

八正散加减方对慢性非细菌性前列腺炎大鼠 Th1/Th2 细胞平衡影响的实验研究

李广森¹, 俞旭君², 陈帝昂¹, 尤耀东³, 张培海⁴,
钟振东⁵, 蔡剑¹, 毕明帅¹, 陈晓洋⁶, 常德贵²

1. 成都中医药大学附属医院男科, 四川 成都 610072
2. 成都中医药大学第二附属医院男科, 四川 成都 610041
3. 成都中医药大学, 四川 成都 610075
4. 四川省中西医结合医院, 四川 成都 610041
5. 四川省人民医院病理科, 四川 成都 610072
6. 邛崃市医疗中心医院, 四川 邛崃 611500

[摘要] 目的: 探讨八正散加减方治疗慢性非细菌性前列腺炎 (CAP) 的作用机制。方法: 取 15 月龄 SD 雄性大鼠 60 只, 按随机数字表法分为空白组、模型组、对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 每组 10 只。除空白组外, 其余组大鼠均用 25% 乌拉坦按 1 g/kg, 经腹腔注射麻醉, 无菌条件下做去势手术, 术后放回鼠笼, 密切观察, 于术后第 2 天皮下注射苯甲酸雌二醇 0.25 mg/kg, 每天 1 次, 连续 30 天。空白组不做任何处理, 正常喂养。在最后 1 次皮下注射苯甲酸雌二醇后第 2 天, 低剂量组、中剂量组、高剂量组分别给予 3.12 g/(kg·d)、6.24 g/(kg·d)、12.48 g/(kg·d) 八正散加减方水煎剂灌胃; 对照组给予前列通瘀胶囊 3.9 g/(kg·d) 灌胃; 模型组灌服 0.9% 的生理盐水, 连续用药 4 周。末次给药 24 h 后处死大鼠, 留取标本。HE 染色、光镜下观察各组前列腺组织的病理学表现, ELISA 法测各组大鼠血清中干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-4 (IL-4) 的含量。结果: 与空白组比较, 模型组血清中 IFN- γ 水平明显升高, IFN- γ /IL-4 比值明显增高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明造模成功。与模型组比较, 对照组、中剂量组、高剂量组血清中 IFN- γ 水平明显下降, IL-4 水平明显升高, IFN- γ /IL-4 比值明显减小, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 低剂量组血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平、IFN- γ /IL-4 比值无明显变化。与对照组比较, 中剂量组、高剂量组血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平变化不明显, IFN- γ /IL-4 比值大小基本相当, 差异无统计学意义。结论: 八正散加减方可通过提高机体 Th2 细胞应答水平, 进而调节 Th1/Th2 细胞平衡, 从而达到治疗慢性非细菌性前列腺炎的目的。

[关键词] 慢性非细菌性前列腺炎 (CAP); 八正散; 干扰素- γ (IFN- γ); 白介素-4 (IL-4); Th1/Th2; 动物实验; 大鼠
[中图分类号] R285.5; R697.33 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 02-0007-04
DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.02.003

Experimental Study of Modified Bazheng San on Balance of Th1/Th2 in Rats with CAP

LI Guangsen, YU Xujun, CHEN Di'ang, YOU Yaodong, ZHANG Peihai,
ZHONG Zhendong, CAI Jian, BI Mingshuai, CHEN Xiaoyang, CHANG Degui

Abstract: Objective: To discuss the mechanism of modified Bazheng san in treating chronic abacterial prostatitis (CAP). Methods: Selected 60 SD rats of 15 months old, and divided them into the blank group, model group, control group, low, middle and high dose group randomly, 10 cases in each. Except the blank group, other groups were all given 25% urethane (1 g/kg), and anaesthetized with intraperitoneal injection for castration under sterile condition. After operation, replaced the rats to the squirrel cage and given close observation. After the second day of operation, given subcutaneous injection with 0.25 mg/kg estradiol benzoate once a day, lasting for 30 days. Without giving any treatment, the blank group was fed normally. After the second day of the last time of subcutaneous injection with estradiol benzoate, the low, middle and high dose group was given decoction of modified Bazheng san of 3.12 g/(kg·d), 6.24 g/

[收稿日期] 2016-08-18

[基金项目] 成都中医药大学科技发展基金 (ZRYW201129)

[作者简介] 李广森 (1983-), 男, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗男科疾病的基础与临床研究。

[通讯作者] 常德贵, E-mail: cdg998@sina.com。

(kg·d), 12.48 g/(kg·d) by gavage, respectively. The control group was given 3.9 g/(kg·d) Qianlie Tongyu capsule by gavage. The model group was given 0.9% saline. All medication last for four weeks. Rats were sacrificed, and specimens were taken after 24 hour of the last medication. Observed pathological manifestation of prostate tissues in the rats of each group with HE staining and light microscope, and detected contents of Interferon- γ (IFN- γ) and Interleukin-4 (IL-4) in serum of the rats with enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Results: Compared with the blank group, IFN- γ levels in serum and ratio of IFN- γ /IL-4 of the model group were significantly increased($P < 0.05$), suggested the success of modeling. Compared with the model group, IFN- γ levels in serum were significantly decreased, IL-4 levels were significantly increased, and the ratio of IFN- γ /IL-4 was significantly decreased in the control group, middle and high dose group, the difference being significant($P < 0.01$). Level of IFN- γ and IL-4, the ratio of IFN- γ /IL-4 of the low dose group had no significant change. Compared with the control group, the change of levels of IFN- γ and IL-4 in serum of middle and high dose group was not obvious and the ratio of IFN- γ /IL-4 was basically equivalent($P > 0.05$). Conclusion: Modified Bazheng san can regulate the balance of Th1/Th2 by improve body response level of Th2, so as to achieve the purpose of treating CAP.

Keywords: Chronic abacterial prostatitis(CAP); Bazheng san; Interferon- γ ; Interleukin-4; Helper T cell 1/ helper T cell 2; Animal experiment; Rats

慢性非细菌性前列腺炎(Chronic abacterial prostatitis, CAP)是男科门诊中最为常见的前列腺炎疾患,约占前列腺炎综合征的90%~95%^[1]。Th细胞即辅助性T淋巴细胞,根据其产生细胞因子的不同,将其分为Th1、Th2两种亚型。Th1型细胞主要分泌干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- β (TNF- β)等促炎因子,主要介导细胞免疫;Th2型细胞主要分泌白介素-4(IL-4)、白介素-5(IL-5)、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)、白介素-13(IL-13)等抗炎因子,刺激B细胞产生抗体,促进体液免疫反应。Th1/Th2型细胞间生理性平衡稳态对机体正常免疫功能的维持起着重要作用,一旦这种稳态被打破而发生病理性漂移,机体就会趋向发病状态。近年来越来越多的学者研究发现,自身免疫和T细胞异常的增殖反应可能参与了CAP的发病过程^[2]。本实验应用八正散加减方对CAP模型鼠进行干预,检测其血清中IFN- γ 和IL-4的含量,探讨八正散加减方对Th1/Th2平衡稳态的复建作用,为临床上应用八正散加减方治疗CAP提供理论依据。

1 材料与方

1.1 实验动物 选取15月龄雄性清洁级SD大鼠60只,体质量450~600g,由成都中医药大学实验动物中心提供(川实动管227号),实验期间饲养于室温控制在(22±3.0)℃,相对湿度40%~60%,自由摄食全价大颗粒饲料、饮水,适应性饲养1周。

1.2 试剂与药物 八正散加减方:药方由瞿麦、篇蓄、车前子、土鳖虫、琥珀、甘草、滑石、川木通8味中药组成,比例按1.5:1.5:1.5:1.5:1.0:1.0:2.0:0.6,所有药材均购自成都中医药大学附属医院中药房。人和大鼠按体表面积折算的等效剂量比率为人(70.0kg):大鼠(200g)=1:0.018,计算每只大鼠每天剂量。将一定量的中药置煎煮容器内,加相当

药材5倍量的冷水浸泡1h,煮沸30min过滤。药渣再加3倍量的水,继续煎煮20min,过滤,合并两次滤液。水煎剂于开始灌胃的前1天制备完成,置于4℃冰箱保存备用。Rat IFN- γ ELISA kit: Abcam公司,货号:E-30652,规格:48孔/盒,北京永辉生物科技有限公司进口分装;Rat IL-4 ELISA kit: Abcam公司,货号:E-30645,规格:48孔/盒,北京永辉生物科技有限公司进口分装。

1.3 仪器与设备 计算机(型号:TFT185W80PS),冠捷显示科技有限公司生产;酶标仪(型号:Multiskan Mk3),赛默飞世尔仪器有限公司生产;优普超纯水制造系统(型号:UPH-10T),成都超纯科技有限公司生产;电子恒温水浴锅(型号DZKW-4),北京中兴伟业仪器有限公司;手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器(型号:SYQ-DSX-280B),上海申安医疗器械厂生产;微波炉(型号:MF-2270EQ),青岛海尔微波制品有限公司;移液枪,规格:1000 μ L、200 μ L、20 μ L、10 μ L、2 μ L,大龙兴创实验仪器(北京)有限公司生产;枪头,规格:1000 μ L、200 μ L、20 μ L,美国Axygen公司生产;EP管,规格:1.5mL、0.2mL、100 μ L,美国Axygen公司生产。

1.4 动物分组、模型制备及给药 将60只大鼠采用随机数字表法分为6组:空白对照组(空白组)、CAP模型组(模型组)、CAP+前列腺炎胶囊组(对照组)、CAP+八正散加减方低剂量治疗组(低剂量组)、CAP+八正散加减方中剂量治疗组(中剂量组)、CAP+八正散加减方高剂量治疗组(高剂量组),每组10只。大鼠非细菌性前列腺炎动物模型参见文献^[3]制作,具体方法:模型组、对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组大鼠均用25%乌拉坦按1g/kg量,经腹腔注射麻醉,无菌条件下做去势手术,术后放回鼠笼,密切观察。于术后第2天皮下

注射苯甲酸雌二醇 0.25 mg/kg, 每天 1 次, 连续 30 天。空白组不做任何处理, 正常喂养。在最后 1 次皮下注射苯甲酸雌二醇后第 2 天, 低剂量组、中剂量组、高剂量组分别给予 3.12 g/(kg·d)、6.24 g/(kg·d)、12.48 g/(kg·d)(分别相当于推荐临床试验 70 kg 成人日用剂量的 5 倍、10 倍、20 倍)八正散加减方水煎剂灌胃; 对照组给予前列通瘀胶囊 3.9 g/(kg·d)(相当于临床试验 70 kg 成人日用剂量的 20 倍)灌胃; 模型组灌服 0.9% 的生理盐水。采用等容积不等浓度药液法给药, 0.1 mL/10g 体质量连续用药 4 周。每 7 天称 1 次体重, 按变化后的体质量调整给药容积。

1.5 取材 处死大鼠前, 取大鼠股动脉血 3 mL, 温室静置 30 min, 离心机离心 30 min, 制备血清 1 mL, 保存于 -20℃ 冰箱中待用; 断头处死后, 剖取大鼠前列腺组织迅速放置于 10% 福尔马林液固定, 24 h 后作冠状面取材, 石蜡包埋, 以备切片用。

1.6 检测方法 应用双抗体夹心法测定大鼠血清中 IFN- γ 、IL-4 水平。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值), 通过标准曲线计算大鼠血清中 IFN- γ 和 IL-4 的浓度。将石蜡包埋的前列腺组织, 切片厚度 2~3 μ m, 苏木素-伊红(HE)染色, 镜下观察病理学改变。

1.7 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件分析数据, 符合正态分布用单因素方差分析, 不符合正态分布用非参数检

验, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用独立 *t* 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况 实验结束时, 剩余大鼠 42 只(空白组 9 只, 低剂量组 8 只, 高剂量组 7 只, 模型组、对照组、中剂量组各 6 只), 死亡原因考虑与造模后切口感染、灌胃不当以及鼠间咬斗等有关。

2.2 各组大鼠前列腺组织的病理图片 见图 1-6。空白组大鼠的前列腺组织结构完整, 不黏连其邻近组织或器官, 容易分离, 质地柔软、色泽鲜亮且富有弹性, 腺泡上皮多为单层柱状或立方状; 腺腔形态大小不一, 皱壁丰富, 腔内仅少量生理性分泌物, 间质无充血水肿, 少见纤维结缔组织和平滑肌。模型组大鼠前列腺组织呈现明显炎性改变, 表现为大鼠前列腺腺体与周围组织黏连, 弹性差, 腺腔缩小, 可见明显的单核细胞和淋巴细胞等炎性细胞浸润于间质内, 纤维组织明显增生。对照组与模型组比较, 少数前列腺腺腔比模型组增大, 腔内分泌物有所增多, 间质内炎性细胞浸润有所减少, 纤维组织增生稍有减少。中、高剂量组有向正常对照组的病理表现靠近的趋势, 组织结构比较完整, 腺体柔软光泽, 与周围组织无明显黏连, 腺泡上皮多为立方状, 无明显的炎性细胞浸润及水肿。低剂量组与模型组病理情况相近, 炎症消退不明显。

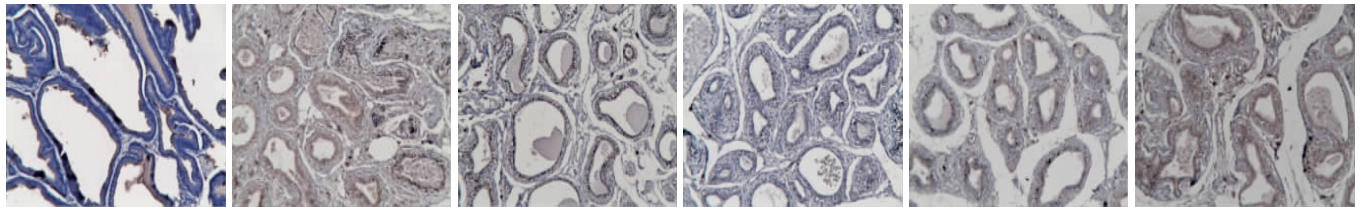


图 1 空白组(x200) 图 2 模型组(x200) 图 3 对照组(x200) 图 4 高剂量组(x200) 图 5 中剂量组(x200) 图 6 低剂量组(x200)

2.3 各组大鼠血清中 IFN- γ 和 IL-4 含量比较 见表 1。与空白组比较, 模型组血清中 IFN- γ 水平明显升高($P < 0.05$), 说明造模成功。与模型组比较, 对照组、中剂量组、高剂量组血清中 IFN- γ 水平明显下降, IL-4 水平明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 低剂量组血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平无明显变化。与对照组比较, 中剂量组、高剂量组血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平变化不明显, 差异无统计学意义。

2.4 各组大鼠 IFN- γ /IL-4 比较 见表 2。与空白组比较, 模型组 IFN- γ /IL-4 比值有明显增高($P < 0.05$), 说明造模成功。与模型组比较, 对照组、中剂量组、高剂量组 IFN- γ /IL-4 比值明显减小, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 低剂量组血清中 IFN- γ /IL-4 比值水平无明显变化。与对照组比较, 中剂量组、高剂量组 IFN- γ /IL-4 比值大小基本相当, 无统计学意义。

表 1 各组大鼠血清中 IFN- γ 和 IL-4 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN- γ (ng/L)	IL-4(ng/L)
空白组	9	940.11 \pm 50.06	110.58 \pm 10.21
模型组	6	1180.95 \pm 87.16 ^①	120.11 \pm 9.33
对照组	6	962.64 \pm 80.05 ^②	185.49 \pm 12.22 ^②
低剂量组	8	1141.62 \pm 97.50	123.57 \pm 6.65
中剂量组	6	970.09 \pm 55.85 ^②	183.64 \pm 13.66 ^②
高剂量组	7	985.39 \pm 45.77 ^②	171.25 \pm 12.02 ^②

与空白组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.01$

表 2 各组大鼠 IFN- γ /IL-4 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN- γ /IL-4
空白组	9	8.50
模型组	6	9.71 ^①
对照组	6	5.19 ^②
低剂量组	8	9.43
中剂量组	6	5.25 ^②
高剂量组	7	5.28 ^②

与空白组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.01$

3 讨论

研究发现, Th1 与 Th2 型细胞间的动态平衡对机体正常免疫功能的维持有着重要意义, 如果这种稳态被病理性漂移的稳态所取代, 机体就会趋向某种病态^[4]。随着对免疫学研究的不断深入, 免疫因素在 CAP 发病中的作用越来越受到重视。国内学者研究表明, CAP 患者体内存在 Th1/Th2 平衡失调, Th1 型免疫反应模式占优势状态, 提示 Th1 型细胞的过分化在 CAP 的发生中可能起重要作用^[5-6]。另外, 动物实验研究也表明, 模型组 Th1/Th2 比值明显升高, 支持慢性非细菌性前列腺炎发病中存在 Th1/Th2 比值失衡学说^[7]。由于目前缺乏公认的 Th1 和 Th2 细胞特异性膜表面标记蛋白, 而 IFN- γ 和 IL-4 又分别被视为 Th1 和 Th2 特异性细胞因子, 故通过检测 IFN- γ 和 IL-4 水平可了解 Th1/Th2 细胞的漂移情况。

前列腺为男子胞, 归属肾系, 属奇恒之腑, 病机上易虚易实, 治疗上宜补也宜泻。慢性非细菌性前列腺炎属于中医淋症、精浊、白淫等病症范畴, 临床上历代医家多从湿热、血瘀、肾虚进行论治。随着人们生活水平的提高和社会节奏的加快, 出现了嗜食肥甘、少劳多逸、生存压力加大的局面, 致使具有湿热质、瘀血质等实体质的患者越来越多。李兰群等研究表明, 慢性前列腺炎以邪实证为主, 湿热、血瘀、肝郁多交互为患; 虚证多为兼夹证, 较少见^[8]。在中医里, 八正散是治疗热淋的经典名方, 出自宋代《太平惠民和剂局方》, 八正散中的栀子、大黄主要有清泻三焦实火、泻下攻积、凉血解毒之功效, 且两味中药皆性味苦寒, 易伤中焦脾胃, 致使需长期服药的慢性前列腺炎患者不能耐受; 其归经不入肾和膀胱, 与湿热下注导致本病的主要病机不相符合, 若长期服用栀子、大黄容易损伤正气。常德贵教授根据临床经验, 去其苦寒的大黄、栀子, 选加平和的土鳖虫、琥珀, 化裁而成八正散加减方(又名八琥散)用于治疗慢性前列腺炎, 其疗效满意^[9]。

本课题应用八正散加减方对 CAP 模型鼠进行干预, 结果显示慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠体内 Th1/Th2 型细胞间的平衡被向 Th1 型方向的病理性漂移所取代, 提示 Th1 型免疫应答模式处于优势状态, 而八正散加减方药物干预之后, 中剂量、高剂量组大鼠血清中的 IFN- γ 浓度显著降低, IL-4 浓度显著升高, 向 Th1 型方向的病理性漂移得到明显抑制, 与

模型组比较具有统计学差异($P < 0.01$), 说明经八正散加减方治疗后, 能够提高机体 Th2 型细胞免疫应答水平, 据此对 CAP 发挥治疗作用。与西药相比, 八正散加减方本身就是一个复方, 具有多靶点、多途径的治疗效应, 更为具体、详尽的作用机制仍有待进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] 唐孝达. 慢性前列腺炎 / 慢性盆疼痛综合征诊治中值得商榷的问题[J]. 中华男科学, 2003, 9(6): 403-406.
- [2] Schaeffer AJ, Landis JR, Knauss JS, et al. Demographic and clinical characteristics of men with chronic prostatitis: the national institutes of health chronic prostatitis cohort study [J]. J Urol, 2002, 168(2): 593-598.
- [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] Van Eden W, Van Der Zee R, Van Kooten P, et al. Balancing the immune system: Th1 and Th2 [J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(Suppl1): 25-28.
- [5] 刘大标, 王洪珍, 成晓青, 等. 慢性非细菌性前列腺炎 / 慢性骨盆疼痛综合征患者外周血 Th1/Th2 淋巴细胞比值的免疫学研究[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(30): 4131-4132.
- [6] 刘海红, 夏欣一, 吴永明, 等. 慢性非细菌性前列腺炎 / 慢性骨盆疼痛综合征患者外周血 Th1/Th2 细胞的检测[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(4): 330-332.
- [7] 邱永生, 周璐, 余锦屏, 等. 前列汤对实验性慢性非细菌性前列腺炎大鼠 Th1/Th2 细胞平衡的影响[J]. 江西中医药, 2009, 40(7): 22-23.
- [8] 李兰群, 李海松, 郭军, 等. 慢性前列腺炎中医证型临床调查[J]. 中华中医药杂志, 2013, 26(3): 451-454.
- [9] 常德贵, 王同庆, 魏永进, 等. 八正散加减方治疗湿热下注型慢性前列腺炎排尿症状的临床研究[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(7): 664-668.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)