

# 密蒙花总黄酮含药血浆干预干眼症细胞凋亡模型 AR mRNA 表达

王方<sup>1,2</sup>, 彭清华<sup>1</sup>, 姚小磊<sup>1,3</sup>, 李怀凤<sup>1</sup>, 陈佳文<sup>1</sup>, 李点<sup>1</sup>

**基金项目:**中国国家自然科学基金资助项目(No. 30772824); 中国教育部高等学校博士学科点专项基金资助项目(No. 200805410004); 中国湖南省自然科学基金资助项目(No. 07JJ3049); 中国湖南省科技厅科研基金资助项目(No. 200-9FJ3001); 2008年中国湖南省研究生创新基金资助项目

**作者单位:**<sup>1</sup>(410007)中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学第一附属医院中医眼科学重点学科;<sup>2</sup>(550003)中国贵州省贵阳市, 贵阳中医学院第二附属医院眼科;<sup>3</sup>(530011)中国广西壮族自治区南宁市, 广西中医学院附属瑞康医院眼科

**作者简介:**王方, 博士, 研究方向: 眼表疾病、眼底病。

**通讯作者:**彭清华, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 中国中西医结合学会眼科专业委员会副主任委员、世界中医药学会联合会眼科分会常务理事、中华中医药学会眼科分会常务委员、中国湖南省中西医结合眼科专业委员会主任委员, 研究方向: 中西医结合防治眼表疾病、青光眼、眼底病。pqhz\_520@163. com; 姚小磊, 博士, 主治医师。yxshh@126. com

收稿日期:2010-12-01 修回日期:2011-01-11

## Intervention of Buddleja officinalis total flavonoids drug-containing plasma on the expression of AR mRNA in dry eye apoptosis model

Fang Wang<sup>1,2</sup>, Qing-Hua Peng<sup>1</sup>, Xiao-Lei Yao<sup>1,3</sup>, Huai-Feng Li<sup>1</sup>, Jia-Wen Chen<sup>1</sup>, Dian Li<sup>1</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 30772824); Doctor-Subject Site Special-Purpose Foundation of High-School, China(No. 200805410004); Natural Science Foundation of Hunan Province, China (No. 07JJ3049); Scientific Research Foundation of Hunan Provincial Science and Technology Department, China (No. 200-9FJ3001); Postgraduate Innovate Foundation of Hunan Province in 2008, China

<sup>1</sup>Key Disciplines of Traditional Chinese Medicine Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, Guizhou Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Ruikang Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

**Correspondence to:** Qing-Hua Peng; Xiao-Lei Yao. Key Disciplines of Traditional Chinese Medicine Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. pqhz\_520@163. com; yxshh@126. com

Received:2010-12-01 Accepted:2011-01-11

## Abstract

• **AIM:** To establish the dry eye apoptosis model caused by the reduction of androgen levels, to explore the effect of Buddleja officinalis total flavonoids drug-containing plasma for activating the expression of AR mRNA; detect the expression of AR mRNA with the same method after using androgen receptor blockers, to determine relationship of the expression of AR mRNA with the binding effect of AR receptor in the Buddleja officinalis total flavonoids drug-containing plasma.

• **METHODS:** *In vitro* lacrimal gland epithelial cells were isolated and cultivated. The apoptosis of epithelial cells of rat lacrimal gland were induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the dry eye apoptosis state caused by the reduction of androgen levels were established. There were the blank plasma group, Buddleja officinalis plasma total flavonoids interfere with drug-containing group, the intervention group of testosterone propionate, the expression of AR mRNA in each group was observed and androgen receptor blocker flutamide was used to explore the intended androgen effect of Buddleja officinalis total flavonoids.

• **RESULTS:** The results of Western blot showed that after the intervention of drug-containing plasma, the expression of AR mRNA in Buddleja officinalis drug-containing plasma total flavonoids intervention group and testosterone propionate intervention group were enhanced and the differences between the two groups were significant ( $P < 0.01$ ). After using the androgen receptor blocker in all groups, the expression of AR mRNA in each group had no difference ( $P > 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Buddleja officinalis total flavonoids drug-containing plasma can promote the expression of AR mRNA which is associated with the combination of Buddleja officinalis total flavonoids drug-containing plasma and the AR receptor, creating the same androgen effect with testosterone propionate.

• **KEYWORDS:** dry eye syndrome; lacrimal gland epithelial cells; culture; AR mRNA; AR; flutamide

Wang F, Peng QH, Yao XL, *et al.* Intervention of Buddleja officinalis total flavonoids drug-containing plasma on the expression of AR mRNA in dry eye apoptosis model. *Guoji Yanke Zazhi( Int J Ophthalmol)* 2011;11(2):220-222

## 摘要

**目的:**探讨密蒙花总黄酮含药血浆对雄激素水平下降所致干眼症的细胞凋亡模型 AR mRNA 表达的影响,并应用雄

激素受体阻滞剂以确定 AR mRNA 表达与密蒙花总黄酮含药血浆和 AR 受体的结合效应有关。

**方法:**体外分离及培养泪腺上皮细胞,以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导大鼠泪腺上皮细胞凋亡,建立雄激素水平下降所致干眼症的细胞凋亡模型。设立空白血浆组、密蒙花总黄酮含药血浆组、丙酸睾酮组,分别观察各组 AR mRNA 表达情况;并应用雄激素受体阻滞剂氟他胺,观察密蒙花总黄酮的拟雄激素效应。

**结果:**密蒙花总黄酮含药血浆干预组与丙酸睾酮干预组中 AR mRNA 的表达增强,两组间的差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。各组加入雄激素受体阻滞剂后,组间的 AR mRNA 表达无差异 ( $P > 0.05$ )。

**结论:**密蒙花总黄酮含药血浆可促进 AR mRNA 表达,产生与丙酸睾酮相同的雄激素效应。AR mRNA 的表达与密蒙花总黄酮含药血浆和 AR 受体的结合效应有关。

**关键词:**干眼症;泪腺上皮细胞;培养;AR mRNA;AR;氟他胺

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.02.07

王方,彭清华,姚小磊,等.密蒙花总黄酮含药血浆干预干眼症细胞凋亡模型 AR mRNA 表达.国际眼科杂志 2011;11(2):220-222

## 0 引言

干眼症 (dry eye syndrome) 是由于泪液的量或质的异常、泪膜不稳定和眼表损害而导致的一组眼不适症状,又称角结膜干燥症 (keratoconjunctivitis sicca, KCS)。其多发生于年龄大于 60 岁的女性,是常见的眼表疾病。干眼症的病因多种多样,其病理生理及临床表现过程均无特异性,雄激素水平下降是干眼症的重要发病原因<sup>[1]</sup>。现今药物对雄激素水平下降所致干眼症有一定的局限性,因此在中药领域寻找一种可以替代雄激素治疗的药物,并明确其作用机制迫在眉睫。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康 1 月龄 Wistar 雄性大鼠 120 只,体质量 150~180g(湘雅医学院动物中心提供,SPF 级,远交系),普通饲料喂养。超声细胞破碎仪(先欧科技),电热恒温水浴箱(浙江杭州蓝天化验仪器厂),iQ5 Real Time PCR Detection System(Bio-Rad 公司)。密蒙花总黄酮提取物(自制),Trizol(美国 Invitrogen 公司),First Strand cDNA Synthesis Kit,2 × AllinOne™ Q-PCR Mix(美国 GeneCopoeia 公司),OLig(DT)15, RNA 酶抑制剂(PRMEGA 公司),电泳级琼脂糖 Agarose(武汉博士德公司),溴化乙锭(EB)分析纯、10 × DNA 加样缓冲液(杭州四季清生物工程材料有限公司),氟他胺(北京鼎国生物技术有限公司),丙酸睾酮(湖北省远大制药集团股份有限公司)。引物合成:广州贝复能生物技术有限公司(表 1)。

**1.2 方法** 将初步提取的泪腺上皮细胞以  $3 \times 10^5/\text{cm}^2$  接种在 50mL 塑料培养瓶中,反复贴壁 3 次(每次 15~20min)纯化泪腺上皮细胞,置于 37℃、含 50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。36h 后首次半量换液,48h 后全量换液 1 次。以后每 4d 换液 1 次,待细胞融合 2d 后,将生长状况良好的原代泪腺上皮细胞随机分为空白血浆组、密蒙花总黄酮含药血浆组、雄激素组,置于 24 孔培养板中,每组 2 孔。空白血浆组加入健康雄性大鼠血浆,密蒙花总黄酮含药血

表 1 引物序列表

引物名称	引物序列
GADPH	上游 5'-CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3'
	下游 5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTC-3'
AR	上游 5'-CGGGATCCGCCATTGACTATTACTT-3'
	下游 5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3'

浆组加入自制的雄性大鼠密蒙花总黄酮含药血浆,雄激素组直接加入丙酸睾酮液(最终浓度为  $1 \times 10^{-6}$  mol/L)。干预 48h 后,再分别加入终浓度为 100μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,继续培养 60min,诱导细胞凋亡。吸出含有血清的培养液,加入无血清的培养基静置 12h 后,倒掉培养基,分别予以含药血浆及氟他胺干预 12h。RT-PCR 采用染料法(WUBRGreen I)进行 AR mRNA 的表达检测,对 AR mRNA 行相对定量分析:将 2 × AllinOne™ Q-PCR Mix 在室温下融解,离心;将制备好的 PCR reaction mix 加入 96 孔板中离心,采用标准的三步法程序进行 PCR 反应后,进行熔解曲线分析。最终用  $\Delta\Delta\text{Ct}$  进行分析的相对定量(例:以持家基因为参考基因时的分析方法)。(1)前提:需要明确对照(参考)样品与处理(未知)样品,并且得到了所有样品的目的基因及其持家基因(如 GAPDH, ACTB, 18s rRNA)的 Ct 值。(2)分析方法(以一个未知基因为例):a 求出各个样品的未知基因与持家基因的  $\Delta\text{Ct}$ :  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct 未知} - \text{Ct 持家基因}$ ; b 求出未知样品基因的  $\Delta\text{Ct}$  与对照样品的  $\Delta\text{Ct}$  差值  $\Delta\Delta\text{Ct}$ :  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct 未知} - \Delta\text{Ct 对照}$ ; c 求相对含量  $= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计学软件进行多组间方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 内参基因——GADPH 在不同样本中的数据分析** 内参基因 ACTB 在各个样品中扩增效果良好,说明各样品的反转录等没有问题。

**2.2 泪腺上皮细胞中 AR mRNA 的表达** 空白血浆干预组中有少量 AR mRNA 表达;密蒙花总黄酮含药血浆组和丙酸睾酮组 AR mRNA 的表达量升高,分别为  $2.67 \pm 1.42$  和  $4.08 \pm 2.03$ ,与空白血浆干预组相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ );密蒙花总黄酮含药血浆组中 AR mRNA 表达量比丙酸睾酮组表达量低,且两者间的差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

**2.3 氟他胺干预后 AR mRNA 在泪腺上皮细胞中的表达** 氟他胺干预泪腺上皮细胞后,密蒙花总黄酮含药血浆组和丙酸睾酮组 AR mRNA 的表达分别为  $2.93 \pm 1.14$  和  $2.67 \pm 1.23$ ,两组与空白血浆组间的差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

密蒙花有效部位为黄酮,可分离得到 8 个黄酮类化合物——刺槐素、芹菜素、木犀草素、密蒙花新苷、蒙花苷、木犀草素-7-O-芸香糖苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、秋英苷。现已证明眼是性激素作用的靶器官,已证实 AR 广泛存在于人、兔和鼠的泪腺、角膜等眼表组织中泪腺上皮细胞为雄激素的靶细胞,AR 存在于腺泡及腺管上皮细胞核上。雄激素、黄酮均为杂环多酚类化合物,可以利用其化学结构的相似性,与 AR 结合。目前研究已证明某些黄酮类化合物具有拟雄激素作用<sup>[1]</sup>,可以用于治疗因雄激素水平下降所致的某些疾病,如骨质丢失等。利用放射性示踪标记

的方法研究还表明,黄酮是细胞 AR 的刺激物,可以与细胞 AR 结合发挥生物学效应<sup>[2]</sup>。由此可见,密蒙花中所含黄酮也应可以与 AR 结合,产生拟雄激素效应,治疗雄激素水平下降导致的疾病,自然也可包括干眼症。虽然中药复方治疗干眼症有效的报道较多见,但目前,将密蒙花作为君药的方剂治疗本病的临床及实验报道仍较少。所以,基于文献支持其可能的拟雄激素效应,以及古代医籍对于其治疗眼表干涩的论述,前期研究证明:密蒙花黄酮类提取物对于实验性雄激素水平下降所致干眼症,有良好的治疗效果,其机制主要与密蒙花黄酮能够有效调节泪腺局部炎症反应和细胞凋亡有关,能改善泪腺超微结构,从而维持泪液基础分泌量<sup>[3,4]</sup>。密蒙花黄酮类提取物为一种天然药物,黄酮类物质属于植物雌激素的一种<sup>[5]</sup>,其临床应用有较高的安全性,有良好应用前景。前期研究及文献调研支持其有望成为一种新的雄激素替代物,疗效肯定,能够避免雄激素替代治疗(testosterone supplementation therapy, TST)所造成的一系列副作用,且治疗机制与雄激素下水平下降所致干眼症的发病机制相对应。

现已证明,眼是性激素作用的靶器官,已证实雄激素、雌激素、孕激素和催乳素受体广泛存在于人、兔和鼠的泪腺、睑板腺、角膜等眼表组织中。对干燥综合征(Sjögren syndrome, SS)模型鼠的泪腺组织雄激素受体(androgen receptor, AR)的免疫组化定位及激素调节进行研究时发现,泪腺上皮细胞为雄激素的靶细胞,AR 存在于腺泡及腺管上皮细胞核上。雄激素可以通过与这些受体结合而发挥生理作用。AR mRNA 为 AR 的基因蛋白,直接调控 AR 的特异性表达,从而决定 AR 的生理功能,其表达量直接反应 AR 的表达量。本研究表明密蒙花总黄酮可调节 AR 基因蛋白的表达,并可促进其表达量增加。

雄激素受体阻滞剂作用原理为:在靶组织(或靶细胞)内与雄激素受体结合,阻断雄激素活性形式物质及类物质与雄激素受体结合,抑制靶组织摄取雄激素与雄激素类物质,从而起到抗雄激素作用。氟他胺具有以上生物效应,可以作为本实验研究中阻断泪腺上皮细胞上雄激素受体与雄激素类物质相结合。实验结果显示,密蒙花总黄酮干预加入雄激素受体阻滞剂的泪腺上皮细胞后,AR mRNA 的表达与空白血浆组的表达差异无显著性。说明密蒙花总黄酮可通过与 AR 结合,促进 AR mRNA 的表达,直接实现密蒙花总黄酮的拟雄激素效应。

综上所述,密蒙花总黄酮含药血浆可通过与 AR 的结合促进 AR mRNA 表达,并产生与丙酸睾酮相同的雄激素效应。AR mRNA 表达增加是否只与密蒙花总黄酮含药血浆与 AR 的结合有关,或与其他生物效应的联合作用,以及密蒙花总黄酮的拟雄激素效应是否完全由密蒙花总黄酮与雄激素受体结合产生,或与其它机制共同完成,还需更深入的研究。

#### 参考文献

- 1 黄秀兰,周亚伟,王伟. 淫羊藿黄酮类化合物药理研究进展. 中成药 2005;27(6):719-721
- 2 Nifli AP, Bosson-Kouamé A, Papadopoulou N, *et al.* Monomeric and oligomeric flavanols are agonists of membrane androgen receptors. *Exp Cell Res* 2005;309(2):329-339
- 3 姚小磊,彭清华,吴权龙,等. 密蒙花提取物对去势导致干眼症白兔泪腺细胞凋亡的影响. 中国中医眼科杂志 2007;17(3):139-144
- 4 彭清华,姚小磊,吴权龙,等. 密蒙花提取物对去势雄兔干眼症的预防作用. 中华眼科杂志 2008;44(11):1011-1019
- 5 姚小磊,彭清华. 植物雌激素与性激素失调导致的干眼症. 中国中医眼科杂志 2006;16(4):235-237