

“一杯法”:一种前列腺按摩液收集方法

何玮 李路 袁红方 陈志强 徐华 蓝儒竹 余淦 叶章群

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科 湖北省泌尿外科研究所(何玮、李路、陈志强、徐华、蓝儒竹、余淦、叶章群),计划生育研究所(袁红方)

何玮、李路为共同第 1 作者

通信作者:叶章群,Email:zhangqun_ye@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2017.07.027

【摘要】 目的 建立一种简便、快速、可靠的收集前列腺按摩液(EPS)的新方法。方法 35 条 Beagle 犬,随机分为 7 组,每组 5 条。构建尿路感染模型,收集尿液、EPS 和前列腺组织进行细菌培养和白细胞镜检,同时取尿道和前列腺组织进行组织病理和电镜检查及尿道黏膜刺激性评估。结果 细菌学检查:EPS 结果表明第 3 组阳性,其余 4 组均阴性;尿液结果第 1~2 组均为阴性,第 3~5 组均为阳性。EPS 白细胞镜检,第 6 组白细胞计数 $[(3.60 \pm 0.55)$ 个/高倍镜视野]与第 7 组 $[(3.33 \pm 0.41)$ 个/高倍镜视野]比较差异无统计学意义($t=0.871, P=0.409$)。组织病理和电镜检查证实上述结果。尿道黏膜刺激性评分结果显示,洁悠神(JUC)对黏膜具有极轻微刺激性。结论 经 JUC 尿道膜收集的 EPS 可以排除被尿道污染(假阳性)以及被尿道膜干扰(假阴性)的可能性,“一杯法”具有可行性。

【关键词】 前列腺按摩液; 洁悠神长效抗菌材料; Beagle 犬尿路感染模型; 前列腺炎

基金项目:国家自然科学基金(31072238、31172441、31372562、81170650);国家重大新药创制项目(2012ZX09303018)

A novel strategy to collect expressed prostatic secretion He Wei, Li Lu, Yuan Hongfang, Chen Zhiqiang, Xu Hua, Lan Ruzhu, Yu Gan, Ye Zhangqun

Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; Institute of Urology of Hubei Province, Wuhan 430030, China (He W, Li L, Chen ZQ, Xu H, Lan RZ, Yu G, Ye ZQ); Family Planning Research Institute, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Yuan HF)

He Wei and Li Lu are the first authors who contributed equally to the article

Corresponding author: Ye Zhangqun, Email:zhangqun_ye@163.com

【Abstract】 Objective To establish a simple, rapid and reliable method for collecting expressed prostatic secretion (EPS). **Methods** Thirty-five Beagle dogs were randomly divided into 7 groups ($n=5$ each). After construction of urinary tract infection animal model, urine, EPS and prostate tissue were collected for bacterial culture and microscopic examination of white blood cells. Besides, urethra and prostate tissue were obtained for histopathological and electron microscopic examination, and evaluation of urethral mucosa irritation. **Results** EPS results showed that bacterial test in the third group was positive, that in the other four groups was negative, Urine results in group 1 and 2 were negative, and those in the group 3-5 were positive. There was not significant ($t=0.871, P=0.409$) difference between the sixth groups $[(3.60 \pm 0.55)/HP]$ and the seventh groups $[(3.33 \pm 0.41)/HP]$. The results above were confirmed by histopathological and electron microscopic examinations. The results also showed that JUS long-acting antibacterial material had a slight irritation to mucous membrane. **Conclusion** The EPS collected by JUC can exclude the possibility of being contaminated by urethra (false positive) and the interference of urethra (false negative), suggesting a time-wise feasible.

【Key words】 Expressed prostatic secretion; JUC long-acting antibacterial material; Beagle urinary tract infection model; Prostatitis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (31072238, 31172441, 31372562, 81170650); China Key Hi-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs(2012ZX09303018)

前列腺按摩液(EPS)检查是诊断前列腺炎的必需项目。近几十年诊疗指南推荐采用 Meares-Stamey 的“四杯法”对前列腺炎进行分类,但这种方法操作繁

琐、费用较高,对临床的指导意义有限^[1],且 EPS 经尿道流出易被尿道中的微生物污染,造成假阳性,影响结果准确性。因此迫切需要一种操作简单避免污染的收

集 EPS 的新方法,从而快速、简便、准确地诊断前列腺炎。我们利用 Beagle 犬构建尿路感染(UTI)模型,将洁悠神(JUC)长效抗菌材料挤入其尿道形成尿道膜,通过“一杯法”收集 EPS 进行细菌学检测,现报道如下。

材料与方 法

1. 材料:致病性金黄色葡萄球菌[美国典型菌种保藏中心(ATCC),25923]传代至第 5 代,调整浓度至 1×10^9 菌落形成单位(CFU)/ml,由华中科技大学同济医学院微生物教研室提供。健康雄性 Beagle 犬 35 条,平均年龄 24 个月,体重 11 ~ 13 kg,由华中科技大学同济医学院附属同济医院动物实验中心(实验动物设施使用编号:00023472;动物质量合格证号:00018012)提供并统一管理,饲养于无特定病原体(SPF)清洁级环境,所有操作经由同济医学院实验动物使用伦理委员会许可(ChiECRCT20140040)。入组的 35 条 Beagle 犬随机分为 7 组,每组 5 条。7 组 Beagle 犬中随机选择其中 5 组(组 1 ~ 组 5)进行 EPS 细菌检测实验,另外两组(组 6 ~ 组 7)进行白细胞检测。JUC 尿道膜(由 1.5% 有机硅双长链双季铵盐和 98.5% 去离子水组成),批号:18010006,由中国南京神奇科技开发有限公司提供。

2. Beagle 犬 UTI 模型构建^[2]:称重后,给予戊巴比妥钠 1 ml/kg 静脉麻醉,固定四肢,1% 活力碘消毒外生殖器及尿道外口,插入 F6 尿道测压管,轻轻按摩膀胱以排出尿液,并擦掉尿道口所有残余的尿液。经管腔 5 s 内注入制备好的金黄色葡萄球菌混悬液 2.5 ml,接种后立即移除导管以避免膀胱输尿管反流。第 1、2、3、5、7、9 天接种菌液 1 次,第 9 天收集中段尿液进行细菌培养。

3. EPS 收集^[3]:检查前充分饮水,(1)挤压膀胱分别收集前段尿(VB1)5 ~ 10 ml 和中段尿(VB2)10 ml;(2)插入 F6 尿道测压管至膀胱颈部,注入 JUC 或生理盐水,直至尿道外口有液体反流,停止注入并移除导管。10 min 后,按压前列腺,收集 EPS 2 ~ 5 ml;(3)再次挤压膀胱,收集后段尿(VB3)10 ml。收集的尿液和 EPS 均送细菌培养及菌落计数。

4. “一杯法”EPS 收集:按上述方法中步骤(2)和(3)收集 EPS 和 VB3。

5. 取材:以上操作完成后,将所有 Beagle 犬在无菌环境下取前列腺组织和尿道组织,液氮保存,待用。

6. 金黄色葡萄球菌 UTI 动物模型鉴定标准:(1)尿培养结果为致病性金黄色葡萄球菌(凝固酶实验阳性);(2)细菌培养计数 $> 10^3$ CFU/ml。

7. 检测指标:(1)微生物检测:将所有尿液、EPS 和前列腺组织进行细菌培养,观察计数菌落是否高于 10^3 CFU/ml。(2)白细胞镜检:高倍视野下对收集的前列腺液进行白细胞计数,由同一实验员完成。(3)组织病理观察:将前列腺和尿道组织以 10% 中性甲醛固定 72 h 后,石蜡包埋,经苏木素-伊红(HE)染色后观察。(4)扫描电子显微镜观察:取组织于 2.5% 戊二醛中 4 ℃ 固定 30 ~ 60 min,再用 1% 四氧化锇固定 30 ~ 120 min,依次用 50% ~ 100% 的乙醇浸泡,梯度脱水,每次 5 ~ 15 min,脱水后放入醋酸异戊酯液中浸泡 15 min 置换,在体积分数 100% CO_2 中临界干燥,离子溅射仪镀金膜,扫描电子显微镜(Hitachi S-4800)观察、拍照和分析。(5)尿道黏膜刺激性评估:参照 ISO10993-10:2010(医疗器械的生物学评价——第 10 部分:刺激和皮肤敏化试验)标准对尿道黏膜的形态进行观察并记录分数,确定刺激指数:0 分反应程度为无,1 ~ 4 分为极轻,5 ~ 8 分为轻度,9 ~ 11 分为中度,12 ~ 16 分为重度。如有反应,进行组织病理学检查,半定量分析,判断病理变化,包括:(1)上皮细胞脱落;(2)白细胞浸润;(3)组织充血;(4)水肿。

8. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 统计软件,对计量数据采用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. UTI 构建:在第 9 天,第 3 组、第 4 组和第 5 组所有 Beagle 犬的尿道外口可见明显的脓性分泌物流出,对尿液进行细菌培养,均提示致病性金黄色葡萄球菌(凝固酶实验阳性),细菌培养计数均 $> 10^3$ CFU/ml。

2. 细菌培养:(1)对第 1 ~ 5 组 Beagle 犬的前列腺组织培养,结果均呈阴性。表明前列腺组织未受到尿道内细菌的侵袭。(2)对第 1 ~ 5 组 Beagle 犬的 EPS 培养,只有第 3 组结果呈阳性,其他 4 组结果均呈阴性。说明采用生理盐水处理尿道的第 3 组“四杯法”不能够排除假阳性,而采用 JUC 处理尿道的第 4 组“四杯法”和第 5 组“一杯法”可以排除假阳性结果。(3)对第 1 ~ 5 组 Beagle 犬尿培养结果,第 1 组和第 2 组的 VB1、VB2 和 VB3 结果均呈阴性,而第 3 组至第 5 组 VB1、VB2 和 VB3 均呈阳性。结果显示,采用 JUC 处理尿道的第 4 组“四杯法”和第 5 组“一杯法”可以排除假阴性结果。

3. 白细胞镜检:第 6 组白细胞计数均值为 (3.60 ± 0.55) 个,第 7 组为 (3.33 ± 0.41) 个,差异无统计学意义($t = 0.871, P = 0.409$),表明采用 JUC 处理尿道的“一杯法”可以排除白细胞假阴性。

4. 组织病理检查:HE 染色法结果显示,第 1 组至第 5 组的前列腺组织均显示为正常的组织;第 1 组和第 2 组尿道组织均显示为正常组织;第 3 组至第 5 组的尿道组织均显示为细菌感染的尿道组织。与正常组织比较,感染的尿道组织在镜下表现为尿道黏膜边缘不齐,有溃疡、水肿等改变,其组织内有白细胞、浆细胞和淋巴细胞浸润,毛细血管扩张,尿道腔内有红细胞堆积。

5. 电镜观察:第 1 组为正常尿道上皮细胞,细胞壁光滑、完整,尿道腔内无分泌物和炎性细胞浸润;第 2 组 JUC 在正常尿道黏膜上形成了均匀的、致密的、有规则的物理抗微生物膜;第 3 组在尿道黏膜上形成了结构致密、高度组织化的多细胞群体结构的细菌生物膜;第 4 组和第 5 组在尿道黏膜上的细菌生物膜上, JUC 形成了均匀的、致密的、有规则的物理抗微生物膜,并且细菌生物膜被物理抗微生物膜崩解。

6. 尿道黏膜刺激性评分结果:尿道黏膜形态刺激指数显示第 1 组~第 5 组所有动物模型的尿道评级均为极轻微,组间差异无统计学意义。说明 JUC 对尿道黏膜无明显刺激。

讨 论

前列腺炎是泌尿外科常见疾病,有数据显示近 50% 的男性在一生中的某个时期会受到前列腺炎的影响,且部分前列腺炎可严重影响患者生活质量^[4]。前列腺炎症状常缺乏特异性, EPS 检查对其诊断具有重要价值。由于传统的“四杯法”操作繁琐,价格较高,临床应用价值有限,亟需一种简便、快速、可靠的收集 EPS 的新方法。本研究结果表明,与传统的“四杯法”比较,采用 JUC 的“一杯法”可快速、高效、简便地收集无污染的 EPS,且操作对黏膜刺激极轻微。

慢性细菌性前列腺炎(Ⅱ型)的主要致病菌之一是金黄色葡萄球菌^[5],因此本研究选用金黄色葡萄球菌构建 UTI 模型。在注射致病菌后第 9 天,检测结果表明 UTI 模型构建成功。

JUC 喷雾敷料是抗微生物的物理方法专利产品,由 1.5% 有机硅双长链双季胺盐和 98.5% 去离子水组成,已获得美国食品与药物管理局(FDA)、欧盟 CE、中国和韩国等医疗器械产品注册。据文献报道,采用 JUC 喷洒体表(皮肤、黏膜),可在体表表面形成一层

致密的正电荷网状膜,对带负电荷的细菌、真菌、病毒等病原微生物具有强烈吸附作用,通过静电力作用杀灭和隔离细菌^[6]。这种物理学抗菌方法与抗生素的化学方法比较可以克服其耐药性难题,已有报道 JUC 对常见的细菌耐药菌株不会产生耐药性优势^[7];JUC 在烧伤、多重耐药感染(MRSA)、尿路感染、腹膜透析感染、呼吸机相关肺炎感染等有多项临床试验中均显示良好效果^[8]。上述结论与本研究结果一致, JUC 注入膀胱在尿道黏膜表面形成致密生物膜防止尿道细菌污染 EPS,减少假阳性和假阴性结果发生率,提高诊断准确率,且对尿道黏膜刺激性少,从而使得“一杯法”具有可行性。

我们观察到 Beagle 犬尿道黏膜生物膜的形成,快速收集到了无污染的 EPS。此外,本研究通过建立 Beagle 犬尿路感染模型,排除了“一杯法”假阳性和假阴性的可能性,显示“一杯法”设计的可行性。

参 考 文 献

- [1] Nickel JC, Nyberg LM, Hennenfent M. Research guidelines for chronic prostatitis: consensus report from the first National Institutes of Health International Prostatitis Collaborative Network [J]. *Urology*, 1999, 54(2):229-233.
DOI:10.1016/S0090-4295(99)00205-8.
- [2] Hung CS, Dodson KW, Hultgren SJ. A murine model of urinary tract infection [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(8):1230-1243.
DOI:10.1038/nprot.2009.116.
- [3] Dale A, Wilson J, Forster G, et al. Management of chronic prostatitis in genitourinary medicine clinics in the United Kingdom's North Thames Region 2000 [J]. *Int J STD AIDS*, 2001, 12(4):256-259.
DOI:10.1258/0956462011923011.
- [4] Krieger JN, Riley DE, Cheah PY, et al. Epidemiology of prostatitis: new evidence for a world-wide problem [J]. *World J Urol*, 2003, 21(2):70-74.
DOI:10.1007/s00345-003-0329-0.
- [5] Choi YS, Kim KS, Choi SW, et al. Microbiological etiology of bacterial prostatitis in general hospital and primary care clinic in Korea [J]. *Prostate Int*, 2013, 1(3):133-138.
DOI:10.12954/PI.13023.
- [6] Dai LG, Fu KY, Hsieh PS, et al. Evaluation of wound healing efficacy of an antimicrobial spray dressing at skin donor sites [J]. *Wounds*, 2015, 27(8):224-228.
DOI:10.1018/S0090-4295(99)00215-8.
- [7] Konwar A, Kalita S, Kotoky J, et al. Chitosan-iron oxide coated graphene oxide nanocomposite hydrogel: a robust and soft antimicrobial biofilm [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(32):20625-20634.
DOI:10.1021/acsami.6b07510.
- [8] Borzabadi-Farahani A, Borzabadi E, Lynch E. Nanoparticles in orthodontics, a review of antimicrobial and anti-caries applications [J]. *Acta Odontol Scand*, 2014, 72(6):413-417.
DOI:10.3109/00016357.2013.859728.

(收稿日期:2016-12-12)