

前列汤对实验性慢性非细菌性前列腺炎大鼠 Th_1/Th_2 细胞平衡的影响^{*}

★ 邱永生 周蓉 余锦屏 常爱玲 姚丽琴 胡明芳 李猛 林桂香 吴林红 (江西省上饶曙光医院 上饶市前列腺研究所 上饶 334000)

摘要:目的:观察前列汤对实验性慢性非细菌性前列腺炎(CAP)大鼠 Th_1/Th_2 细胞平衡的影响,探讨前列汤治疗慢性非细菌性前列腺炎的作用机理。方法:采用前列腺腹叶注射角叉菜胶的方法,建立 CAP 大鼠模型。用前列汤按 10 mL/(kg·d)灌胃(C组),并与模型对照组(B组)及正常组(A组)作对照。分别在给药后第30天后,采用流式细胞术检测各组动物外周血 CD_3^+ 、 CD_8^+ 、T细胞内细胞因子干扰素 γ (IFN- γ)和白细胞介素4(IL-4)的表达,分别代表 Th_1 和 Th_2 细胞,测定各自在淋巴细胞所占比例,计算 Th_1/Th_2 比值。结果:与A组相比,B、C组 Th_1 细胞数均升高, Th_1/Th_2 比值升高,差异有显著性($P<0.05$), Th_2 细胞数差异无统计学意义($P>0.05$);C组与B组相比, Th_1 细胞数下降, Th_1/Th_2 比值下降,差异有显著性($P<0.05$)。结论:(1)模型组 Th_1/Th_2 比值明显升高,支持慢性非细菌性前列腺炎发病中存在 Th_1/Th_2 比值失衡学说。(2)前列汤选择性降 Th_1 数量,逆转失衡的 Th_1/Th_2 比值是其治疗慢性非细菌性前列腺炎的重要机理之一。

关键词:前列汤;慢性非细菌性前列腺炎;动物模型; Th_1/Th_2 平衡

中图分类号:R 256.32 **文献标识码:**A

自1986年Mosmann等^[1]发现 CD_4^+ T细胞按其分泌的细胞因子可分为 Th_1 和 Th_2 型以来,人们对 Th_1/Th_2 细胞失衡与众多免疫性疾病的关系研究日益深入。近年免疫因素与前列腺炎的关系日益受到重视。本实验通过前列汤对实验性慢性非细菌性前列腺炎(CAP)大鼠 Th_1/Th_2 平衡的影响,探讨前列汤治疗慢性非细菌性前列腺炎的作用机理。

1 材料

1.1 动物

清洁级SD大鼠,雄性,6月龄,体重180~220g,由南昌大学动物中心提供(医动字:第02196-02号)。常规分笼,室温22~25℃,相对湿度50%,光照时间15小时,自由进食饮水。

1.2 药物

前列汤中药复方(黄芪12g、赤芍15g、桃仁10g、红花15g、柴胡6g、川牛膝10g、王不留行25g、败酱草15g、车前子15g、丹参10g、延胡索10g、枳壳10g、黄柏10g、石菖蒲10g、远志10g、生地15g、三七粉10g、炮甲珠10g),药材购自上饶市曙光医院药剂科,由上饶市曙光医院制剂室制备成水提液,含生药2.0g/mL。

1.3 试剂和仪器

细胞表面标记抗体CD3-TC单克隆抗体(McAb)、 CD_8^+

异硫氰酸荧光素(FITC)(CD_8^+ FITC) McAb、细胞因子抗体抗大鼠IL-4-PE、抗大鼠IFN- γ -PE、相应的同型对照及Fix&Perm破膜剂均由美国Caltag公司提供。佛波醇乙酯(PMA)、离子霉素(ionomycin)、蓝菌素A(BrefeldinA, BFA)均购自美国Sigma公司。RPMI1640购自Gibco公司。流式细胞仪为美国Becton Dickinson公司,FACScan流式细胞仪(氩离子激光器功率为15mW,激发光波长为488nm)。CO₂培养箱(Forma3121型)。

2 方法

2.1 CAP大鼠模型的制备

将大鼠随机分为正常组(A组)、哮喘组(B组)、前列汤组(C组),每组10只。大鼠在清洁级实验动物房适应性饲养1周后,除A组外,其余各组小鼠按参考文献[4]将实验SD雄性大鼠分别称重,用10%水合氯醛(350mg/kg)腹腔麻醉,备皮,无菌条件下取下腹正中切口,直达腹腔,棉签轻轻挑起膀胱,暴露附于膀胱颈外侧的前列腺,于左、右侧腹叶注入1%角叉菜胶生理盐水溶液0.05mL,缝合腹壁肌肉皮肤,术后连续3天大鼠肌肉注射庆大霉素(0.1mL/只)预防感染,放回鼠笼,正常清洁饲养。

2.2 灌胃给药

于角叉菜胶造模1周后,以体质量计算,为临床人用

* 基金项目:江西省上饶市科委2008年社会发展指导性科技项目(081C0008)

剂量的 10 倍;每只大鼠按每 100 g 体质量灌胃 1 mL,于造模术后 40 天后,每天 2 次。对 C 组连续灌胃给前列汤 3 周,同时 A 组和 B 组给予 9.0 g/L 的氯化钠注射液,按 20 mL/kg 剂量,每天 2 次。

2.3 取材和测定

2.3.1 取材 给药 30 天结束次日,股动脉放血处死大鼠,同时并取得肝素钠抗凝的新鲜外周血 3 mL;剖取大鼠前列腺右叶,在匀浆机中组织匀浆, -30 ℃ 保存;剖取大鼠前列腺左叶迅速放入含有 1/1000 DEPC 的 4% 多聚甲醛 0.1 MPBS 固定液中固定。室温下经梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡 2 小时后石蜡包埋,以备切片用。

2.3.2 流式细胞术测定外周血的比率 (1) 细胞培养及活化。取肝素钠抗凝的新鲜外周血 100 μ L,加入 RPMI1640 培养液 100 μ L 混匀。分别加入刺激剂 PMA 和 Ionomycin,使其终浓度分别为 25 ng/mL 和 1 μ g/mL,同时加入工作浓度为 10 μ g/mL 的蛋白转运阻断剂 BFA,未刺激对照组只加 BFA,不加刺激剂,混匀后细胞在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 小时。

(2) 细胞表面抗原标记、破膜及胞内细胞因子染色:在试管中加入 10 μ L CD3 TC 和 10 μ L CD8 FITC,各管分别加入 100 μ L 培养全血,混匀,室温暗处孵育 15 分钟;用破膜剂 (Fix&Perm 中的 A 液) 100 μ L 固定;再加入 3 mL pH 7.40.01 mol/LPBS 缓冲液,混匀,分成 A1、A2 两管,1200 转/分钟离心 5 分钟,弃上清,每管加入 50 μ L Fix&Perm 中的 B 液破膜和溶血,孵育 5 分钟,然后各管中分别加入 10 μ L 抗大鼠 IFN- γ PE 及 10 μ L 抗大鼠 IL-4 PE,室温暗处孵育 15 分钟,每管加入 1.5 mL PBS,1 200 转/分钟离心 5 分钟,弃上清,0.5 mL PBS 重悬细胞,2 小时内上机检测。

(3) 数据获取及分析 用 CD₃⁺ CD₈⁻ 设门来圈定 CD₄⁺ T 细胞群,收集 1×10^4 个细胞,用 Cellquest 软件进行数据分析。得出 Th₁ (CD₃⁺ CD₈⁻ /IFN γ +) 和 Th₂ (CD₃⁺ CD₈⁻ /IL-4 +) 的百分率及 Th₁/Th₂ 细胞的分布。

2.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.0 统计软件进行配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

见表 1。

表 1 给药 30 天后各组大鼠外周血 Th₁/Th₂ 所占淋巴细胞比率和 Th₁/Th₂ 比值表 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Th ₁ (%)	Th ₂ (%)	Th ₁ /Th ₂
A	10	11.20 $\pm$ 0.87	7.35 $\pm$ 1.19	1.56 $\pm$ 0.38
B	10	20.70 $\pm$ 2.19 [▲]	6.46 $\pm$ 0.91 [☆]	3.24 $\pm$ 0.43 [▲]
C	10	13.29 $\pm$ 1.78 [△]	6.93 $\pm$ 0.74 [☆]	1.81 $\pm$ 0.77 ^{△☆}

▲ 与 A 组比较, $P < 0.05$; ☆ 与 A 组比较, $P > 0.05$; △ 与 B 组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

机体维持正常的免疫功能状态,有赖于各种免疫细胞 (特别是 T 细胞亚群) 之间的相互协调或相互制约,以产生适度的免疫应答,使之既能清除异物抗原,又不损伤机体自身

组织。Th₁/Th₂ 亚群的区 Th₁ 型与 Th₂ 型免疫应答之间存在着交互的负反馈作用,调节着正常免疫平衡,负反馈的调节通常是靠细胞因子的产生来起作用的,即一型 TH 细胞释放的细胞因子可以下调另一型细胞的功能。Th₁ 细胞产生的 IFN- γ 可抑制 Th₂ 类细胞因子的产生,Th₂ 类细胞产生的 IL-4 和 IL-10 则可下调 Th₁ 细胞的功能,两者相互作用,相互影响,在免疫应答中发挥中心调节作用。Th₁/Th₂ 亚群的区分极大地提高了人们对细胞因子网络的认识,在生理条件下,机体 Th₁/Th₂ 细胞的免疫功能处于动态平衡状态,一旦这种平衡发生偏离,机体就会趋向疾病状态。如果能人为地选择性诱导或调控 Th₁/Th₂ 细胞的免疫反应,促使 Th₁/Th₂ 细胞反应的动态平衡,则将十分有利于疾病转归。男性生殖道是一个免疫优势部位,自身免疫和 T 细胞增殖反应可能参与了 CAP/CPPS 的发病过程,CAP/CPPS 可能与自身免疫导致的生殖系统 (包括前列腺) 损伤有关,而泌尿道感染、急性细菌性前列腺炎和创伤等是其加剧因素。

中医学将本病归于“白淫”、“浊”、“精浊”、“淋证”范畴。前列汤是根据本病病因病机特点——肝郁肾虚,相火妄动,致精窍封藏及疏泄无权;从而导致湿热、败精瘀阻精室,蕴久酿毒,阻于经络,气血凝滞而制定。方中车前子、黄柏、败酱草清热利湿,加上石菖蒲、远志开窍导浊,可使前列腺的炎症肿胀消退及前列腺液的排出;黄芪、延胡索行气活血,三七、丹参、赤芍解毒活血,炮甲珠、桃仁、红花、王不留行祛瘀通络,活血化瘀通络,改善前列腺的血液循环,畅通络脉之瘀阻,缓解本病疼痛和 (或) 不适;生地补肾益精可调节机体内环境,其与黄芪合用可提高机体免疫能力,特别是恢复和增强前列腺局部免疫功能;柴胡舒肝解郁,且会同川牛膝引诸药而达病所。诸药合用,共奏清热除湿、行气活血、祛瘀补肾、通窍导浊之功,而使湿毒得清,气血畅行,从而取得满意的疗效。

在研究前列汤治疗与 Th₁/Th₂ 漂移的相关性时,通过采用流式细胞术,在单个细胞水平研究了外周血 CD₄⁺ Th₁、CD₄⁺ Th₂ 细胞内 INF γ 和 IL-4 + 的分泌情况,结果表明,在模型组,Th₁ (CD₄⁺ INF γ +) 所占比例明显上调,Th₁/Th₂ 比值升高,同正常组相比差异显著 ($P < 0.05$); 而 Th₂ (CD₄⁺ IL-4 +) 虽有下调,但同 A 组相比,无统计学意义 ($P > 0.05$)。

综上所述,前列汤能在单个细胞水平下调 Th₁/Th₂ 比值,对 CAP 大鼠 Th₁/Th₂ 细胞漂移起到恢复作用,这可能是其治疗 CAP 的机理之一,但前列汤对 Th₁/Th₂ 漂移影响的具体作用机制,还有待对调控 Th₁/Th₂ 平衡的相关基因,以及特异性转录因子 T-bet 和 GATA-3 等^[2] 的进一步研究。

参考文献

- [1] Mosmann, TR, Cherwinski, i H, et al. Two types of murine helper T cell clone (I): Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins [J]. J Immunol, 1986, 136: 2 348 - 2 357.
- [2] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th₁ lineage commitment [J]. Cell, 1997, 100: 655 - 669.

(收稿日期: 2008-12-11 责任编辑: 曹征)