基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0231-03

白芍总苷对慢性非细菌性前列腺炎大鼠 IFN-γ、TNF-α 和 IL-10 表达影响的实验研究

王洪志,刘朝东,韦 超
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察白芍总苷(Total glucosides of paeony,TGP)对慢性非细菌性前列腺炎(Chronic abacterial prostatitis,CAP)大鼠干扰素-γ(Interferon-γ,IFN-γ),肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α,TNF-γ)和白细胞介素-10(Interleukin-10,IL-10)表达的影响,并初步探讨其作用机制。方法:将 40 只老龄 SD 大鼠随机分为正常对照组、CAP 模型组、CAP+ TGP 低剂量治疗组、CAP+ TGP 高剂量治疗组,每组 10 只。观察大鼠前列腺病理形态学改变,免疫组化法检测 IFN-γ、TNF-α 在各组大鼠前列腺中的表达,ELISA 法定量分析各组大鼠前列腺中 IL-10 的表达。结果:(1) CAP 大鼠模型的组织病理学改变符合 CAP 的特点,治疗组炎症明显消退;(2) CAP 模型组 IFN-γ、TNF-α 和 IL-10 表达强度显著高于正常对照组;(3) TNF-α、INF-γ 和 IL-10 蛋白表达随 TGP 呈剂量相关性降低($P<0.01$);(4) 各组大鼠之间 INF-γ、TNF-α 和 IL-10 的比值有统计学意义($P<0.01$)。结论:TGP 对 CAP 大鼠具有治疗作用,其机制可能与其调节 CAP 大鼠异常的免疫功能,平衡细胞因子的产生有关。

【关键词】前列腺炎;白芍总苷;干扰素-γ;肿瘤坏死因子-α;白细胞介素-10
【中国图书分类法分类号】R697.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-01

Effects of total glucosides of paeony on the expression of IFN-γ, TNF-α and IL-10 in the rat model for chronic abacterial prostatitis

WANG Hong-zhi, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of TGP on IFN-γ, TNF-α and IL-10 in prostatic tissue of CAP rats. *Methods*: 40 aged sprague dawley rats were randomly divided into four groups: the control group(10 rats), the rat model for CAP group(10 rats), the rat model for CAP treated with low dose TGP group (10 rats) and the rat model for CAP treated with high dose TGP group (10 rats). The changes of prostate gland inflammation was investigated by HE stain. The expression of IFN-γ and TNF-α in rat prostatic tissue was detected by immunohistochemistry (sp). The expression of IL-10 in rat prostatic tissue was detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). *Results*: (1) The changes in histopathology in the animal model were similar to those in clinical CAP and the inflammation of treatment group obvious change for the better; (2) The IFN-γ, TNF-α and IL-10 in the rat model for CAP group were higher than the control group; (3) The IFN-γ, TNF-α and IL-10 expression reduces along with the TGP dosage increases in the rat model for CAP ($P<0.01$); (4) Between each group the IFN/IL-10 and TNF/IL-10 have statistics significance ($P<0.01$). *Conclusion*: TGP has therapeutic effects on CAP rats. The mechanisms may be associated with its ability to ameliorate the abnormal immunological functions and cytokine secretion in CAP rats.

【Key words】Prostatitis; TGP; IFN-γ; TNF-α; IL-10

慢性非细菌性前列腺炎(Chronic abacterial prostatitis,CAP)是泌尿外科最常见的疾病之一,对患者健康状况和生活质量有明显的影响。目前对其病因、发病机制研究显示免疫异常可能是重要因素之一。白芍总苷(Total glucosides of paeony,TGP)是从我国传统中药白芍中提取的有效成分,其药理作用具有多途径双向调节免疫反应的巨大优势,以及抗炎、止痛的作用[1,2],是治疗自身免疫病的重要组方之一。本研究旨在观察 TGP 对 CAP 模型大鼠 IFN-γ、TNF-α 和 IL-10 表达的影响,进一步探讨 TGP 对 CAP 的治疗作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

选取 12 月龄健康雄性 SD 大鼠 40 只,均购自重庆医科大学动物实验中心,体重 450~550 g,随机分为 4 组:正常对

作者介绍:王洪志(1980-),男,硕士,研究方向:慢性前列腺炎。
通讯作者:刘朝东,男,副教授,E-mail:chfliu315@163.com。

照组、CAP 模型组、CAP+TGP50 mg/kg 治疗组，CAP+TGP 150 mg/kg 治疗组，每组 10 只。

1.2 建立动物模型

采用魏氏[3]大鼠非细菌性前列腺炎建模方法构建模型，所需苯甲酸雌二醇购于上海通用药业有限公司(生产批号 070422)。

1.3 实验处理

第 31 d CAP+ TGP 低剂量治疗组给予白芍总苷胶囊(帕夫林，生产批号 071606)，购于宁波立华制药有限公司，50 mg/kg 灌胃，每日 1 次，CAP+ TGP 高剂量治疗组给予 150 mg/kg 灌胃，每日 1 次，前列腺炎模型组给予同样剂量的生理盐水灌胃，连续 30 d。末次给药后 24 h，取血后剖开下腹部，解剖摘取前列腺，将其中一叶前列腺组织 4%多聚甲醛固定以备免疫组化实验，另一叶以备 ELISA 实验。

1.4 标本检测

1.4.1 组织病理形态学 采用 HE 染色，观察前列腺形态学改变。每张切片随机选择 5 个区域，用生物显微镜(BHS 型，日本 Olympus 公司)测定炎症细胞数后取平均值。炎症分级按照慢性前列腺炎组织学分类系统进行分级[4]。

1.4.2 IFN-γ 和 TNF-α 的检测 前列腺组织 IFN-γ 和 TNF-α 蛋白表达的检测采用免疫组化链霉卵白素－过氧化酶法(北京博奥森公司 SP 即用型试剂盒)。阳性反应为胞浆及腺胞腔中出现棕黄色颗粒。免疫组化结果采用多功能彩色病理图象分析系统处理，采用 MetaMorph 图像分析软件，每张切片在高倍镜下(40×10 视野)随机选择 5 个视野，测量前列腺组织阳性呈色区域的平均积分光密度值，取 5 个视野的平均值间接作为所测指标的蛋白表达量。

1.4.3 IL-10 的检测 取一叶前列腺组织，将前列腺剪碎，按每 100 mg 前列腺组织加入 0.9%氯化钠溶液 1 ml 的比例，将 0.9%氯化钠溶液和剪碎的前列腺组织加入小烧瓶，将小烧瓶放入冰水浴中，然后用匀浆器搅拌充分制成匀浆(注意搅拌时要间断暂停，以防止匀浆过热变性)。将搅拌好的匀浆吸取加入离心试管中，3 000 r/min 离心 10 min，取匀浆上清液。采用双抗体夹心 ELISA 法定量分析各组大鼠前列腺中 IL-10 的表达，ELISA 试剂盒购于北京晶美生物工程有限公司，检测灵敏度为 30 pg/ml。用全自动酶标仪在 450 nm 处读取 A 值，绘制标准曲线，根据标本 A 值在标准曲线上获得 IL-10 的浓度。

1.5 统计学方法

全部计量数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 来表示，用 SPSS 统计软件行各组间单因素方差分析。检验水准 α 均定为 0.05。

2 结 果

2.1 病理形态学改变

CAP 模型组大鼠前列腺组织呈现明显炎性改变，炎症 3 级。TGP 低剂量治疗组腺上皮细胞增生改善，炎症明显减轻，可见腺腔增大，腺上皮细胞轻度增生，排列整齐，腔内分泌物减少，间质有少量炎症细胞散在分布，炎症 2 级。TGP 高剂量治疗组效果更加明显，炎症明显消退，炎症 1 级。

2.2 IFN-γ 和 TNF-α 免疫组化表达结果

观察免疫组织化学染色结果显示，IFN-γ 和 TNF-α 在前列腺组织中分布基本相同，在 CAP 模型中呈强阳性表达，在低剂量治疗组中阳性表达区域较之减少，高剂量治疗组中的阳性表达区域更为减少。统计结果显示各组之间有显著性差异，具体结果见表 1，图 1、2。

2.3 IL-10 ELISA 表达结果

ELISA 检测结果显示在 CAP 模型中 IL-10 蛋白表达明显高于其他组。统计结果显示各组之间有显著性差异，具体结果见表 1。

2.4 各组大鼠 IFN-γ、TNF-α 与 IL-10 比值

统计结果显示各组之间有显著性差异，具体结果见表 2。

3 讨 论

本文采用去势和注射雌激素苯甲酸雌二醇的方法构建 CAP 大鼠模型，魏武然[3]研究表明模型组大鼠前列腺组织病理组织学基本符合人类 CAP 的特点，本实验对模型组大鼠组织病理学和几种炎性介质的观察也支持这一点。

从动物实验和临床研究表明，免疫异常在慢性前列腺炎的发病中具有重要作用，国内外学者进行免疫治疗探索并取

表 1 大鼠前列腺 IFN-γ 和 TNF-α 与 IL-10 的含量分析结果(pg/ml)

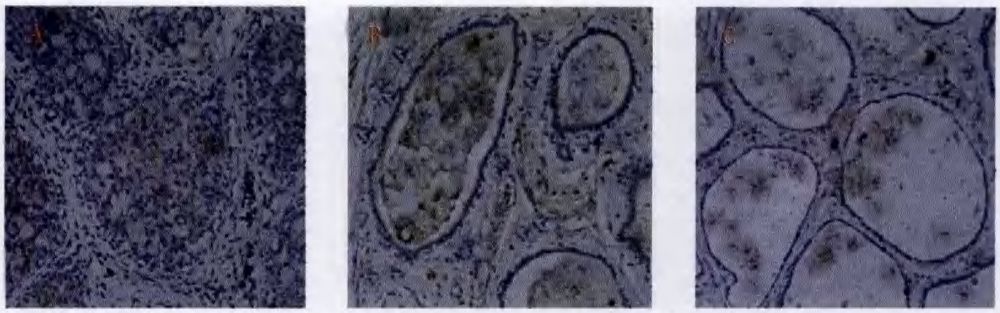
组别	IFN-γ	TNF-α	IL-10
CAP 模型组	0.372 ± 0.041	0.328 ± 0.035	330.14 ± 31.48
CAP+TGP 50 mg/kg 组	0.188 ± 0.021*	0.169 ± 0.017*	150.75 ± 18.36*
CAP+TGP150 mg/kg 组	0.082 ± 0.008▲	0.073 ± 0.006▲	50.29 ± 5.38▲

与 CAP 模型组相比，*P<0.01；与 CAP+ TGP 50 mg/kg 组相比，▲P<0.01

表 2 各组大鼠 IFN-γ，TNF-α 与 IL-10 比值

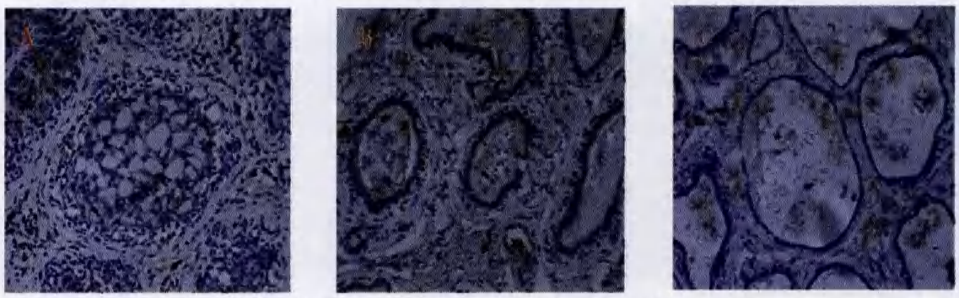
组别	IFN / IL-10	TNF / IL-10
CAP 模型组	0.001 15 ± 0.000 17	0.001 10 ± 0.000 14
CAP+TGP 50 mg/kg 组	0.000 86 ± 0.000 11*	0.000 82 ± 0.000 10*
CAP+TGP150 mg/kg 组	0.000 75 ± 0.000 09▲	0.000 71 ± 0.000 08▲

与 CAP 模型组相比，*P<0.01；与 CAP+ TGP 50 mg/kg 组相比，▲P<0.01



A. CAP 模型组；B.CAP+TGP 50 mg/kg 组；C.CAP+TGP150 mg/kg 组

图 1 各组大鼠前列腺中 IFN-γ 表达（SP×400）



A.CAP 模型组；B. CAP+TGP 50 mg/kg 组；C.CAP+TGP150 mg/kg 组

图 2 各组大鼠前列腺中 TNF-α 表达（SP×400）

得了一定的疗效。国外学者 Dimitrakov JD 采用免疫抑制剂骁悉单剂对 200 例 CAP 患者进行治疗，结果治疗组 85%的患者疼痛明显减轻，治疗后炎性细胞因子 IL-1β、IL-6 也显著下降。国内杨镒缸等用非甾体免疫抑制类药物雷公藤多甙对 CAP 大鼠灌胃 1 周，病理组织学示治疗组大鼠前列腺炎症明显好转，并且治疗组细胞间粘附分子 -1、炎性细胞因子 TNF-a 蛋白表达显著下降[5,6]。

白芍总苷是从传统中药白芍中提取的有效成分。现代药理研究表明，TGP 具有多途径双向调节自身免疫反应，抑制单核巨噬细胞产生和分泌 TNF-α 和 IL-1，以及抗炎、止痛、抗应激等作用，近年来在临床上已广泛应用于多种免疫性疾病的治疗，有较好的疗效，且不良反应少[7]。

本实验观察组织病理学证实治疗组大鼠前列腺炎症得到改善，TGP 对 CAP 有治疗作用，同时发现 TGP 明显降低 IFN-γ、TNF-α 与 IL-10 的过高表达并且呈现剂量相关性，提示 TGP 对 CAP 有明显的治疗作用可能与调节 CAP 大鼠免疫反应，平衡细胞因子的产生有明显关系。

IFN-γ 是一种强有力的促炎性因子，有着广泛地免疫调节作用，可以活化巨噬细胞促其释放过氧化氢、产生 iNOS，促进 NO 的合成，导致内皮细胞炎性损伤，促进炎症的形成。IFN-γ 主要由活化的 T 细胞产生，研究表明 TGP 体外给药对自身免疫导致大鼠异常增高的 T 淋巴细胞增殖反应有抑制作用[1]，这可能与高浓度 TGP 负调节脾细胞 ConA 增殖反应并促进巨噬细胞产生一氧化氮和 PGE 有关[8]。在体内实验亦研究发现，腹腔注射白芍总苷可使异常增强的小鼠细胞免疫恢复正常[9]。

TNF-α 能活化单核巨噬细胞，提高其杀伤活性，刺激内皮细胞产生多种粘附分子如 ICAM-1，促进中性粒细胞、淋巴细胞粘附到内皮细胞上，还诱导血管内皮细胞产生炎症介质，引起局部的炎症反应。TNF-α 是来源于单核巨噬细胞的促炎性细胞因子，研究发现白芍总苷以 12.5～250 mg/L 的浓度加入大鼠腹腔单核细胞的培养体系，TNF-α 的活性随白芍总苷的浓度增加而降低，而前列腺素 E_2（PGE_2）的浓度随白芍总苷浓度的升高而上升，提示白芍总苷对 TNF-α 的下调作用，可能与 PGE_2 有关。进一步的研究发现高浓度 PGE_2 可能通过阻断单核巨噬细胞 TNF-α mRNA 的转录而抑制 TNF-α 的产生[10]。研究证实，核转录因子 NF-K B（NF-κ B）的活化在炎症过程中扮演了关键性角色，其活化后可启动 TNF-α 等多种促炎症基因的转录[11]，研究发现 TGP 可抑制巨噬细胞 NF-κ B 的活化，其主要机制与 TGP 抑 NF-κ B 与 DNA 的结合活性密切相关[12]。

IL-10 又称为细胞因子合成抑制因子，主要由Ⅱ类辅助性 T 淋巴细胞（Th2）产生，是人类免疫反应过程中最重要的抗炎性细胞因子，它能够抑制 T 细胞的增殖、Th1 细胞产生多种炎症因子和介质，减弱炎性反应，限制炎症的发展。促炎性细胞因子与抑炎性细胞因子之间的平衡是维持正常免疫状态的基础。Th1和 Th2 细胞通过分泌不同的细胞因子相互拮抗来达到 Th1/Th2 细胞的平衡从而使自身免疫处于平衡状态。当体内 Th1细胞分泌的 IFN-γ、TNF-α 等促炎性细胞因子异常增高时，Th2 会分泌大量的 IL-10 阻止幼稚 T 细胞发展成 Th1细胞从而阻止 IFN-γ、TNF-α 等促炎性细胞因子的产生。

目前认为，Th1/Th2 细胞的平衡是维持正常免疫功能的重要因素，主要分泌促炎性细胞因子的 Th1与主要分泌抑炎性细胞因子的 Th2 失平衡将导致异常的免疫反应。本研究以促炎性细胞因子/抑炎性细胞因子的比值间接反应 Th1/Th2

临床研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0234-04

肝硬化食管静脉曲张套扎术前后降钙素基因相关肽及内皮素水平的观察

薛林云,何 松,梅浙川
(重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究肝硬化合并食管静脉曲张患者套扎前后血浆降钙素基因相关肽(Calcitonin gene related peptide, CGRP)及内皮素(Endothelin-1, ET-1)水平的变化,寻找判断食管静脉曲张套扎术后疗效的简易指标。方法:采用酶联免疫分析法测定 40 例肝硬化(Liver cirrhosis, LC)合并食管静脉曲张(Esophageal varices, EV)患者行食管静脉曲张套扎术(Endoscopic variceal ligation, EVL)前后空腹血浆 CGRP 及 ET-1 水平。结果:食管静脉曲张套扎前后 CGRP 及 ET-1 水平均明显高于正常值,具有显著性意义($P<0.01$)。套扎术后 CGRP 水平显著高于套扎前,具有显著性意义($P<0.05$)。部分病例行两次套扎,再次套扎前 CGRP 水平较上次套扎前后均明显降低,差异有显著性意义($P<0.05$)。套扎后 ET-1 水平较套扎前有所降低,但差异无显著意义。结论:CGRP 及 ET-1 升高在肝硬化门脉高压中起重要作用。套扎后 CGRP 水平变化情况与临床上套扎后发生上消化道出血的危险性变化相一致,因此 CGRP 水平可能与出血危险性有相关性。食管静脉曲张套扎术可降低侧枝循环压力,减轻食管静脉曲张程度,改善高动力循环状态。

【关键词】降钙素基因相关肽;内皮素;肝硬化;门静脉高压;食管静脉曲张套扎;酶联法
【中国图书分类法分类号】R571+.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-20

作者介绍:薛林云(1982-),女,硕士,
研究方向:门脉高压的临床治疗。
通讯作者:何 松,男,教授,E-mail:hedoctor65@sina.com。

的比势,来进一步分析 Th1/Th2 的平衡对前列腺炎的影响,结果显示,在 CAP 模型组 Th1/Th2 明显高于治疗组,说明 Th1/Th2 平衡的失调与慢性前列腺炎的发生有一定关系。经过白芍总苷治疗后,发现其有效降低 IFN-γ、TNF-α 和 IL-10 的过高表达,同时 IFN-γ、TNF-α 与 IL-10 的比值也有明显的降低,间接发现 Th1/Th2 比势的下调($P<0.01$),Th1/Th2 的平衡得到有效调节。

综上所述,病理组织学证实治疗组 CAP 大鼠前列腺炎性损伤得到缓解,IFN-γ、TNF-α 与 IL-10 的过高表达得到下调,说明白芍总苷对 CAP 大鼠有明显的治疗作用。TGP 对 CAP 大鼠的治疗作用,可能与其调节机体异常增强的免疫功能、平衡 Th1 细胞与 Th2 细胞比值、调控细胞因子的产生及作用有关,为白芍总苷的临床治疗或辅助治疗 CAP 提供了新的实验理论依据。

参 考 文 献

[1] 朱 蕾, 魏 伟. 白芍总苷对大鼠胶原性关节炎及其免疫功能的影响[J].中国药学杂志,2007,20(42):1547-1550.
[2] 张鸿炼,吴文蔚.白芍总甙的药理作用与临床应用[J].中国医院药学杂志,1995,15(8):371.
[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] 郭应禄,李宏军.前列腺炎[M].北京:人民军医出版社,2006.204-205.
[5] Dimitrakov J D,Dikov D Y,Lagny-sur-marine C.Mycophenolate mofetil in the treatment of CPPS.Adouble-blind placebo-controlled study [J].J Urol, 2003,(s1):112-115.
[6] 杨镒缸,张唯力,欧阳洁.雷公藤多甙对慢性非细菌性前列腺炎大鼠 ICAM-1、TNF-a 表达的影响[J]. Chinese Journal of Andrology, 2007,21(4): 24-27.
[7] 赵福涛,丁元晶.白芍总苷在风湿免疫性疾病中的应用进展[J].中国医院药学杂志,2006,26(12):1546-1548.
[8] 王 斌,陈敏珠,徐叔云.TGP 对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞功能和脾细胞增殖反应的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,1994,8(2):129-131.
[9] 王兴旺,陈敏珠,徐叔云.白芍总甙对 T 淋巴细胞亚群的作用[J].中国药理学通报,1992,8(5):340.
[10] 王 斌,陈敏珠,徐叔云.白芍总甙对大鼠腹腔巨噬细胞产生肿瘤坏死因子的影响[J].中国药理学通报,1997,13(3):255-257.
[11] Makarov S S.NF-κB in rheumatoid arthritis:a pivotal reS,lator of inflammation,hyperplasia,and tissue destruction[J].Arthritis Res,2001,3(4):200.
[12] 陈 刚,邓小红,郭莉霞,等.白芍总苷对巨噬细胞核转录因子-κB 活化的影响及其机制研究[J]. 中国中药杂志,2008,6(33):669-672.

(责任编辑:冉明会)