

圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎的治疗作用及机制研究

屠凌岚^{1,2}, 郑晓亮^{1,2}, 程丽艳¹, 颜冬梅^{1,2}, 郑高利^{1*}¹浙江省医学科学院药物研究所; ²浙江省医学科学院分子医学中心, 杭州 310013

摘要: 本文研究圆锥铁线莲水提取物对实验性慢性非细菌性前列腺炎的治疗作用, 并对其抗炎的作用机制进行初步探讨。采用苯甲酸雌二醇致去势大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型, 研究圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎的治疗作用。酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测血清细胞因子白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的水平, Western Blot 和免疫组化法检测前列腺组织环氧酶 2 (COX-2) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的变化, 探讨圆锥铁线莲发挥抗炎作用的可能机制。研究发现苯甲酸雌二醇致去势大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型中, 圆锥铁线莲 2 g/kg 组可见前列腺液中白细胞数明显降低, 卵磷脂小体数量明显增加; 病理切片可见炎症细胞浸润和成纤维细胞增生的情况有所改善。圆锥铁线莲能明显降低苯甲酸雌二醇致去势大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型血清中 IL-1 β 及 TNF- α 的含量, 减少前列腺组织中 COX-2 和 iNOS 的表达。表明圆锥铁线莲水提取物对慢性非细菌性前列腺炎具有良好的抑制作用, 其作用机制可能是通过调节炎症细胞因子水平、抑制 COX-2 以及 iNOS 的表达, 从而避免局部产生过量的前列腺素 (PG) 和一氧化氮 (NO), 减轻局部炎性损伤实现的。

关键词: 非细菌性前列腺炎; 圆锥铁线莲

中图分类号: R932

文献标识码: A

Protective Effects of *Clematis terniflora* DC. on Chronic Abacterial Prostatitis in Rats and Its Mechanism

TU Ling-lan^{1,2}, ZHENG Xiao-liang^{1,2}, CHENG Li-yan¹, YAN Dong-mei^{1,2}, ZHENG Gao-li^{1*}¹Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences; ²Center for Translational Molecular Medicine, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China

Abstract: To investigate the protective effects of *Clematis terniflora* DC. on chronic abacterial prostatitis (CAP) in rats and its possible mechanism. The CAP rat models were established by estrogen induction to observe the protective effects of *Clematis terniflora* DC. The levels of IL-1 β and TNF- α in serum were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the expression of iNOS and COX-2 were evaluated by Western Blotting and immunohistochemistry. The number of white blood cells was obviously decreased, the density of lecithin corpuscle in prostatic secretion was increased and the edema, inflammatory infiltration and proliferation of prostate were partly recovered by *C. terniflora* in estradiol benzoate-induced chronic abacterial prostatitis rats. *C. terniflora* can obviously reduce the level of IL-1 β and TNF- α in serum and the expression of iNOS and COX-2 in prostate tissue. These results demonstrated that *C. terniflora* had protective effects on chronic abacterial prostatitis. Participation of immune regulation and inhibiting COX-2 and iNOS expression may be the possible mechanisms.

Key words: Abacterial Prostatitis; *Clematis terniflora* DC.

非细菌性前列腺炎是男科与泌尿科的常见疾病之一, 其发病缓慢, 病因病理复杂, 包括感染、自身免疫反应和骨盆肌肉痉挛等; 临床症状表现多样化, 主要表现为会阴或阴囊痛、排尿和下尿道刺激症状、前

列腺分泌增加等; 并发症较多, 病程迁延, 反复发作, 经久难愈, 是一种较顽固的慢性炎症。中药治疗慢性非细菌性前列腺炎由来已久。中医认为, 慢性非细菌性前列腺炎其主要病机病理是下焦湿热, 久之精室被扰, 精关不固, 封藏失职。本病不仅是一个简单的局部病症, 也是一种内分泌及免疫系统失调的全身性疾病, 清热解毒为治疗慢性非细菌性前列腺

收稿日期: 2014-03-06 接受日期: 2014-08-15

基金项目: 浙江省医学重点学科群建设项目 (XKQ-010-001); 浙江省科技计划项目 (2012F10005, 2007R20009)

* 通讯作者 Tel: 86-571-88215620; E-mail: gaoli-z@163.com

炎的一大法则^[1]。圆锥铁线莲(*Clematis terniflora* DC.)属于铁线莲属(*Clematis*),分布于低海拔(≤600 m)山区,作为中药及民间草药已有很长的历史,在中医临床和民间常用做利尿通淋或祛风止痛类药物,全草用于治疗慢性咽炎和慢性前列腺炎等,有较高的药用价值^[2]。本文研究圆锥铁线莲水提取物对实验性慢性非细菌性前列腺炎的治疗作用,并对其抗炎的作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

圆锥铁线莲水提取物浸膏,含生药 1.18 g/g,由本室自制。高剂量组称取 1.7 g 浸膏,加 20 mL 纯净水,给药体积 0.2 mL/10g,灌胃给药每天 1 次,相当于生药 2 g/kg 的剂量;低剂量为高剂量对半稀释,即为 1 g/kg;阳性对照药物舍尼通购自南京美瑞制药有限公司,批号 20100102;苯甲酸雌二醇购自上海通用药业股份有限公司,批号 100702;兔抗大鼠 COX-2、iNOS、GAPDH 多克隆抗体、Rabbit ABC Staining System 免疫组化试剂盒均购自 SANTA CRUZ 公司;ELISA 试剂盒购自 Bender Med Systems 公司。

1.2 实验动物与分组

SD 大鼠,清洁级,雄性,250~300 g,购自浙江省实验动物中心,实验动物合格证号:SCXK(浙)2008-0033;50 只大鼠随机分成 5 组:正常对照组、模型组、舍尼通组(60 mg/kg)、圆锥铁线莲水提取物高剂量组(2 g/kg)、圆锥铁线莲水提取物低剂量组(1 g/kg)。

1.3 苯甲酸雌二醇致去势大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型

SD 大鼠以戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,仰卧位固定,剪除阴囊部被毛,在阴囊中间纵行剪一约 1 cm 长切口,将双侧睾丸分别挤出阴囊,在睾丸根部结扎切断,止血后缝合皮下组织及皮肤,术后连续 3d 每只肌注青霉素 4 万单位,术后第 7 d 将去势大鼠随机分组给药,同时每日皮下注射苯甲酸雌二醇 0.25 mg/kg 诱导去势大鼠慢性非细菌性前列腺炎^[3]。

1.4 样本采集

末次给药后取血,断颈处死大鼠,剖取前列腺侧叶,肉眼观察前列腺病变状态并称湿重,计算前列腺指数;取前列腺按摩液 5 μL 加入 195 μL 白细胞稀释液中,光学显微镜下计数白细胞总数;取一滴前列腺液涂片,镜下观察卵磷脂小体密度,评分标准为:

卵磷脂小体满视野为 4 分,1/2 视野为 3 分,1/4 视野为 2 分,低倍镜下仅见数个为 1 分;取一侧组织制备成组织匀浆,分装并在 -80 °C 冰箱冻存备用;取另一侧组织置于 10% 福尔马林溶液中固定,常规脱水透明,制备石蜡切片,用于 HE 染色后于光学显微镜下观察组织形态变化,或免疫组化法检测组织中 COX-2 及 iNOS 的表达。

1.5 ELISA 法检测血清 IL-1β、TNF-α 的含量

按照试剂盒说明书建议的实验流程操作,取大鼠动脉血,室温自然凝固 20 min,3000 rpm × 20 min 离心,收集上清,加入预包装的反应板中,37 °C 孵育 2 h 后洗涤,加入酶结合物,37 °C 孵育 2 h 后洗涤,加入底物溶液并室温反应 30 min 后以 Bio-Rad 公司 Model 680 型酶标仪检测波长 490 nm 时各反应孔吸光度值。

1.6 免疫组化法检测前列腺组织 COX-2 及 iNOS 的表达

按照试剂盒说明书建议的实验流程操作,采用 SABC 法,将组织切片二甲苯脱蜡,梯度酒精复水,微波修复抗原 5 min,3% 过氧化氢处理 20 min 以抑制内源性过氧化物酶活性,正常羊血清孵育 20 min 封闭抗原以减少非特异性背景,一抗工作浓度 1:150,4 °C 孵育过夜,生物素化二抗孵育 20 min,链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC 复合物)孵育 20 min,三氨基联苯二胺(DAB)显色,自来水冲洗终止反应,苏木素复染,脱水,透明,封片。Olympus 光学显微镜下观察 COX-2 及 iNOS 的表达。实验中用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.7 Western blot 法检测前列腺组织 COX-2 及 iNOS 的表达

前列腺组织匀浆解冻后于 4 °C 12000 rpm × 10 min 离心,收集上清,考马氏亮蓝染色法测定总蛋白浓度;制备 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每孔加相同浓度蛋白样品,应用 Bio-Rad Mini-PROTEAN 电泳仪电泳后通过 Bio-Rad 电转移仪将蛋白转印到硝酸纤维素滤膜;5% 脱脂奶粉 TBS 缓冲液封闭 2 h,4 °C 下一抗孵育过夜后 TBS 洗膜 3 次,加入二抗后孵育 2 h,TBS 洗 5 次后加入 ECL 孵育 1 min,暗室中显影、定影后曝光压片。

1.8 数据统计

所有计量数据均表示为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),采用 SPSS Statistics 17.0 软件进行统计分析,组间比

较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为统计学差异有显著性;病理结果采用 Ridit 法统计。

2 实验结果

2.1 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠前列腺液的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠前列腺液中的

表 1 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠前列腺液的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of *C. terniflora* on prostatic fluid of chronic abacterial prostatitis rats ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 Group | 剂量 Dose (g/kg) | 侧叶前列腺湿重指数 Index of lateral lobe prostate wet weight | 白细胞数 Leukocyte number ($10^6/\text{mL}$) | 卵磷脂小体密度 Lecithin density |
|-------------------|-------------------|--|--|-----------------------------|
| 正常对照 Control | - | 17.5 ± 3.6 | 9.0 ± 2.4 | 3.5 ± 0.5 |
| 模型 Model | - | 6.7 ± 1.3 # | 51.9 ± 15.8 # | 1.0 ± 0.8 # |
| 舍尼通 Cer-nilton | 0.06 | 7.3 ± 1.3 | 38.7 ± 12.0 * | 2.4 ± 0.7 ** |
| 铁线莲高剂量 Clematis-H | 2 | 6.9 ± 1.2 | 39.4 ± 8.8 * | 2.2 ± 0.9 ** |
| 铁线莲低剂量 Clematis-L | 1 | 7.1 ± 1.1 | 50.6 ± 13.6 | 1.5 ± 1.2 |

注:与正常对照组比较, # $P < 0.05$;与模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, # $P < 0.05$; Compare with model, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.2 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠前列腺组织病理变化的影响

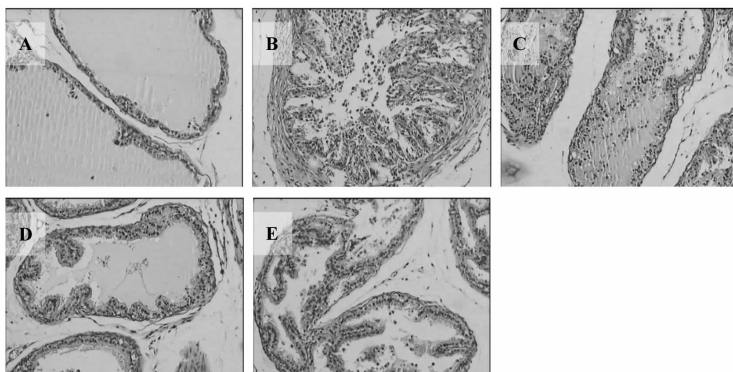
正常对照组大鼠侧叶前列腺腺体大小不一,腺腔较大,腺腔内有大量粉红色的分泌物;模型组大鼠侧叶前列腺间质中可见程度不等的淋巴细胞、单核细胞等炎症细胞浸润和成纤维细胞增生,致间质明显增宽,腺腔明显变小,腺腔内分泌物明显减少,甚至无分泌物。与模型组比较,圆锥铁线莲 2 g/kg 组大鼠侧叶前列腺间质中炎症细胞浸润和成纤维细胞增生均显著减轻,腺腔扩大,腔内有较多分泌物,多数前列腺形态结构基本正常(图 1),其治疗作用与阳性对照药物舍尼通组相当;对前列腺组织炎症细

卵磷脂小体密度明显减少,白细胞数显著增加,呈现出慢性前列腺炎的病理变化,表明造模成功。与模型组比较,铁线莲 2 g/kg 组卵磷脂小体密度显著增加,白细胞数显著减少,表明炎症明显改善(表 1),其治疗作用与阳性对照药物舍尼通组相当($P > 0.05$)。

胞浸润、成纤维细胞增生、腺腔大小及腺腔内分泌物多少四个指标评分并对分值进行 Ridit 统计,结果显示圆锥铁线莲对前列腺炎病理变化有显著的改善作用(表 2、3),其治疗作用与舍尼通组相当($P > 0.05$)。

2.3 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠血清炎症因子表达的影响

与正常对照组比较,模型组 IL-1 β 、TNF- α 含量均显著高于正常对照组,圆锥铁线莲 2 g/kg 组及 1 g/kg 组均能明显减低血清中 IL-1 β 、TNF- α 含量(表 4)。



A: Control; B: Model; C: Cer-nilton; D: Clematis 2 g/kg; E: Clematis 1 g/kg

图 1 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠前列腺组织病理变化的影响

Fig. 1 The pathological changes in prostate tissue of chronic abacterial prostatitis rats treated by *C. terniflora* stained with HE under the light microscope

表 2 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠前列腺组织病理学的影响 ($n = 10$)Table 2 Effect of *C. terniflora* on pathological changes in prostate tissue of chronic abacterial prostatitis rats ($n = 10$)

| 组别 Group | 剂量 Dose (g/kg) | 炎症细胞浸润和成纤维细胞增生 Infiltration of inflammatory cells and proliferation of fibroblast | | | | 腺腔大小及腺腔内分泌物多少 The cavity size and secretions of glandular | | |
|-------------------|-------------------|---|---|----|-----|--|---|----|
| | | - | + | ++ | +++ | - | + | ++ |
| 正常对照 Control | - | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 |
| 模型 Model | - | 0 | 0 | 2 | 8 | 0 | 0 | 10 |
| 舍尼通 Cer-nilton | 0.06 | 2 | 4 | 3 | 1 | 2 | 6 | 2 |
| 铁线莲高剂量 Clematis-H | 2 | 1 | 4 | 2 | 3 | 1 | 6 | 3 |
| 铁线莲低剂量 Clematis-L | 1 | 0 | 4 | 2 | 4 | 0 | 6 | 4 |

注:表中所示为发生该等级病理变化的动物数。

Note: Number of animals listed in the table for the occurrence of pathological changes in the level.

表 3 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠前列腺组织病理学影响 Ridit 统计结果

Table 3 Results of Ridit Statistics for the pathological changes in prostate tissue of chronic abacterial prostatitis rats treated with *C. terniflora*

| 组别 Group | 剂量 Dose (g/kg) | 炎症细胞浸润和成纤维细胞增生 Infiltration of inflammatory cells and proliferation of fibroblast | | | 腺腔大小及腺腔内分泌物多少 The cavity size and secretions of glandular | | |
|-------------------|-------------------|---|--|----------------|--|--|----------------|
| | | Ridit 均值 Ridit Mean | 95% 可信限 95% Confidence Intervals | P 值 P Value | Ridit 均值 Ridit Mean | 95% 可信限 95% Confidence Intervals | P 值 P Value |
| 正常对照 Control | - | 1.000 | 0.817 ~ 1.183 | < 0.05 | 1.000 | 0.817 ~ 1.183 | < 0.05 |
| 模型 Model | - | 0.500 | 0.317 ~ 0.683 | - | 0.500 | 0.317 ~ 0.683 | - |
| 舍尼通 Cer-nilton | 0.06 | 0.910 | 0.727 ~ 1.093 | < 0.05 | 0.900 | 0.717 ~ 1.083 | < 0.05 |
| 铁线莲高剂量 Clematis-H | 2 | 0.800 | 0.617 ~ 0.983 | < 0.05 | 0.850 | 0.667 ~ 1.033 | < 0.05 |
| 铁线莲低剂量 Clematis-L | 1 | 0.740 | 0.557 ~ 0.923 | < 0.05 | 0.800 | 0.617 ~ 0.983 | < 0.05 |

表 4 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠血清炎症因子表达的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of *C. terniflora* on serum inflammatory cytokines of chronic abacterial prostatitis rats ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 Group | 剂量 Dose (g/kg) | IL-1 β (pg/mL) | TNF- α (pg/mL) |
|-------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| 正常对照 Control | - | 42.0 \pm 10.8 | 60.8 \pm 14.8 |
| 模型 Model | - | 75.1 \pm 17.0 # | 86.3 \pm 20.3 # |
| 舍尼通 Cer-nilton | 0.06 | 41.0 \pm 16.6 ** | 61.0 \pm 19.5 ** |
| 铁线莲高剂量 Clematis-H | 2 | 48.1 \pm 16.2 ** | 59.4 \pm 19.4 ** |
| 铁线莲低剂量 Clematis-L | 1 | 53.7 \pm 18.7 * | 70.6 \pm 16.6 * |

注:与正常对照组比较, # $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

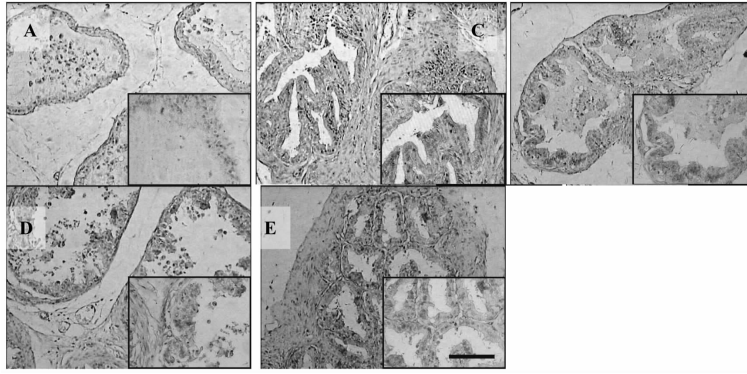
Note: Compare with control, # $P < 0.01$; Compare with model, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.4 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎大鼠前列腺组织内 iNOS 及 COX-2 表达的影响

免疫组化实验检测结果显示,正常对照组大鼠前列腺组织内 iNOS 和 COX-2 表达均为阴性;模型组前列腺上皮细胞胞浆内 iNOS 和 COX-2 呈棕褐色阳性表达;圆锥铁线莲 2 g/kg 组细胞胞浆呈浅棕黄

色, iNOS 和 COX-2 均呈弱阳性表达,与模型组相比表达明显减弱(图 2、3)。

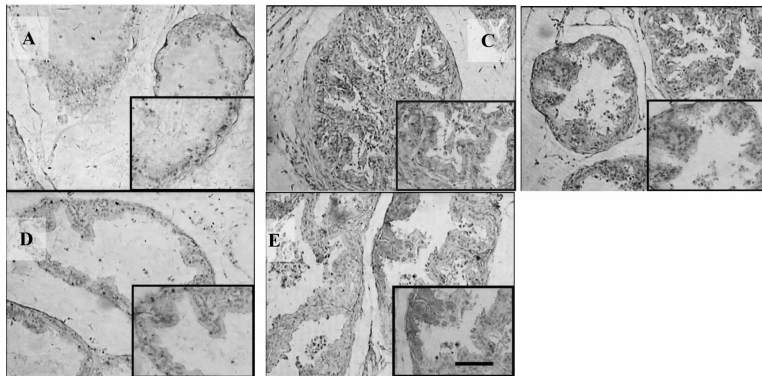
Western Blot 检测结果显示,与正常对照组相比,模型组大鼠前列腺组织 COX-2 和 iNOS 的表达显著增强;与模型组相比,圆锥铁线莲 2 g/kg 和 1 g/kg 组 COX-2 和 iNOS 的表达显著减少(图 4)。



A: Control; B: Model; C: Cer-nilton; D: Clematis 2 g/kg; E: Clematis 1 g/kg (Bar = 50 μ m)

图2 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠前列腺组织 iNOS 表达的影响

Fig. 2 The iNOS level in prostate tissue of chronic abacterial prostatitis rats treated with *C. terniflora*



A: Control; B: Model; C: Cer-nilton; D: Clematis 2 g/kg; E: Clematis 1 g/kg (Bar = 50 μ m)

图3 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠前列腺组织 COX-2 表达的影响

Fig. 3 The COX-2 level in prostate tissue of chronic abacterial prostatitis rats treated with *C. terniflora*

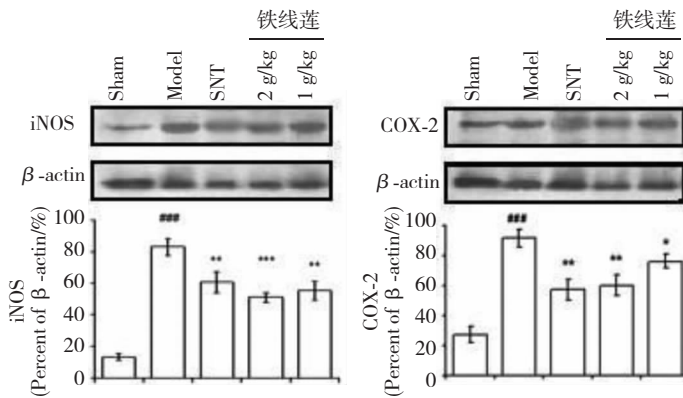


图4 圆锥铁线莲对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠前列腺组织 iNOS 和 COX-2 表达的影响

Fig. 4 The iNOS and COX-2 level in prostate tissue of chronic abacterial prostatitis rats treated with *C. terniflora*

3 讨论

实验结果证明圆锥铁线莲水提取物对苯甲酸雌二醇诱导的去势大鼠慢性非细菌性前列腺炎具有良

好的治疗作用,同时发现血清炎症细胞因子水平、前列腺组织炎症相关因子 COX-2 和 iNOS 的表达均显著降低。

多项研究表明大鼠体内类固醇激素水平的变化

是引起慢性非细菌性前列腺炎的一个重要因素^[4-6]。Seethalakshmi 等研究证实注射 17β -雌二醇可诱导大鼠前列腺炎症,表现为淋巴细胞浸润、肥大细胞浸润和组胺释放肽增加,据此推断这种方法诱导的前列腺炎是由免疫细胞介导的自身免疫性的炎症,其病理表现非常接近于临床慢性非细菌性前列腺炎^[7]。本实验参考了这种方法来构建慢性非细菌性前列腺炎模型,实验中模型组白细胞明显升高,卵磷脂小体明显减少,病理呈现慢性炎症表现,最大程度模拟临床疾病的特点。

细胞因子是免疫和炎症细胞产生的调节局部和全身免疫反应的小分子蛋白,其主要作用是通过信号转导调节机体的免疫反应,决定炎症反应的类型和持续时间。现已发现细胞因子与某些免疫性疾病、感染性疾病有关。前炎症细胞因子在组织的炎症反应过程中起促进作用,而抗炎症细胞因子可抑制炎症反应及促进组织的修复和再生。两者的平衡将影响组织创伤和炎症的结局^[8]。前列腺组织的炎症是以细胞因子为中介产生的连锁反应。

本实验中圆锥铁线莲能缓解炎症引起的促炎性细胞因子的增高,提示其抗炎的机理可能是通过抑制 IL- 1β , TNF- α 等细胞因子的产生和分泌,降低其表达水平,从而抑制免疫过反应,减轻由此引起的炎症损伤;同时抑制 COX-2 以及 iNOS 的表达,避免局部产生过量的 PG 和 NO,减轻局部炎性损伤,达到治疗的目的。结果提示圆锥铁线莲具有抑制雌激素诱导的炎症的作用可能是由于其具有一定的免疫调节作用,从而抑制了由于激素异常变化引起的免疫性炎症。而这正验证民间认为这种植物具有祛风除湿,凉血消肿的功效。

参考文献

- 1 Qian BC (钱伯初), Shi H (史红). Progress in studies on traditional Chinese medicine and clinical research of chronic prostatitis. *Zhejiang J Integr Tradit Chin Western Med* (浙江中西医结合杂志), 2002, 12(2): 67-68.
- 2 Chen RZ, Cui L, Guo YG, et al. *In vivo* study of four preparative extracts of *Clematis terniflora* DC. for antinociceptive activity and anti-inflammatory activity in rat model of carrageenan-induced chronic non-bacterial prostatitis. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134: 1018-1023.
- 3 Qian BC (钱伯初), Shi H (史红), Zheng XL (郑晓亮). Progress in research on animal models of chronic nonbacterial prostatitis. *Chin J Clin Pharmacol Therapeutics* (中国临床药理学与治疗学), 2007, 12: 14-18.
- 4 Naslund MJ, Strandberg JD, Coffey DS. The role of androgens and estrogens in the pathogenesis of experimental nonbacterial prostatitis. *J Urol*, 1988, 140: 1049-1053.
- 5 Robinette CL. Sex-hormone-induced inflammation and fibromuscular proliferation in the rat lateral prostate. *Prostate*, 1988, 12: 271-286.
- 6 Krieg M, Nass R, Tunn S. Effect of aging on endogenous level of 5α -dihydrotestosterone, testosterone, estradiol and estrogen in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin En Met*, 1993, 77: 375-381.
- 7 Seethalakshmi L, Bala RS, Malhotra RK, et al. 17 beta-Estradiol induced prostatitis in the rat is an autoimmune disease. *J Urol*, 1996, 156: 1838-1842.
- 8 Hochreiter WW. Male accessory gland infection; standardization of inflammatory parameters including cytokines. *Andrologia*, 2003, 35: 300-303.