者占60.32%。传统对"尿道口滴白"发病机制的解释为炎症细胞浸润,炎性分泌物较多"溢出"尿道,故出现滴白现象。文献[3]报道却与此相反,认为当前列腺发生慢性炎症时,由于炎症对前列腺腺泡和各级腺管的损害,其自身的分泌功能是低下的。国外也有相关研究认为前列腺感染引起的前列腺液显著改变主要是腺体分泌功能下降,同时伴有精浆生物及生化特性的变化,进而影响精子的功能和受精潜力[7]。由此可以推测,当前列腺发生炎症时,其自身的分泌量是下降的,那么"尿道溢出"的滴白液应另有来源。"尿道口滴白"的本质是黏液,既往的研究多注重前列腺本身的病因、病理机制研究,而对尿道黏膜下尿道腺的作用和黏液的高分泌缺乏足够的认识。尿道腺分布于黏膜下层,阴茎海绵体部分布较多,该腺为黏液腺,细胞质清,含黏液颗粒。其排泄管开口于尿道黏膜表面,形成许多针尖大小的小窝。其分泌黏液占精液总量的5%[8],主要用于润滑尿道。分泌功能受神经及周围理化因素的影响[9]。

在本实验中,给予SD大鼠前列腺双侧叶注射完全弗氏佐剂各0.1 ml建立前列腺炎模型,2周后处死大鼠,前列腺常规病理检查(图1)提示前列腺组织内见大量炎细胞浸润,符合前列腺炎的诊断标准。球部尿道腺AB-PAS黏液染色(图2)结果显示前列腺炎大鼠尿道腺黏液细胞数量变化不显著,但单细胞黏液的面积、直径、光密度都显著大于对照组(表1),提示前列腺炎对尿道腺黏液的合成和分泌有明显的促进作用。粘蛋白免疫组化(图3)结果显示MUC5AC在尿道腺中皆有表达,分布情况与AB-PAS染色范围一致,主要分布在细胞质中,尿道黏膜及周围结缔组织无表达,这与人的尿道腺MUC5AC表达分布一致[10]。且MUC5AC是尿道腺唯一的分泌蛋白[10],故MUC5AC的分泌量、分泌浓度和分布范围能够代表黏液分泌情况。在前列腺炎组,免疫组化显示MUC5AC较对照组阳性率明显升高($P<0.05$),且阳性表达程度明显升高($P<0.05$,表2),颗粒多,染色深,偶可见聚集现象,提示在发生前列腺炎时,尿道腺MUC5AC合成分泌能力明显增强,这可能与其基因被激活,而呈现出增殖能力活跃的生物学性状有关。

总之,与正常对照组相比,我们所研究的前列腺炎大鼠确实存在周围腺体如尿道腺腺细胞体积增大、黏液增多及MUC5AC粘蛋白表达量增加,提示前列腺炎可以导致周围脏器及腺体发生相应的改变。进一步探索引起这种改变的机制,将为临床诊断治疗前列腺炎症状提供理论依据,为新的治疗干预提供新的靶体。

参考文献:

[1] Shoskes D A. Use of antibiotics in chronic prostatitis syndromes[J]. Can J Urol, 2001, 8(Suppl 1): 24-28.

[2] Collins M M, Stafford R S, O'Leary M P, *et al*. How common is prostatitis? A national survey of physician visits[J]. J Urol, 1998, 159(4): 1224-1228.

[3] 贾玉森, 赵风志, 李曰庆, 等. 前列腺炎栓对前列腺组织病理学的影响[J]. 北京中医药大学学报,1999, 22(5): 56-57.

[4] 周占松, 宋 波, 卢根生, 等. 前列腺炎性疼痛与脊髓星形胶质细胞活化关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(18): 1853-1854.

[5] 张吉强, 姚 青, 刘建军, 等. 不同显色方法对免疫细胞化学显色结果的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(3): 359-360.

[6] 孙中明. 鲍严钟对慢性前列腺炎的治疗思路[J]. 浙江中西医结合杂志, 2005, 15(1): 38-39.

[7] Kavanagh J P. Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid[J]. J Reprod Fertil, 1985, 75(1): 35-41.

[8] Owen D H, Katz D F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant[J]. J Androl, 2005, 26(4): 459-469.

[9] Epple H J, Kreusel K M, Hanski C, *et al*. Differential stimulation of intestinal mucin secretion by cholera toxin and carbachol[J]. Pflugers Arch, 1997, 433(5): 638-647.

[10] Russo C L, Spurr-Michaud S, Tisdale A, *et al*. Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia[J]. Human Reprod, 2006, 21(11): 2783-2793.

(编辑 王小寒)