基础研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0696-03

大鼠慢性前列腺炎模型长时程形态学研究

赵秀娟，王 红，徐 晨
（重庆医科大学生命科学研究院，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨大鼠慢性前列腺炎（Chronic prostatitis，CP）模型长期造模后对前列腺形态学改变的影响。方法：选取 SD 大鼠，于 0、30 d 腹腔分别注射百白破疫苗，同时皮下多点注射 20 g/L 的大鼠前列腺蛋白提纯液及完全福氏佐剂（Freundg complete adjuvant，FCA），第 45、60、90、120 天 取材观察各组大鼠前列腺组织的形态学变化。结果：造模后不同时段前列腺组织学变化具有差异性。造模 45 d 后前列腺间质毛细血管周围出现淋巴细胞浸润，上皮细胞间隙增宽；60 d 和 90 d 后，间质水肿明显，出现肥大细胞浸润；造模后 120 d 出现间质纤维化，腺腔扩张等病理变化。结论：长期造模的不同时段可反映 CP 不同的病理学变化过程，提示大鼠 CP 模型不同时间段可分别用于不同病理生理阶段的发病机理和临床治疗研究。

【关键词】自身免疫性前列腺炎；动物模型
【中国图书分类法分类号】R-331 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-20

Morphological changes in long-time chronic prostatitis rat models

ZHAO Xiu-juan, WANG Hong, XU Chen
(*Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the morphological changes of prostates in long-time prostatitis rat models at different stages. *Methods*: Male Sprague Dawley rats were intradermally immunized with pertussis-diphtheria-tetanus vaccine 0.5 ml combined with the saline extract of rat prostate glands (RPG) in concentrations of 20 mg/ml and Freundg complete adjuvant (FCA) i. P at the 0 and 30th day. Animals were sacrificed after 45 days, 60 days, 90 days and 120 days. Morphological changes of prostates were observed under light and electron microscope. *Results*: After 45 days, the lymphocytes were observed around the capillary vessels in intercellular substance of prostates; the intercellular spaced of epithelia were widened; interstitial edema and mast cell were apparent after 60 days and 90 days. The Interstitial fibrosis and dilatation of prostate lumens were remarkable after 120 days. *Conclusion*: The present study established all the pathological stages of chronic prostatitis and suggested that the chronic prostatitis models at different stages could be used for studying the mechanism of CPPS at different pathophysilogical stages and providing refrence for their clinical treatment.

【Key words】autoimmune prostatitis; animal model

慢性前列腺炎（Chronic prostatitis，CP）是泌尿外科最常见的疾病之一，发病率约为 2.0%~16.0%，占泌尿外科门诊患者总数的 25.0%~33.0%[1]。该病呈慢性过程，临床表现为盆腔疼痛、排尿刺激性症状和性功能障碍等。然至今 CP 的发病机制仍然不清楚，是困扰世界医学界的难题。目前，认为自身免疫因素在 CP 的发病机制中起着重要的作用[2,3]，稳定且符合疾病临床和病理表现的动物模型是研究 CP 发病机制、诊断和治疗的首要条件。有关自身免疫性 CP 模型的研究多侧重于对免疫细胞性因子的变化方面[4,5]，对于前列腺在长时程造模后的形态学动态改变方面研究报道很少，且造模时间较短。基于 CP 的病理变化呈慢性过程，不同时段的治疗方法应有所不同。由此，对 CP 动物模型长时段造模后进行动态形态学研究很有必要。本研究结合其他学者[6]的 CP 造模方法，采用光镜、电镜以及形态计量学等研究手段，观察造模后不同时段前列腺组织的病理变化，旨在探讨 CP 各造模时段的形态学变化，为 CP 研究选用不同时段模型提供实验依据。

作者介绍：赵秀娟（1984-），女，硕士，
研究方向：泌尿生殖系统的神经调控。
通信作者：徐 晨，男，教授，Email：xuchen@cqmu.edu.cn。
基金项目：重庆市自然科学基金重点资助项目（编号：CSTC，2009BA5081）。

1 材料与方法

1.1 动物选择

成年雄性 SD 大鼠 60 只，体重 240~300 g（重庆医科大学实验动物中心供）。饲养条件：室内温度 20℃~26℃，湿度 50%~70%，昼夜节律用日光灯控制，每日光照 12 h，自由摄食、水。

1.2 前列腺蛋白提纯液制备

取 280~300 g 雄性 SD 大鼠 10 只，脱颈椎处死，下腹部

剪毛，局部皮肤消毒，下腹正中切口，暴露膀胱及雄性附属腺，提起膀胱，分离前列腺腹叶，称重后用冷生理盐水洗净，剪碎后加入含 0.5%TritonX-100 等重的生理盐水溶液，制成匀浆后移入无菌离心管中，低温高速离心机离心，双缩脲法（购自南京建成科技有限公司）测定上清液中蛋白含量，用 PBS 缓冲液（0.1 mol/L，pH=7.4）将前列腺蛋白提纯液稀释为 20 g/L 备用。

1.3 动物造模

50 只雄性 SD 大鼠，体重 240~260 g，随机分成正常对照组（n=10），45 d 模型组（n=10），60 d 模型组（n=10），90 d 模型组（n=10），120 d 模型组（n=10）。所有模型组采用相同造模方法：大鼠乙醚麻醉后腹腔注射百白破疫苗（武汉生物制品研究所，批号：20080620-5）0.5 ml，同时腹侧皮下多点注射大鼠前列腺蛋白提纯液和完全弗氏佐剂 FCA（比例 1:1 的混悬液，FCA 购自美国 Sigma 公司）1 ml，于第 0、30 天注射 2 次。正常对照组于相同时间腹腔注射生理盐水 0.5 ml，腹侧皮下多点注射生理盐水 1 ml。

1.4 动物取材

分别于动物造模后的第 45、60、90、120 天断颈处死，取大鼠前列腺组织。

1.5 HE 染色

取各组大鼠前列腺的右上半腹侧叶，生理盐水洗净，10%中性甲醛溶液固定，石蜡包埋切片，HE 染色后光学显微镜下观察各实验组前列腺组织结构变化并拍照。

1.6 体视学测量

采用体视学 Visiopharm Integrator System 分析测试系统（丹麦），每个实验组 HE 切片于 4 倍物镜下画出前列腺实质区域。每张 HE 切片随机地从所标记的区域内抽取 10 个视野。计数无偏计数框内腺腔个数 N，同时计数无偏计数框内与前列腺腺腔重叠的测点数 $\sum P$，公式如下：

$$Smean=a(p)\times\sum P/N$$

注：公式中 Smean 代表前列腺腺腔平均面积，a(p)为每一测点所对应的面积（4 550 μm²）

1.7 电镜检查

取各组大鼠前列腺的右下半腹侧叶，切成 1 mm³ 的组织块，4%戊二醛和 1%锇酸（pH=7.4）4℃双固定，乙醇丙酮逐级脱水，环氧树脂 618 包埋后切片。超薄切片经醋酸铀及柠檬酸铅染色，H-7500 透射电镜下观察。

1.8 统计学处理

实验数据采用 SPSS17.0 统计软件包进行统计学分析；大鼠前列腺腺腔平均面积数据方差不齐，采用 Kruskal-Wallis 秩和检验，P=0.013，表明不同组的大鼠前列腺腺腔平均面积有差别。组间两两比较时采用 Nemenyi 法（Nemenyi test）检验。

2 结 果

2.1 HE 染色

正常对照组前列腺腺腔规则，腺上皮细胞排列整齐，腺腔内分泌物较均匀一致，腺腔周围间质未见炎性细胞浸润（图 1A）；45 d 模型组见腺腔不规则且腺腔扩大（见表 1），部分腺腔上皮细胞脱落，个别腺腔内分泌物增多，间质轻度水肿，毛细血管周围出现少量淋巴细胞浸润（图 1B）；60 d 组前列腺局部腺上皮向腔内突入，间质水肿更加明显，毛细血管周围及腺腔之间出现多量淋巴细胞和肥大细胞（图 1C）；造模后 90 d 前列腺腺腔上皮细胞脱落明显，部分腺腔内分泌物色泽浅淡；间质明显水肿，仍见散在淋巴细胞和嗜酸性粒细胞（图 1D）；120 d 模型组前列腺腺腔形状极其不规则，明显扩张（见表 1），腺上皮细胞变薄，大部分腺腔分泌物很浅淡，部分腺腔内未见分泌物；间质内可见大量胶原纤维及散在淋巴细胞（图 1E）。

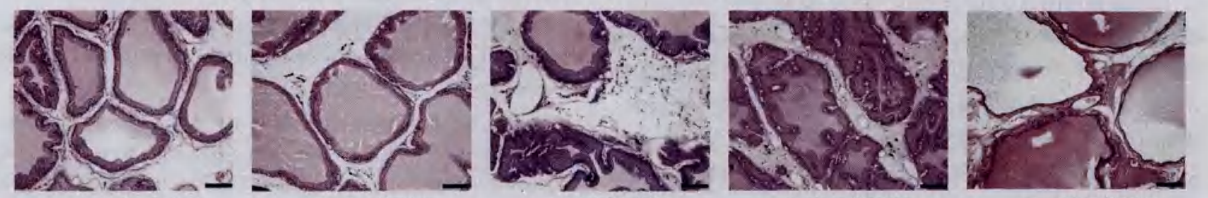
表 1 实验各组大鼠前列腺腺腔平均面积（$\bar{x}\pm s$）

分组	n	视野	前列腺腺腔面积（μm²）
正常对照	10	10	44 391.665 6 ± 13 470.200 1$^{\triangle\blacktriangle\diamond\blacklozenge}$
45 d	10	10	70 006.805 6 ± 3 248.538 6 $^{*\diamond\blacktriangle\blacklozenge}$
60 d	10	10	83 183.962 4 ± 1 0643.719 4 $^{*\triangle\blacklozenge}$
90 d	10	10	97 747.753 6 ± 12 875.782 5 $^{*\triangle\blacklozenge}$
120 d	10	10	141 143.280 0 ± 14 488.888 1 $^{*\triangle\blacktriangle\diamond}$

注：*，P<0.05，与正常对照组比较；△，P<0.05，与 45 d 模型组比较；▲，P<0.05，与 60 d 模型组比较；◇，P<0.05，与 60 d 模型组比较；◆，P<0.05，与 120 d 模型组比较

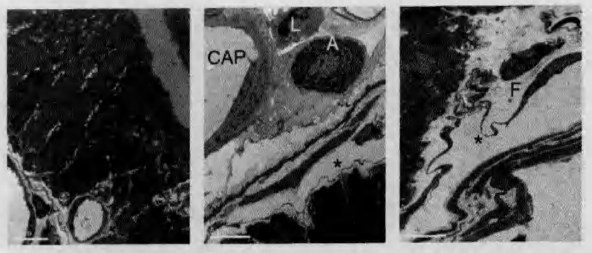
2.2 超微结构变化

造模 45 d 后电镜下观察前列腺柱状上皮排列整齐，核位于细胞的基底部，胞质内粗面内质网丰富，顶部胞质内含多量分泌颗粒；上皮细胞间隙增宽，腺腔内可见大量的细颗粒状或均质状分泌物；管周轻度水分积聚，间质内可见淋巴细胞（图 2A）；60 d 后前列腺上皮管周间质水肿加重，管周细胞与上皮基底部间隙增宽，毛细血管周围见淋巴细胞和肥大细胞浸润，胞质内细胞器结构正常（图 2B）；90 d 组管周间质水肿更加明显，成纤维细胞及胶原原纤维数量增多，见散在肥大细胞；造模后 120 d 胞质内溶酶体增多，部分腺上皮细胞溶解坏死，腺腔基底部形态极不规则，管周间质明显增宽，间质出现多量的胶原原纤维（图 2C）。



A. 正常对照组　B. 45 d 模型组　C. 60 d 模型组　D. 90 d 模型组　E. 120 d 模型组

图 1 各组前列腺 HE 染色图（scalebar=100 μm）



A. 45 d 模型组示前列腺上皮细胞间隙增宽　B. 60 d 模型组毛细血管(CAP)周围可见淋巴细胞(L)和嗜酸性粒细胞(A),* 示间质水肿　C. 120 d 模型组前列腺间质 F 示胶原纤维,* 示间质水肿

图 2　前列腺的超微结构（scalebar=5 μm）

3　讨　论

按美国 NIH 的分型[7],最常见的 CP 是慢性非细菌性前列腺炎/慢性骨盆疼痛综合征(Chronic nonbacterial prostatitis/Chronic pelvic pain syndrome,CP/CPPS)[8],占 CP 发病率的 90% 以上[9]。

CP/CPPS 的病因与发病机理尚未阐明,早在 1979 年 Chemyshow VP[10]就提出了自身免疫反应因素参与了 CP 的发生过程,近年来免疫反应在前列腺炎发病机制中的作用日益受到重视[10]。深入研究 CP 离不开动物模型的建立,国内学者周晓辉用 wista 大鼠前列腺蛋白成功诱导自身免疫性 CP 动物模型。国内外其他学者也采用相似方法成功复制 CP 动物模型,但造模时间多在 60 d 以内[6,12-16],有关动物模型长时间造模后的病理学动态研究未见报道。CP 是一个慢性的病理过程,本研究将造模时间定为 45、60、90、120 d,旨在探讨自身免疫性 CP 大鼠模型不同的造模时段前列腺的动态病理学改变。有文献报道,Wista 老年大鼠可出现自发性 CP,SD 大鼠则无此现象报道。本研究参照周晓辉[6]造模方法,为了排除大鼠饲养期间出现自发性 CP 的可能,选取 SD 大鼠,以明确本研究复制的模型确系自身免疫性 CP 模型。

本研究结果表明:造模第 45 天开始出现淋巴细胞,造模 60 d 达到高峰,并在毛细血管周围形成了明显的血管套,这与其他研究者观察到的结果相似[6,17];进一步延长造模时间淋巴细胞开始减少甚至消失;当淋巴细胞大量出现时(即造模第 60 天)前列腺组织内出现散在的肥大细胞,造模 90 d 肥大细胞达到高峰,这与自身免疫反应过程完全吻合;120 d 后,前列腺管周间质仅能看到极少的肥大细胞和淋巴细胞;同时,管周出现纤维化表现。结果还表明,随着造模时间延长前列腺腺腔平均面积明显增大(表 1),提示管周组织纤维化导致腺腔分泌物排泄受阻,符合 CP 的病理生理表现。提示本动物模型制备方法可完整复制 CP 全部病理表现。同时,研究人员可根据本模型的不同时段用于不同时期 CP 的病理生理和临床治疗研究,以更加准确地探讨 CP 的临床表现产生的原因,为 CP 的治疗提供科学的实验室研究基础。

参　考　文　献

[1] Bergman J,Zeitlin S I.Prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J].Expert Review of Neurotherapeutics,2007,7(3):301-307.

[2] John H,Maake C,Barghorn A,et al.Immunologicalal terations in the ejaculate of chronic prostatitis patients:clues for autoimmunity[J].Andrologia,2003,35(5):294-299.

[3] Jang T L,Schaeffer A J.The role of cytokines in prostatitis[J].World JUrol,2003,21(2):95-99.

[4] Maccioni M,Rivero V E,Riera C M.Prostatein(or rat prostatic steroid binding protein)is a major autoantigen in experimental autoimmune prostatitis[J].Clin Exp Immunol,1998,112(2):159-165.

[5] Harris M T,Feldberg R S,Lan K M,et al.Expression of proin-flammatory genes during estrogen-induced inflammation of the rat[J].Prostate,2000,44(1):19-25.

[6] 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[J].中国男科学杂志,2005,11(4):290-295.

[7] Krieger J N,Nyberg L J,Nickel J C.NIH consensus definition and classification of prostatitis[J].Am Med Assoc,1999,282(3):236-237.

[8] Krieger J N,Ross S O,Riley D E.Chronic prostatitis:epidemiology and role of infection[J].Urology,2002,60(6):8-12.

[9] Pontari M A,Ruggieri M R.Mechanisms in prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J].J Urol,2004,172(3):839-845.

[10] Chemysshow V P.Lymphocyte response to phytomitogens in comparison to autoirrantme Reactions an d the state of spermatogenesis in uro(urethro)genic experimental prostatitis in dogs[J].FiziolZh,1979,25(3):286-296.

[11] Tomaskovic I,Ruzic B,Trnski D,et al.Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome in males may be an autoimmune disease,potentially responsive to corticosteroid therapy[J].Medical Hypotheses,2009,72(3):261-262.

[12] Maccioni M,Rivero V E,Riera C M.Prostatein(or rat prostatic steriod binding protein)is a major autoantigen in experimental autoimmune prostatitis[J].Clin Exp Immunol,1998,112(2):159-165.

[13] Penna G,Amuchastegui S,Cossetti C,et al.Spontaneous and prostatic steroid binding protein Peptide-induced Autoimmune prostatitis in the nonobese diabetic mouse[J].the journal of immunology,2007,179(3):1559-1567.

[14] Giuseppe P,Benedetta F,Mario M,et al.Prostate autoimmunity:from experimental models to clinical counterparts[J].Expert review of Clinical Immunology,2009,5(5):577-586.

[15] Hou Y F,DeVoss J,Dao V,et al.An aberrant prostate antigen specific immune response causes prostatitis in mice and is associated with chronic prostatitis in humans[J].Clin Invest,2009,119(7):2031-2041.

[16] Vykhovanets E V,Resmick M I,Maclennan G T,et al.Experimental rodent models of prostatitis:limitations and potential[J].Prostate Cancer and Prostatic Diseases,2007,10(1):15-29.

[17] Tomaskovic I,Ruzic B,Trnski D,et al.Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome in males may be an autoimmune disease,potentially responsive to corticosteroid therapy[J].Medical Hypotheses,2009,72(3):261-262.

（责任编辑:冉明会）