

当归贝母苦参煎剂对实验性慢性细菌性前列腺炎大鼠前列腺 TNF- α 的影响

何丽清^{1*}, 傅延龄², 马艳红², 曹峰², 刘小河²

(1. 山西中医学院基础部伤寒教研室, 太原 030024; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 观察当归贝母苦参煎剂对慢性细菌性前列腺炎(CBP)大鼠前列腺组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的免疫组化和 mRNA 表达的影响, 探讨其可能的作用机制。方法: 雄性 SD 大鼠 60 只, 随机分为空白对照组、模型组、诺氟沙星组、当归贝母苦参煎剂高、中、低剂量组 6 组, 每组 10 只, 前列腺背叶注射大肠埃希菌制备 CBP 动物模型。当归贝母苦参煎剂高、中、低剂量分别为 11.67, 5.83, 2.92 g·kg⁻¹, 诺氟沙星剂量为 9.3 × 10⁻² g·kg⁻¹。术后第 15 天起用药, 连续 4 周。用免疫组化法观测大鼠前列腺组织中的 TNF- α 表达, 用 RT-PCR 法测大鼠前列腺组织 TNF- α mRNA 的表达。结果: 与模型组比较, 当归贝母苦参煎剂各剂量组 TNF- α 免疫组化阳性表达和 mRNA 基因表达均明显降低($P < 0.01$), 其中高剂量组最低。结论: 当归贝母苦参煎剂治疗慢性细菌性前列腺炎的作用机制可能与减少 TNF- α 的产生有关。

[关键词] 当归贝母苦参煎剂; 慢性细菌性前列腺炎; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0212-03

The Effects of Danggui Beimu Kushen Decoction on TNF- α in Prostates in Rats with Chronic Bacterial Prostatitis

HE Li-qing^{1*}, FU Yan-ling², MA Yan-hong², CAO Feng², LIU Xiao-he²

(1. Shanxi College of Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[收稿日期] 2011-09-19

[通讯作者] * 何丽清, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医临床基础研究, Tel: 0351-2272046, E-mail: hlqyx@163.com

沉积及其神经元毒性、防止 SAD 样病理改变的作用。有关这一作用机制有待进一步深入探讨。

[参考文献]

- [1] Watson G S, Cholerton B A, Reger M A, et al. Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone [J]. *Am J Geriatr Psychiat*, 2005, 13: 950.
- [2] Craft S. Insulin resistance syndrome and Alzheimer disease: pathophysiologic mechanisms and therapeutic implications [J]. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2006, 20: 298.
- [3] Suzanne Craft. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment [J]. *Current Alzheimer Research*, 2007, 4: 147.
- [4] 姚玉惠, 程琦. 胰岛素及胰岛素抵抗与阿尔茨海默病 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2008, 35 (3): 287.
- [5] 盛树力. 胰岛素与散发性老年性痴呆 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2006: 226.
- [6] 庄晓明, 穆珺, 李然, 等. APP17 肽对糖尿病 KK 小鼠海马神经元胰岛素信号转导途径的影响 [J]. *首都医科大学学报*, 2007, 28 (3): 275.
- [7] Zhao L, Teter B, Morihara T, et al. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention [J]. *J Neuroscience*, 2004, 24: 11120.
- [8] Farris W, Mansourian S, Chang Y, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein and the β -amyloid precursor protein intracellular domain *in vivo* [J]. *PNAS*, 2003, 100 (7): 4162.

[责任编辑 何伟]

[Abstract] Objective: To observe the effects of Danggui Beimu Kushen (DGBMKS) decoction on tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the prostates of chronic bacterial prostatitis (CBP) rats and investigate the mechanism. **Method:** Sixty male SD rats were randomly divided into 6 groups (10 each): control group, the model group, western medicine group, high, middle and low-dose groups of DGBMKS decoction. The CBP model was established by injecting *E. coli* into the dorsal lobes of the prostate. High, medium and low doses of DGBMKS decoction were 11.67, 5.83, 2.917 g·kg⁻¹, and norfloxacin dose was 9.3 g·kg⁻¹. Drugs were given on the 15th day after operation for 4 weeks. The expression of TNF- α and its mRNA in the prostates of rats were measured. **Result:** Compared to the model group, the expression of TNF- α and its mRNA were significantly decreased in the high, middle and low-dose groups of DGBMKS decoction ($P < 0.01$), especially most decreased in the high-group. **Conclusion:** The mechanism of DGBMKS decoction treating CBP may be related to reducing the production of TNF- α in CBP rats.

[Key words] Danggui Beimu Kushen decoction; chronic bacterial prostatitis; TNF- α

慢性细菌性前列腺炎 (CBP) 近年来发病逐渐增多,且呈年轻化趋势。当归贝母苦参丸是经典名方,其治疗泌尿、生殖系统感染疗效显著,根治率高,复发率低,是治疗 CBP 的有效方剂^[1-2]。本实验从实验性 CBP 大鼠前列腺组织 TNF- α 的免疫组化与 mRNA 基因表达两方面对其作用机制进行了研究和探讨。

1 材料

1.1 菌株 实验菌株为标准质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922,由北京中医药大学东方医院检验科提供。

1.2 动物 SD 大鼠 60 只,雄性,体重(250 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2002-0003。

1.3 药物与试剂 当归贝母苦参丸药物煎剂按照傅延龄教授的临床经验剂量(当归 15 g,浙贝母 20 g,苦参 15 g),大鼠高、中、低剂量分别按成人剂量的 14, 7, 3.5 倍计算,配制为 1.17, 0.58, 0.29 g·mL⁻¹。诺氟沙星产自北京大恒裕业制药有限公司,临用前配成 9.3 × 10⁻³ g·mL⁻¹ 的混悬液。TNF- α 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),PCR 引物(北京博迈德科技发展有限公司);Trizol (Invitrogen 公司),反转录酶 (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega 公司),Taq E 和 dNTP (大连宝生物技术有限公司),DNA Marker (晶美公司)等。

1.4 仪器 免疫组化染色孵育盒(北京普博 Probe),图像分析仪(日本 Nikon-50i),凝胶成像及分析系统(Alpha Innotech Fluor Chem),PCR 扩增仪(Eppendorf),电泳仪(北京君意机电技术公司

JY600)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 将雄性 SD 大鼠 60 只随机分为 6 组,分别为空白对照组、模型组、诺氟沙星组、当归贝母苦参煎剂高、中、低剂量组,每组 10 只。麻醉成功后,在大鼠下腹正中开约 1 cm 的切口,暴露前列腺,在前列腺背叶两侧各注入 1.5 × 10⁷ cfu/mL 的大肠埃希菌菌液 0.1 mL,空白对照组注入生理盐水 0.1 mL,2 周后造模成功。术后第 15 天起,各治疗组大鼠按 10 mL·kg⁻¹, ig, 1 次/d,空白对照组和模型组 ig 蒸馏水,连续 4 周。

2.2 标本采集和指标检测

2.2.1 TNF- α 免疫组化表达 常规石蜡包埋、切片、脱蜡,免疫组化 SP 法观测各组大鼠前列腺组织中 TNF- α 表达,通过图像分析仪、Image-pro plus 5.1 图像分析软件对显色结果拍照、分析。每剂量组显色组织切片 40 倍物镜下随机选取 7 处视野拍照,测吸光度(A),以其平均值表示 TNF- α 含量。

2.2.2 TNF- α mRNA 基因表达 用 RT-PCR 方法观测各组大鼠前列腺组织中 TNF- α mRNA 表达, TNF- α 上游引物 5'-GTCCCAACAAGGAGGAGAA-GT-3';下游引物 5'-TGGTATGAAATGGCAAATCG-3';产物长度 328 bp。应用 Quantity One 图像分析系统对 RT-PCR 产物进行分析,计算目的条带和 β -actin 的积分吸光度(IA),IA 值为平均吸光度 × 面积。以两者的比值表示 RT-PCR 目的产物的相对含量。

2.3 统计学方法 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 15.0 统计软件进行分析处理,用 *t* 检验进行多组间均数的比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对模型大鼠前列腺组织 TNF- α 含量的影响
空白对照组大鼠前列腺上皮细胞胞浆内 TNF- α 仅有少量表达;模型组呈强阳性表达,为棕褐色,间质内的炎症细胞胞浆也有阳性表达,亦呈现棕褐色。各治疗组细胞胞浆呈弱棕黄色,诺氟沙星组、当归贝母苦参煎剂各剂量组大鼠前列腺组织中 TNF- α 的阳性表达与模型组相比均明显降低 ($P < 0.01$),当归贝母苦参煎剂高剂量组最低。见表 1。

表 1 当归贝母苦参煎剂对模型大鼠前列腺 TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF- α /IA
空白对照	-	0.087 ± 0.001 ²⁾
模型	-	0.463 ± 0.010 ¹⁾
诺氟沙星	9.3 × 10 ⁻²	0.364 ± 0.004 ^{1,2)}
当归贝母苦参煎剂	11.67	0.358 ± 0.006 ^{1,2)}
	5.83	0.370 ± 0.006 ^{1,2)}
	2.92	0.373 ± 0.011 ^{1,2)}

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对模型大鼠前列腺组织 TNF- α mRNA 表达的影响
诺氟沙星组、当归贝母苦参煎剂高、中、低剂量组与模型组相比均明显降低,大鼠前列腺组织中 TNF- α mRNA 的表达有显著性差异 ($P < 0.01$),当归贝母苦参煎剂高剂量组为最低;当归贝母苦参煎剂高、中剂量组与诺氟沙星组相比均明显降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 当归贝母苦参煎剂对模型大鼠前列腺 TNF- α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF- α mRNA 相对表达量/%
空白对照	-	86.05 ± 4.58 ²⁾
模型	-	519.21 ± 10.79 ¹⁾
诺氟沙星	9.3 × 10 ⁻²	217.59 ± 2.43 ^{1,2)}
当归贝母苦参煎剂	11.67	142.36 ± 2.06 ^{1,2,3)}
	5.83	192.49 ± 1.65 ^{1,2,3)}
	2.92	306.80 ± 3.98 ^{1,2)}

注:当归贝母苦参煎剂组与诺氟沙星组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

TNF- α 是重要的促炎症性细胞因子,可以活化单核细胞和巨噬细胞,提高其杀伤活性;可提高中性粒细胞的吞噬能力,刺激内皮细胞表达主要组织相

容性抗体类抗原,促进 IL-1, IL-6, IL-8 的分泌;还可明显诱导中性粒细胞、淋巴细胞功能相关抗原、巨噬细胞分化抗原的表达和构象的变化,并促进中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞黏附到内皮细胞上,从而参与炎症反应^[3]。TNF- α 在前列腺慢性炎症的发生、发展过程中起重要作用。前列腺经细菌刺激,其单核巨噬细胞,可分泌大量 TNF- α 。TNF- α 等免疫反应产物或免疫复合物刺激神经末梢可引发前列腺炎出现诸多复杂症状。因此, TNF- α 可作为前列腺局部免疫反应强弱、慢性前列腺炎诊断和病情检测的指标^[4-5],降低促炎细胞因子 TNF- α 水平对防止器官损伤具有重要意义^[6]。

本实验显示,在细胞和基因转录两个水平上当归贝母苦参煎剂各治疗组均能明显降低 CBP 模型大鼠前列腺组织中 TNF- α 的阳性表达,作者前期研究证实当归贝母苦参煎剂能显著降低 CBP 大鼠前列腺 IL-8 含量^[7]。据报道,在炎症诱发的细胞因子连锁反应中 IL-8 可能是关键的参与者,而 TNF- α 可诱导 IL-8 的产生和分泌^[8]。笔者的 2 个实验相互印证,说明当归贝母苦参煎剂治疗慢性细菌性前列腺炎的作用机制可能与减少 TNF- α 的产生有关,并通过影响 TNF- α 进而影响到 IL-8。

[参考文献]

- [1] 郭本传. 当归贝母苦参丸方加味治疗慢性前列腺炎 85 例[J]. 国医论坛, 2008, 23(6): 7.
- [2] 谢作钢. 当归贝母苦参丸治疗慢性前列腺炎临证体会[J]. 浙江中医杂志, 2010, 45(2): 108.
- [3] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2001: 177.
- [4] 孙一鸣, 刘丽, 李英林, 等. 前列腺水丸对慢性细菌性前列腺炎大鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平的影响[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(5): 470.
- [5] 李火金, 史明, 张忠林. 精浆热休克蛋白及细胞因子表达与前列腺炎分型的关系[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2006, 20(11): 801.
- [6] 王守富, 张慧俭, 李建生, 等. 毒素清颗粒对细菌性肺炎老龄大鼠多器官损伤炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 169.
- [7] 何丽清, 傅延龄, 马艳红, 等. 当归贝母苦参煎剂对实验性慢性细菌性前列腺炎大鼠前列腺中 IL-2 和 IL-8 的影响[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(6): 505.
- [8] Miller L J, Fischer K A, Goralniek S J, et al. Inter-Leukin Levels in seminal Plasma; implications for chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome [J]. J Urol, 2002, 167(2): 753.

[责任编辑 何伟]