

滋阴清热方对金黄地鼠血清性激素 及雄激素受体 mRNA 表达的影响

徐萍¹, 陈力^{2*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210046;

2. 南京中医药大学附属医院 皮肤科, 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨滋阴清热方对金黄地鼠血清性激素及雄激素受体表达的影响。**方法:**选用成年雄性金黄地鼠侧腹皮脂腺斑作为动物模型,随机分为4组,分别予生理盐水、滋阴清热方高剂量(18 g·kg⁻¹)、滋阴清热方低剂量(9 g·kg⁻¹)、安体舒通(10 mg·kg⁻¹)灌胃给药,每天1次。4周后,采用ELISA法检测各组血清睾酮(T)、雌二醇(E₂)的水平,实时荧光定量PCR法检测各组皮脂腺斑处雄激素受体(AR)mRNA的表达水平。**结果:**滋阴清热方高、低剂量组与空白组比较,能降低血清T水平,但无显著性差异;高剂量组血清E₂水平升高,与空白组比较有显著性差异(P<0.05)。4组皮脂腺斑处AR mRNA的表达水平有显著性差异(P<0.05),清热滋阴方高剂量组与空白组比较有显著性差异(P<0.05)。**结论:**滋阴清热方可能是通过改善金黄地鼠血清雌二醇水平,并抑制局部雄激素受体 mRNA 的表达,而影响皮脂腺的增生。

[关键词] 滋阴清热方; 金黄地鼠; 性激素; 雄激素受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0201-04

[doi] 10.11653/syjf2013220201

Effect of Ziyin Qingre Decoction on Serum Levels of Sex Hormones and Androgen Receptor mRNA Expression in Golden Hamster

XU Ping¹, CHEN Li^{2*}

(1. First Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Dermatology Department, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Ziyin Qingre decoction on golden hamster in serum sex hormones and androgen receptor. **Method:** The animals were randomly divided into 4 groups, namely blank control group, positive control group, high and low dosage Ziyin Qingre decoction. Rats were respectively fed with saline solution, antisterone (10 mg·kg⁻¹), Ziyin Qingre decoction (18, 9 g·kg⁻¹) for 4 weeks. The serum testosterone (T) and estradiol (E₂) levels were detected using enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) method. The gene androgen receptor (AR) mRNA in flank organ was measured by real-time PCR. **Result:** Compared with blank control group, high and low dosage Ziyin Qingre decoction could reduce serum T level and serum E₂ level (P<0.05). There was a difference between four groups in expressions of AR mRNA (P<0.05). The AR mRNA in high dosage group was decreased (P<0.05), compared to the blank control group. **Conclusion:** Ziyin Qingre decoction can increase the serum E₂ level and suppress the expression of AR mRNA. These may affect the proliferation of sebaceous gland.

[Key words] Ziyin Qingre decoction; golden hamster; sex hormone; androgen receptor

[收稿日期] 20130614(001)

[基金项目] 江苏省普通高校自然科学基金研究计划资助项目
(11KJB360007)

[通讯作者] * 陈力, 主任医师, 从事皮肤附属器疾病的诊疗,
Tel:025-86617141, E-mail:wandyf@sina.com

痤疮, 俗称青春痘, 是一种有关皮脂腺的慢性炎症性皮肤病, 虽不会危及生命, 但作为损容性疾病可严重影响患者的生活质量。我国的发病率已达70% -87%, 痤疮对青少年心理和社交影响超过了哮喘

喘和癫痫^[1]。滋阴清热方是南京中医药大学附属医院皮肤科陈力主任中医师的经验方,近年来用于临床取得了良好的疗效^[2]。笔者前期的研究证实滋阴清热方有抗金黄地鼠皮脂腺斑增生的作用^[3],现为进一步探讨其作用机制,笔者检测了滋阴清热方对金黄地鼠血清性激素水平及雄激素受体 (androgen receptor, AR) mRNA 表达的影响。

1 材料

1.1 动物 雄性金黄地鼠,体重 120 ~ 130 g,由南京中医药大学动物实验中心购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2006 0009。饲全价营养颗粒饲料,自由饮水,室温 (22 ± 2) °C,湿度 59% ~ 65%。

1.2 药物 滋阴清热方由生地黄 10 g,女贞子 10 g,山药 10 g,知母 10 g,黄柏 10 g,黄芩 10 g,牡丹皮 10 g,丹参 15 g,茵陈 10 g,白花蛇舌草 15 g 组成,中药制剂购自南京中医药大学附属医院中药房,江阴天江药业有限公司生产。蒸馏水水浴溶解后,分装,4 °C 冰箱保存备用。安体舒通,杭州民生药业有限公司,生产批号 T11G512。

滋阴清热方成人用药 110 g 生药,以成人体质量 60 kg 估算,剂量为生药 1.8 g·kg⁻¹。参照人与动物等效剂量换算方法(通过体表面积换算)^[4],金黄地鼠低、高剂量按照成人用量的 5 倍,10 倍计算,即生药 9,18 g·kg⁻¹,灌胃给药体积为 10 mL·kg⁻¹。安体舒通成人用量每天 60 mg,以成人体质量 60 kg 估算,成人用量约 1 mg·kg⁻¹,地鼠取 10 倍成人用量即 10 mg·kg⁻¹,地鼠灌胃给药体积为 10 mL·kg⁻¹。

1.3 试剂与仪器 睾酮(T)、雌二醇(E₂) ELISA 试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司)。采用 Qiagen RNeasy FFPE Kit 试剂盒提取石蜡包埋组织 mRNA,反转录采用 Qiagen Quantitect Reverse Transcription Kit 试剂盒,RT-PCR 使用试剂为 lifetech(ABI) Power SYBR Green PCR master mix。AR,β-actin 引物由上海生工生物工程有限公司合成。AR 上游引物 5' TCCAGAGTGTGCGGAAGCG-3',下游引物 5'-AGGGCCAGGTAGCCTGTGGG-3',产物长度为 150 bp;β-actin 上游引物 5'-CAACCCAGCATGAGACATTG-3',下游引物 5'-TACCGGTAACCTCTGGTTGG-3',产物长度为 150 bp。

Bio-Tek 公司 SyneRgy HT 型酶标仪(美国),lifetech(ABI) 7900 real-time PCR system(新加坡)。

2 方法

2.1 分组与给药 受试动物随机分为 4 组,即空白对照组、滋阴清热方高剂量组、低剂量组、安体舒通阳性对照组。按照上述剂量给药,空白对照组给等体积蒸馏水,每天 1 次灌胃,连续给药 4 周。

2.2 标本收集与制备 于实验结束后,腹腔注射麻醉,分离腹主动脉,用注射器穿刺抽出血液 3 mL,以 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,分离血清备用。皮脂腺斑处脱毛后病理取材,常规石蜡包埋切片。

2.3 血清性激素测定 采用 ELISA 法检测金黄地鼠血清睾酮、雌二醇的水平,根据说明书操作。

2.4 各组皮脂腺斑处 AR mRNA 实时荧光 PCR 检测 使用 Qiagen RNeasy FFPE Kit 试剂盒提取石蜡包埋组织 mRNA,按照试剂盒说明书进行 mRNA 浓度和纯度鉴定。反转录采用 Qiagen Quantitect Reverse Transcription Kit 试剂盒,反应体系为 10 μL,其中 gDNA 1 μL,总 RNA 6 μL,混合后 42 °C 孵育 2 min,再加入 2 μL Buffer,0.5 μL Oligo dT 引物,0.5 μL 逆转录酶,共 10 μL 反应体系,ABI7900PCR 仪 42 °C 30 min,95 °C 5 min,得到 cDNA。RT-PCR 使用试剂为 lifetech(ABI) Power SYBR Green PCR master mix,体系为 PCR mix 2.5 μL,上游引物 0.25 μL,下游引物 0.25 μL,cDNA 1 μL,DEPCH2O1 μL,共 5 μL,每个样本每个基因 3 次重复。PCR 循环条件 95 °C 预变性 10 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,45 个循环。以 β-actin 作为内参基因相对定量,计算各组 AR 的 ΔCt 值,ΔCt = Ct_{AR} - Ct_{β-actin},以 ΔCt 值为相对定量结果进行统计分析。

采用 RQ MANAGE2.1 和 SDS 2.3 软件分析实时荧光定量 PCR 的扩增曲线和溶解曲线。通过设置复孔取平均值,作为各样本中目的基因扩增的 Ct 值。Ct 值表示 PCR 反应过程中出现荧光信号的初始循环数。起始拷贝数越多,Ct 值越小,起始拷贝数越少,Ct 值越大。

2.5 统计方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数检验采用方差分析,方差分析后有显著性差异后,再进行样本的两两比较。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组用药后对金黄地鼠血清血清睾酮(T)、雌二醇(E₂)的影响 经方差分析,4 组间血清睾酮水平无显著性差异,4 组间血清 E₂ 水平比较有显著性差异(P < 0.05)。滋阴清热方高、低剂量组 T 水平较空白组有所下降,但无显著性差异;大剂量组 E₂

表 1 滋阴清热方对金黄色鼠药后血清 T, E₂ 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	T	E ₂
空白	-	2.778 ± 0.070	0.105 ± 0.003
滋阴清热方	18	2.604 ± 0.097	0.172 ± 0.009 ¹⁾
	9	2.668 ± 0.092	0.123 ± 0.004
安体舒通	0.01	2.536 ± 0.079	0.116 ± 0.004

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05(表 2 同)。

表 2 滋阴清热方对金黄色鼠药后皮脂腺斑处 AR mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ct _{AR}	Ct _{β-actin}	ΔCt
空白	-	31.941 ± 0.509	26.265 ± 0.406	5.676 ± 0.149
滋阴清热方	18	34.881 ± 0.368 ¹⁾	26.280 ± 0.443	8.602 ± 0.305 ¹⁾
	9	32.781 ± 0.324	26.371 ± 0.316	6.410 ± 0.214
安体舒通	0.01	36.282 ± 0.456 ¹⁾	25.641 ± 0.482	10.641 ± 0.209 ¹⁾

症性疾病,属于祖国医学“粉刺”之范畴,古代医家多认为本病是由于肺胃血热上熏头面所致。现代大多数医家认为本病是由于素体阳热偏盛,加上青春代谢旺盛,营血日渐偏热,血热外壅,气血郁滞,蕴阻肌肤而发。但近年来青春期后(25 岁以上)痤疮的发病率有上升趋势,以女性为主,较顽固,对患者的精神、心理和身体具有不同程度的影响^[5]。经过多年的临床观察,笔者认为青春期后女性发病与素体肾阴不足,相火过旺以致肺胃血热,上熏面部有关。故当治以滋肾阴、清肺热,根据这一原则组成了滋阴清热方。方中治本以生地黄、女贞子、山药滋阴补肾、凉血清热为君;治标者,伍以知母、黄柏直折相火、黄芩清泻肺热共为臣,佐以丹参、牡丹皮活血化瘀、凉血消痈,茵陈、白花蛇舌草清热解毒、利湿散结。诸药共奏滋阴清热、凉血活血、消散痈结之效。现代药理研究表明山药、女贞子有抗菌、抗炎的作用^[6-7];丹参具有较温和的雌激素活性、抗雄激素作及抗痤疮丙酸杆菌的作用^[8]。

现代医学认为痤疮是一个多因素性疾病,发病机制较为复杂,其发病主要与性激素水平、皮脂大量分泌、痤疮丙酸杆菌增殖、毛囊皮脂腺导管的角化异常及炎症反应等因素相关^[9]。其中引起痤疮的病理生理基础是皮脂腺快速发育和皮脂过量分泌,而皮脂腺的发育是直接受雄激素支配的。针对痤疮病因和发病机制,采用雌激素或抗雄激素药物是目前主要治疗方法之一。

现已知,雄性金黄色鼠侧腹部所特有皮脂腺斑是雄激素依赖性器官,可作为筛选和研究药物抗雄激素及皮脂腺增生活性的动物模型^[10]。在痤疮的

水平较空白组明显升高(P < 0.05)。

3.2 各组用药后皮脂腺斑处 AR mRNA 的表达经方差分析,4 组 Ct_{β-actin} 值无显著性差异。4 组 Ct_{AR}, ΔCt 值具有显著性差异(P < 0.05),其中滋阴清热方高剂量组 Ct_{AR}, ΔCt 值与空白组比较有显著性差异(P < 0.05)。

4 讨论

痤疮是皮肤科常见的一种毛囊皮脂腺慢性炎

发病机制中,雄激素与痤疮的关系的研究一直是皮肤科医生关注的热点。但有研究发现,除青春期早期粉刺形成和血循环中硫酸脱氢异雄酮相关外,大多数痤疮患者血循环中雄激素水平并无异常,因此痤疮并不是单纯的内分泌失调^[11]。20 世纪 80 年代初人们已从正常人皮肤分离出雄激素受体,证实了皮脂腺是雄激素的靶器官,痤疮的发生与体内雄激素及其受体的水平有关^[12]。这也可部分解释了那些雄激素水平正常的痤疮患者的发病原因。我们前期的研究证实滋阴清热方有抗金黄色鼠皮脂腺斑增生的作用,能使皮脂腺腺体层数减少,腺体萎缩,排列松散^[3]。本实验结果表明,滋阴清热方大剂量组能降低金黄色鼠血清雄激素水平,显著升高血清雌二醇水平,调节雌、雄激素水平比例,并能抑制局部雄激素受体的表达,从而起到抑制金黄色鼠皮脂腺斑增生的作用。这一结果部分地解释了滋阴清热方防治痤疮的机制。本次实验中的作用是组方中单味药作用的结果,还是组方后共同作用的结果,以及其他作用途径和机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 中国医师协会皮肤科医师分会《中国痤疮治疗指南》专家组. 中国痤疮治疗指南(讨论稿)[J]. 临床皮肤科杂志, 2008, 37(5):339.
- [2] 谢骏逸,陈力,徐萍. 清热滋阴法治疗女性迟发性痤疮临床疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(8):1605.
- [3] 徐萍,赵潇玲,陈力,等. 滋阴清热方对金黄色鼠皮脂腺增生的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4):206.

山核桃叶总黄酮苷元及其主要单体成分球松素查尔酮的 抗氧化活性

徐敏,沈勇,张坤,刘楠楠,蒋福升,丁志山*
(浙江中医药大学生命科学院,杭州 310053)

[摘要] 目的:测定山核桃叶总黄酮苷元(TFA)及其主要单体成分——球松素查尔酮(PSC)的抗氧化活性。方法:采用柱层析法分离、富集山核桃叶中的总黄酮苷元及单体化合物球松素查尔酮;测定总黄酮苷元中总酚含量,通过 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基实验、铁离子还原/抗氧化能力(FRAP)测定法、抗脂质过氧化(LPO)实验、抗蛋白氧化羰基(PCO)生成实验,对 TFA 和 PSC 进行体外抗氧化活性研究。结果:富集的山核桃叶总黄酮苷元中总酚含量用没食子酸当量(GAE)表示为 $(283.75 \pm 10.82) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;TFA 和 PSC 对 DPPH 自由基清除的抑制浓度(IC_{50})分别为 (20.05 ± 1.74) 、 $(11.66 \pm 0.61) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,抑制脂质过氧化的 IC_{50} 分别为 (74.62 ± 5.39) 、 $(24.38 \pm 1.24) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,抑制蛋白过氧化的 IC_{50} 分别为 (174.29 ± 11.26) 、 $(86.74 \pm 7.89) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;TFA 和 PSC 均具有较强的抗氧化能力;除了对铁离子还原力外,其他各项指标化合物 PSC 均显著强于 TFA。结论:山核桃叶中含有较高含量的黄酮苷元,其富集的总黄酮苷元具有较强的抗氧化活性,已知成分大于 50%,而球松素查尔酮是其主要药效物质,值得进一步开发应用。

[关键词] 山核桃;总黄酮苷元;球松素查尔酮;总酚;抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0204-05

[doi] 10.11653/syfyj2013220204

Antioxidant Activity of Total Flavonoid Aglycones and the Main Compound Pinostrobin Chalcone Separated from Leaves of *Carya cathayensis*

XU Min, SHEN Yong, ZHANG Kun, LIU Nan-nan, JIANG Fu-sheng, DING Zhi-shan*

[收稿日期] 20130613(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81303258);浙江省新苗人才计划项目(2008R40G2120013;2012R410057);浙江省医药卫生科技计划项目(2012KYB136)

[第一作者] 徐敏,硕士研究生,从事中医药抗肿瘤研究,Tel:18042320249,E-mail:xmlyrl@gmail.com

[通讯作者] *丁志山,博士,教授,从事中医药抗肿瘤研究,Tel:0571-86613666,E-mail:zjctmdzs@163.com

- [4] 张树森,况时祥,肖雁. 脑通胶囊对 VD 大鼠海马 NMDA 受体 mRNA 表达及锥体细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):230.
- [5] 石平荣,莫润田,刘庆元,等. 复方甘草酸苷治疗女性青春期后痤疮疗效观察[J]. 岭南皮肤性病科杂志,2006,15(3):133.
- [6] 孙晓生,谢波. 山药药理作用的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(3):353.
- [7] 杨曦,蒋桂华. 女贞子的研究开发现状与展望[J]. 时珍国医国药,2008,19(12):2987.
- [8] 高玉桂,王灵芝,唐冀雪. 丹参酮的性激素样活性[J]. 中国医学科学院学报,1998,2(3):189.
- [9] 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 南京:江苏科技出版社,2010:1165.
- [10] Shiba K, Hamaguchi T, Kataoka K, et al. Cloning of the hamster androgen receptor gene[J]. J Dermatol Sci, 2001,26(3):163.
- [11] Deplewski D, Rosenfield R L. Role of hormones in pilosebaceous unit development[J]. Endocr Rev,2000,21(4):363.
- [12] 弓娟琴. 痤疮与雄激素关系的研究进展[J]. 国外医学:皮肤性病学分册,1997,23(2):65.

[责任编辑 聂淑琴]