

白细胞介素-1 β 在SD大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型中的表达及其意义

张礼刚^{1,2}, 骆广跃^{1,2}, 张力^{1,2}, 陈先国^{1,2}, 梁朝朝^{1,2}

摘要 目的 通过构建雄性SD大鼠慢性非细菌性前列腺炎(CNP)模型研究白细胞介素-1 β (IL-1 β)的表达,探讨IL-1 β 在CNP中的可能发挥的作用。方法 取3月龄雄性SD大鼠30只随机分为正常对照组和CNP模型组,每组15只。造模后通过HE染色观察两组大鼠前列腺组织炎症浸润情况,并应用Western blot法、免疫组化SABC法检测两组SD大鼠前列腺组织中IL-1 β 表达情况。结果 HE染色结果证实成功构建出SD大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型,Western blot法、免疫组化法检测都显示CNP模型组IL-1 β 的表达水平均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 IL-1 β 在SD大鼠CNP模型中表达水平增高,在前列腺炎的发生发展过程中起着重要作用。

关键词 白细胞介素-1 β ;慢性非细菌性前列腺炎;大鼠动物模型

中图分类号 R 697+.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0843-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.014

慢性前列腺炎(chronic prostatitis, CP)是泌尿男科的常见病和多发病,最近我国的一项大样本流行病学调查显示中国男性前列腺炎样症状发生率约为8.4%^[1],其主要表现为下腹及会阴部耻骨区疼痛不适、排尿异常,并且可导致男性功能障碍和男性不育,严重影响着患者的生活质量与身心健康。CP主要分为细菌性和非细菌性,其中约90%为慢性非细菌性前列腺炎(chronic nonbacterial prostatitis,

CNP)。由于目前对CNP的发病机制及病理生理改变的认识还不清楚,因此治疗上主要是对症治疗,以致治疗效果不佳,治愈率低,复发率高,使患者承受着严重的经济和心理负担^[2]。研究^[3]显示,细胞因子在调节免疫应答、炎症反应和参与组织修复过程中起着重要作用。而CNP的病理过程常伴有众多的炎症因子的改变,其在炎症局部的病理变化可能对前列腺炎的发生、发展和转归产生重要影响。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)是一种重要的促炎反应介质,该研究通过构建SD大鼠CNP模型,检测细胞因子IL-1 β 的表达水平,旨在为CNP的基础研究及诊疗措施提供一种新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠40只,3月龄,250~350 g,饲养于安徽省实验动物中心动物房(SPF级)相对湿度50%~70%,室温20~26℃,光照黑暗各12 h,自由摄食饮水。

1.2 主要试剂与仪器 完全弗氏佐剂(美国Sigma公司);BCA法测蛋白浓度试剂盒(上海碧云天生物技术公司);兔多克隆抗IL-1 β 抗体(英国Abcam公司,货号:ab9722);山羊抗兔IgG-HRP(美国Santa Cruz公司);SABC免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物有限公司);青霉素(国药准字H13020426,华北制药股份有限公司);Chemscope 5600化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);ELx800酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);超净工作台(苏州净化设备公司);高速冷冻离心机(美国Thermo公司)。

1.3 SD大鼠前列腺蛋白提纯液的制备 随机取10只雄性SD大鼠,脊髓离断处死,局部皮肤消毒,下腹正中切口,取出前列腺,剔除多余脂肪组织及纤维结缔组织,称重后用冷生理盐水洗净,加入含0.5% Triton X-100等重的生理盐水溶液(预先高温灭菌),用匀浆器制成匀浆。将匀浆液置入高速冷冻离心机中4℃、10 000 r/min离心30 min,留取上

2017-02-05 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81401518、81370856、81470986);国家临床重点专科(含中医专业)建设项目(2012)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,合肥 230022

²安徽医科大学泌尿外科研究所,合肥 230032

作者简介:张礼刚,男,硕士研究生;

陈先国,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:cxg7866186@126.com;

梁朝朝,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:liang_chaozhao@163.com

清液。以 BCA 法测定上清液的蛋白含量。将前列腺蛋白浓度滴定至 40 mg/ml。然后将完全弗氏佐剂与前列腺蛋白提取液按 1:1 的比例混匀,用乳化匀浆机乳化。

1.4 模型的分组和建立 将 30 只大鼠编号,采用随机数字表法将大鼠分为正常对照组和 CNP 模型组,每组 15 只。采用腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 方法麻醉。正常对照组 SD 大鼠麻醉后下腹部消毒,打开盆腹腔,找到前列腺的两侧叶各注射 0.1 ml 生理盐水,然后关闭腹腔;CNP 模型组 SD 大鼠麻醉后,采用同样方法在前列腺的两侧叶各注入 0.1 ml 乳化的前列腺抗原,然后关闭腹腔。手术结束后保暖至大鼠苏醒,然后每只按 30 万单位/100 g 体重的青霉素皮下注射 1 周。首次免疫造模 4 周后,于大鼠腹侧 2 点及背侧 2 点皮下注射完全弗氏佐剂 0.1 ml。根据既往研究^[4],造模 6 周后炎症反应相对比较稳定,故在 6 周后处死 SD 大鼠留取大鼠前列腺组织。取部分前列腺组织分别放入 10% 福尔马林中固定。剩余组织置于 EP 管中 -80 °C 冷冻保存备用。

1.5 HE 染色 前列腺组织经过 10% 福尔马林固定 24 h,石蜡包埋、切片,常规 HE 染色后光学显微镜下观察各组前列腺组织结构变化及炎症浸润情况。

1.6 Western blot 检测 IL-1 β 的表达 RIPA 裂解液裂解新鲜前列腺组织,提取前列腺总蛋白,使用双缩脲法测定蛋白浓度进行蛋白定量后,蛋白样品与上样缓冲液共同混匀后煮沸 10 min,分离胶浓度为 15%,用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,加入 IL-1 β 一抗 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 4 次,每次 10 min,加入二抗 (山羊抗兔) 37 °C 孵育 1 h,内参采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),采用 ECL 发光试剂显影,Chemscope 5600 化学发光成像系统成像,使用 Image J 进行灰度值测量。

1.7 免疫组化法检测 IL-1 β 的表达 免疫组化 SABC 法操作严格按照说明书进行:组织切片脱蜡、梯度酒精脱水;次碘酸灭活组织内源性过氧化物酶,微波炉抗原修复,山羊血清封闭后滴加兔多克隆抗体 IL-1 β (1:200),阴性对照以 PBS 代替 4 °C 孵育

过夜,次日 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴加生物素化山羊抗兔 IgG,室温 20 min,滴加试剂 SABC,然后 DAB 显色,苏木精轻度复染,中性树脂封片、镜检。随机选取 3 个不连续视野 400 倍镜下拍照,用 Image Pro Plus 分析软件进行阳性染色平均光密度分析。

1.8 统计学处理 运用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 实验动物情况 正常对照组及 CNP 模型组各有 15 只大鼠,其中正常对照组 2 只因术后肠管胀气坏死而死亡,CNP 模型组 1 只大鼠因被其他大鼠撕咬而死亡,其余大鼠均正常存活至实验性处死。

2.1 HE 染色结果 成功构建 SD 雄性大鼠 CNP 模型,正常对照组前列腺腺泡结构完整,腺腔规则,腺腔间质未见明显炎症细胞浸润,前列腺上皮细胞排列较整齐,见图 1A;CNP 模型组腺腔被广泛破坏,间质及腺体内炎性细胞浸润明显,腺腔周围可见明显纤维结缔组织增生,见图 1B。

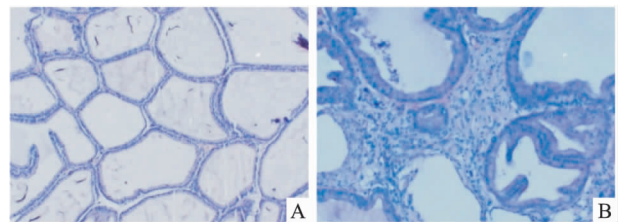


图 1 前列腺组织 HE 染色光镜照片 HE $\times 100$

A: 正常对照组; B: CNP 模型组

2.2 Western blot 检测结果 CNP 模型组前列腺组织中的表达水平高于正常对照组 ($t = 5.268, P < 0.05$),见图 2。

2.3 免疫组化法检测结果 与正常对照组相比,CNP 模型组中前列腺组织的 IL-1 β 的表达水平是增高的,两组指标采用 t 检验进行主体间效应检验 ($t = 14.75, P < 0.05$),差异有统计学意义,见图 3。

3 讨论

CP 是泌尿男科最常见的疾病,其中约 90% 为 CNP,CNP 最近被定义为慢性盆腔疼痛综合征 (chronic pelvic pain syndrome, CPPS),是以盆腔或

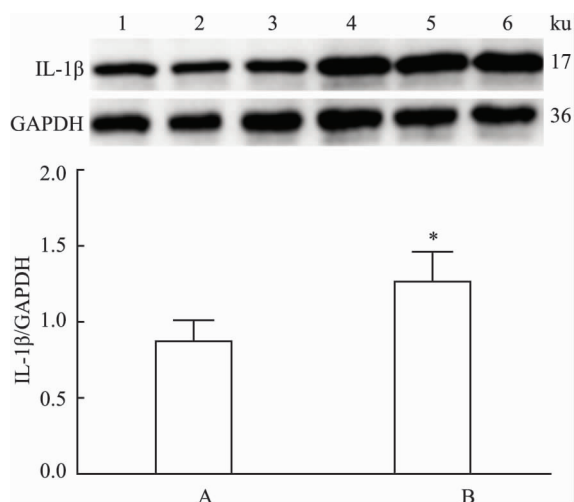


图2 Western blot 法检测各组大鼠前列腺组织 IL-1 β 的表达情况
1、2、3:正常对照组;4、5、6: CNP 模型组;A:正常对照组;B: CNP 模型组;与正常对照组比较:* $P < 0.05$

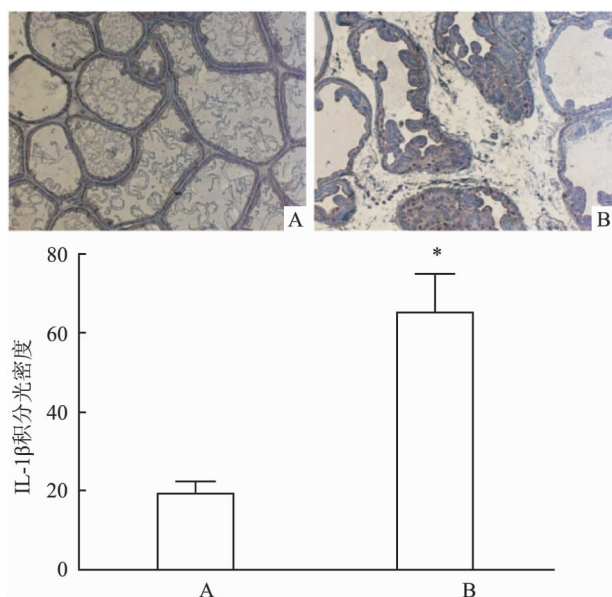


图3 IL-1 β 在前列腺组织中的表达 SABC $\times 50$

A:正常对照组;B: CNP 模型组;与正常对照组比较:* $P < 0.05$

会阴周围疼痛为特征并与前列腺的炎症反应相关联。临床上一般以前列腺液涂片中白细胞计数来区别,前列腺液涂片每高倍镜视野白细胞计数 ≥ 10 个为炎症型, < 10 个为非炎症型,也称前列腺痛,但最新的观点认为前列腺液内的白细胞不一定可以说明有前列腺炎存在,前列腺液内白细胞数量更与其临床症状严重程度无关^[5]。目前其病因及发病机制尚不十分明确,近年来大多数研究者趋向于认为 CNP 是多种因素共同作用的结果^[6]。近来关于 CNP 发病机制方面的研究^[7],已从原来研究炎症反

应中的细胞功能过渡到研究炎症反应应答的调节机制,其中最重要的是细胞因子。细胞因子 IL-1 β 主要由单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞等产生,具有广泛的免疫调节作用,并有致热和介导炎症的作用。研究^[8]表明,细胞因子 IL-1 β 是一种重要的促炎反应介质,它在机体受到损伤刺激或者免疫刺激时产生,导致炎症的发生和发展,在炎症的发生中起着关键性作用。IL-1 β 可以促进一系列免疫炎症反应,促使血管细胞和内皮细胞表达黏附分子,导致单核细胞、淋巴细胞和白细胞从血管渗出,侵入组织;诱导巨噬细胞和内皮细胞合成 IL-8 家族趋化因子,进一步活化白细胞;通过诱导炎症细胞和内皮细胞、成纤维细胞等分泌细胞因子而使炎症级联反应扩大^[9],引起众多生物学效应。

Nadler et al^[10]用 ELISA 法检测了 72 例不同类型 CPPS 患者精浆中的 IL-1 β 与肿瘤坏死因子- α , 结果显示, CPPS 患者 III a 组精浆中的 IL-1 β 与肿瘤坏死因子- α 水平明显高于 III b 组和正常对照组,认为检测精液中的细胞因子有助于 CP-CPPS 的诊断与分型。杨进益等^[11]研究表明精浆中 IL-1 β 水平在前列腺炎伴有白细胞计数增高的患者中明显增高,但与白细胞计数升高并无明显相关性。细胞因子 IL-1 β 可能来源于前列腺上皮细胞、白细胞或基质细胞以及少数特异性白细胞甚至前列腺以外的其他细胞。在前列腺液中,炎症早期即有细胞因子 IL-1 β 的存在,在细胞因子 IL-1 β 的介导下,白细胞游走进入前列腺组织,并在其刺激下进一步产生 IL-1 β 等细胞因子,这可能有助于明确 CNP 的病因学和症状学。这些研究^[10-11]均说明细胞因子 IL-1 β 参与了 CNP 炎症变化的过程。

本研究造模方法参考国内其他研究人员的造模方法^[4]构建出了比较稳定的 CNP 动物模型。以往针对细胞因子 IL-1 β 与 CNP 关系的研究主要集中在研究 CNP 患者精浆及前列腺液中 IL-1 β 的水平^[10-13]。本研究通过构建 SD 雄性大鼠 CNP 动物模型,研究细胞因子 IL-1 β 在 CNP 中的表达,并且证实在 SD 大鼠 CNP 模型中前列腺组织的 IL-1 β 水平明显高于正常对照组,进一步阐明了 IL-1 β 在 CNP 发生发展中的作用。目前主流观点^[14-15]认为 IL-1 β 的分泌和释放主要受 NLRP3 炎症体和 NF- κ B 信号通路调控。未来,本研究将就这两种信号通路在 CNP 中 IL-1 β 表达调控的相关机制进一步深入研

究,为研究 CNP 诊疗方法及其基础研究提供一种新的思路和方法。

参考文献

- [1] Liang C Z ,Li H J ,Wang Z P ,et al. The prevalence of prostatitis-like symptoms in China[J]. *J Urol* 2009 ,182(2) :558 -63.
- [2] Liang C Z ,Li H J ,Wang Z P ,et al. Treatment of chronic prostatitis in Chinese men[J]. *Asian J Androl* ,2009 ,11(2) :153 -6.
- [3] Elmariah S B ,Lerner E A. The missing link between itch and inflammation in atopic dermatitis[J]. *Cell* ,2013 ,155(2) :267 -9.
- [4] 尹学来,宋竖旗,刘冬等. 实验性自身免疫性前列腺炎疼痛大鼠模型的制作[J]. *北京医学* 2016 ,38(3) :253 -6.
- [5] 梁朝朝. 慢性前列腺炎诊断标准的再认识[J]. *现代泌尿外科杂志* ,2012 ,17(6) :537 -40.
- [6] 张斌斌,白安胜. 慢性前列腺炎的病因、发病机制及治疗新进展[J]. *新医学* ,2014 ,45(2) :83 -7.
- [7] Hochreiter W W ,Nadler R B ,Koch A E ,et al. Evaluation of the cytokines interleukin 8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 as indicators of inflammation in prostatic secretions[J]. *Urology* 2000 ,56(6) :1025 -9.
- [8] Guo H ,Xu Y M ,Ye Z Q ,et al. Heat-shock protein 70 expression in the seminal plasma of patients with chronic bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010 ,13(4) :338 -42.
- [9] McGettrick A F ,O'Neill L A. How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation[J]. *J Biol Chem* 2013 ,288(32) :22893 -8.
- [10] Nadler R B ,Koch A E ,Calhoun E A ,et al. IL-1beta and TNF-alpha in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis[J]. *J Urol* 2000 ,164(1) :214 -8.
- [11] 杨进益,叶林,姜洪波,等. 慢性前列腺炎患者前列腺液 IL-1 β 和 TNF- α 的检测及意义[J]. *中华男科学杂志* ,2004 ,10(6) :449 -54.
- [12] Razumov S V ,Medvedev A A ,Chirun N V ,et al. Role of cytokines in the diagnosis of chronic prostatitis[J]. *Urologia* ,2003 ,6(6) :25 -8.
- [13] 侯四川,冯元法,王春玲. 慢性前列腺炎病人前列腺液中 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 和 PGE2 的变化及意义[J]. *青岛大学医学院学报* 2007 ,43(6) :497 -9.
- [14] Subramanian N ,Natarajan K ,Clatworthy M R ,et al. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammatory activation[J]. *Cell* ,2013 ,153(2) :348 -61.
- [15] Hu M M ,Yang Q ,Zhang J ,et al. TRIM38 inhibits TNF α - and IL-1 β -triggered NF- κ B activation by mediating lysosome-dependent degradation of TAB2/3[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2014 ,111(4) :1509 -14.

Expression and significance of interleukin-1 β in SD rat model of chronic nonbacterial prostatitis

Zhang Ligang^{1,2} , Luo Guangyue^{1,2} , Zhang Li^{1,2} , et al

(¹Dept of Urology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022;

²The Urological Institute of Anhui Medical University ,Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the possible role of interleukin-1 β (IL-1 β) in chronic prostatitis by exploring the expression level of IL-1 β in chronic nonbacterial prostatitis (CNP) SD rat model. **Methods** 30 three-month-old male SD rats were randomly divided into two groups ,15 for control-group , and 15 for CNP model-group. To assess the prostate tissue inflammation of two groups ,hematoxylin-eosin (HE) staining was used. Then the expression of IL-1 β of the two groups were detected by Western blot and strept avidin-biotin complex (SABC) immunohistochemistry. **Results** The results of HE staining showed that the SD rat model of CNP was successfully constructed. Western blot and immunohistochemistry showed that the expression of IL-1 β in CNP model-group were higher than that of control-group ,the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of IL-1 β is elevated in CNP SD rat model and IL-1 β may play an important role in the pathogenesis of CNP.

Key words interleukin-1 β ; chronic nonbacterial prostatitis; rat model