DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20230425.002
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20230425.1529.004.html

建立大鼠慢性非细菌性前列炎模型两种方法的比较研究

唐益文[1,2],王 雄[2],周艳艳[2],陈豪特[2],张泽家[2],王 忠[2],高庆和[3],刘剑刚[4]✉,高 瞻[2]✉
(1.北京中医药大学研究生院,北京 100029;2.中国中医科学院西苑医院泌尿外科,北京 100091;3.中国中医科学院西苑医院男科,北京 100091;4.中国中医科学院心血管病研究所,北京 100091)

[摘要] **目的**:比较去势结合雌激素诱导法与自身免疫反应诱导法建立慢性非细菌性前列腺炎(CNP)模型大鼠的生物学特性及稳定性。**方法**:去势激素组采用去势结合17β-雌二醇诱导法、自身免疫组分别采用40、20、10 mg/mL三种浓度前列腺蛋白匀浆制备CNP大鼠模型,采用病理学(HE染色)评价前列腺组织损伤程度,免疫比浊法测定免疫球蛋白IgA、IgM、IgG含量,ELISA法测定白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、高敏-C反应蛋白(hs-CRP),电化学发光法测定睾酮(T)表达水平,应用上诉指标对两种模型方法进行比较。**结果**:与假手术组比较,取材前去势激素组和自身免疫组两种模型大鼠体质量均显著降低($P<0.01$,$P<0.01$),两种模型大鼠前列腺组织病理显示腺体结构破坏,炎性细胞明显增多。去势激素组同自身免疫组比较,去势激素组前列腺组织病理变化和炎症病理评分、免疫指标IgA、IgM、IgG含量均具有显著差异($P<0.05$,$P<0.05$,$P<0.05$),自身免疫组IL-1β、IL-10、TNF-α、hs-CRP、T水平显著改变($P<0.01$)。自身免疫组高、中、低剂量组三者之间比较,其中自身免疫组中剂量病理变化稍优于组间其它两组,但自身免疫组低剂量IL-1β、IL-10、TNF-α、hs-CRP、T改变最为显著($P<0.05$)。**结论**:去势结合雌激素诱导法和自身免疫反应诱导法建立的慢性非细菌性前列腺炎模型的病理组织均显示显著变化,综合指标显示去势结合雌激素诱导法是更为合适的造模选择。

[关键词] 慢性非细菌性前列腺炎;去势手术;自身免疫;动物模型;大鼠
[中图分类号] R-332;R697.33 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2023)13-0961-07

A comparative study of two methods for establishing a chronic non-bacterial prostatitis model in rats

TANG Yi-wen[1,2], WANG Xiong[2], ZHOU Yan-yan[2], CHEN Hao-te[2], ZHANG Ze-jia[2], WANG Zhong[2], GAO Qing-he[3], LIU Jian-gang[4]✉, GAO Zhan[2]✉
(1. *Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100029, *China*; 2. *Department of Urology, Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine , Beijing* 100091, *China*; 3. *Department of Male Medicine, Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing* 100091, *China*; 4. *Institute of Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing* 100091, *China*)

[*Foundation Project*]: *National Natural Science Foundation Project* (82104881); *Major Scientific and Technological Innovation Project of the China Academy of Chinese Medical Sciences* (*CI*2021A02205)
[*Author*]: *TANG Yi-wen*, *E-mail*: *tangyw*1215@163.*com*.
[*Correspondence to*]: *GAO Zhan*, *Ph.D*, *Chief Physician*, *E-mail*: *gaozhanmd@vip*.163.*com*; *LIU Jian-gang*, *Researcher*, *E-mail*: *liujiangang*2002@*sina.com*.
Received: 2023-02-11 *Revised*: 2023-04-21 *JHMU*, 2023;29(13):961-967

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To compare the biological characteristics and stability of the chronic non-bacterial prostatitis (CNP) model in rats induced by the depot combined with estrogen induction method and the autoimmune response induction method. **Methods**: The CNP rat model was prepared using the depot combined with 17β-estradiol induction method in the depot hormone group

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82104881);中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A02205)
[作者简介] 唐益文,E-mail:tangyw1215@163.com。
[通讯作者] 高瞻,博士,主任医师,E-mail: gaozhanmd@vip.163.com;刘剑刚,研究员,E-mail:liujiangang2002@sina.com。
[收稿日期] 2023-02-11 [修回日期] 2023-04-21 网络出版时间:2023-04-26 09:29:20

and three concentrations of prostate protein homogenate at 40 mg/mL, 20 mg/mL and 10 mg/mL in the autoimmune group, respectively. The degree of prostate tissue damage was evaluated by pathology (HE staining), and the immunoturbidimetric method was used to evaluate the contents of immunoglobulins IgA, IgM and IgG. ELISA was used to evaluate interleukin-1β (IL-1β), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and high-sensitivity-C-reactive protein (hs-CRP), and electrochemiluminescence was used to evaluate the expression level of testosterone (T), and the two model methods were compared. **Results**: Compared with the sham-operated group, the body mass of rats in both models was significantly lower in the depot hormone group and autoimmune group before extraction ($P<0.01$, $P<0.01$), and histopathology of the prostate in both models showed destruction of glandular structure and a significant increase in inflammatory cells. Compared with the depot hormone group and the autoimmune group, the histopathological changes and inflammatory pathological scores of prostate and the contents of immune indexes IgA, IgM and IgG were significantly different in the depot hormone group ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$), and the levels of IL-1β, IL-10, TNF-α, hs-CRP and T were significantly changed in the autoimmune group ($P<0.01$). The comparison between the high, medium and low dose groups of the autoimmune group, in which the pathological changes in the medium dose of the autoimmune group were slightly better than the other two groups between the groups, but the changes in IL-1β, IL-10, TNF-α, hs-CRP, and T in the low dose of the autoimmune group were the most significant ($P<0.05$). **Conclusion**: The pathological tissues of the chronic non-bacterial prostatitis model established by the depot combined with estrogen induction method and the autoimmune response induction method both showed significant changes, and the comprehensive indexes indicated that the depot combined with estrogen induction method was a more appropriate modeling choice.

[**KEYWORDS**] Chronic non-bacterial prostatitis; Debridement surgery; Autoimmune; Animal model; Rats

慢性非细菌性前列腺炎(chronic nonbacterial prostatitis,CNP)为泌尿外科常见疾病,占所有前列腺炎的90%以上[1,2],因前列腺特殊的解剖及生理特点,致使临床表现多样、症状反复难愈,是前列腺炎中最常见、最复杂的一类临床综合征[3]。目前研究发现病原体感染、尿液反流、神经内分泌因素、氧化应激等都与前列腺炎发病相关,其中免疫因素在CNP发生发展中起到重要作用[4,5]。免疫因素CNP动物模型的建立,是进行CNP病因病机及药物研究的重要基础,目前,前列腺免疫因素动物模型包括去势结合雌激素诱导型、自身免疫反应诱导型、自发型CNP模型[6],其中常用方法为前两种,但尚缺乏系统的从手法、病理组织、免疫炎症指标和激素水平比较两种模型的报道,本研究拟采用此两种方法建立CNP模型,比较两种模型特征、病理及各项指标,探讨制备CNP动物模型的最优选择,为今后药物防治CNP的实验研究提供较好的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康SPF级,雄性,Wistar大鼠34只,体质量(200±20)g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司[SYXK(京)2019-0030]提供,饲养于中国中医科学院西苑医院屏障级实验动物室[SYXK(京)2018-0018]。饲养环境:屏障系统内饲养,温度22℃~26℃,湿度控制在40%~70%,由12 h光照/黑暗循环,自由饮食。饲料由北京科澳协力饲料有限公司[京饲证(2014)06054]提供。饮水:灭菌水,装入饮水瓶供实验动物自由饮用。

1.1.2 试剂 0.9%生理盐水(山东辰欣药业股份有限公司,批号:1211040591);10%水合氯醛(国际集团化学有限公司,批号:20050805);苯甲酸雌二醇(Solarbio公司,批号:WXBD0151V);弗氏完全佐剂(CFA)(Sigma公司,批号:C104202);BCA测蛋白浓度试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号:P0010);IgA、IgG、IgM试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号:20220416BH);白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、高敏-C反应蛋白(hs-CRP)试剂盒(北京欣博盛生物科技有限公司,批号:20220428X);T试剂盒(上海罗氏诊断产品有限公司,批号:48879601)。

1.1.3 仪器 3-18K型低温离心机(美国SiGma公司);T18型分散机(德国IKA公司);DNP9082型电热恒温平培养箱(上海精宏实验设备有限公司);MultiSkan3型酶标仪(美国Thermo公司);EG1150型病理包埋机(德国Leica公司);7160型全自动生化仪(日本HITACHI公司);DR-200BS型全自动酶标分析仪(无锡华卫德朗仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型构建和分组 适应性饲养大鼠7 d后,按随机对照表分为5组,假手术组6只、去势结合雌激素诱导CNP模型组(去势激素组)8只、自身免疫性前列腺炎(experimental autoimmune prostatitis,EAP)组3组,分别为EAP蛋白高剂量组(高EAP组)8只、EAP蛋白中剂量组(中EAP组)6只、EAP蛋白低剂量组(低EAP组)6只。

去势结合雌激素诱导CNP造模，大鼠采用10%水合氯醛腹腔麻醉(0.2 mL/kg体质量)，仰卧位固定四肢及头颈，充分暴露会阴区视野，会阴区备皮并消毒铺巾，眼科剪剪开阴囊正中皮肤，逐层分离两侧睾丸至鞘膜，钝性分离睾丸和附睾，丝线结扎睾丸根部，剪断精索，移走睾丸，仔细观察结扎断端，确认无活动性出血。伤口消毒，逐层缝合，再次消毒伤口，放回鼠笼。术后连续3 d背部4点肌内注射青霉素(剂量25万 U/kg，每只注射0.1 mL)，以防感染。术后第2天开始，每天对大鼠进行背部皮下注射苯甲酸雌二醇，剂量为0.25 mg/kg·d^{-1}，连续注射30 d。第31天可制备大鼠慢性前列腺炎模型，该模型可维持不少于30 d[7]。假手术组手术步骤同前，区别仅在于钝性分离睾丸和附睾步骤即止，伤口予以缝合放回鼠笼，每日注射药物为芝麻油。

EAP造模，取下预备大鼠前列腺组织放入生理盐水中，修掉脂肪、膀胱及多余组织，清洗2～3次，剪碎搅匀前列腺组织，加入含0.5%Triton-100的生理盐水溶液，冰浴匀浆，12 000 r/min，4℃离心30 min。离心后吸去上层的脂肪组织，上清液吸入冷冻管进行液氮冷冻，并保存于－20 ℃条件下备用。临用前用BCA测定蛋白浓度，根据测得的蛋白浓度，用0.01 mmol/L的PBS将蛋白提纯液分别稀释成40、20、10 mg/mL高中低3种浓度，吸取前列腺蛋白提纯液高、中、低3种浓度0.5 mL分别与完全弗氏佐剂0.5 mL等比混悬，共1 mL。在造模的第0天、15天、30天将1 mL高、中、低三种浓度混悬液分别对应不同组别进行背部4点皮下注射，腹腔同时注射百白破疫苗0.5 mL，造模时间为45 d。第46天可制备大鼠EAP模型，本模型的维持时间不少于30 d[7]。

1.2.2 标本采集 各组大鼠按相应组别造模时间结束之后，称重，再次麻醉，腹主动脉取血，静置1 h后，3 000 r/min，离心10 min，分离血清备用，－80 ℃保存。取出大鼠前列腺组织，剥离被膜及脂肪组织，生理盐水清洗2～3次，滤纸吸干，电子天平称重，计算各组大鼠前列腺指数，即前列腺湿重/体质量，取材结束后采用二氧化碳安死术处理。实验过程中严格遵循2011年修订版《实验动物管理条例》及相关规定，动物实验经过中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会批准(伦理批件号：2022XLC043-2)。

1.3 模型评价

1.3.1 一般情况 记录大鼠一般体征状况变化，造模期间每周对各组大鼠予以称重记录，并每日观察进食量、饮水量，观察大鼠毛发情况及一般活动情况。

1.3.2 前列腺组织病理学评价 将各组大鼠前列腺组织选取一部分保存于10%福尔马林溶液固定72 h，室温下水洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、烤片处理后，HE染色后封片，光镜下观察前列腺局部病理变化。其余部分备用留取做匀浆用于前列腺组织指标测定。

1.3.3 前列腺组织炎症病理评分 对前列腺组织从炎性细胞、成纤维细胞、腺腔大小、分泌物四个指标进行评价。炎性细胞：0分：无炎性细胞浸润，2分：炎性细胞轻度浸润，4分：炎性细胞中度浸润，6分：炎性细胞重度浸润。成纤维细胞：0分：无成纤维细胞增生，1分：成纤维细胞轻度增生，2分：成纤维细胞中度增生，3分：成纤维细胞重度增生。腺腔：0分：腺腔大，1分：腺腔中等，2分：腺腔小，3分：腺腔闭锁或消失。分泌物：0分：分泌物多，1分：分泌物中等，2分：分泌物少，3分：无分泌物[8]。

1.3.4 大鼠血清免疫球蛋白测定 按照试剂盒要求采用免疫比浊法测定IgA、IgM、IgG水平。

1.3.5 大鼠血清炎症因子测定 按照试剂盒要求采用酶联免疫(ELISA)双抗体夹心法测定IL-1β、IL-10、TNF-α、hs-CRP水平。

1.3.6 大鼠前列腺组织激素水平测定 按照试剂盒要求采用电化学发光法测定睾酮(T)水平。

1.4 统计学处理

采用SPSS27.0和Graphpad Prism9.4.1软件进行数据处理和统计分析处理，计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式，组间比较若方差齐采用单因素方差分析(ANOVA检验)，若不满足正态分布或方差不齐，则采用校正检验，组间多重比较采用Bonferroni检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组的一般情况

各组Wistar大鼠按相应造模方式进行饲养，去势激素组大鼠于第2天死亡2只，高EAP组大鼠2只36 d死亡。所有未死亡大鼠一般情况良好，无异常现象，进食量、饮水量正常，其中去势激素组大鼠和高、中、低EAP组大鼠毛色明显变黄，光泽度下降，反应稍缓。每7 d对所有大鼠称重，较假手术组，去势激素组从第1周开始具有显著差异($P<0.05$)；高EAP组、中EAP组、低EAP组大鼠分别从第2周、第4周、第5周差异具有统计学差异($P<0.05$)。见表1。

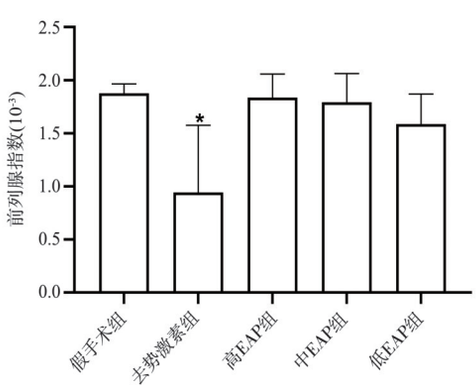
取材时称量前列腺湿重，计算前列腺指数。去势激素组大鼠前列腺腺体极度萎缩，腺体软，体积减小，与周围组织有黏连，与假手术组和EAP组相比，大鼠前列腺指数具有极显著差异（$P<0.01$，$P<0.01$）。肉眼观察高、中、低EAP 3组和假手术组无明显变化（$P>0.05$），较假手术组体积稍小，前列腺腺体稍硬；高、中、低EAP组大鼠3组组间无明显差别（$P>0.05$）。见图1。

表 1　造模期间各组大鼠体质量变化（g，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Changes in body mass of rats in each group during the modeling period (g, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	第0周	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周	取材前
假手术组	6	181.75±7.13	220.50±2.08	268.50±2.38	310.00±4.40	352.50±15.41	386.75±13.22	420.75±10.69	430.00±13.04
去势激素组	6	179.33±3.93	209.67±3.39$^{\#}$	255.67±4.30$^{\#}$	293.33±5.43$^{\#}$	331.83±8.40$^{\#}$	363.67±10.42$^{\#}$	402.16±13.60$^{\#}$	411.17±13.50$^{\#}$
高EAP组	6	186.16±4.46	220.33±9.22	256.00±7.32$^{\#}$	298.83±7.22$^{\#}$	330.67±7.47$^{\#}$	362.67±9.2$^{\#}$	408.33±11.88$^{\#}$	418.83±10.68$^{\#}$
中EAP组	6	182.67±4.72	226.00±5.97	268.50±3.73	312.00±9.86	333.33±7.87$^{\#}$	366.67±4.97$^{\#}$	404.16±6.97$^{\#}$	413.17±6.91$^{\#}$
低EAP组	6	184.83±4.62	220.17±3.92	261.50±5.35	308.50±7.26	339.33±7.20	366.00±8.94$^{\#}$	410.10±13.94$^{\#}$	414.17±8.23$^{\#}$
F		1.239	5.715	6.002	6.845	5.307	7.705	5.481	5.580
P		0.320	0.001	<0.001	<0.001	0.020	<0.001	0.010	<0.001

注：与假手术组相比，$^{\#}P<0.05$；$^{\#\#}P<0.01$。



与假手术组相比，$^{*}P<0.05$

图1　各组大鼠前列腺指数

Fig 1　Prostate index of rats of each group

2.2　各组大鼠前列腺组织病理学的比较

假手术组大鼠前列腺组织结构完整，界限清晰，腺腔规则，腺体上皮细胞形态正常，无炎症反应，见图2A。去势激素组大鼠前列腺组织存在明显腺体结构破坏，上皮细胞形态发生病变，间质明显水肿，腺腔显著扩大，可见大量炎性细胞弥漫性浸润，血管扩张充血，见图2B。高EAP组大鼠存在腺体结构破坏，腺腔扩大，可见少量炎性细胞浸润，见图2C。；中EAP组大鼠存在腺体结构破坏，腺腔稍扩大，腺上皮减少，间质内可见部分炎性细胞浸润，见图2D。；低EAP组大鼠腺体结构有破坏，腺腔疏松，间质内可见少量炎性细胞浸润[8]，见图2E。

2.3　各组大鼠前列腺组织炎症病理评分的比较

造模后，与假手术组相比，去势激素组大鼠前列腺组织炎性细胞、成纤维细胞、腺腔大小、腺腔内分泌物显著上升，具有显著差异（$P<0.05$）；与假手术组相比，高、中、低EAP组大鼠前列腺组织炎症病理评分变化无显著差异（$P<0.05$）；与自身免疫组相比，去势激素组与高、中、低EAP组炎症病理评分各指标具有显著差异（$P<0.05$）；高、中、低EAP组组间对比未见明显差异，无显著差异（$P>0.05$）。见表2。

2.4　各组大鼠血清免疫球蛋白的比较

与假手术组相比，去势激素组大鼠IgA、IgG、IgM显著上升，差异具有显著差异（$P<0.05$）；与假手术组相比，高、中、低EAP组大鼠仅IgM具有显著差异（$P<0.05$）；与自身免疫组相比，去势激素组与高、中、低EAP组炎症病理评分各指标具有显著差异（$P<0.05$）；高、中、低EAP组组间对比未见明显

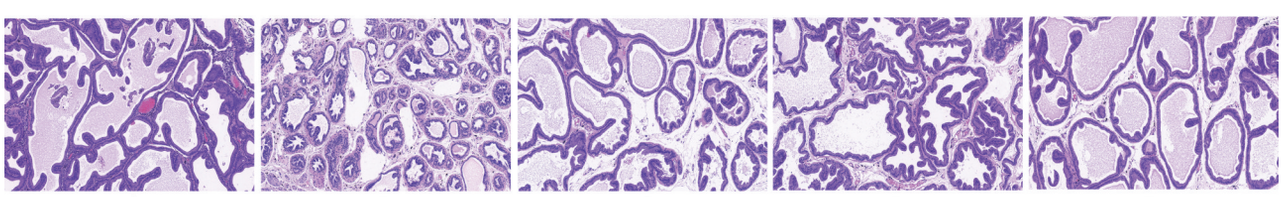


图2　各组大鼠前列腺组织观察（HE，×100）

Fig 2　Observation of prostate tissue in rats of each group (HE, ×100)

表 2 各组大鼠前列腺组织炎症评分比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of inflammation scores of prostate tissue in each group of rats($\bar{x}\pm s$)

组别	n	炎性细胞	成纤维细胞	腺腔大小	腺腔内分泌物
假手术组	6	1.33±1.03	0.50±0.55	0.00±0.00	0.67±0.82
去势激素组	6	3.67±2.88$^{\#}$	2.00±0.00$^{\#\#}$	1.50±0.55$^{\#\#}$	2.00±0.63$^{\#}$
高EAP组	6	1.33±3.34	1.00±0.00	0.17±0.41	0.33±0.57
中EAP组	6	1.33±1.03	0.83±0.41	0.33±0.52	0.50±0.84
低EAP组	6	1.33±1.03	1.00±0.00	0.50±0.55	0.67±0.82
F		5.00	20.18	10.08	4.94
P		0.004	<0.001	<0.001	0.004

注:与假手术组相比,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$。

差异,无显著差异($P>0.05$)。见表3。

表 3 各组大鼠血清IgA、IgG、IgM水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Comparison of serum IgA, IgG and IgM levels of rats in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IgA(g/L)	IgG(g/L)	IgM(g/L)
假手术组	6	0.49±0.40	4.92±0.22	0.44±0.08
去势激素组	6	0.93±0.15$^{\#}$	7.65±0.72$^{\#\#}$	0.78±0.08$^{\#\#}$
高EAP组	6	0.78±0.20	6.56±0.35$^{\#\#}$	0.73±0.04$^{\#\#}$
中EAP组	6	0.74±0.08	6.38±0.14$^{\#\#}$	0.71±0.02$^{\#\#}$
低EAP组	6	0.72±0.03	6.16±0.16$^{\#}$	0.67±0.01$^{\#\#}$
F		6.27	12.70	31.80
P		0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比,$^{\#}P<0.05$;$^{\#\#}P<0.01$。

2.5 各组大鼠血清炎症因子的比较

与假手术组相比,去势激素组IL-1β、TNF-α、CRP、IL-10未见明显差异($P>0.05$);与假手术组相比,低EAP组大鼠IL-1β、TNF-α、CRP、IL-10均显著变化,差异具有极显著差异($P<0.01$),中EAP组大鼠IL-1β、TNF-α具有统计学意义($P<0.05$);高EAP组大鼠各指标未见显著差异($P>0.05$);高、中、低EAP组组间对比,以低EAP组大鼠指标变化最为敏感,极显著差异($P<0.01$)。见表4。

2.6 各组大鼠前列腺组织激素水平的比较

与假手术组分别相比,去势激素组、高EAP组大鼠T水平均未见显著差异($P>0.05$),中EAP组大鼠T水平明显降低,差异具有显著差异($P<0.05$),低EAP组大鼠T水平均具有极显著差异($P<0.05$);高、中、低EAP组组间以低EAP组大鼠T水平变化最为明显($P<0.05$)。见表5。

3 讨论

CNP是泌尿外科常见病,临床病因和发病机制仍未阐明,常规西药治疗也存在局限性,因此建立理想合适的、模拟人类CNP发病机制及病理状态的动物模型大鼠具有很重要的意义。

去势结合雌激素诱导慢性非细菌性前列腺炎大鼠模型特点,免疫因素CNP大鼠模型主要包括去势结合雌激素诱导CNP模型、自身免疫反应诱导CNP模型、自发性CNP模型等。自发性CNP模型选用老年雄性大鼠自发产生CNP,虽然病理表现与临床相似,病理特异性良好,稳定性良好,但因对大鼠种类和周龄要求严格,造模时间长,成本高,个体偏差大,模型难以复制等缺点限制其在实验研究中的应用,目前相关文献中选用该模型进行实验研究十分罕见。去势结合雌激素方法可致大鼠体内睾酮激素水平失衡,一氧化氮合酶增高,引起前列腺组织局部免疫机能亢进,介导免疫炎症反应,造成前列腺组织细胞损伤,形成CNP,较自发性CNP模型造模方法简单、造模成本低,且病理变化不劣于CNP模型,此外在模型持续时间、稳定性方面也具

表 4 各组大鼠血清IL-1β、IL-10、TNF-α、CRP水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Comparison of serum IL-1β, IL-10, TNF-α and CRP levels of rats in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1β(pg/mL)	IL-10(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)	CRP(mg/L)
假手术组	6	21.25±1.48	14.04±0.53	49.84±13.02	6.39±0.42
去势激素组	6	21.77±2.88	15.11±0.81	51.12±10.01	6.07±0.84
高EAP组	6	25.89±3.34	13.24±0.72	58.59±9.38	6.96±0.39
中EAP组	6	28.96±4.96$^{\#}$	11.77±0.61$^{\#\#}$	65.05±3.83	7.86±0.83
低EAP组	6	35.30±3.83$^{\#\#}$	10.38±0.69$^{\#\#}$	72.61±4.83$^{\#\#}$	9.38±1.64$^{\#\#}$
F		14.13	37.82	7.36	10.84
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比,$^{\#}P<0.05$;$^{\#\#}P<0.01$。

表5　各组大鼠前列腺组织T水平比较(ng/mL，$\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Comparison of T levels in prostate tissue of rats in each group(ng/mL，$\bar{x}\pm s$)

组别	n	T
假手术组	6	1.01±0.05
去势激素组	6	0.93±0.65
高EAP组	6	0.87±0.42
中EAP组	6	$0.88\pm0.31^{\#}$
低EAP组	6	$0.67\pm0.03^{\#\#}$
F		0.84
P		0.54

注：与假手术组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

有优良特性。该方法的主要缺点在于是该模型产生原理尚有商榷之处，是单纯雄激素剥夺和雌激素治疗、亦或是自发性或基因型多因素结合促使产生炎症并不清楚；并且此模型严重影响大鼠体内激素水平，大鼠经过去势，理论上睾酮急剧下降，但是否因此体内产生负反馈作用仍未可知，因此有激素水平评估或性功能检测要求时，该类动物模型并不适合[9]。本研究去势结合雌激素诱导CNP大鼠模型发现，去势激素组大鼠T与假手术组相较虽然有所下降，但未见统计学意义，这可能大鼠体内肾上腺弥补部分功能有关。

自身免疫反应诱导慢性非细菌性前列腺炎大鼠模型特点，通过纯化前列腺蛋白刺激诱导CNP是制备CNP大鼠模型的常用方法，原理为同种别雄性附性腺匀浆液可诱发大鼠产生自身免疫反应，从而选择性地诱导细胞免疫及前列腺间隙单个核细胞浸润，形成CNP。此类造模方法操作简便，模型维持时间与去势结合雌激素方法相当，但较为繁琐的是前期需搜取大鼠前列腺制备蛋白匀浆。目前大多文献对蛋白匀浆液浓度以及注射时间的选择，尚未形成统一共识，尽管在相关规范草案中推荐选用20 mg/mL[7]，连续注射45 d的方法制备CNP大鼠模型，但并未指出这一推荐的具体依据。Galmarini等[10]采用大鼠雄性副腺提取物配制成15 mg/mL的蛋白匀浆液和完全弗氏佐剂等比配成1 mL于0，30和45 d对Wistar大鼠进行多点注射，每7 d对大鼠细胞免疫反应动力学进行研究，发现所有大鼠在第35、42、49天时靶器官出现明显的组织学改变，前列腺及附腺产生炎症反应，小血管周围存在单核细胞浸润。周晓辉等[11]在此方法上进一步探索，采用第0天和30天多点注射的方法，发现注射蛋白匀浆液为15 mg/mL时大鼠可在45 d后形成CNP模型，而浓度为5 mg/mL、10 mg/mL时均未出现明显病理改变和炎症反应。宋国宏等[12]选用20、40、60和80 mg/mL的蛋白匀浆液研究浓度与大鼠模型成功率的量效关系，各组分别第0天和第30天多点皮下注射1次，结果显示蛋白匀浆液浓度40、60 mg/mL两组造模45 d后能产生较好炎症反应且保持稳定。综上而言，目前常用大鼠前列腺蛋白匀浆液浓度有15、40、60 mg/mL可供选择，和完全弗氏佐剂1∶1配比成1 mL后多点注射，注射间隔时间少到1 d 1次、注射45次，长至15 d 1次、注射2～3次；SD大鼠或Wistar大鼠均可形成EAP模型。本研究采40、20、10 mg/mL三种浓度构建大鼠CNP模型，造模后可见三组免疫球蛋白指标未见明显变化；与假手术组相比，10 mg/mL组炎症因子指标IL-1β、TNF-α、CRP、IL-10明显改变，20 mg/mL组病理变化更为明显。

两种模型在造模过程中均出现进食及饮水量较假手术组减少，体质量降低，去势激素组前列腺指数显著性下降。其中去势激素组模型死亡2只，考虑大鼠可能对规定麻醉剂量不耐受而死亡；高EAP组死亡2只，可能与伤口感染、大鼠同类撕咬有关。

两种模型病理均有不同程度改变，其中去势激素组前列腺指数腺体结构破坏、腺腔弥漫性分布炎性细胞，变化最为明显；高、中、低EAP组病理变化各有优劣，中EAP组大鼠腺体结构破坏、炎性细胞浸润较多，3组较假手术组有明显改变，但仍逊于去势激素组。两种模型比较，去势激素组造模更符合CNP的病理变化，炎性细胞浸润较高、中、低EAP 3组均明显。

前列腺组织炎症病理评分以去势激素组上升变化最为明显，相较于假手术组和自身免疫组，去势激素组炎性细胞、成纤维细胞、腺腔大小、腺腔内分泌物均可见明显异常；相较假手术组，高、中、低EAP组未见显著差异；高、中、低EAP组组间差异亦未有统计学意义。

血清免疫球蛋白IgA[13]、IgG[14]、IgM[15]是检测大鼠是否产生免疫反应的重要指标。IgA分布于机体黏膜局部，是抗感染免疫的第一防线；IgG能够激活补体、吞噬病菌、中和毒素，是感染免疫的主要力量，并且能在体内维持较长时间；IgM是机体受感染的标志物，受到抗原刺激后会第一时间激活免疫应答反应，在早期机体免疫防御中意义重大，因此血清免疫球蛋白水平高低也提示CNP免疫反应的强弱。本研究发现去势激素组和高、中、低EAP组大鼠IgA、IgG、IgM水平较假手术组均有不同程度上升，其中以去势激素组大鼠变化最为明显，差异均具有显著意义($P<0.05$)。

促炎性细胞因子包括IL-1β[16]、TNF-α[17]、

CRP[18]等,在炎症中起到促进作用,加速细胞间黏附因子表达、增加前列腺素,造成前列腺组织局部损伤;抗炎性细胞因子IL-10可强烈抑制单核巨噬细胞,减少炎症介质产生,达到修复组织的功能[19]。本研究中相较假手术组,低EAP组大鼠IL-1β、IL-10、TNF-α、CRP均显著变化,差异均具有统计学意义($P<0.05$),去势激素组未见明显差异($P>0.05$)。

雄激素对前列腺正常发育起主导作用,具有抑制体液免疫的作用,当雄激素含量水平降低,便可诱发自身免疫反应的发生[20]。本研究中相较假手术组,中、低EAP组大鼠T水平均具有统计学意义($P<0.05$),去势激素组大鼠T水平亦有所下降,但未见明显差异($P>0.05$)。

综上所述,去势结合雌激素诱导法和自身免疫反应诱导法均可成功构建CNP模型。一般情况方面去势激素组前列腺指数明显下降;病理方面,去势激素组可导致明显的腺体破坏、间质水肿,前列腺组织炎性细胞浸润十分明显,更符合CNP的病理变化;免疫指标中,去势激素组大鼠优于高、中、低EAP组;在炎症因子指标中及性激素指标中,低EAP组(10 mg/mL)大鼠明显优于其他各组变化。根据制备草案计算权重[7],可得去势激素组CNP模型总积分为0.81,高、中、低EAP组分别为0.62、0.73、0.67分,根据本研究结果,一般情况下,去势结合雌激素诱导法造模是两者之间更为合适的一种方法。具体而言,去势结合雌激素诱导法更适合研究CNP病理及免疫应答反应变化,更适用于研究CNP长期改变;而对于研究CNP炎症因子指标及性激素指标,10 mg/mL的前列腺蛋白匀浆液是制备大鼠CNP更为合适的理想浓度,更适用于研究CNP早期炎症指标变化。

作者贡献度说明:

唐益文、王雄:负责造模实验、数据整理、统计及文章书写;周艳艳、陈豪特、张泽家、王忠:协助实验进行以及核对实验数据;高庆和、刘建刚:负责理论指导、审阅文章;高瞻:工作支持,提供经费。

所有作者声明无利益冲突关系。

参考文献

1 Khattak AS, Raison N, Hawazie A, et al. Contemporary management of chronic prostatitis[J]. Cureus, 2021, 13(12): e20243.

2 米华, 陈凯, 莫曾南. 中国慢性前列腺炎的流行病学特征[J]. 中华男科学杂志, 2012,18(7): 579-582.

3 中华医学会男科学分会, 慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征诊疗指南编写组, 商学军,等. 慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征诊疗指南[J]. 中华男科学杂志, 2022,28(6): 544-559.

4 王丹丹, 孙大林, 金保方. 慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征发病机制的研究进展[J]. 中华泌尿外科杂志, 2021, 42(10): 797-800.

5 罗志强, 王营, 彭绪峰, 等. 慢性前列腺炎的免疫学机制研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2023,27(1): 145-148.

6 陈静, 白明, 苗明三. 基于数据挖掘的慢性非细菌性前列腺炎动物模型应用分析[J]. 中药药理与临床, 2021,37(3): 183-190.

7 慢性前列腺炎动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018,24(19): 10-14.

8 李长建, 焦玉涛, 王玉华, 等. 马鞭草总苷对大鼠慢性前列腺炎/骨盆疼痛综合征的改善作用及机制研究[J]. 广州中医药大学学报, 2022,39(4): 908-914.

9 张新玥, 张静文, 卫昊. 慢性非细菌性前列腺炎大鼠模型的研究现状与评价[J]. 中国临床药理学杂志, 2021,37(10): 1282-1286.

10 Galmarini M, Ferro ME, Riera CM. Delayed hypersensitivity and lesions following isoimmunization with modified rat male accessory glands: Kinetics of induction[J]. J Reprod Immunol, 1988,13(2): 147-157.

11 周晓辉, 韩蕾, 周智恒, 等. 免疫性慢性非细菌性前列腺炎大鼠模型的形态学与分子生物学特性[J]. 中华男科学杂志, 2005,(4): 290-295.

12 宋国宏, 李文玉, 张晨, 等. 免疫法制作大鼠非细菌性前列腺炎模型的量效关系研究[J]. 中华男科学杂志, 2011, 17(7): 586-590.

13 徐国良, 焦志灵, 李路鹏, 等. 慢性前列腺炎患者前列腺液免疫球蛋白和炎性因子及趋化因子水平变化及意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018,32(9): 887-889.

14 邓敏, 赵洪福. 血清及前列腺按摩液中免疫球蛋白水平对慢性前列腺炎病情进展的影响[J]. 河北医科大学学报, 2019,40(8): 960-963.

15 王家芷, 王成. 血清IgA、IgG、IgM检测在前列腺炎疗效评估中的应用[J]. 检验医学, 2018,33(12): 1094-1097.

16 张礼刚, 骆广跃, 张力, 等. 白细胞介素-1β在SD大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型中的表达及其意义[J]. 安徽医科大学学报, 2017,52(6): 843-846.

17 Liu Y, Mikrani R, Xie D, et al. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostate cancer: Study of immune cells and cytokines[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2020,34(2): 160-172.

18 赵枫, 宋丹妮, 洪莺, 等. 前列腺液NAP积分和血液PCT在各种慢性前列腺炎诊断中的应用[J]. 现代实用医学, 2019,31(3): 383-384.

19 李天赋, 李卫巍, 吴秋月, 等. 自身免疫性前列腺炎大鼠模型的建立[J]. 中华男科学杂志, 2014,20(5): 414-418.

20 马建锋, 刘颖, 孙立娜, 等. 前列腺炎患者与健康人群的血清睾酮、雌二醇水平的临床比较[J]. 中国性科学, 2017, 26(4): 25-26.

[本文编辑] 宋睿璞 谭贝加 朱 昊