

慢性前列腺炎动物模型制备规范(草案)

中华中医药学会 中药实验药理专业委员会

[摘要] 慢性前列腺炎是中老年男性的常见多发病证,现慢性前列腺炎动物模型主要是病理模型,且以西医的诊断指标为主,兼顾中医证型特点。在基于对慢性前列腺炎中西医临床病证特点分析的基础上,经大量动物实验验证,形成了慢性前列腺炎动物模型规范(草案)。

[关键词] 慢性前列腺炎;动物模型;规范;草案;雌激素

[中图分类号] R24;R22;TU202;R285;R697+.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0010-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20183002

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171230.1112.010.html>

[网络出版时间] 2018-01-05 9:32

Specifications for Preparation of Chronic Prostatitis Animal Models (Draft)

Traditional Chinese Medicine Experimental Pharmacology Professional Committee,
China Association of Chinese Medicine

[Abstract] Chronic prostatitis is a common multiple disease syndrome in medium-elderly men, and the animal models of chronic prostatitis are mainly the pathological models, which are mainly characterized by the diagnosis index of western medicine and the characteristics of traditional Chinese medicine syndrome. Based on the analysis of the characteristics of clinical symptoms of chronic prostatitis and a large number of animal experiments, this article forms the following specifications (draft) for the preparation of chronic prostatitis models (draft).

[Key words] chronic prostatitis; animal models; specification; draft; estrogen

1 造模动物

可用于制备慢性前列腺炎模型的动物有小鼠、大鼠、犬等,常采用雄性大鼠、小鼠制备慢性前列腺炎模型。

2 造模方法

目前慢性前列腺炎的病因病机尚无定论,主要有神经内分泌学说、免疫学说等。基于各学说,建立相应体现中西医诊断特点的动物模型。

2.1 免疫性慢性前列腺炎模型

2.1.1 雌激素诱导去势大(小)鼠制备慢性前列腺炎模型 原理为大剂量雌激素可致诱导型一氧化氮合酶(iNOS)增高,引起前列腺组织局部免疫机能亢进,造成前列腺组织细胞的损伤,形成慢性前列腺

炎。操作方法为大鼠,体质量280~320g,小鼠,体质量20~23g。腹腔注射10%水合氯醛(大鼠、小鼠剂量均为 $0.003\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$),麻醉后皮肤消毒,腹部开口,摘除双侧睾丸,残端处结扎、缝合。术后每天肌肉注射青霉素(剂量 $25\text{ 万 U}\cdot\text{kg}^{-1}$,大鼠每只注射0.1 mL,小鼠每只0.02 mL),连续3 d,以防感染。大(小)鼠摘除双侧睾丸后第1天,每日按剂量 $0.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 皮下注射雌二醇(溶于橄榄油中),每天1次,连续给药30 d。第31天,可制备大(小)鼠慢性前列腺炎模型。该模型维持不少于30 d。

2.1.2 纯化前列腺蛋白刺激制备大(小)鼠慢性前列腺炎模型 原理为同系雄性附性腺匀浆液可诱发大(小)鼠自身免疫反应,选择性地诱导细胞免疫及

[收稿日期] 20171020(010)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI53B09);国家中医药管理局中医药标准化专项(2017-149-11);国家自然科学基金项目(81173474)

前列腺间隙单个核细胞浸润,形成慢性前列腺炎。操作方法为大鼠,体质量280~320 g,小鼠,体质量20~23 g。将纯化的大鼠前列腺蛋白配成 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗原液,给大(小)鼠多点皮下注射(可选背部4点皮下注射),每天1 mL(小鼠0.5 mL),辅以大(小)鼠腹腔注射百白破疫苗0.5 mL(小鼠0.1 mL),连续45 d。第46天,可制备大(小)鼠慢性前列腺炎模型。该模型维持不少于30 d。

纯化前列腺蛋白及抗原液制备方法为取预备好的雄性大鼠,局部皮肤消毒,下腹正中切口,剪开大鼠腹部皮肤和肌肉,剥离前列腺组织,用生理盐水洗净,待用。将前列腺组织剪碎,加入生理盐水(预先高温灭菌)制成匀浆。将匀浆液置入高速离心机中以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min,取上清液,利用UV测定上清液中蛋白含量,加入生理盐水将蛋白质质量浓度稀释至 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按1:1的比例加入弗氏完全佐剂稀释前列腺蛋白,乳化至滴一小滴至水面上保持圆珠状而不散开为止。

2.2 前列腺注射消痔灵或角叉菜胶制备大鼠慢性前列腺炎模型

2.2.1 原理 角叉菜胶或消痔灵均为致炎剂,局部注射均可诱发前列腺炎性细胞浸润、腺腔梗阻及纤维增生性改变,形成慢性前列腺炎。

2.2.2 方法 大鼠,体质量280~320 g,按剂量 $0.003\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 腹腔注射10%水合氯醛,待大鼠麻醉后于无菌条件下在下腹正中切口,暴露膀胱背侧前列腺,将25%消痔灵注射液按0.2 mL/只注入大鼠前列腺两背侧叶(或1%角叉菜胶生理盐水溶液按0.1 mL/只注入精液囊内),然后缝合肌肉皮肤。术后肌肉按剂量 $25\text{ 万 U}\cdot\text{kg}^{-1}$ 注射青霉素,每天1次,连续3 d,预防感染。第21天可制备大鼠慢性前列腺炎模型。该模型可维持不少于30 d。

2.3 自发性犬慢性前列腺炎模型

2.3.1 原理 犬的前列腺解剖学特点同人类相似,且存在自发性前列腺炎现象。

2.3.2 方法 老龄犬(年龄7~15年),通过前列腺按摩液检测白细胞以及卵磷脂小体分布情况,筛选出已有前列腺炎特点的犬作为慢性前列腺炎模

型。该模型可一直存在。

3 模型指标

3.1 病理学指标 慢性前列腺炎最直接的指标是前列腺组织形态出现明显炎症,光镜下可见前列腺被膜增厚,腔内皱襞消失,腺泡被破坏,间质明显肿胀、模糊,有大量淋巴细胞、单核细胞浸润及浆细胞分布;前列腺纵隔内平滑肌细胞和结缔组织大量增生,可见血管扩张及充血现象。病理指标在慢性前列腺炎模型的确证中具有重要地位,权重系数选择0.4。

3.2 生化指标 慢性前列腺炎的直接指标就是前列腺液或其匀浆液中白细胞明显升高,卵磷脂小体分布明显减少。模型制备成功后,前列腺匀浆液中免疫球蛋白G(IgG),IgA,IgM,特异性IgA(sIgA)水平升高;去甲肾上腺素(NE),前列腺素(PG),组胺,5-羟色胺(5-HT),神经生长因子(NGF),白细胞介素-6(IL-6),IL-8,IL-10,IL- 1β ,肿瘤坏死因子(TNF)- α ,干扰素(IFN)及炎症因子花生四烯酸水平平均升高。血清或前列腺组织匀浆液中睾酮(T)水平降低、雌二醇(E_2)水平升高,血清中特异性抗原(PSA)和C反应蛋白升高。生化指标在慢性前列腺炎的临床诊断中占有重要地位,也是慢性前列腺炎模型制备是否成功的直接相关指标,权重系数选择0.3。

3.3 表观指标、尿流动力学指标 慢性前列腺炎模型成功后,表观指标可见前列腺指数增加,排尿量、饮水量减少,开场活动减少等。采用膀胱造瘘方法,测定尿动力情况,模型成功后可见最大排尿压、排尿间隔、膀胱静止压明显提高等。表观指标、尿流动力学指标是慢性前列腺炎的重要判定依据,是直接相关指标,权重系数选择0.3。

4 备注

本规范(草案)介绍的是与中西医临床病症特点吻合度较高的前列腺炎模型,还有一些其他的慢性前列腺炎模型,如大肠埃希菌致慢性细菌性前列腺炎模型,因其与临床病症特点吻合度低,故未纳入本制备规范(草案)。

慢性前列腺炎动物模型制备规范(草案)起草说明

1 造模动物^[1-2]

目前应于制备慢性前列腺炎模型的动物有犬、

小鼠、大鼠等。自发性前列腺炎犬价格昂贵且难获得,应用较少。现多选大鼠、小鼠作为造模动物。由

于 Wistar 大鼠品种经过纯化蛋白刺激患前列腺炎的概率更大,因而纯化大鼠蛋白免疫刺激法多选取 Wistar 大鼠。

2 饲养环境^[3-6]

大(小)鼠的饲养条件全部使用独立通风笼具(IVC),每笼饲养密度严格按照《实验动物国家标准》《关于善待实验动物的指导性意见》《实验动物管理条例》,GB 14925-2010《实验动物环境及设施》《中华人民共和国动物保护法》的要求,屏障环境温度的要求是 20~26℃,湿度 40%~70%,实验动物垫料选用锯末、刨花等,保证干燥、清洁、定期更换等。实验动物的饮水应当符合城市生活饮用水的卫生标准,适宜的住所环境、运动时间自由,食物、水及适合于健康与福利的照料,保证所有实验动物都能享受各种权益。

3 造模原理及评价依据

目前慢性前列腺炎的病因病机尚无定论,主要学说有神经内分泌学说、免疫学说等。西医临床诊断标准依据的是 2006 年版《前列腺炎诊断治疗指南》,具体为①排尿次数增多,排尿间隔缩短,饮水量升高;②前列腺液常规检查主要采用镜检涂片计数的方式,当白细胞计数>10个/HP时,卵磷脂小体分布减少;③血清及前列腺按摩液中 IgG 和 IgA 含量升高;④免疫学检测患者细胞因子水平中 IL-1 β ,IL-10 及 TNF 含量升高;⑤前列腺组织中炎症细胞浸润明显;⑥患者表现出明显的焦虑,抑郁心理。参照《中国慢性前列腺炎中西医结合诊疗指南(试行版)》,慢性前列腺炎有气滞血瘀证、湿热下注证、肾阳亏虚证、肝气郁结证 4 种证型,其中代表性的有以下 2 种:湿热下注证主证为①小便灼热,涩痛;②尿频,尿急;次证为①尿黄短赤,尿后滴沥;②小便白浊,阴囊潮湿;③心烦,口干,口臭。肾阳亏虚证主证为①畏寒怕冷;②腰膝酸软或酸痛;次证为①尿后滴沥;②精神萎靡;③阳痿或性欲低下。

3.1 免疫性慢性前列腺炎模型

3.1.1 雌激素诱导去势大(小)鼠制备慢性前列腺炎模型^[7-8] 大剂量雌激素可以使前列腺组织局部的 NO 含量升高,从而引起了前列腺局部组织免疫机能的明显亢进,会造成局部前列腺细胞的损伤,从而引发慢性前列腺炎。另一方面,iNOs 能造成前列腺组织细胞损伤的作用。与临床指标吻合情况为符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 90\%$;符合中医指标的肾阳亏虚证主证①②,次证①②③,吻合度 $\geq 90\%$ 。应注意手术后感染。雌雄激素配比是该模型

成功的重点。

3.1.2 纯化前列腺蛋白刺激制备大(小)鼠慢性前列腺炎模型^[9] 通过同系雄性附性腺匀浆液来刺激造模动物前列腺组织,从而产生免疫性炎症,有选择性地诱导细胞免疫及前列腺间隙单个核细胞浸润,从而制备慢性前列腺炎动物模型。诱发自身免疫反应,与临床指标吻合情况为符合西医指标①②③④⑤,吻合度 $\geq 80\%$;符合中医指标的湿热下注证主证①②,次证①②,吻合度 $\geq 80\%$ 。注意事项为纯化前列腺蛋白的制备是模型成功的关键。

3.2 前列腺注射消痔灵(角夹菜胶)制备大鼠慢性前列腺炎模型^[10-11] 角叉菜胶或消痔灵均为致炎剂,局部注射均可以诱发前列腺炎症细胞浸润、腺腔梗阻及纤维增生性改变。前列腺背叶体积较腹叶小,因管腔狭小,腺液引流不畅,制作模型时较易形成炎症及纤维增生性改变。与临床指标吻合情况为符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度 $\geq 90\%$;符合中医指标的湿热下注证主证①②,次证①②,吻合度 $\geq 80\%$ 。注意事项为前列腺腹叶不宜作为注射部位,多选背叶注射造模。

3.3 自发性犬慢性前列腺炎模型^[12] 犬的前列腺解剖学特点同人类相似,且存在自发性前列腺炎现象。与临床指标吻合情况为符合西医指标①②③④⑤⑥,吻合度为 $\geq 90\%$;符合中医指标的肾阳亏虚证主证①②,次证①②③,吻合度 $\geq 90\%$ 。注意犬的年龄应一致,这是模型一致的基础。

4 观测指标

4.1 病理学指标——I类指标(核心指标) 慢性前列腺炎最直接的指标是前列腺组织形态出现明显炎症,病理学观察可以准确确证前列腺炎的轻重,光学显微镜观察动物前列腺组织是否有炎症细胞浸润以及炎症细胞浸润的程度,是否有组织水肿、腺上皮坏死和剥落及腺上皮消失。慢性前列腺炎动物模型前列腺组织病理变化分级参考标准^[13]为“-”表示前列腺腺体多数处于静止状态,腺体缩小,腺上皮皱折排列,腺腔内无分泌物,腺腔明显较小;“+”表示前列腺大部分腺体处于扩张状态,腺腔内有分泌物,但分泌物较少,周围可见少量的炎症细胞;“++”表示前列腺腺体处于明显扩张状态,腺上皮变薄呈扁平状,腺腔内充满着红色的分泌物;“+++”表示前列腺腺体处于显著扩张状态,腺体增大 1~3 倍,腺上皮呈扁平状,腺腔内充满着大量红色分泌物,腺腔明显扩张,周围可见散在炎症细胞。病理指标可以直接反映慢性前列腺炎的病变特点,是判断慢性前列

腺炎模型是否成功的核心指标,权重系数选择0.4。

4.2 生化指标——Ⅱ类指标(直接相关指标) 慢性前列腺炎的直接指标就是前列腺液或其匀浆液中白细胞明显升高,卵磷脂小体分布明显减少^[14-15]。基于前列腺炎免疫因素,常检测动物前列腺匀浆液中IgG, IgA, IgM和sIgA水平,模型成功时,明显增高。基于神经内分泌学说,前列腺炎产生疼痛,前列腺液过度分泌。前列腺匀浆液中NE, PG, 组胺, 5-HT和NGF水平增加, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β 水平升高, TNF- α 水平升高, IFN和炎症因子花生四烯酸含量升高。基于免疫性学说,模型复制成功时,血清或前列腺组织匀浆液中T水平降低, E₂水平升高,血清中PSA增高, C反应蛋白含量也急剧升高。生化指标可以反映慢性前列腺炎的发生、发展及康复过程,是直接相关的指标,权重系数为0.3。

4.3 表观指标、尿流动力学指标——Ⅲ类指标(直接相关指标) 表观指标包括动物前列腺指数, 排尿量、饮水量, 开场活动等。模型制备成功后,可见前列腺湿重及前列腺指数增加、排尿量减少、饮水量减少、开场活动减少、毛发光泽度降低等。前列腺炎可引起尿流动力学的改变,前列腺炎动物膀胱压、排尿间隔、最大排尿压等尿流动力学指标可直接反映前列腺炎的情况,模型制备成功后,最大排尿压、排尿间隔、膀胱静止压明显提高。表观指标是慢性前列腺炎的直接反映,为直接相关指标,权重系数为0.3。

4.4 指标分类 慢性前列腺炎动物模型Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ类指标按整体为1进行各自的量化积分,同一类指标如生化指标是由IgG, IgA, IL-6, IL-8^[16]和TNF- α ^[17]等多项指标组成,均按同一贡献度计算;如观察的生化指标有5项,积分时各项小指标权重均为0.2,即该指标最高分值为0.2。如具体每一类指标中有特殊重要的指标,可对同一类指标中的小指标进行不同的权重分级。所有指标的量化均按此方法计算。

计算出慢性前列腺炎动物模型各类指标各自的总积分,乘以相应的权重,然后再将三类指标积分相加,即可计算出慢性前列腺炎动物模型制备后的总积分。按上述计算方法,雌激素诱导去势致大(小)鼠慢性前列腺炎模型总积分约0.925,纯化前列腺蛋白刺激法致大(小)鼠慢性前列腺炎模型总积分约0.85,前列腺注射消痔灵或角夹菜胶致大鼠慢性前列腺炎模型总积分约0.895,自发性犬慢性前列腺炎模型总积分约0.9。慢性前列腺炎动物模

型成功率相对较高,为保证每次所造慢性前列腺炎动物模型的基本一致,建议总积分可以有20%左右的偏差,所得总积分>0.7即可认为该模型制备成功。本草案所采用的计算方法及所得总积分仅供参考,研究者可根据需求的不同另行调整^[18]。

4.5 说明 本规范(草案)提示的该类指标在慢性前列腺炎动物模型中的重要性,不是绝对的。研究者可根据具体研究情况进行调整。因为在不同动物模型制备过程中所采用的标准不一致,表观指标、病理指标的分类也会有所差异;同时,所列生化指标未能涵盖慢性前列腺炎相关的所有指标。研究者应根据具体慢性前列腺炎实验研究的特点,尽量将定性描述转变成定量或半定量指标,以提高判定的可控性;所列的具体指标及其分类等仅供参考,研究者可根据需要,对其进行增减,或另行设定。

[起草人] 苗明三, 田硕, 王坦, 苗艳艳

[参考文献]

- [1] 张建军,杨琦,王淳,等.分清肾茶片对角叉菜胶致大鼠前列腺炎的治疗作用及对肿瘤坏死因子- α 、前列腺素E₂的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(10):2909-2913.
- [2] 张良,程丽艳,史红.槲皮素对自身免疫性前列腺炎模型COX-2及5-LOX表达的影响[J].中华中医药学刊,2014,32(3):600-602.
- [3] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会.白癜风动物模型制备规范(草案)[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(24):1-5.
- [4] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会.乳腺增生动物模型制备规范(草案)[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(24):17-22.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.实验动物环境及设施:GB 14925-2010[S].北京:中国标准出版社,2010:1-24.
- [6] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会.湿疹动物模型制备规范(草案)[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(24):6-10.
- [7] 黄建波,张光霁,楼招欢,等.补中益气汤加味对慢性非细菌性前列腺炎大鼠的治疗作用[J].中华中医药杂志,2015,30(6):2038-2040.
- [8] 王晶,梁朝朝,樊松,等.逼尿肌相关蛋白在慢性前列腺炎大鼠模型中的表达及意义[J].安徽医科大学学报,2015,50(8):1072-1076.
- [9] 李天赋,吴秋月,李卫巍,等.复方玄驹胶囊治疗自身免疫性前列腺炎大鼠的实验研究[J].中国男科学杂志,2014,20(5):442-447.

- [10] 曾瑾,赵军宁,邓治文,等.复方金钱草胶囊对消痔灵致大鼠慢性前列腺炎的影响[J].中药药理与临床,2012,28(5):161-163.
- [11] 樊千,李明,周玉春,等.“瘀热”型慢性前列腺炎大鼠模型的两种造模方法比较研究[J].江苏中医药,2015,47(3):77-79.
- [12] 李明,薛建国.Ⅲ型前列腺炎动物造模评析[J].河南中医,2014,34(12):2500-2501.
- [13] 张子梅,苗明三,张玉林.水蔓菁总黄酮对大鼠炎症性前列腺组织形态和超微结构的影响[J].现代预防医学,2009,36(16):3116-3118.
- [14] 陈志强,何羿婷,陈更新,等.前列清颗粒对大鼠慢性非细菌性前列腺炎的作用[J].中药新药与临床药理,2012,23(2):128-131.
- [15] 王琳琳,李寒冰,苗明三.马鞭草总苷对大鼠慢性非细菌性前列腺炎的干预作用[J].中国医药导报,2016,13(16):4-7.
- [16] 张子梅,苗明三,张玉林.水蔓菁总黄酮对大鼠前列腺炎模型的影响[J].中国医院药学杂志,2009,29(16):1358-1361.
- [17] 邹如政,曹继刚,冯秋珍,等.前列安丸对慢性非细菌性前列腺炎大鼠前列腺组织 IL-1 β 、IL-10 及 TNF- α 的影响[J].中国中西医结合杂志,2015,35(10):1223-1227.
- [18] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会.烧(烫)伤动物模型制备规范(草案)[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(24):11-16.

[责任编辑 刘德文]