

• 论著-实验研究 •

慢性非细菌性前列腺炎小鼠前列腺中 α_1 -受体亚型的表达变化*

刘峰¹ 许小林¹ 俞建军¹ 胡晓勇²

[摘要] 目的:复制小鼠慢性非细菌性前列腺炎(CAP)模型,研究前列腺炎发展过程中 α_1 肾上腺素能受体(α_1 -AR)亚型的表达及其与前列腺中炎症介质 TNF- α 的关系。方法:使用大鼠前列腺蛋白提纯液辅以双重免疫佐剂,造成实验性慢性非细菌性前列腺炎(CAP)小鼠模型,在造模后 45 天解剖小鼠,获得前列腺组织样本,抽提 RNA 转录为 cDNA,运用实时荧光逆转录聚合酶链反应检测组织标本中 α_1 a-AR、 α_1 b-AR、 α_1 d-AR、TNF- α 的 mRNA 的表达,观察 CAP 小鼠 α_1 -AR 三种亚型的表达变化,并观察其与前列腺中炎症介质 TNF- α 的关系。背侧组织做病理切片观察,进一步判别前列腺的炎症程度。结果:造模小鼠均出现排尿障碍等症状;病理切片观察到炎症细胞浸润;造模小鼠中 TNF- α 明显升高,但 α_1 a-AR、 α_1 b-AR、 α_1 d-AR 无明显变化。结论:慢性前列腺炎小鼠模型复制成功,CAP 的炎症程度与 TNF- α 的表达成正相关关系,与 α_1 a-AR、 α_1 b-AR、 α_1 d-AR 无明显关系。

[关键词] 慢性非细菌性前列腺炎;动物模型;免疫佐剂法

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2017.02.012

[中图分类号] R697.33 **[文献标识码]** A

Expression of α_1 -adrenoceptor subtypes in the mouse with chronic abacterial prostatitis

LIU Feng¹ XU Xiaolin¹ YU Jianjun¹ HU Xiaoyong²

(¹Department of Urology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital South Campus, Shanghai, 201499, China;²Department of Urology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital)

Corresponding author: YU Jianjun, E-mail: 13916672582@163.com

Abstract Objective: To make a kind of chronic abacterial prostatitis (CAP) mice, and try to find the relationship between α_1 -adrenoceptor (α_1 -AR) subtypes and prostate inflammatory mediators TNF- α . **Method:** We use prostate protein purification solution from SD rat to cause a kind of experimental CAP mouse model with two immune adjuvants. We killed mice after 45 days to get the prostatitis tissue samples. And then, RNA was extracted and transcribed into cDNA. Later, we used real time reaction to detect the expression of α_1 a-AR, α_1 b-AR, α_1 d-AR, TNF- α , and found the expression changes in three α_1 -AR subtypes as well as the relationship with TNF- α . We also did some pathological observation to define the degree of inflammation in prostate. **Result:** The symptoms such as building urination disorders occurring in CAP mice and pathological inflammatory cell infiltration were observed. In realtime result, TNF- α had a higher expression in CAP group, while α_1 a-AR, α_1 b-AR and α_1 d-AR didn't show the significance. **Conclusion:** We have copied a kind of CAP mice. The degree of inflammation is positively related to the expression of TNF- α , but not associated with α_1 a-AR, α_1 b-AR or α_1 d-AR.

Key words chronic abacterial prostatitis; animal models; immune adjuvants

慢性非细菌性前列腺炎(chronic abacterial prostatitis, CAP)是泌尿外科常见病、难治病,约占泌尿外科门诊成年男性患者疾病的 25%。其临床特点是病因复杂,症状多变,复发率高,严重影响患者的生活质量,并给公共卫生事业造成巨大的经济负担,目前其发病机制尚未明确,对于该疾病的药

物研发及治疗方法都未能取得满意的结果,本文中我们采用诱导动物自身免疫的方法制作慢性非细菌性前列腺炎小鼠模型,探讨模型中 α_1 -受体亚型的表达变化,为该疾病进一步研究提供可行的途径,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

C57/B6 小鼠 20 只(8 周龄以上,雄性,体重 25~30 g),SD 大鼠(8 周龄以上,雄性,体重 240~300 g)由上海南方模式生物研究中心提供。Tri-

*上海市卫计委青年基金项目(编号 2011-Y132)

¹上海交通大学附属第六人民医院南院泌尿外科(上海, 201499)

²上海交通大学附属第六人民医院泌尿外科

通信作者:俞建军, E-mail: 13916672582@163.com

tonX-100、BCA 蛋白定量试剂盒、匀浆器完全弗氏佐剂、百日咳毒素购自 Sigma 公司,引物由生工合成,序列见表 1。

表 1 引物序列

名称	序列
α_1 a-AR-F	TGATGCCCATTTGGGTCCTTC
α_1 a-AR-R	GTAATCCTGGCCGATCCCTG
α_1 b-AR-F	CAAGAATCTGGAGGCGGGAG
α_1 b-AR-R	CACCCAGGATACGCATGAA
α_1 d-AR-F	ATCGTGAACCTAGCAGTGGC
α_1 d-AR-R	TACCGGTCCACAGAGATGGT
Tnfa-F	ACCGTCAGCCGATTTGCTAT
Tnfa-R	CCGACTCCGCAAAGTCTAA
Actin-F	TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA
Actin-R	ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT

1.2 方法

1.2.1 大鼠前列腺蛋白提纯液制备 取 240~300 g 成年雄性 SD 大鼠 3 只,将大鼠颈椎脱臼处死后,在无菌超净台下,迅速解剖,取出大鼠前列腺组织,加入含 0.5% TritonX-100 及蛋白酶抑制剂的 PBS 溶液,用超声仪匀浆。10 000 g/min 离心,离心时间为 30 min。收集上清,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.2 实验分组及具体操作方法 取 C57/B6 小鼠 20 只,随机分为对照组和造模组,每组 10 只小鼠。造模当天,将前列腺蛋白提纯液用 PBS 稀释至使用浓度后,按 1:1 加入完全福氏佐剂(CFA)乳化。造模组按不同组别和抗原蛋白浓度多点皮内注射(左脚垫、右脚垫、左肩胛、右肩胛、尾根)0.5 ml 乳化后的蛋白提纯液,其中给药剂量为 1 mg/只,对照组注射 PBS 作为对照。免疫共分 2 次,分别在第 0 天及 21 天。第 0 天造模组腹腔注射百日咳毒素 0.1 ml/只,浓度为 1 μ g/ml,对照组注射 PBS。百日咳毒素每隔 2 天注射 1 次,共计注射 3 次。于造模后 45 天处死小鼠,取组织。

1.2.3 观察指标 解剖分离小鼠前列腺组织,测定前列腺湿重。前列腺背侧部组织做 HE 染色病理观察,部分进行 Realtime 检测。前列腺于中性甲醛中固定,做 HE 染色观察。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析,小鼠体重(BW)、前列腺湿重(PW)、PW/BW 等数据的比较采用组间方差分析,TNF- α 、 α_1 -受体各亚型值采用独立样本组间 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

本实验周期为 45 d,未发现小鼠死亡现象。造

模组小鼠均有不同程度的尿频等前列腺炎症状。在造模后 30 天,部分造模组小鼠出现排尿不畅的现象。小鼠在造模 45 天后处死,解剖小鼠、取前列腺组织,造模组小鼠膀胱壁有增厚的现象。

2.1 湿重体重比

于实验后 45 天取得小鼠前列腺组织,称重测量,结果见表 2。通过分析可得,造模组小鼠前列腺湿重体重比上升。

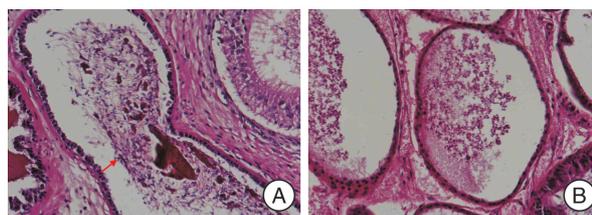
表 2 体重湿重比

组别	体重/g	湿重/g	湿重:体重/%
对照组	29.38 \pm 1.47	0.0538 \pm 0.0038	0.183 \pm 0.014
造模组	26.90 \pm 2.40	0.0650 \pm 0.0093	0.242 \pm 0.028 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 前列腺病理切片结果

从病理切片可见,正常的前列腺组织表现出较规则的形状,腺腔内有大量的细胞分泌物,无单核/炎症细胞,上皮细胞呈现立方体状。在造模组中,箭头所指处细胞间质中有炎症细胞浸润,腺上皮细胞排列较紊乱,存在不均匀的组织水肿。见图 1。



A:造模组;B:对照组

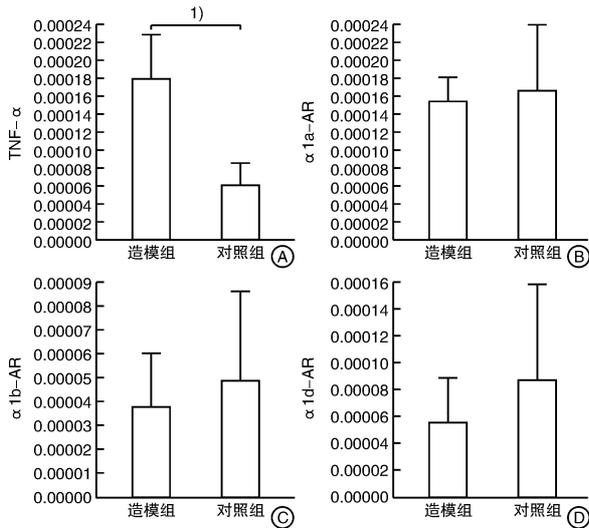
图 1 前列腺 HE 染色切片(200 \times)

2.3 Realtime 检测结果

从 Realtime 结果来看,造模组小鼠 TNF- α 呈现显著上升的现象,差异有统计学意义,前列腺内有炎症因子表达,结合病理图片,证明 CAP 模型建立成功;但对比造模组和对照组小鼠 α_1 a-AR、 α_1 b-AR、 α_1 d-AR,未发现明显差异。见图 2。

3 讨论

目前,CAP 动物模型的建立尚未有统一的标准方法,一般动物模型集中于大鼠,而对于小鼠模型却罕有报道,当今小鼠已然成为生物学研究中的主流模式生物,其为近交系品系,和人类在基因上有 99% 的相似性,模型背景较纯,数据均一性较好,实验动物对于实验结果的影响较小^[1]。本文参考了 Keeth、叶伟成等^[2,3]所报道的动物自免疫的方法,制作前列腺炎小鼠模型,从结果来看,造模组小鼠前列腺湿重体重比上升,表明前列腺有增重现象,且该比例与疾病严重程度成正相关关系;从病理切片来看,造模组小鼠前列腺细胞间质、腺体管腔内有炎症细胞浸润,部分出现增生情况,腺体上



A: TNF- α ; B: α_1a -AR; C: α_1b -AR; D: α_1d -AR; 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

图 2 Realtime 检测结果

皮细胞呈现高柱状,且排列紊乱,证明小鼠出现前列腺炎^[4]。从 Realtime 结果来看,造模组小鼠 TNF- α 表达明显升高,然而 α_1a -AR、 α_1b -AR、 α_1d -AR 未有明显改变。

关于 CAP 的病因和发病机制有多种学说,前列腺内尿液反流学说是主要学说之一,该学说认为前列腺局部的炎症反应及全身植物神经功能失调、心理障碍等均可使局部 α_1 -AR 兴奋性增高,后尿道中的 α_1 -AR 亚型的表达上调,使排尿时前列腺尿道压力增加,尿液易反流至前列腺腺管内,可引起化学性前列腺炎,它不仅是 CAP 的重要致病因素,而且尿液反流时将病原体带入前列腺内,也是 I、II 型前列腺炎的重要感染途径。这种推测被广泛接受的原因是基于前列腺增生的下尿路 α_1 -AR 变化的基础研究^[5],但至今缺乏直接来源于慢性前列腺炎的实验研究的支持。本次实验结果证实在 CAP 小鼠前列腺组织中未发现 α_1 -AR 的表达量明显上调,基于这一点考虑,现有的药物是否类似于安慰剂的效应值得思考。

目前,根据慢性前列腺炎是由下尿路功能性梗阻致尿液反流造成的“化学性前列腺炎”理论学说,解除下尿路功能性梗阻成为治疗该病的关键,因此 α -受体阻滞剂和抗生素是治疗慢性前列腺炎的一线药物^[6],然而其临床疗效目前仍存在争论,国内李宏军等^[7]报道 α_1 受体阻滞剂治疗 CAP 有效率达 73.2%,可显著改善患者的 NIH-CPSI 评分,但在由美国国立卫生研究所慢性前列腺炎合作研究

网(NIH-CPCRN)进行,而非药商资助的大样本随机安慰剂对照多中心研究中,6 周的坦索罗辛治疗效果与安慰剂相似^[8]。欧洲泌尿外科学据此在 2009 年修订的指南中认为 α_1 -AR 阻滞剂治疗 III 型前列腺炎,短期应用没有特别好的效果^[8]。

α_1 -AR 受体阻滞剂可以降低前列腺组织中平滑肌张力,缓解前列腺腺体导管的堵塞,使腺泡内炎症介质可以通过腺管随着前列腺液排出,故能缓解患者尿频、尿急及会阴部胀痛不适等症状。但并不是所有的患者均应用 α_1 -AR 受体阻滞剂有效,我们考虑这种疗效差异可能与前列腺内不同组织张力有关,对于前列腺内组织水肿严重、张力过高的患者, α_1 -AR 受体阻滞剂虽可以使前列腺内平滑肌张力降低,但并不足以恢复腺管的通畅,故不能明显缓解患者症状。故观察 α_1 -AR 受体阻滞剂的疗效与前列腺组织张力的关系,是我们下一步准备进行的实验内容。

[参考文献]

- 1 Wittnam C A. The measure of the man[J]. Ann Intern Med, 2008, 149(6): 431-432.
- 2 Keetch D W, Humphrey P, Ratliff T L. Development of a mouse model for nonbacterial prostatitis[J]. J Urol, 1994, 152(1): 247-250.
- 3 叶伟成, 薛慈民, 徐兆东, 等. 免疫佐剂法制作慢性非细菌性前列腺炎小鼠模型的方法[J]. 中国男科学杂志, 2001, 15(1): 29-32.
- 4 Wang X, Zhong S, Xu T, et al. Histopathological classification criteria of rat model of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. Int Urol Nephrol, 2015, 47(2): 307-316.
- 5 Kojima Y, Sasaki S, Shinoura H, et al. Quantification of alpha1-adrenoceptor subtypes by real-time RT-PCR and correlation with age and prostate volume in benign prostatic hyperplasia patients[J]. Prostate, 2006, 66(7): 761-767.
- 6 Nickel J C. Antibiotics and alpha-blockers for chronic prostatitis; evidence from recent randomized placebo-controlled studies[J]. Rev Urol, 2005, 7(1): 65-66.
- 7 李宏军, 李汉忠, 商学军, 等. α 受体阻滞剂治疗 III 型前列腺炎的效果分析[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(6): 424-427.
- 8 Alexander R B, Probert K J, Schaeffer A J, et al. Ciprofloxacin or tamsulosin in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome; a randomized, double-blind trial[J]. Ann Intern Med, 2004, 141(8): 581-589.

(收稿日期: 2016-09-16)