

· 基础研究 ·

麝香配伍乳香调节小鼠前列腺 Claudins mRNA 表达的实验研究

周 青¹ 高瑞松¹ 刘慧英² 黄 培² 林群芳¹ 王 帅² 贺勇凯² 闵 杰² 张仲楠² 田雪飞³

摘要 **目的** 探讨麝香配伍乳香对正常 C₅₇BL/6 小鼠前列腺组织 Claudins mRNA 表达的影响。**方法** 正常 C₅₇BL/6 小鼠 48 只随机分为 4 组:麝香组、乳香组、配伍组和对照组,每组 12 只。按组别分别给予麝香、乳香、麝香+乳香、生理盐水灌胃,分别于 24、48 h 时处死 6 只取前列腺组织。采用实时荧光定量 PCR 方法检测小鼠前列腺组织 Claudin-1、Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4、Claudin-5、Claudin-7、Claudin-8、Claudin-10 mRNA 表达。**结果** 24 h 时,与对照组比较,配伍组 Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4、Claudin-8 表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$);与麝香组和乳香组比较,配伍组 Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4、Claudin-5、Claudin-8 表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。48 h 时,与对照组比较,麝香组 Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4、Claudin-5、Claudin-8 mRNA 表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$),乳香组 Claudin-5 mRNA 表达下调($P < 0.05$),配伍组 Claudin-5 mRNA 表达下调($P < 0.05$);与配伍组比较,麝香组 Claudin-2、Claudin-8 mRNA 表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 麝香配伍乳香可加快 Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4、Claudin-8 mRNA 表达下调速度,两种药物具有“相须”为用的协同性。

关键词 麝香;乳香;前列腺;Claudins 基因

Experimental Study of *Moschus moschiferus* L. Combined with Frankincense on Regulation of Claudins mRNA Expression in Prostate of Mice ZHOU Qing¹, GAO Rui-song¹, LIU Hui-ying², HUANG Pei², LIN Qun-fang², WANG Shuai², HE Yong-kai², MIN Jie², ZHANG Zhong-nan², and TIAN Xue-fei³ 1 Department of Andrology, First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410007); 2 Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208); 3 School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha(410208)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of *Moschus moschiferus* L. combined with Frankincense on regulation of Claudins mRNA expression in prostate of C₅₇BL/6 mice. **Method** Totally 48 C₅₇BL/6 mice were randomly divided into 4 groups, which were the *Moschus moschiferus* L. (musk) group, Frankincense group, combination group and control group, 12 in each group. The mice were given with *Moschus moschiferus* L., Frankincense, *Moschus moschiferus* L. combined with Frankincense, and saline by gavage respectively. Six mice in each group were sacrificed after 24 and 48 hours respectively. Expressions of Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3, Claudin-4, Claudin-5, Claudin-7, Claudin-8 and Claudin-10 mRNA in mice prostate were examined by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** At 24 h, compared with control group, the mRNA expressions of Claudin-2, Claudin-3, Claudin-4 and Claudin-8 in combination group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with *Moschus moschiferus* L. group and Frankincense group, the mRNA expressions of Claudin-2, Claudin-3, Claudin-4, Claudin-5 and Claudin-8

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81573988);湖南省科技厅资助项目(No. 2015JC3075);湖南省发改委资助项目(No. 湘财外指[2015]40号);国家中医药管理局中医男科重点学科资助项目(No. 国中医药人教发[2012]32号)

作者单位:1. 湖南中医药大学第一附属医院男科(长沙 410007);2. 湖南中医药大学研究生院(长沙 410208);3. 湖南中医药大学中西医结合学院(长沙 410208)

通讯作者:田雪飞, Tel: 13787150655, E-mail: windsame@163.com

DOI: 10. 7661/j.cjim. 20180425. 172

in combination group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At 48 h, compared with control group, the mRNA expressions of Claudin-2, Claudin-3, Claudin-4, Claudin-5 and Claudin-8 in musk group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the mRNA expressions of Claudin-5 in Frankincense group decreased ($P < 0.05$), the mRNA expressions of Claudin-5 in combination group decreased ($P < 0.05$). Compared with combination group, the mRNA expressions of Claudin-2 and Claudin-8 in *Moschus moschiferus* L. group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusions The combination of *Moschus moschiferus* L. and Frankincense can accelerate decreasing the mRNA expressions of Claudin-2, Claudin-3, Claudin-4 and Claudin-8. The *Moschus moschiferus* L. and Frankincense have synergetic effects.

KEYWORDS *Moschus moschiferus* L.; Frankincense; prostate; Claudins gene

近年研究发现,前列腺组织中存在血—前列腺屏障系统造是造成慢性前列腺炎缠绵难愈,疗效不佳的重要原因^[1]。Claudins 蛋白是血—前列腺屏障系统中紧密连接结构的主要骨架蛋白。前期研究发现,麝香配伍乳香对前列腺上皮屏障紧密连接相关的 Claudin-1、Claudin-3、ZO-1 以及 Occludin 等蛋白表达调控结果与单独使用存在明显差异^[2]。因此,麝香配伍乳香对前列腺上皮屏障功能的调节可能存在“相须”功效,两者有协同作用。为了进一步明确麝香配伍乳香对紧密连接相关蛋白的调控机制及协同作用,本研究采用实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR, RT-PCR) 方法检测麝香、乳香单独或配伍处理后不同时间点 C₅₇BL/6 小鼠前列腺组织 Claudins mRNA 表达变化,探讨相关分子机制。

材料与方法

1 实验动物 健康 SPF 级 C₅₇BL/6 雄性小鼠,体重 (18.2 ± 2.0) g, 8 ~ 12 周龄,购自常州卡斯文实验有限公司 [生产许可证:SCXK(苏)2011-0003]。本研究严格遵守《赫尔辛基宣言》基本原则。

2 主要试剂和药物 RNA 提取试剂 TRIzol Reagent 购自美国 Ambion 公司;逆转录试剂盒购自日本 Takara 公司;SYBR Green Master Mix 购自美国 Biosystems 公司;RT-PCR 引物由中国上海生工生物工程有限公司合成,人工麝香购自四川省药品检验所 (批号:09.09.18),乳香超微颗粒购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科 (批号:16055)。

3 药物配置方法 乳香悬浊液配制:称取乳香超微颗粒 0.46 g 溶于 15 mL 蒸馏水中。麝香混悬液配制:每次现配现用,称取麝香 0.062 g 溶于 15 mL 的蒸馏水中。麝香配伍乳香悬浊液配制:称取麝香 0.062 g 溶于乳香混悬液 15 mL 中。以上混悬液均在室温下充分搅拌 30 min 以上。

4 分组及干预方法 将 48 只 C₅₇BL/6 小鼠采用

随机数字表法分为 4 组:麝香组、乳香组,配伍组和对照组,每组 12 只。灌胃剂量以临床等效剂量麝香 0.1 g,乳香 10 g 按人—小鼠体表面积换算后确定。分别给予麝香 0.021 g/(kg · d),乳香 2.083 g/(kg · d),配伍组给予麝香 0.021 g/(kg · d) 及乳香 2.083 g/(kg · d),每只小鼠按相应组别用药物混悬液 0.5 mL 灌胃 1 次,对照组给予等剂量生理盐水。麝香酮的生物半衰期为 9 h,但乳香为混合物生物半衰期不明确,因此于干预后 24、48 h 各处死 6 只,收集前列腺组织置 -80 °C 冰箱保存待测。

5 RT-PCR 方法检测前列腺组织 Claudins 基因 mRNA 表达 选取 100 mg 前列腺组织置研钵中,添加液氮后研磨成粉末后转移至 1.5 mL 离心管,参照 TRIzol Reagent 说明书步骤提取前列腺组织总 RNA,用 20 μL DEPC 处理水溶解 RNA 样品,漩涡混合器充分混匀后,检测 RNA 测纯度。逆转录采用 10 μL 体系,在冰上配置 PCR 反应液和 Master Mix 混合液,以 10 μL 分装到每个反应管中,轻柔混匀后,按 25 °C 10 min,37 °C 60 min,95 °C 5 min 条件进行反转录反应。

使用 RT-PCR 方法对 mRNA 丰度进行定量。小鼠 Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3, Claudin-4, Claudin-5, Claudin-7, Claudin-8, Claudin-10 基因的引物设计序列见表 1。PCR 采用 25 μL 体系,反应条件为 95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 30 s,50 个循环。所有信息资料使用 ABI 7500 序列扩增仪收集并存储于系统软件中进行分析。扩增的 PCR 产物进行溶解曲线分析,获取 Ct 值,每个样本重复 3 次取平均值,每次试验均设阴性对照组,以双蒸水代替 cDNA。计算 ΔCt 值,计算公式为 ΔCt 值 = Claudins 基因 Ct 值 - 对照组 β-actin 基因 Ct 值。

6 统计学方法 实验数据应用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK 法分析, $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

表 1 小鼠 Claudins 基因引物序列

基因	产物长度 (bp)	引物序列	基因序列号
Claudin-1	524	F5'-GTGGATGTCTCGCTGTC R5'-GGTGTGGGTAAGAGGTTGT	NM_016674.4
Claudin-2	480	F5'-GCCTCTGGATGGAATGTGCC R5'-GCTACCGCCACTCTGTCTTTG	NM_016675.4
Claudin-3	180	F5'-AACACCATTATCCGGGACTTCT R5'-GCGGAGTAGACGACCTTGG	NM_009902.4
Claudin-4	210	F5'-TGGGGCTACAGGAATGGG R5'-GGTCTGCGAGGTGACAAATGTT	NM_009903.2
Claudin-5	425	F5'-CTCTGCTGGTTCGCCAACAT R5'-CAGCTCGTACTTCTGCGACA	NM_013805.4
Claudin-7	716	F5'-AGTCGCAAAATGTACGACTCG R5'-GGAGACCACCATTAGGGCTC	NM_001193619.1
Claudin-8	680	F5'-GCATGTAGAGGACTTATGATCGC R5'-TCACGCAATTCATCCACAGTC	NM_018778.3
Claudin-10	564	F5'-CAACCCATGCCCTAGAATCGC R5'-TCCGACTTTGGTACACTTCATTC	NM_001160096.1

结 果

1 干预 24 h 各组 Claudins mRNA 表达比较 (表 2) 干预 24 h 时,各组间 C₅₇BL/6 小鼠前列腺组织 Claudin-1、Claudin-7、Claudin-10 mRNA 表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较,配伍组 Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4、Claudin-8 表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与麝香组和乳香组比较,配伍组 Claudin-2、Claudin-3、Claudin4、Claudin-5、Claudin-8 表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2 干预 48 h Claudins mRNA 表达比较 (表 3) 干预 48 h 时,各组间 C₅₇BL/6 小鼠前列腺组织 Claudin-1、Claudin-7、Claudin-10 mRNA 表达比较差异

无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较,麝香组 Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4、Claudin-5、Claudin-8 mRNA 表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$),乳香组及配伍组 Claudin-5 mRNA 表达下调($P < 0.05$)。与配伍组比较,麝香组 Claudin-2、Claudin-8 mRNA 表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

血—前列腺上皮屏障的概念由 Fulmer BR 等^[3]学者提出,经研究证实确实存在于前列腺间质与腺管管腔之间的上皮中。该屏障除阻止有害物质进入前列腺液或间质中,也阻止了治疗药物的有效成分通过。前期研究中,不但观察到类似结构的存在,而且发现芳香透窍的麝香、乳香配伍使用对该屏障具有良好的调节功效^[4],可促进清热利湿药物虎杖等更有效地作用于前列腺组织从而发挥抗前列腺炎作用^[5]。为明确具体机制,需对麝香、乳香的屏障功能相关蛋白调控过程进行更深入的探索。

近年来研究认为,紧密连接(tight junction, TJ)在组织屏障的构成中起关键作用。Claudins 蛋白作为 TJ 的主要骨架蛋白^[6],对细胞完整性的维持起着至关重要的作用^[7],且其他 TJ 相关蛋白 Occludin、ZO-1/ZO-2 等必须通过与 Claudins 蛋白之间的相互作用,才能正常发挥调节 TJ 的功能^[8,9]。

研究结果发现,用药 24 h 时与对照组比较,麝香组和乳香组 Claudins mRNA 表达未出现明显变化,配伍组 Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4、Claudin-8 mRNA 表达下调;与麝香组和乳香组比较,Claudin-2、Claudin-3、Claudin4、Claudin-5、Claudin-8 表达下降,5 种基因的调控模式非常接近,表达量均下降。用药

表 2 24 h 时 C₅₇BL/6 小鼠各组前列腺组织 Claudin mRNA 表达水平比较 (ΔCt, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Claudin-1	Claudin-2	Claudin-3	Claudin-4	Claudin-5	Claudin-7	Claudin-8	Claudin-10
对照	6	9.020 ± 0.396	6.465 ± 0.631	7.045 ± 0.816	11.750 ± 0.726	11.410 ± 0.594	4.218 ± 0.353	4.917 ± 0.691	2.399 ± 0.462
配伍	6	8.467 ± 1.294	4.927 ± 1.817 *	5.855 ± 5.070 **	9.645 ± 1.989 **	10.170 ± 1.112	4.364 ± 0.558	3.500 ± 1.751 *	2.357 ± 2.086
麝香	6	8.939 ± 0.311	9.516 ± 0.664 ΔΔ	10.850 ± 0.338 ΔΔ	13.760 ± 1.084 ΔΔ	11.820 ± 0.295 Δ	4.175 ± 0.314	8.310 ± 0.764 ΔΔ	2.201 ± 1.416
乳香	6	8.658 ± 0.469	8.356 ± 0.538 ΔΔ	9.615 ± 0.851 ΔΔ	13.230 ± 0.933 ΔΔ	11.780 ± 0.378 Δ	4.208 ± 0.219	7.061 ± 0.460 ΔΔ	2.131 ± 1.093

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与配伍组比较,Δ $P < 0.05$,ΔΔ $P < 0.01$

表 3 48 h 时 C₅₇BL/6 小鼠各组前列腺组织 Claudin-1、Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4 mRNA 表达水平比较 (ΔCt, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Claudin-1	Claudin-2	Claudin-3	Claudin-4	Claudin-5	Claudin-7	Claudin-8	Claudin-10
对照	6	9.020 ± 0.397	6.465 ± 0.631	7.045 ± 0.816	11.750 ± 0.727	11.410 ± 0.594	4.218 ± 0.353	4.917 ± 0.691	2.399 ± 0.462
配伍	6	9.402 ± 0.716	6.337 ± 0.824	6.306 ± 0.835	10.820 ± 0.949	10.310 ± 0.455 *	4.459 ± 0.598	4.762 ± 0.881	2.418 ± 1.046
麝香	6	9.155 ± 0.237	4.868 ± 0.505 **ΔΔ	5.489 ± 0.467 *	9.915 ± 0.568 **	10.560 ± 0.950 *	4.575 ± 0.495	3.443 ± 0.455 *Δ	1.958 ± 0.728
乳香	6	9.492 ± 0.706	5.479 ± 0.911	6.216 ± 0.862	10.720 ± 0.850	9.958 ± 0.330 *	4.533 ± 0.322	4.080 ± 0.960	1.886 ± 0.944

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与配伍组比较,Δ $P < 0.05$,ΔΔ $P < 0.01$

48 h 时, 各组 Claudin-1、Claudin-7、Claudin-10 的 mRNA 表达仍无变化, 说明麝香、乳香不参与调节此 3 种基因。用药 48 h 时, 与对照组比较, 配伍组仅 Claudin-5 基因表达下调, 麝香配伍乳香对基因调节的协同作用减弱, 而麝香或乳香单独使用的调节作用开始显现, 麝香组 Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4、Claudin-5、Claudin-8 mRNA 表达下调, 乳香组仅 Claudin-5 表达下调, 说明麝香在表达调节中起主要作用。在本次研究中, 未观察到明显 mRNA 表达上调, 但 24 h 的结果显示麝香、乳香单独使用有上调 Claudin-2、Claudin-3、Claudin-4、Claudin-8 的趋势, 笔者将进一步扩大样本量进行验证。

Claudin-2 被证实具有杯状细胞特异性, 属于孔状蛋白成员并参与细胞旁转运途径, 通过促进 TJ 杯状细胞的粘蛋白水合作用和脱水作用从而影响细胞的分泌^[10,11]。Claudin-3 功能尚不清楚, 近年研究显示与屏障形成及封闭细胞旁分泌途径有关, 过表达可降低紧密连接介导的离子渗透性^[12,13]。与 Claudin-3 类似, Claudin-4、Claudin-5 也属于细胞旁分泌途径的封闭作用蛋白, 并参与 TJ 的组装^[14]。Claudin-8 是伴侣蛋白, 必须通过与 Claudin-4 的交互作用并募集 Claudin-4 至 TJ, Claudin-8 的缺失, 将影响 Claudin-4 的定位与 TJ 的装配^[15]。

综上所述, 麝香、乳香可通过介导 Claudins 基因表达下调, 提高血—前列腺上皮屏障通透性。麝香配伍乳香可加快相关 mRNA 表达下调速度, 优于单独使用麝香或乳香。麝香、乳香配伍使用表现出良好协同性, 体现了中药配伍“相须”为用之意。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] 崔栋, 尚永刚, 韩广玮, 等. 大鼠前列腺上皮细胞体外培养及其屏障功能的初步研究[J]. 中华男科学杂志, 2016, 22(2): 38–42.
- [2] 林群芳, 黄培, 田雪飞, 等. 麝香配伍乳香对大鼠前列腺上皮细胞紧密连接结构相关蛋白表达的影响[J]. 中华男科学杂志, 2015, 21(12): 1110–1115.
- [3] Fulmer BR, Turner TT. blood-prostate barrier restricts cell and molecular movement across the rat ventral prostate epithelium[J]. J Urol, 2000, 163(5): 1591–1594.

- [4] 周青, 何清湖, 田雪飞, 等. 麝香配伍乳香促前列腺上皮屏障通透性作用的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(5): 1448–1553.
- [5] 周青, 何清湖, 田雪飞, 等. 麝香配伍乳香促虎杖提取物治疗慢性非细菌性前列腺炎的动物实验研究[J]. 中华男科学杂志, 2012, 18(5): 460–465.
- [6] Muto S. Physiological roles of claudins in kidney tubule paracellular transport[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 312(1): F9–F24.
- [7] Weber CR, Turner JR. Dynamic modeling of the tight junction pore pathway[J]. Ann N Y Acad Sci, 2017, 1397(1): 209–218.
- [8] Blasig IE, Bellmann C, Cording J, et al. Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(5): 1195–1219.
- [9] González-Mariscal L, Quirós M, Díaz-Coránguez M. ZO proteins and redox-dependent processes[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(5): 1235–1253.
- [10] Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability[J]. Physiol Rev, 2013, 93(2): 525–569.
- [11] Gipson IK. Goblet cells of the conjunctiva: a review of recent findings[J]. Prog Retin Eye Res, 2016, 54: 49–63.
- [12] D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(28): 26233–26240.
- [13] Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, et al. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1798(11): 2048–2057.
- [14] Schlingmann B, Molina SA, Koval M. Claudins: gatekeepers of lung epithelial function[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 42(3): 47–57.
- [15] Ashikari D, Takayama KI, Obinata D, et al. CLDN8, an androgen-regulated gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration[J]. Cancer Sci, 2017, 108(7): 1386–1393.

(收稿: 2017–10–08 在线: 2018–05–07)

责任编辑: 邱禹