

水飞蓟宾磷脂复合物对大鼠自身免疫性前列腺炎炎性细胞因子的影响

陈 华*,陈 钧#,杨学娟,刘友彬,徐卫东(江苏大学药学院,江苏 镇江 212013)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)41-3873-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.41.12

摘要 目的:研究水飞蓟宾磷脂复合物(SPC)对大鼠自身免疫性前列腺炎炎性细胞因子的影响。方法:将大鼠随机分为正常对照组、模型组、普适泰[26 mg/(kg·d)]组和高、中、低剂量[84、42、21 mg/(kg·d)]SPC组,每组8只。除正常对照组外,其余各组采用免疫佐剂法建立大鼠自身免疫性前列腺炎模型,灌胃给予相应药物,连续给药30 d。检测各组大鼠末次给药24 h后前列腺、脾、胸腺的脏器指数,前列腺组织病理变化,血清中白细胞介素8(IL-8)、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平。结果:各组大鼠的脏器指数差异均无统计学意义($P>0.05$)。与正常对照组比较,模型组大鼠的前列腺组织有明显炎症反应,血清中IL-8、IL-10、TNF- α 水平均明显增加($P<0.05$);与模型组比较,普适泰组和中、高剂量SPC组大鼠前列腺组织的炎症反应均有好转,血清中IL-8、IL-10、TNF- α 水平均明显减少($P<0.05$),低剂量SPC组大鼠血清中仅TNF- α 水平明显减少($P<0.05$),其余指标间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:SPC能显著改善自身免疫性前列腺炎模型大鼠的免疫功能,并具有减轻前列腺免疫炎症反应的作用。

关键词 自身免疫性前列腺炎;水飞蓟宾磷脂复合物;炎性因子;免疫调节;大鼠

Effects of Silybin-phospholipid Complex on Inflammatory Factors of Autoimmune Prostatitis in Rats

CHEN Hua, CHEN Jun, YANG Xue-juan, LIU You-bin, XU Wei-dong (College of Pharmacy, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the effects of Silybin-phospholipid complex (SPC) on inflammatory factor of autoimmune prostatitis in rats. **METHODS:** The experimental rats were randomly divided into normal control group, model group, Pushitai group [26 mg/(kg·d)] and high-dose, medium-dose and low-dose [84, 42 and 21 mg/(kg·d)] SPC groups with 8 rats in each group. Autoimmune prostatitis model was established in those group except normal control group, and then given relevant medicine intragastrically for 30 days. The prostate tissue, spleen and thymus gland index, and the pathologic changes of prostatic tissue were determined, and the expressions of IL-8, IL-10 and TNF- α were also detected 24 h after the last medication. **RESULTS:** There were no significant difference in organ index of each group ($P>0.05$). Compared with normal control group, significant inflammatory reaction was found in prostatic tissue, and the levels of IL-8, IL-10, TNF- α in serum of model group were increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, inflammatory reaction of prostatic tissue was recovered in Pushitai group and medium-dose and high-dose SPC groups, while the levels of IL-8, IL-10 and TNF- α in serum were decreased obviously ($P<0.05$), just the level of TNF- α in serum of low-dose SPC group was decreased obviously ($P<0.05$), the other index had no significant difference ($P>0.05$). **CONCLUSIONS:** SPC can improve immune function of autoimmune prostatitis rat and alleviate the prostatic immune inflammatory responses.

KEY WORDS Autoimmune prostatitis; Silybin-phospholipid complex; Inflammatory factors; Immunoregulation; Rats

慢性非细菌性前列腺炎(Chronic nonbacterial prostatitis, CNP)是泌尿外科最常见的疾病之一。临床上CNP是一种常见的疾病,但由于其有不同的临床表现,且其病因及发病机制尚不十分清楚,因此临床上对于CNP的诊断和治疗十分棘手,虽然治疗方法很多,但疗效欠佳^[1]。近年来研究^[2]发现,自身免疫反应在前列腺炎发病机制中起着重要作用,这已成为国内外的研究热点。水飞蓟宾是黄酮木脂素类化合物,是菊科植物水飞蓟的提取物,具有明显的抗氧化和抗炎特性,近年来研究^[3]发现水飞蓟宾还具有免疫调节作用,使其越来越受到国内

外的广泛关注。水飞蓟宾的水溶性及脂溶性均较差,与卵磷脂进行复合制备成水飞蓟宾磷脂复合物(SPC)以增加其脂溶性,可提高生物利用度。本文以SPC为供试药,通过观察给药前后大鼠自身免疫性前列腺炎炎性细胞因子的变化,探讨SPC在治疗自身免疫性前列腺炎中的作用。

1 材料

1.1 仪器

BB16UV/BB5060UV CO₂培养箱(德国 Herae 公司); SPECTRA MAX 190 酶标仪(美国 Molecular Device 公司); LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);COVER-018 光学显微镜(日本 Olympus 公司);TDL-5-A 低温高速离心机(上海安亭科学仪器厂);UV-2102 PCS 型紫外-可见分光光度计(上海洪富仪器仪表有限公司)。

* 硕士研究生。研究方向:药效与毒理学。E-mail: wschenhua001@126.com

通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:药效与毒理学。电话:0511-88780196。E-mail: syxchenjun@126.com

1.2 药品与试剂

普适泰片(商品名:舍尼通,南京美瑞制药有限公司,批号:20111202,规格:每片含70 mg花粉提取物P-5和4 mg花粉提取物EA-10);百白破联合疫苗(武汉生物制品研究所,批号:20110619-2);完全弗氏佐剂(FCA,美国Sigma公司,批号:101M8711);水飞蓟宾(江苏大学药学院提取,批号:20120312,纯度:98%);卵磷脂(国药集团化学试剂有限公司);大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、大鼠白细胞介素8(IL-8)ELISA试剂盒、大鼠IL-10 ELISA试剂盒(扬州麦琪生物科技有限公司);蛋白定量(双缩脲法)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物

Sprague-Dawley大鼠, δ ,体质量220~250 g,清洁级,由江苏大学实验动物中心提供,使用许可证号:SCXK(苏)2009-0002。大鼠饲养条件:室温22~25℃,相对湿度65%,光照12 h,黑暗12 h,自由饮水进食。

2 方法

2.1 SPC的制备与检测^[4]

水飞蓟宾与卵磷脂在一定条件下进行复合,得到SPC,用高效液相色谱法对其进行含量测定。

2.2 前列腺蛋白提纯液的制备^[5]

取36只大鼠,颈椎脱臼处死,在无菌条件下剥取前列腺组织,修剪掉脂肪,放入冷0.9%氯化钠注射液(生理盐水)中洗净,称质量,匀浆,10 000 r/min(离心半径8 cm)离心30 min,取上清液,紫外分光光度法测定蛋白含量;加入预先高温灭菌的0.5%聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100),生理盐水稀释成50 mg/ml,即得。

2.3 建模

采用免疫佐剂法建立自身免疫性前列腺炎模型^[6-7]。取大鼠于第0、7天在其腹股沟和颈部多点皮内注入大鼠前列腺蛋白提纯液与FCA的混悬液(等比混匀)1 ml,腹腔注射百白破联合疫苗0.5 ml,第21天腹腔注射大鼠前列腺蛋白提纯液0.5 ml,35 d后建模成功。

2.4 分组与给药

按等效剂量直接折算法^[8]折算给药剂量。取48只大鼠适应性饲养1周,按质量随机分成6组,每组8只,即正常对照组、模型组、普适泰[26 mg/(kg·d)]组和高、中、低剂量[84、42、21 mg/(kg·d)]SPC组,除正常对照组不作任何处理外,其他各组大鼠按“2.3”项下方法建模,灌胃给予相应药物,连续给药30 d。

2.5 检测指标

观察各组大鼠的体质量、体毛、活动及饮食变化;末次给药24 h后,10%水合氯醛麻醉大鼠,股动脉取血,肉眼观察前列腺、膀胱组织变化并剥离前列腺、脾、胸腺,计算脏器指数[脏器指数=脏器湿质量(g)/动物体质量(g) \times 100%]。取前列腺组织,洗净、固定、脱水、包埋,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察各组大鼠前列腺组织病理变化。ELISA试剂盒检测各组大鼠血清中IL-8、IL-10、TNF- α 的水平^[9],按试剂盒说明书步骤操作。

2.6 统计学分析

采用SPSS 19.0 for Windows统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间分析采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 常规观察

与正常对照组比较,各组大鼠建模后体质量、体毛、活动及饮食差异均无统计学意义($P > 0.05$),未见扎堆现象。肉眼观察,正常对照组、普适泰组和各剂量SPC组大鼠的前列腺色泽红润,与周围组织无粘连,膀胱色偏白,腹腔内各脏器未见异常;模型组大鼠前列腺颜色苍白,体积大致正常,膀胱色偏白,其中有3只大鼠的前列腺组织与周围组织轻度粘连,其余大鼠前列腺组织与周围组织无粘连,腹腔内各脏器未见异常。各组大鼠前列腺、脾、胸腺的脏器指数差异均无统计学意义($P > 0.05$),具体见表1。

表1 各组大鼠脏器指数比较(% , $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab 1 Comparison of organ index in each group (% , $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	前列腺	脾	胸腺
正常对照组	0.134 \pm 0.012 6	1.89 \pm 0.167	0.818 \pm 0.177
模型组	0.147 \pm 0.012 4	1.96 \pm 0.507	0.721 \pm 0.186
普适泰组	0.144 \pm 0.011 3	1.73 \pm 0.356	0.715 \pm 0.279
高剂量SPC组	0.127 \pm 0.005 7	2.02 \pm 0.245	0.724 \pm 0.148
中剂量SPC组	0.138 \pm 0.066 3	1.83 \pm 0.191	0.722 \pm 0.104
低剂量SPC组	0.137 \pm 0.011 3	1.89 \pm 0.203	0.725 \pm 0.147

3.2 前列腺组织病理变化

显微镜下,正常对照组大鼠前列腺组织结构清楚,部分腺腔内有分泌物,无充血、水肿,无腺体、血管萎缩或增生,间质内未见炎性细胞浸润。模型组大鼠前列腺组织结构模糊,腺腔萎缩,间质及腺体内有大量的炎性细胞浸润,有明显的充血、水肿现象。与模型组比较,普适泰组大鼠前列腺组织结构清楚,腺腔萎缩、间质水肿明显改善,基本无充血现象,间质内炎性细胞数量减少;高剂量SPC组大鼠前列腺组织结构清楚,部分腺体内有分泌物,充血、水肿现象有所改善,间质内炎性细胞数量明显减少;中剂量SPC组大鼠前列腺组织结构清楚,充血、水肿有所好转,间质内炎性细胞数量减少;低剂量SPC组大鼠前列腺组织结构清楚,充血、水肿未见明显好转,间质内炎性细胞数量减少。提示SPC对模型大鼠前列腺炎的免疫炎症反应有一定的缓解作用。各组大鼠前列腺组织病理学显微镜图见图1。

3.3 炎性细胞因子表达水平检测结果

各组大鼠血清中IL-8、IL-10、TNF- α 水平比较见表2。与正常对照组比较,模型组大鼠血清中IL-8、IL-10、TNF- α 水平均明显增加($P < 0.05$),表明模型组大鼠存在免疫炎症反应。与模型组比较,普适泰组和中、高剂量SPC组大鼠血清中IL-8、IL-10、TNF- α 水平均明显减少($P < 0.05$),低剂量SPC组大鼠血清中仅TNF- α 水平明显减少($P < 0.05$),其余指标间差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明SPC能显著改善模型大鼠的免疫功能。

4 讨论

目前研究认为CNP的发生与自身免疫有比较密切的关系,自身免疫因素在前列腺炎发病机制中的作用逐渐成为当

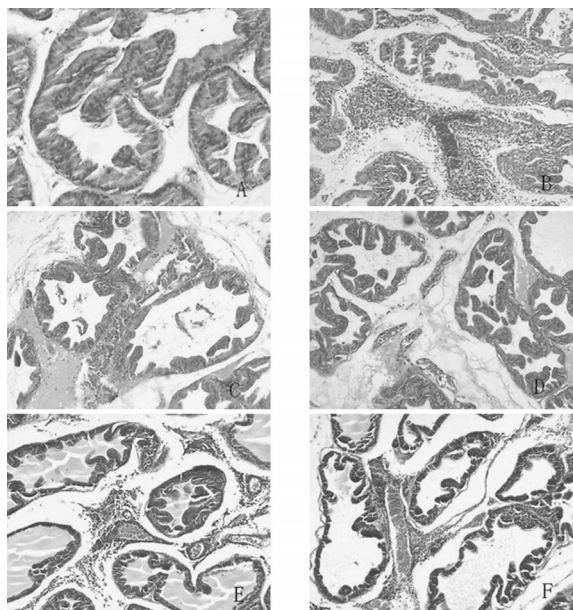


图1 各组大鼠前列腺组织病理学显微镜图(HE, ×100)
A.正常对照组;B.模型组;C.普适泰组;D.高剂量SPC组;E.中剂量SPC组;F.低剂量SPC组

Fig 1 Microscopic images of prostate tissue pathology in each group(HE, ×100)

A. normal control group; B. model group; C. Pushitai group; D. high-dose SPC group; E. medium-dose SPC group; F. low-dose SPC group

表2 各组大鼠血清中IL-8、IL-10、TNF-α水平比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Comparison of the levels of IL-8, IL-10 and TNF-α in serum in each group (pg/ml, $\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	IL-8	IL-10	TNF-α
正常对照组	46.50 ± 4.46	19.35 ± 5.25	78.13 ± 11.85
模型组	76.15 ± 17.51*	30.08 ± 8.14*	147.88 ± 27.89*
普适泰组	52.83 ± 11.88 [#]	19.98 ± 2.88 [#]	88.70 ± 16.56 [#]
高剂量SPC组	50.90 ± 8.39 [#]	19.65 ± 3.35 [#]	92.59 ± 17.20 [#]
中剂量SPC组	56.39 ± 12.06 [#]	21.90 ± 4.28 [#]	101.18 ± 20.82 [#]
低剂量SPC组	69.41 ± 24.19*	25.02 ± 6.23*	120.50 ± 35.67**

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: [#] $P < 0.05$

今研究的热点。当机体内环境发生了某些特定的变化时,可使前列腺局部抗原(PSA)暴露,进而刺激血液、组织中的CD4⁺T淋巴细胞,直接或通过释放淋巴细胞溶解因子(SoFs)造成细胞毒性T细胞(Te)、辅助性T细胞(Th)等细胞免疫活性细胞浸润前列腺组织,通过细胞毒性作用导致前列腺组织充血、水肿以及前列腺液淤积等临床表现^[10]。炎性细胞因子的变化是免疫因素参与前列腺炎症形成的有力证明,细胞因子在炎症反应应答的调节机制中发挥了重要作用。调节性细胞因子、促炎性细胞因子、抗炎性细胞因子都参与了前列腺炎的免

疫反应^[11]。

普适泰片为临床治疗慢性前列腺炎的常用药物,其主要成分为花粉提取物P-5、EA-10。其药品说明书中注明绝大多数患者对其高度耐受,且临床疗效较好,因此选择其作为阳性对照药。

本研究采用免疫佐剂法成功建立了大鼠自身免疫性前列腺炎模型,并用SPC对其进行干预。实验结果表明,模型组大鼠存在自身免疫性炎症反应,与组织病理学变化结果一致。SPC能显著改善模型大鼠的免疫功能,组织病理学变化结果也表明SPC具有缓解前列腺免疫炎症反应的作用。这为进一步研究SPC治疗自身免疫性前列腺炎提供了一定的实验依据。

参考文献

- [1] 汪克蕾.细胞因子在慢性非细菌性前列腺炎发病机制中的研究进展[J].医学信息,2001,24(3):341.
- [2] 刘海红,夏欣一,黄宇峰.慢性前列腺炎与细胞因子研究进展[J].中华男科学杂志,2006,12(6):548.
- [3] 王红军,姜媛媛,路平,等.水飞蓟宾的抗肿瘤、抗氧化和免疫调节分子药理学机制研究进展[J].药学学报,2010,45(5):413.
- [4] 肖衍宇,宋赞梅,陈志鹏,等.水飞蓟宾磷脂复合物的制备与大鼠生物利用度的研究[J].药学学报,2005,40(7):611.
- [5] 张亚强,王炎,李敏,等.大鼠前列腺组织抗原蛋白诱导自身免疫性前列腺炎模型的建立[J].中国中西医结合外科杂志,2008,14(6):584.
- [6] 李冬梅,胡文娟,刘向云,等.大鼠自体免疫性前列腺炎模型的实验研究[J].实验动物与比较医学,2008,28(3):151.
- [7] Rivero V, Carnaud C, Riera CM. Prostatein or steroid-binding protein (PSBP) induces experimental autoimmune prostatitis (EAP) in NOD mice[J]. *Clinical Immunology*, 2002, 105(2): 176.
- [8] 徐淑云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2006:203.
- [9] 王伊光,孟建,王代伟,等.热林清颗粒对大鼠自身免疫性前列腺炎治疗作用机制的进一步探讨[J].临床泌尿外科杂志,2009,24(12):939.
- [10] 韦超,刘朝东,王洪志.慢性非细菌性前列腺炎的免疫学病因[J].内分泌外科杂志,2008,2(4):276.
- [11] 温志鹏,洪志明,林星游,等.前列活血汤对自身免疫性前列腺炎大鼠模型前列腺内炎性细胞因子的影响[J].世界中西医结合杂志,2010,5(5):396.

(收稿日期:2012-12-27 修回日期:2013-03-11)