

原花青素对大鼠自身免疫性慢性非细菌性前列腺炎的治疗作用及其机制的研究

孙鑫波, 刘朝东*, 王咸钟 (重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016)

摘要:目的 研究原花青素对前列腺炎的治疗作用及其作用机制。方法 建立慢性非细菌性前列腺炎大鼠模型, 动物随机分成对照组、模型组、原花青素高、中、低剂量组(50、25、10 mg·kg⁻¹)。各组于第1、2、6、10天进行药物干预。光镜下观察各组前列腺组织病理学变化, 测定前列腺组织和血浆中白细胞介素-10和巨噬细胞炎性蛋白-1 α 的表达, 并测定超氧化物歧化酶活力和丙二醛水平。结果 原花青素能有效改善慢性非细菌性前列腺炎造成的病理改变, 以中、低剂量效果更佳。原花青素各剂量均能降低慢性非细菌性前列腺炎大鼠组织白细胞介素-10和巨噬细胞炎性蛋白-1 α 基因水平表达, 并降低慢性非细菌性前列腺炎大鼠血浆白细胞介素-10和巨噬细胞炎性蛋白-1 α 蛋白水平表达。原花青素各剂量均能显著降低组织丙二醛的生成, 但对超氧化物歧化酶活性没有显著影响。结论 原花青素具有抗慢性非细菌性前列腺炎治疗效果, 其机制可能部分与抗炎抗氧化有关。

关键词:原花青素; 慢性非细菌性前列腺炎; 白细胞介素-10; 巨噬细胞炎性蛋白-1 α ; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

doi: 10.11669/epj.2013.07.008 中图分类号: R697.33 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2013)07-0521-07

Therapeutic Effect of Procyanidins on Chronic Abacterial Prostatitis in Rats and Its Mechanisms

SUN Xin-bo¹, LIU Chao-dong*, WANG Xian-zhong (The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the therapeutic effect of procyanidin (PC) on rats with chronic abacterial prostatitis (CAP) and its underlying mechanisms. **METHODS** The experimental rat model of autoimmune nonbacterial prostatitis was established. The animals were randomly divided into control group, model group, PC high dose, medium dose and low dose group (50, 25 and 10 mg·kg⁻¹), and received the corresponding treatment on day 1, 2, 6 and 10. A placebo normal control group was also set. HE staining was used to observe the histopathological changes in prostate. The expressions of interleukin-10 (IL-10) and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in prostate tissue and plasma were detected. The activity of superoxide dismutase (SOD) and content of malondialdehyde (MDA) were observed. **RESULTS** The pathological change in CAP rats was improved after treating with PC, especially at medium or low dose. All the three doses of PC could reduce the gene expressions of IL-10 and MIP-1 α in prostate tissue and the protein expressions of IL-10 and MIP-1 α in serum of CAP rats. The three doses of PC all decreased the content of MDA in prostate tissue of CAP rats, and showed no significant effect on the activity of SOD in tissue or plasma. **CONCLUSION** PC has potent therapeutic effect for chronic abacterial prostatitis, and its mechanism of action is partly related to its anti-inflammatory and anti-oxidation effect.

KEY WORDS: procyanidin; chronic abacterial prostatitis; interleukin-10; macrophage inflammatory protein-1 α ; superoxide dismutase; malondialdehyde

慢性前列腺炎(chronic prostatitis, CP)是最常见的泌尿生殖系统疾病,流行病学调查显示,CP在男性人群发病率高达2.5%~16%。而在CP中,又以慢性非细菌性前列腺炎(chronic abacterial prostatitis, CAP)为主,约占90%~95%,对健康状况和生活质量影响甚大^[1]。然而由于CAP的发生机制及病因尚不清楚,目前尚没有治疗CAP的有效治疗药物。

原花青素(procyanidin, PC)是一种有着特殊分子结构的生物类黄酮,已被证实具有抗炎、抗氧化等多种作用,多篇文献报道称PC对前列腺疾病有一

定治疗作用^[2-5],然而对慢性前列腺炎的治疗方面目前尚没有相关报道。因此,本实验通过建立免疫性大鼠CAP模型,以评价不同剂量PC对于CAP的治疗作用,通过组织病理学观察、组织炎性因子基因水平检测、血清及组织炎性因子检测、氧化还原指标检测来探索PC对CAP可能的治疗作用。

1 材料

1.1 动物

雄性Wistar大鼠,200~300g[合格证号:SCXK

作者简介:孙鑫波,男,硕士研究生 研究方向:慢性前列腺炎 *通讯作者:刘朝东,男,副主任医师 研究方向:慢性前列腺炎及尿动力学 Tel/Fax:(023)89012559

(沪 2007-0005),上海斯莱克公司]。

1.2 试剂

PC(天津市尖峰天然产物研究开发公司);吸附无细胞百白破联合疫苗(武汉生物制品研究所);弗氏完全佐剂(FCA)(Sigma公司);UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒和ReverTra Ace qPCR RT Kit(上海生工生物工程技术有限公司);Bradford蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究);白细胞介素-10(IL-10)Elisa试剂盒和巨噬细胞炎性蛋白 1α (MIP-1 α)Elisa试剂盒(R&D公司);超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

2 方法

2.1 动物模型制作

将60只Wistar大鼠随机分成对照组($n=15$)和实验组($n=45$)。根据文献^[6]方法制作CAP大鼠模型:实验组腹腔注射百白破疫苗0.5 mL,并多点皮下注射大鼠前列腺蛋白提纯液和FCA乳剂(比例为1:1的混悬液)1.0 mL;对照组分别腹腔及皮下多点注射PBS 0.5、1.0 mL。以上各组均分别于0、30 d各造模一次,45 d后模型成功。

2.2 分组与给药

验证造模成功:取对照组及实验组大鼠各5只,手术剥取前列腺组织,肉眼观察两组大鼠前列腺组织的表面及粘连情况。

分组:将余下实验组大鼠($n=40$)称重,随机分为4组,每组10只,分别为模型组、PC高剂量组($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中剂量组($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低剂量组($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

给药:PC各剂量组分别于第1、2、6、10天腹腔注射相应剂量浓度的PC溶液。对照组($n=10$)和模型组($n=10$)于第1、2、6、10天腹腔注射等体积生理盐水。

2.3 动物取样及处理

第11天,大鼠称重,心脏取血,用肝素钠抗凝,离心得血浆,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。然后脱颈椎处死大鼠,肉眼观察大鼠前列腺组织形态、大小、与周围组织粘连情况等。立即摘取前列腺组织,一半浸泡于质量分数为4%的甲醛溶液中待用,另一半中取一部分组织立即放入液氮中保存,另一部分做组织匀浆处理^[7], $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4 前列腺组织病理观察

一周后取上述固定的前列腺叶常规脱水、透明、浸蜡、包埋、用组织切片机将组织块切为 $2\text{ }\mu\text{m}$ 厚的切片,HE染色^[8],高倍镜下观察病理组织学变化。

2.5 组织中IL-10和MIP-1 α 基因表达测定

2.5.1 组织样品的RNA提取 取大鼠前列腺组织样品放入RNAlater中,按试剂盒说明操作,用Trizol试剂盒提取总RNA。取提取出的总RNA样品于 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下温浴5 min后,立即放于冰上冷却。将每个样品取出 $7\text{ }\mu\text{L}$ 进行反转录实验,逆转录反应条件为: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,15 min; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$,5 min。逆转录后样品置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.5.2 Realtime PCR实验 按照SYBR Green试剂盒说明书进行实验操作。IL-10上游引物:5'-GC-TATGTTGCCTGCTCT-3',下游引物:5'-CAAGTAAC-CCTTAAAGTCC-3',片段大小185 bp。MIP1- α 上游引物:5'-CTGGGTCCAAGAATACATC-3',下游引物:5'-GAAGAGTCCCTGGATGTG-3',片段大小217 bp。内参Beta-actin的上游引物:5'-CGTGCGTGACATTA-AAGAG-3',下游引物:5'-TTGCCGATAGTGATGAC-CT-3',片段大小132 bp。PCR扩增反应按PCR扩增反应试剂盒说明操作。 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $55.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s,共40个循环。最后绘制出溶解曲线图。IL-10部分与MIP1- α 部分的反应体系及PCR条件均相同。

每个标本重复3次,取平均 C_t 值,按以下方法分别计算IL-10和MIP1- α 基因表达量: ΔC_{t1} = 实验组的 C_t 值 - 对应内参 C_t 值, ΔC_{t2} = 正常组的 C_t 值 - 对应内参 C_t 值, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t1} - \Delta C_{t2}$,设正常组的基因表达量为1,则 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为实验组的基因较正常组基因表达量的倍数。

2.6 ELISA检测前列腺组织和血浆中IL-10、MIP-1 α 的表达

取每组样本6个,按IL-10、MIP-1 α ELISA试剂盒说明书操作,测定大鼠血浆和前列腺组织中IL-10和MIP-1 α 浓度。每个样本设3个复孔。

2.7 抗氧化指标的测定

取每组样本6个,按试剂盒说明操作,测定大鼠血浆和前列腺组织中SOD活力、MDA水平。

2.8 统计检验

数据值表示,用SPSS13.0统计软件单因素方差分析(ANOVA)实验数据。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 实验结果

3.1 形态学观察

建模情况:对建模后大鼠与正常组大鼠的前列腺组织进行解剖比较,肉眼观察发现:5只正常大鼠前列腺组织均外表光滑、无结节、无粘连,而5只建模大鼠的前列腺组织结构均呈现明显异常,表面欠光滑、部分有结节和粘连。判定本模型构建成功。

此外,与正常大鼠相比,模型组大鼠行动缓慢、摄食量小,体重略有下降。经治疗后,除花青素高剂量组有1只大鼠死亡外,其余都存活。与模型组相比,PC中、低剂量组大鼠更为活跃,体重增加,尤其是低剂量组($P < 0.05$);PC高剂量组动物体重下降、动作迟缓,摄食量较小,见表1。

正常组前列腺表面红润有光泽,腺体组织柔软且有弹性,与周围组织无粘连,易于分离;模型组腺体与周围组织广泛粘连,可见多少不等的灰白色片状结节,弹性较差,体积较正常组稍小。解剖观察发现:对照组和模型组的肝脏没有显著差异,肝脏柔软、平滑、红润;PC高剂量组大鼠肝脏有3~5处白点,中、低剂量PC组未发现有肝脏白点。

3.2 大鼠前列腺组织病理学改变

正常大鼠前列腺上皮多为单层柱状或立方状,腺腔形态不一,皱襞多,腺腔内可见大量深粉染色的内分泌物;模型组前列腺腺腔皱襞多,腺腔内分泌物明显减少,呈淡粉红色,部分腺腔内有出血。PC各剂量组前列腺间质内炎细胞浸润减少,腺泡上皮多恢复正常,腺腔内分泌物明显增多,且中、低剂量组较高剂量组更显著。见图1。

3.3 前列腺组织中 IL-10、MIP-1 α 基因的表达

基因表达相对情况见图2。与对照组相比,模型组前列腺组织中 IL-10 和 MIP-1 α 基因表达均升高(图2A、B)。与模型组相比,PC各剂量治疗后 IL-10 表达呈下降趋势(图2A);PC各剂量治疗后, MIP-1 α 基因表达显著降低(图2B)。

表1 原花青素(PC)治疗前后各组动物体重的变化. $n = 10, \bar{x} \pm s$

Tab.1 The changes of body weight after procyanidin (PC) treatments. $n = 10, \bar{x} \pm s$

Group	Dose/mg · kg ⁻¹	m (pretherapy)/g	m (posttreatment)/g
Control		383.3 ± 66.0	383.8 ± 69.9
Model		380.9 ± 47.9	359.8 ± 56.3
PC	50	382.5 ± 47.0	355.6 ± 41.3
	25	381.7 ± 56.2	362.6 ± 44.5
	10	385.0 ± 51.9	411.2 ± 35.2 ¹⁾

注:与模型组相比,¹⁾ $P < 0.05$

Note: vs model, ¹⁾ $P < 0.05$

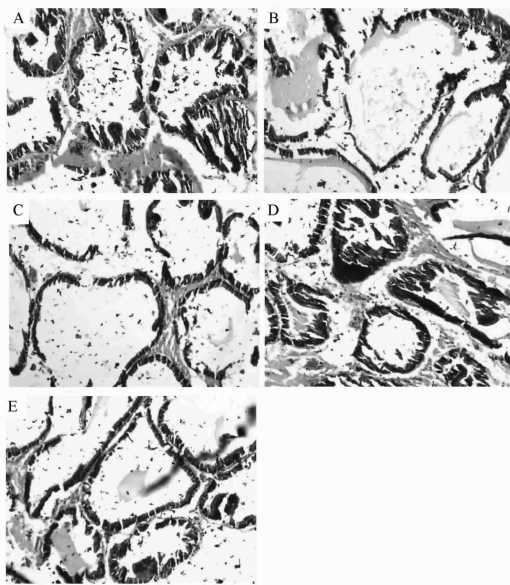


图1 PC对慢性非细菌性前列腺炎组织的作用(HE, ×200)
A - 正常组; B - 模型组; C - 50 mg · kg⁻¹ PC; D - 25 mg · kg⁻¹ PC; E - 10 mg · kg⁻¹ PC

Fig.1 Effect of PC on prostate tissues of the rats in each group (HE, ×200)

A - control; B - model; C - 50 mg · kg⁻¹ PC; D - 25 mg · kg⁻¹ PC; E - 10 mg · kg⁻¹ PC

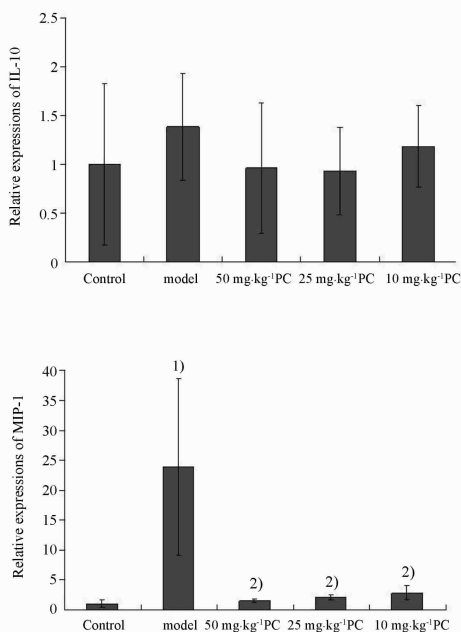


图2 PC对前列腺组织中白细胞介素10(IL-10)、巨噬细胞炎性蛋白1 α (MIP-1 α)基因相对表达的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, 与对照组相比; ²⁾ $P < 0.05$, 与模型组相比

Fig.2 The relative expressions of IL-10 and MIP-1 α genes in prostate tissue. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, vs control; ²⁾ $P < 0.05$, vs model

3.4 前列腺组织和血浆中 IL-10、MIP-1 α 蛋白的表达

3.4.1 IL-10 的表达 模型组的前列腺组织和血浆中 IL-10 蛋白表达均高于正常组 ($P < 0.05$); PC 治疗组的血浆 IL-10 蛋白浓度显著低于模型组 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性, 其中 PC 低剂量组血浆 IL-10 蛋白表达接近正常组; PC 对组织 IL-10 蛋白表达的影响呈相反趋势, 随剂量升高, IL-10 表达升高 ($P < 0.05$), 但与模型组相比没有显著性差异。见图 3。

3.4.2 MIP-1 α 的表达 模型组的前列腺组织和血浆中 MIP-1 α 蛋白表达均低于正常组; 与模型组相比, 低剂量 PC 组血浆 MIP-1 α 蛋白表达升高, 并接近正常组, 但高、中剂量 PC 治疗组的前列腺 MIP-1 α 蛋白表达均降低; PC 各剂量组组织中 MIP-1 α 蛋白表达均升高, 但不呈剂量依赖性, 其中 PC 低剂量组组织 MIP-1 α 蛋白表达接近正常组。见图 4。

3.5 血浆和前列腺组织的 SOD 和 MDA 检测

可见模型组大鼠的前列腺组织中 SOD 活力

[(43.1 \pm 8.71) U \cdot mg⁻¹] 略高于正常组大鼠 SOD 活力 [(35.9 \pm 5.16 U \cdot mg⁻¹); 经不同剂量 PC 治疗后 SOD 活力呈一定下降趋势, 治疗组 SOD 活力与正常组接近, 但各组间没有显著性差异。各组大鼠血浆中 SOD 活力也无显著差异。见图 5。

可见模型组前列腺组织中 MDA 浓度显著高于正常组 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 各剂量 PC 治疗后 MDA 浓度显著降低并接近正常组 ($P < 0.05$)。各组间大鼠血浆 MDA 浓度无显著差异。见图 6。

4 讨论

临床上 CAP 是一种常见且让人十分困惑的疾病, 目前各种治疗手段的治疗效果都不够理想, 因此研究 CAP 新型治疗药物显得十分必要。PC 是目前国际上公认的清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂之一, 具有改善血液循环、抗炎抗过敏、调节免疫力等一系列功能。尽管 PC 的抗氧化作用、抗炎作用已证实, 然而在对前列腺炎治疗研究方面目前尚无相关报道。

本实验通过建立大鼠自身免疫性 CAP 模型这一被广泛认可的常用模型^[9-12], 使用不同剂量的 PC 以一定频次对模型鼠进行腹腔注射, 通过组织病理学观察、血清及组织炎症因子检测、氧化还原指标检测来研究 PC 对免疫性前列腺炎可能的治疗作用, 实验结果显示, 各剂量 PC 对 CAP 都有一定治疗作

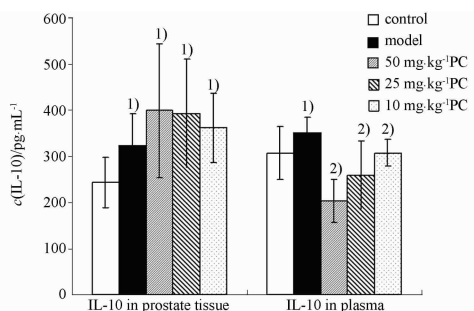


图 3 PC 对前列腺组织和血浆中 IL-10 蛋白表达的影响。

$n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, 与对照组相比; ²⁾ $P < 0.05$, 与模型组相比

Fig. 3 The expression of IL-10 in prostate tissue and plasma.

$n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, vs control; ²⁾ $P < 0.05$, vs model

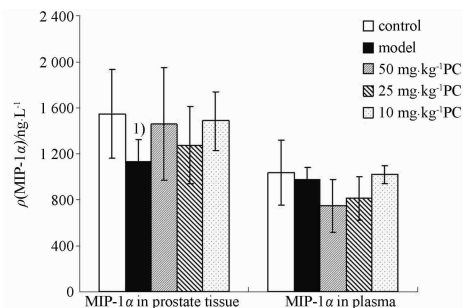


图 4 PC 对前列腺组织和血浆中 MIP-1 α 蛋白表达的影响。

$n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, 与对照组相比

Fig. 4 The expression of MIP-1 α in prostate tissue and plasma.

$n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, vs control

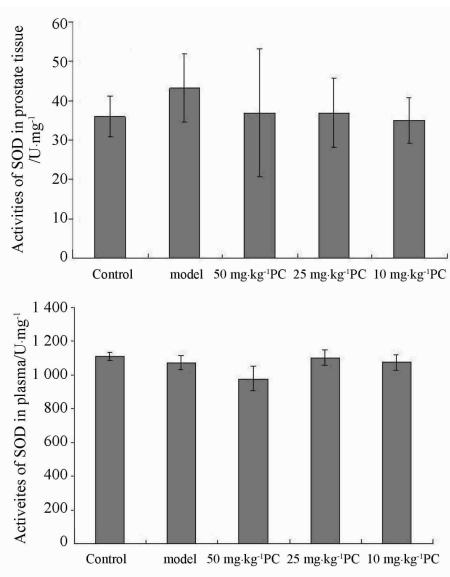


图 5 PC 对大鼠前列腺组织和血浆中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力测定结果。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 The activities of superoxide dismutase (SOD) in prostate tissue and plasma of rats. $n = 3, \bar{x} \pm s$

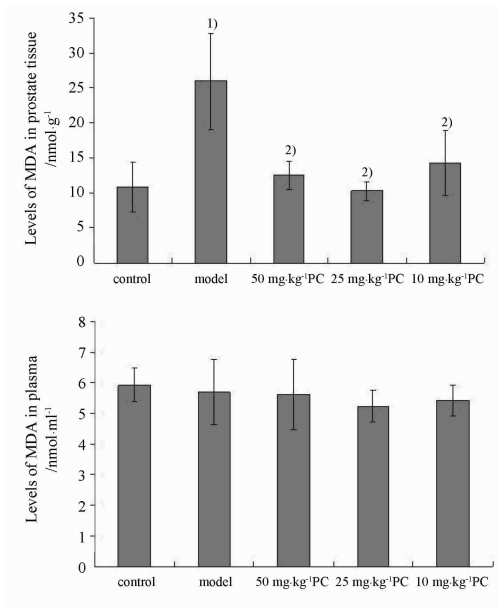


图6 PC对大鼠前列腺组织和血浆中丙二醛(MDA)测定结果. $n=3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, 与对照组相比; ²⁾ $P < 0.05$, 与模型组相比

Fig. 6 The levels of malondialdehyde (MDA) in prostate tissue and plasma of rats. $n=3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, vs control; ²⁾ $P < 0.05$, vs model

用,以中、低剂量更佳。治疗结果显示,CAP大鼠体重显著低于正常大鼠,低剂量PC治疗后大鼠体重显著增加,说明低剂量PC可能促进代谢调节、提高机体免疫力。各组病理切片结果显示,PC能够有效改善免疫性前列腺炎造成的病理改变,其中以中、低剂量效果更佳。

根据PC发挥抗氧化、抗炎作用的多篇文献报道,其动物水平的给药方式多采用大鼠腹腔注射、灌胃或皮下注射,有效剂量一般为 $10 \sim 250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 之间^[13-16]。鉴于目前尚没有PC治疗前列腺炎动物水平的研究报道,首先我们对大鼠对PC的单次最大耐受剂量做了预实验。发现当给药剂量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,给药后大鼠出现身体蜷缩、行动缓慢等症状;而当给药剂量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,给药后大鼠行动正常,无显著毒性反应。因此,我们将最高剂量设为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在此基础上,我们确定了高($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、低($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)3个剂量进行药效学评价。

IL-10是由T细胞特别是Th2细胞产生的细胞因子,是人类免疫应答中已发现的最重要的抗炎症因子,它是一种多效应的细胞因子,作用于不同细胞上可以出现免疫抑制、免疫刺激和抗炎效应。大量研究显示,抗炎因子IL-10与CP密切相关,IL-10水

平的升高可以作为诊断CP的一个非常有价值的指标^[17-20]。Miller等^[17]发现精液中IL-10水平增高与CP患者疼痛的增加相关联。研究发现^[18],具有临床症状的CP患者前列腺分泌物中IL-10水平明显高于无症状前列腺炎和无前列腺炎的健康男性,表明IL-10可能直接参与了CP的临床症状,与Miller等的研究一致。王洪志等^[7]对IL-10在CAP大鼠中的表达测定结果发现,CAP模型组IL-10表达强度显著高于正常对照组。本课题研究也发现CAP模型鼠IL-10基因表达水平、血浆及前列腺组织中IL-10蛋白表达水平均高于正常大鼠。当用PC不同剂量治疗后,各组的前列腺组织中IL-10基因表达水平有一定程度降低,血浆中IL-10蛋白表达也有下降,以高剂量PC组最为显著($P < 0.05$)。我们推测PC可能对抗炎因子IL-10有一定抑制作用。

MIP-1 α 由大量细胞产生,包括淋巴细胞、单核细胞/巨噬细胞、肥大细胞、嗜碱粒细胞等,其通过结合于CCR1及CCR5发挥其生物学效应^[21-23]。MIP-1 α 除对T细胞、单核细胞具有趋化能力外,还对中性粒细胞具有趋化作用^[24],并参与NK细胞和NLT介导的细胞溶解作用,参与炎症或肿瘤局部免疫过程、介导其他细胞因子的释放。MIP-1 α 已被广泛认可与前列腺炎密切相关,在前列腺患者及动物模型中均发现MIP-1 α 水平的升高^[25-27]。前列腺分泌物中MIP-1 α 水平的升高还可以作为鉴定慢性盆腔综合征的识别标志物^[26]。Sugimoto等^[27]发现,MIP-1 α 在非细菌性前列腺炎模型鼠中的表达上升。本课题研究也发现CAP模型鼠MIP-1 α 基因表达显著高于正常大鼠,但蛋白表达水平无论是在血浆还是前列腺组织中与正常组相比都没有显著差异。造模后MIP基因和蛋白水平的不一致可能是因为:基因与其编码产物蛋白的线性对应关系只存在于新生肽链中,而不是最终的功能蛋白中。新生肽链合成后存在多种加工、修饰过程,大量蛋白的化学修饰(如磷酸化、糖基化)、剪切加工不但可改变其结构,而且是实施其功能与调节的结构基础,这些均不能从基因水平上预测,只能通过最终的功能蛋白进行分析。另外MIP蛋白水平还可能受到很多其他因素影响,如组织蛋白酶的作用等,因此蛋白水平和基因水平不一致。当用PC各剂量治疗后,前列腺组织中MIP-1 α 基因的表达均显著下降,血浆MIP-1 α 蛋白水平表达有一定下降,但组织中MIP-1 α 蛋白水平反而有一定升高,但变化趋势均不呈量效关系。因此我们推测PC对MIP-1 α 蛋白水平变化的影响不大。

Orsilles 等^[28]研究前列腺匀浆诱导的自身大鼠免疫性前列腺炎中氧化应激反应,发现过氧化氢活性明显减低,而 SOD 及谷胱甘肽没有显著变化。硫代巴比酸反应物质明显增加,过氧化氢酶活性明显降低与炎症巨噬细胞氧化代谢增强有关,这可能导致自身免疫性疾病中氧化损害。而 Pasqualotto 等^[29]发现慢性前列腺炎及前列腺痛患者不管精液中是否存在白细胞均存在氧化应激反应。我们的研究结果显示,各组间血浆和前列腺组织中 SOD 活性均无显著差异。CAP 组前列腺组织中 MDA 含量显著高于正常组,当用不同剂量 PC 治疗后,MDA 水平显著下降,说明 PC 能够降低 CAP 大鼠前列腺组织的 MDA 水平。提示 PC 对非细菌性前列腺炎大鼠有较好的治疗作用,可能与降低组织 MDA 水平、增强机体抗氧化能力有关,从而对慢性前列腺炎的病变发展起到防治作用。

本实验中我们根据动物状况对给药频次进行了相应调整,即原方案为每天给药一次,而本实验中我们采用前两日每天给药 1 次,然后隔 3 d 给药一次的方法进行药物干预(第 1、2、6、10 天)。主要是因为连续给药 2 天后,我们发现 PC 各剂量组大部分动物身体蜷缩、行动较为缓慢,尤其是高剂量组,甚至出现动物死亡 1 例。推测 PC 有一定毒性,因此我们将后续给药频次改为隔 3 d 给药 1 次。给药频次降低后动物状况有较大改善。本实验病理剖发现,PC 高剂量组(50 mg · kg⁻¹)大鼠肝脏有 3~5 处白点,而中(25 mg · kg⁻¹)、低剂量(10 mg · kg⁻¹)PC 组未有肝脏白点现象。此外从动物体重及活动情况亦发现,中、低剂量 PC 组大鼠状况优于高剂量组。我们推测可能是高剂量 PC 具有一定毒性,高剂量 PC 增加了肝脏代谢负担,反而会对机体带来损伤。以上结果提示,高剂量 PC 可能对机体有一定毒性,因此选择合适的剂量、频次非常重要。Stoupi 等^[30]对 PC 的大鼠体内药动力学研究显示,以 21 mg · kg⁻¹剂量单次静注 PC,测得药物大鼠体内半衰期为(6.67 ± 0.95) h。因此,从半衰期角度考虑,本实验中间隔给药不能保证一定的血药浓度。但 PC 高剂量连续给药的高毒性提示我们按照常规方法,即通过半衰期来确定花青素给药频次可能会产生较大毒性。综合考虑花青素半衰期及毒性,我们推测花青素给药方式以更低剂量(< 10 mg · kg⁻¹)、较低频次给药为佳。或者可采用花青素与其他药物联合用药方式,可能能起到降低毒性、提高疗效的效果。本课题是初步探索研究,因此最佳的给药剂量、频次等还有待进一步深入。

综上所述,PC 对 CAP 具有较好的治疗效果,其可能通过降低免疫炎症介质 MMP-9、MIP-1α 与 MDA 表达,进而从调节免疫炎症、抗氧化方面起作用。PC 治疗 CAP 的详细作用机制以及最适给药剂量等还有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] ROBERTS R O, LIEBER M M, BOSTWICK D G, et al. A review of clinical and pathological prostatitis Syndromes[J]. *Urology*, 1997, 49(6): 809-821.
- [2] NEUWIRT H, ARIAS M C, PUHR M, et al. Oligomeric proanthocyanidin complexes (OPC) exert anti-proliferative and pro-apoptotic effects on prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2008, 68(15): 1647-1654.
- [3] SHANG X J, YAO G, GE J P, et al. Procyanidin induces apoptosis and necrosis of prostate cancer cell line PC-3 in a mitochondrion-dependent manner[J]. *J Andr*, 2009, 30(2): 122-126.
- [4] UCHINO R, MADHYASTHA R, MADHYASTHA H, et al. NFκpαB-dependent regulation of urokinase plasminogen activator by proanthocyanidin-rich grape seed extract: Effect on invasion by prostate cancer cells[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2010, 21(6): 528-533.
- [5] RAINA K, SINGH R P, AGARWAL R, et al. Oral grape seed extract inhibits prostate tumor growth and progression in TRAMP Mice[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5976-5982.
- [6] ZHOU X H, HAN L, ZHOU Z H, et al. Morphological and molecular biological peculiarities of the experimental autoimmune prostatitis rat model[J]. *Nat J Androl*(中华男科学杂志), 2005, 11(4): 290-295.
- [7] WANG H Z, LIU C D, WEI C. Effects of total glucosides of paeony on the expression of IFN-γ, TNF-α and IL-10 in the rat model for chronic abacterial prostatitis[J]. *J Chongqing Med Univ*(重庆医科大学学报), 2010, 35(2): 231-234.
- [8] WANG F, YANG K, PU X F, et al. Experimental study of jiweisanmiao(JWSM) capsuleon pathology affect in rats of prostatitis[J]. *Chin J Bas Med Tradit Chin Med*(中国中医基础医学杂志), 2003, 9(10): 763-765.
- [9] ZHOU Q, TIAN X F, GONG X Y, et al. Effects of Jiawei Huzhang San Decoction on the expressions of inflammatory factors MCP-1 and PDGF-BB in rat models of experimental autoimmune prostatitis[J]. *Nat J Androl*(中华男科学杂志), 2011, 17(1): 83-88.
- [10] MU H Q, YANG S, ZHANG L, et al. The effects of Zegui Longshuang on IFN-γ and IL-4 mRNA in prostate of rats with experimental autoimmune prostatitis[J]. *J Wenzhou Med Coll*(温州医学院学报), 2009, 39(4): 338-341.
- [11] WANG Y G, WANG C L, MENG J, et al. Therapeutical effect of relinqing-granule in rat model with autoimmunity chronic prostatitis[J]. *J Clin Urol*(临床泌尿外科杂志), 2009, 24(3): 228-232.
- [12] HUANG Z H, LU Y Z, LI Z G, et al. Influence of Danhong-tongjing prescription on cytokines levels of blood and prostate tissue in autoim [J]. *China Med Herald*(中国医药导报), 2011, 8(26): 36-38.
- [13] LI W G, ZHANG X Y, WU Y J, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds[J]. *Acta Pharmacol Sin*(中国药理学报), 2001, 22(12): 1117-1120.
- [14] LIANG J Q, ZHU C F, LI Y F. Effects of soybeanisoflavone and grape seed proanthocyanidin on anti-oxidation function in rats with type two diabetes[J]. *Chin Gener Pract*(中国全科医学), 2008, 11(6): 948-950.
- [15] CONG M, LIU X B. The study of the therapy of procyanidins on rat brain cortex oxidated trauma following traumatic brain injury [J]. *J Liaoning Med Univ*(辽宁医学院学报), 2008, 29(3): 210-213.