基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1654-04

SB203580 对大鼠慢性非细菌性前列腺炎作用的研究

李时军[1],崔应东[1],何 昀[2],张唯力[2]

(1. 湖北省恩施自治州中心医院(中医部)泌尿外科,恩施 445000;2. 重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinase,p38 MAPK)特异性抑制剂 SB203580 对大鼠慢性非细菌性前列腺炎(Chronic nonbacterial prostatitis,CNP)的作用,及对细胞因子肿瘤坏死因子 α(Tumor necrosis factor α,TNF-α)、基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase 9,MMP-9)、环氧合酶(Cyclooxygenase 2,COX-2)表达的影响。方法:将成年雄性 SD 大鼠随机分为 3 组,炎症组和处理组去势后每日皮下注射苯甲酸雌二醇连续 4 周,同时处理组腹腔注射 SB203580 隔日 1 次,对照组不做任何处理。HE 染色观察前列腺组织的病理学改变,免疫组化观察 TNF-α、MMP-9、COX-2、磷酸化 p38(Phosphorylation p38,p-p38)表达,Western blot 和 RT-PCR 检测各组 TNF-α、MMP-9、COX-2、p38(p-p38)的表达。结果:光镜下 SB203580 处理组较炎症组的炎症轻。p38 mRNA 的表达在 SB203580 处理组明显比炎症组低。炎症组 TNF-α、MMP-9、COX-2、p-p38 蛋白呈高表达,应用 SB203580 表达显著降低与模型组有差异,与对照组无显著差异。结论:p38 MAPK 信号转导途径在 CNP 中被激活,SB203580 能有效地抑制炎症细胞因子 TNF-α、MMP-9、COX-2 等表达的调控,缓解炎症,这为 CNP 的治疗提供了新的理论和实验依据。

【关键词】p38 MAPK;SB203580;慢性前列腺炎;细胞因子

【中国图书分类法分类号】R697.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-09

Effect of SB203580 on rat chronic nonbacterial prostatitis

LI Shi-jun, et al

(*Department of Urinary Surgery, Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of SB203580, a specific inhibitor of mitogen activated protein kinase p38, on rat chronic nonbacteral prostatitis and its effect on the expressions of TNF-α, MMP-9 and COX-2. *Methods*: Adult male SD rats were randomly divided into three groups, model and treated groups were castrated and hypodermically injected with benzestrofol for 4 weeks; treated group was also injected with SB203580 intraperitoneally every two days; then control group was set up without any treatment. H.E staining pathology of prostate gland tissue was observed under light microscope. The expressions of TNF-α, MMP-9, COX-2 and p-p38 in each group were checked by immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR respectively. *Results*: Inflammatory reaction was severer in model group than SB203580 treated group. Expression of p38 mRNA in model group was higher than those in other two groups. The protein expressions of TNF-α, MMP-9, COX-2 and p-p38 were lower in control group than those in model group. After treated with SB203580, the expressions of all the four proteins decreased significantly and could be compared to those in control group. *Conclusion*: p38 MAPK is activated in CNP. SB203580 can effectively inhibit expressions of TNF-α, MMP-9 and COX-2, and relieve inflammation, which provides an experimental evidence for new treatment of CNP.

【Key words】p38 MAPK; SB203580; Chronic nonbacterial prostatitis; Cytokine

慢性非细菌性前列腺炎(Chronic nonbacterial prostatitis,CNP)是中青年男性的常见病,目前对其发病机制还没有清楚的认识,故治疗效果不佳。Harris MT 等[1]学者在用雄激素诱导大鼠 CNP 模型中检测到白介素 1β、白介素 6、MIP、环氧合酶(Cyclooxygenase 2,COX-2)和 iNos 等细胞因子的基因表达的变化,提示 CNP 的发生与细胞因子有着密切关系。p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinase,p38 MAPK)是细胞内信号转导途径的重要组成部分,参与了多种细胞因子表达的调节,我们前期实验 CNP 大鼠模型中检测到p38MAPK 上调[2],同时伴有炎性细胞因子表达增加,本试验我们拟用 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 干预,探讨其在 CNP 的致病过程的作用以及对炎性细胞因子表达的影响。

作者介绍:李时军(1982-),男,硕士,
研究方向:前列腺疾病。

通讯作者:张唯力,男,教授,E-mail: 66zwl@sina.com。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雄性成年 SD 大鼠,清洁级,购于重庆医科大学实验动物

中心；苯甲酸雌二醇（上海通用药业 批号：061101）；SB203580（LC Laboratories S-3400，100 mg）、小鼠抗人磷酸化p38MAPK（p-p38）抗体、羊抗人肿瘤坏死因子 α（Tumor necrosis factor α，TNF-α）抗体、羊抗人基质金属蛋白酶 9（Matrix metalloproteinase 9，MMP-9）抗体、羊抗大鼠 COX-2 抗体（均为 Santa Cruz）；免疫组化试剂盒（PV-6003）、DAB 染色试剂盒、封闭用羊血清，辣根过氧化物酶（HRP）标记兔抗羊 IgG 和兔抗小鼠 IgG，（均为北京中杉金桥公司）；RIPA 裂解液（申能博彩公司）；45 nm PVDF 膜（Millipore）；Western 增强化学发光显色试剂盒（Thermo Scientific #34080）；TRIpure 总 RNA 抽提试剂盒（百泰克公司）；逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）试剂盒（TOYOBO）；p38MAPK 引物由上海生工合成；PCR 体系（东盛公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及各组实验动物的处理 成年雄性 SD 大鼠共 45 只，随机分为 3 组。对照组：不作处理，正常喂养；炎症模型组：参考魏武然的 CNP 实验动物模型建模方法[3]，用苯甲酸雌二醇诱导产生大鼠 NP；SB203580 处理组：按炎症模型组处理，同时术后 1 d 开始，腹腔注射 SB203580 1 mg/kg 隔日 1 次，连续 4 周，SB203580 由 DMSO 稀释为 100 μg/ml 使用。

1.2.2 石蜡切片 HE 染色和免疫组织化学 将各组大鼠前列腺组织取出后，10%福尔马林溶液固定 24 h，常规石蜡包埋切片，并用苏木精－伊红（HE）染色，光镜下观察大鼠的前列腺组织中腺体，导管和间质的变化。将多聚赖氨酸处理过的石蜡切片脱蜡后，3%H_2O_2 阻断，0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液作抗原热修复，5%封闭血清 37℃封闭，TBST 1:200 稀释的一抗（p-p38，TNF-α，MMP-9，COX-2）4℃过夜，二抗 37℃ 30 min，PBS 洗 5 min × 3 次；DAB 显色，苏木精复染，酒精梯度脱水，封片镜检，观察 p-p38、TNF-α、MMP-9、COX-2 表达情况。

1.2.3 前列腺组织蛋白制备 将各组前列腺组织分别剪碎每 100 mg 装入一管，每管加 1 ml RIPA 裂解液和 10 μl PMSF 裂解并离心，收集含蛋白的上清液，BCA 法蛋白定量。

1.2.4 Western blot 取上述蛋白样品各 40 μl 经 SDS-PAGE 电泳分离，电转移至 PVDF 膜，脱脂奶粉 4℃封闭过夜，TBST 1:300 稀释的一抗（37℃、2 h），TBST 1:5 000 稀释的 HRP 标记的二抗（37℃、1 h），化学发光法测定目的蛋白，GAPDH 为内参照。

1.2.5 RT-PCR 将前列腺取出，液氮中研磨成粉末状，各组织每 100 mg 装入一管，每管加入 1 ml TRIpure，按试剂盒说明操作（注：各步容器，枪头，溶液都用 DEPC 水处理，高温高压消毒）。逆转录反应（RT 参数：30℃ 10 min；42℃ 20 min，99℃ 5 min，4℃ 保存）得到 cDNA。PCR（上游引物：5'-CGAGCGATACCAGAACCT-3'，下游引物：5'-GGATTATGTCAGCCGAGTGT-3'，380 bp；PCR 参数：95℃ 5 min；95℃ 20 s，45℃ 20 s，72℃ 30 s，25 cycles；72℃ 5 min，4℃ 保存）检测p38MAPK mRNA 表达。以 β 肌动蛋白（β-actin）为内参照，上样量 10 μl，2%琼脂糖凝胶电泳，Bio-rad 凝胶成像系统扫描。

1.3 图像分析与统计学处理

Western blot 和 RT-PCR 结果图像均用 Quantity One 软件分析。SPSS 13.0 软件对结果进行统计分析，各组数据用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，各组之间比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 石蜡切片 HE 染色大鼠前列腺组织病理变化（图 1）

对照组前列腺腺腔结构完整，腺体形态排列正常，腺腔内通畅，少量正常分泌物，间质无水肿，无炎症细胞浸润。炎症组前列腺腺体结构呈现明显异常，局部组织结构遭到不同程度的破坏，部分基膜被破坏；腺上皮减少和灶性破坏，间质水肿增宽，血管扩张充血，间质炎症细胞浸润，间质中有纤维增生；腺腔扩张增大，炎性渗出较多。处理组炎症程度轻微，间质轻度水肿，腺腔扩大，腔内少量分泌物，间质内少数炎症细胞散在分布。

2.2 石蜡切片免疫组化（图 2）

p-p38、TNF-α、COX-2、MMP-9 在对照组表达均为阴性；模型组前列腺上皮细胞和间质炎症细胞有较多棕褐色颗粒沉着，为强阳性表达；处理组与模型组相比表达明显减弱，呈弱阳性（图 2）。

2.3 p38 mRNA 表达 RT-PCR 半定量结果（图 3）

前列腺组织中可检测到 p38MAPK 基因表达，炎症模型组 p38MAPK 表达明显增高，SB203580 处理组表达较模型组降低，说明 SB203580 能有效抑制前列腺中 p38 MAPK mRNA 表达。

2.4 Western blot 蛋白半定量结果（图 4，表 1）

炎症组 p-p38、TNF-α、MMP-9、COX-2 蛋白高表达，SB203580 处理组各蛋白表达明显减低。模型组分别与对照组、处理组比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。提示 SB203580 能有效抑制前列腺中 p-p38、TNF-α、MMP-9、COX-2 蛋白



对照组　　炎症组　　处理组

图 1 各组大鼠前列腺组织病理表现（HE × 100）

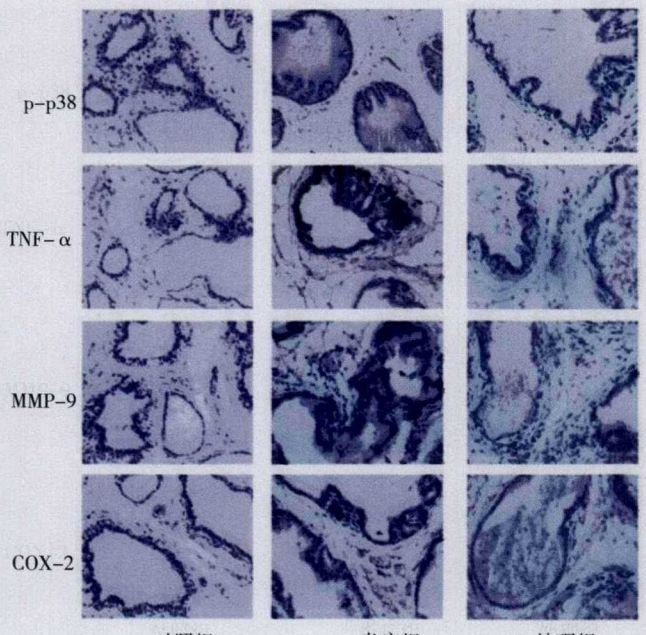


图 2　免疫组化检测 p-p38、TNF-α、MMP-9、COX-2 表达（IHC×200）

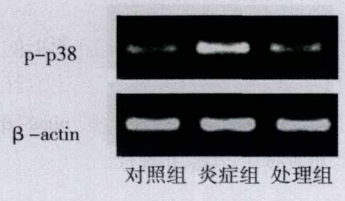


图 3　p38 mRNA 表达

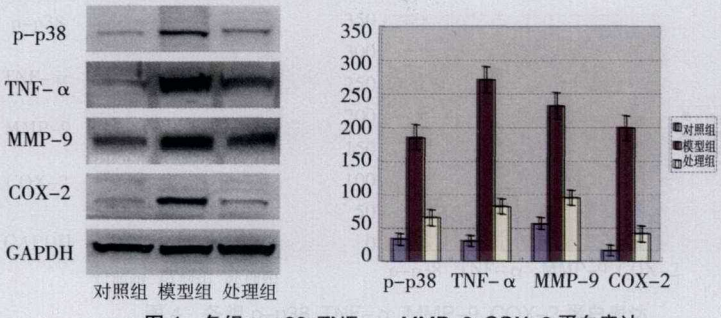


图 4　各组 p-p38、TNF-α、MMP-9、COX-2 蛋白表达

表 1　Western blot 蛋白半定量结果（OD 值）

	对照组	炎症组 *	处理组
p-p38	33.20 ± 8.28	186.0 ± 33.47	65.36 ± 9.22
TNF-α	30.34 ± 6.25	271.0 ± 36.47	82.22 ± 15.33
MMP-9	56.92 ± 7.39	232.2 ± 43.83	95.16 ± 12.13
COX-2	15.97 ± 4.81	199.2 ± 24.18	41.22 ± 7.62

*: $P<0.05$

的表达。

3　讨　论

近年来研究发现，慢性非细菌性前列腺炎的发生与发展是一个多因素共同作用的结果，而局部免疫功能异常在 CNP 的发病中可能扮演着重要的角色。炎症组织在始动因素的作用下产生前炎性细胞因子 TNF-α 和白介素 1β，它们可以通过增加趋化因子的表达，来增加局部炎症细胞的浸润，并释放更多的炎性细胞因子。各种细胞因子通过各自的机制产生不同的生物学效应而对机体组织造成损伤以及导致疼痛等。国内外为研究探寻 CNP 的病因、病理过程以及治疗手段，设计了多种建立前列腺炎模型的方法。我们采用了魏氏建模方法，在去势的 SD 大鼠皮下注射苯甲酸雌二醇，通过试验的模型组大鼠前列腺组织中可以观察到，单核巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、浆细胞、肥大细胞等多种免疫炎性细胞在 CNP 间质组织中、血管周围、上皮细胞旁的浸润，腺上皮有不同程度的破坏，腺腔内有炎性细胞和炎性渗出（图 1），这与临床慢性非细菌性前列腺炎病理变化非常相似，免疫组化还观察到炎性细胞因子 TNF-α、MMP-9、COX-2 表达明显增加（图 2），而对照组无上述变化，说明我们该模型建立成功。

丝裂原活化蛋白激酶家族中 p38 MAPK 是一类在哺乳动物细胞内具有特征的蛋白激酶，与细胞免疫应答和炎症反应调控密切相关，在单核巨噬细胞、$CD4^+$T 细胞、中性粒细胞、上皮细胞等内表达[4]，受炎症刺激时表达增加且通过特异

性的苏氨酸和酪氨酸残基磷酸化而激活为 p-p38。本实验中，炎症模型组 p38 mRNA 表达升高为对照组的 3 倍，同时 Western blot 检测 p-p38 蛋白表达在炎症模型组(186.0±33.47)也较对照组(33.20±8.28)明显增加，说明 p38 MAPK 在 CNP 中被活化。激活 p38 MAPK 可以增加白细胞向炎症部位的迁徙，而抑制它则可以减少白细胞浸润，并减轻由此引起的二次细胞损伤[5]。p38 MAPK 信号转导途径还调控着多种的细胞因子的产生，Lee[6]证实了 p38 MAPK 在介导巨噬细胞对脂多糖刺激的应答产生肿瘤坏死因子的过程中的重要作用。我们在试验中用免疫组化和 Western blot 检测到炎症组 TNF-α、COX-2、MMP-9 表达均增加。p38 可以通过增加 mRNA 的稳定性和蛋白质的生物合成来上调 TNF-α 和 COX-2[7,8]。TNF-α 是关键的前炎症细胞因子，可增加血管通透性，有炎症趋化作用，并可诱导白介素 1、白介素 6、白介素 8 等多种促炎性细胞因子生成，是炎症反应的重要环节。据研究显示，TNF-α 可刺激白细胞、内皮细胞 COX-2 mRNA 和蛋白表达增加。此外，Cho A 等[9]在研究中发现 TNF-α 还可诱导平滑肌细胞 MMP-9 表达增加，而这一过程也与 p38 MAPK 途径密切相关。

SB203580 是选择性的 p38 MAPK 抑制剂，对于 MAPK家族的 JNK/SAPK 和 Erk1/2 无显著的抑制作用。它通过抑制 p38 MAPK 而抑制后续 MAPKAP Kinase-2 和 MAPKAP Kinase-3 的激活以及一些炎症因子诱导的部分信号转导[10]。实验中我们应用 SB203580 后，p38 mRNA 表达较模型组降低。同时 p-p38、TNF-α、MMP-9、COX-2 蛋白的表达，在 SB203580 处理组较炎症组也是明显降低的。结果显示 TNF-α、MMP-9、COX-2 与 p-p38 在对照组、炎症组、处理组之间比较，有相同的变化趋势(图 4)，提示 CNP 时 p38 MAPK 途径参与了炎性细胞因子 TNF-α、MMP-9、COX-2 表达的调控。在 CNP 中 TNF-α 通过增加粒细胞在炎症部位的浸润，刺激单核细胞、血管内皮细胞产生其他细胞因子并诱导其他细胞因子的级联效应，而加剧炎症组织的损伤。炎症组织中多种炎症因子刺激白细胞释放 MMP-9 和其他一些蛋白水解酶合成释放增加，而导致局部细胞外基质和神经末梢的损伤。同时，MMP-9 降解细胞外基质使粒细胞更容易从循环中游走到间质中参与炎症应答[11]，这促进了 CNP 病情的进展，也可能是疼痛产生的一个重要机制。CNP 患者的盆骶疼痛还可能与前列腺 E2 有关，在氧化应激、炎症细胞因子等诱导下 COX-2 能够促进花生四烯酸代谢产生前列腺 E2 增加，从而加剧炎症的疼痛。在 SB203580 处理组炎症缓解，TNF-α、MMP-9、COX-2 表达减少与炎症组相比有明显差异($P<0.05$)。

本研究结果提示在 CNP 的过程中，p38 MAPK 细胞内信号转导途径被激活并参与免疫炎症反应的调控。p38 特异性抑制剂 SB203580 处理组，TNF-α、MMP-9、COX-2 蛋白表达下调，大鼠前列腺炎症轻微，提示 p38 MAPK 信号转导途径在 CNP 中通过对细胞因子表达的调控来发挥作用，可能是 CNP 发生的重要分子机制之一。SB203580 能有效地抑制 p38 MAPK 并缓解炎症，这为 CNP 的治疗提供了新理论和实验依据。

参 考 文 献

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

[2] 何 昀，张唯力，毕 杨，等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型中的表达[J].中国男科学杂志，2008，22(12)：10-14.

[3] 魏武然，张唯力，戴君勇.大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型的建立[J]. 中国男科学杂志，2006，20(1)：22-24.

[4] Hale K K, Trollinger D, Rihanek M, et al. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages[J]. J Immunol, 1999, 162(7): 4246-5422.

[5] Zhang J, Shen B, Lin A. Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway[J]. Trends Pharmacol Sci, 2007, 28(6): 286-295.

[6] Lee J C, Laydon J T, McDonnell P C, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis [J]. Nature, 1994, 372(6508): 739-746.

[7] Chen Y, Kam C S, Liu F Q, et al. LPS-induced up-regulation of TGF-{beta} receptor 1 is associated with TNF-{alpha} expression in human monocyte-derived macrophages[J]. Leukoc Biol, 2008, 83(5): 1165-1173.

[8] Valentina Ulivi, Paolo Giannoni, Chiara Gentili, et al. p38/NF-kB-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2008, 104(4): 1393-1406.

[9] Cho A, Graves J, Reidy M A. Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(12): 2527-2532.

[10] Koranteng R D, Swindle E J, Davis B J, et al. Differential regulation of mast cell cytokines by both dexamethasone and the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor SB203580[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 137(1): 81-87.

[11] Wilson M J, Woodson M, Wiehr C, et al. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of estradiol-induced nonbacterial prostatitis in the lateral prostate lobe of the Wistar rat[J]. Exp Mol Pathol, 2004, 77(1): 7-17.

(责任编辑：关蕴良)