

雄激素调节小鼠泪膜功能与角膜上皮细胞 Mucins 表达的体内研究

黎黎¹, 郑璇², 王双梅³, 高鸽³, 康前雁¹

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(No. 81100647)

作者单位:¹(710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学第一附属医院眼科;²(710002) 中国陕西省西安市第一医院眼科;³(710004) 中国陕西省西安市第四医院眼科

作者简介: 黎黎, 毕业于首都医科大学附属北京同仁医院, 眼科学博士, 主治医师, 助理研究员, 讲师, 研究方向: 眼表疾病。

通讯作者: 康前雁, 毕业于西安交通大学, 博士, 主任医师, 研究方向: 眼组织损伤修复. eyelili2010@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-03-06 修回日期: 2016-06-15

Effect of androgen on mice tear film stability and Mucins expressions in mice corneal epithelial cells *in vivo*

Li Li¹, Xuan Zheng², Shuang - Mei Wang³, Ge Gao³, Qian - Yan Kang¹

Foundation item: National Science Foundation of China (No. 81100647)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; ³Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qian - Yan Kang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. eyelili2010@mail.xjtu.edu.cn

Received: 2016-03-06 Accepted: 2016-06-15

Abstract

• AIM: To study *in vivo* the effect of androgen on mice tear film stability and Mucins expressions in corneal epithelial cells in BALB/c mice after orchectomy.

• METHODS: With orchectomy operation, we set up mice model. And serum androgen concentration of mice was detected by radioimmunoassay. Break - up time (BUT) of tear film was tested in the different experimental points. Mice corneal epithelia were peeled and MUC1 and MUC4 mRNA and protein levels were measured by RT-PCR and Western blot.

• RESULTS: The serum androgen concentration reduced to 0ng/ μ L at 1wk after orchectomy. The BUT values were 68.33 \pm 12.86s, 62.47 \pm 3.75s, 58.67 \pm 10.03s, 47.17 \pm 7.64s, 39.51 \pm 3.39s, 32.67 \pm 3.88s and 31.00 \pm 2.36s in the normal control group, sham group and in orchectomy group at 1, 2, 4, 6 and 8wk, respectively, and the BUTs

were significantly shorter in the orchectomy at 2, 4, 6 and 8wk groups than those in the normal control group (all at $P < 0.05$). MUC1 and MUC4 mRNA and proteins levels decreased with androgen level lowering ($P < 0.05$). Mucin1 level was the lowest at 2wk after orchectomy, and the lowest Mucin4 level was found at 1wk after orchectomy.

• CONCLUSION: *In vivo*, androgen regulates Mucins expressions in mice corneal epithelial cells, makes BUT shorter, and influence the stability of tear film.

• KEYWORDS: androgen; tear film break time; mucins; corneal epithelium cell

Citation: Li L, Zheng X, Wang SM, et al. Effect of androgen on mice tear film stability and Mucins expressions in mice corneal epithelial cells *in vivo*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(7):1228-1231

摘要

目的: 探讨去势小鼠干眼模型中雄激素浓度对小鼠泪膜稳定性以及角膜上皮细胞 Mucins 表达的影响。

方法: 通过双侧睾丸切除去势手术, 改变体内雄激素水平, 观察泪膜破裂时间的变化, 同时在不同时间点采用 RT-PCR 法与 Western-Blot 法分别检测小鼠角膜上皮细胞中 Muc1 和 Muc4 的 mRNA 和蛋白水平的表达变化。

结果: 去势 1wk 后小鼠睾酮质量浓度下降至 0ng/ μ L; 正常对照组、伪手术组及去势术后 1、2、4、6、8wk 组小鼠 BUT 分别为 68.33 \pm 12.86、62.47 \pm 3.75、58.67 \pm 10.03、47.17 \pm 7.64、39.51 \pm 3.39、32.67 \pm 3.88、31.00 \pm 2.36s, 其中术后 2、4、6、8wk 组小鼠泪液 BUT 值较正常对照与伪手术组均明显缩短, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。Muc1 与 Muc4 的 mRNA 与蛋白水平表达, 随雄激素浓度下降, 表达下调 ($P < 0.05$), Muc1 在去势后第 2wk 表达最低, 而 Muc4 在去势后第 1wk 表达降至最低。

结论: 在体内, 雄激素可调控小鼠角膜上皮 Mucins 表达, 并缩短泪膜破裂时间, 参与泪膜稳定性的维持。

关键词: 雄激素; 泪膜破裂时间; 黏蛋白; 角膜上皮细胞
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2016.7.06

引用: 黎黎, 郑璇, 王双梅, 等. 雄激素调节小鼠泪膜功能与角膜上皮细胞 Mucins 表达的体内研究. 国际眼科杂志 2016;16(7): 1228-1231

0 引言

干眼是一类因泪液量或质异常导致泪膜不稳定, 伴眼部不适, 严重时导致眼表组织结构病变的疾病总称。干眼的发病由多因素参与, 近年研究发现性激素分泌失

衡也参与干眼的发生和发展^[1-2]。已有研究证实,雄激素水平的改变可以调控睑板腺、泪腺功能,进而影响泪膜的稳定性^[3],我们前期研究也发现雄激素水平影响体外小鼠角膜上皮细胞 Muc1 和 Muc4 表达^[4],同时去势小鼠的泪膜稳定性也明显下降^[5],然而在体内实验,雄激素浓度改变是否可以调节 Muc1 和 Muc4 的表达,是我们本研究希望了解的内容。本研究拟建立去势小鼠模型,观察在体内小鼠角膜上皮细胞 Muc1 和 Muc4 表达的变化,并观察泪膜稳定性的重要指标——泪膜破裂时间(break-up time, BUT)的表化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 6~8 周龄 BALB/c 雄性小鼠 56 只,无眼部疾病,体质量 20 ± 2 g,由西安交通大学医学院动物中心提供。本研究中,实验动物的使用和喂养遵循国家科学技术部颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器设备 Muc1 兔抗鼠多克隆抗体(ab15481,美国 Abcam 公司),Muc4 兔抗鼠多克隆抗体(sc-20117,英国 Santa 公司);Trizol Reagent(美国 Gibco 公司)。反转录 Real-time PCR 试剂盒(大连宝生物制品公司);酚红棉线(天津晶明医用器材公司);荧光素钠(广州白云山明兴制药有限公司)。眼前节照相系统(苏州 66 视觉科技股份有限公司);游标卡尺(上海仪器一厂)。

1.2 方法

1.2.1 干眼模型的建立及分组 按照随机数字表法将小鼠随机分为正常对照组、伪手术组、术后 1wk 组、术后 2wk 组、术后 4wk 组、术后 6wk 组和术后 8wk 组,每组各 8 只小鼠。手术组小鼠全身麻醉(盐酸氯胺酮 $100\text{mg}/\text{kg}$),无菌条件下经阴囊正中切口,摘除小鼠双侧睾丸,立即缝合创口,肌内注射青霉素 G 0.1mL 。伪手术组小鼠麻醉,无菌条件下剪开阴囊正中皮肤但不摘除睾丸,术后处理同手术组。

1.2.2 竞争放射免疫法检测小鼠外周血睾酮浓度 正常对照组、伪手术组于术后 1wk、手术组于术后 1、2、4、6、8wk 脱颈法处死小鼠,摘除小鼠右眼眼球(每组 8 只),同时采集血液 $500\mu\text{L}$ 以上,室温下静置 2~3h,待血液凝固后收集析出的血清,转移至 1mL 离心管中,置于 -20°C 冰箱内保存。加样前融化摇匀,采用竞争放射免疫法检测并建立标准曲线,计算样品中睾酮浓度。

1.2.3 角膜上皮细胞取材 正常对照组、伪手术组于术后 1wk、手术组于术后 1、2、4、6、8wk 脱颈法处死小鼠,无菌条件下摘除眼球,并放置于 D-Hank 液(含 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ 青-链霉素)中漂洗 2 遍。显微镜下钝性分离角膜上皮组织待用。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠 Muc1 和 Muc4 mRNA 的表达 每组 2 个角膜上皮样本,Trizol Reagent 提取细胞的总 RNA,测总 RNA 浓度及波长 260nm 与 280nm 处的吸光度(A)值的比值($260/280$), -70°C 保存备用。引物设计:在 Genbank 中查出 MUC 基因和内对照基因(β -Actin)的 cDNA 序列,用软件 Primer6.0 设计引物。所用引物序列由大连宝生物制品公司合成。Muc1 引物序列:上游 $5'$ -CCAGGACACCTACCATCTATGAG- $3'$,下游 $5'$ -TCACCACAGCTGGGTTGGTATAAG- $3'$ 。Muc4 引物序列:上游 $5'$ -AGGCCAATGCAAGCACCTG- $3'$,下游

表 1 各组小鼠泪膜破裂时间的比较 ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	样本量	泪膜破裂时间	P
正常对照组	8	68.33 ± 12.86	-
伪手术组	8	62.47 ± 3.75	0.682
手术 1wk 组	8	58.67 ± 10.03	0.087
手术 2wk 组	8	47.17 ± 7.64	0.041
手术 4wk 组	8	39.51 ± 3.39	0.002
手术 6wk 组	8	32.67 ± 3.88	0.001
手术 8wk 组	8	31.00 ± 2.36	0.000

注:P 值为各组与正常对照组比较。

$5'$ -AGTGTTCGCCCGAGGATGTA- $3'$ 。以总 RNA 为模板,用反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,然后进行 Real-time PCR 检测。

1.2.5 Western-Blot 检测各组小鼠 Muc1 和 Muc4 蛋白水平的表达 每组 6 个小鼠角膜上皮样本,液氮研磨,加入 RIPA 缓冲液和 PMSF,获得细胞裂解液,进行 Bradford 比色法测定蛋白质浓度,以 $20 \sim 50\mu\text{g}$ 总蛋白量上样,12% SDS-PAGE 电泳,转膜,漂洗后室温封闭 1h,一抗 $1:1000$ 室温孵育 1h,漂洗后二抗孵育 1h,漂洗后 ECL 显色,拍照,利用 Image J 软件分析条带的灰度值。以 β -Actin 作为内参。

1.2.6 各组小鼠泪膜破裂时间测定 正常对照组、伪手术组于术后 1wk、手术组分别于术后 1、2、4、6、8wk 用微量注射器将 1% 荧光素钠 $1\mu\text{L}$ 滴入各组小鼠下穹隆部,瞬目后可使荧光素钠均匀分布于眼表面。在裂隙灯显微镜的钴蓝光下进行观察,记录小鼠出现第一个泪膜破裂斑所需的时间,即 BUT,重复观察 3 次,取其平均值。

统计学分析:采用 SPSS 15.0 统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析以及 Dunnett-t 检验方法进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 去势手术对血清睾酮浓度的影响 正常对照组、伪手术组小鼠血清睾酮质量浓度分别为 573.87 ± 6.74 、 $579.74 \pm 8.24\text{ng}/\mu\text{L}$,各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。手术组小鼠去势术后 1wk 开始血清睾酮浓度下降至 $0\text{ng}/\mu\text{L}$,与正常组和伪手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各组小鼠泪膜破裂时间比较 正常对照组与伪手术组测定 BUT 分别为 68.33 ± 12.86 、 $62.47 \pm 3.75\text{s}$,各组间比较差异均无统计学意义($F = 2.762, P = 0.119$)。与正常对照组比较,术后 1wk 组小鼠 BUT 差异均无统计学意义($P > 0.05$),但术后 2wk 组、术后 4wk 组、术后 6wk 组和术后 8wk 组小鼠 BUT 逐渐缩短,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

2.3 去势后小鼠角膜上皮 Muc1 和 Muc4 mRNA 表达的影响 与正常对照组比较,去势后各组角膜上皮细胞中 Muc1 mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);去势 2wk 时,Muc1 mRNA 表达降低至最低,去势 4、6、8wk 后 Muc1 mRNA 表达缓慢增加,但仍低于正常对照组表达水平,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。与正常对照组比较,去势后各组角膜上皮细胞中 Muc4 mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);去势 1wk 时,Muc4 mRNA

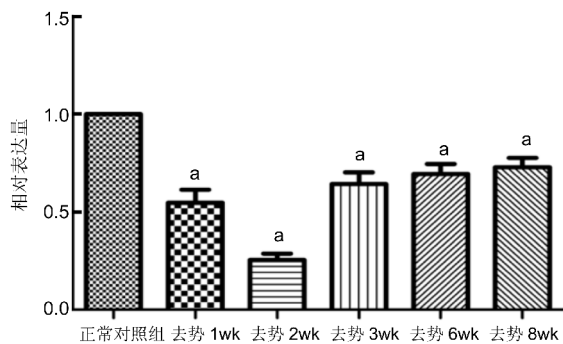


图1 去势后小鼠角膜上皮 Muc1 mRNA 的表达变化 ^a*P* < 0.05 vs 正常对照组。

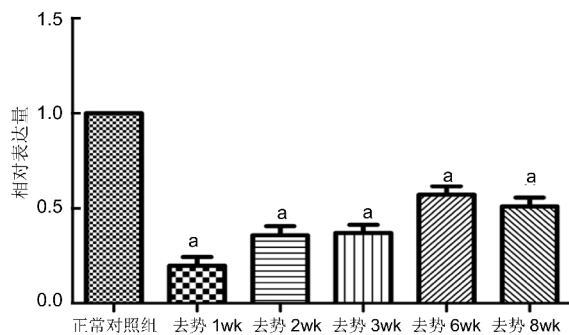


图2 去势后小鼠角膜上皮 Muc4 mRNA 的表达变化 ^a*P* < 0.05 vs 正常对照组。

表达降低至最低,去势2、4、6、8wk后 Muc4 mRNA 表达缓慢增加,但仍低于正常对照组表达水平,差异有统计学意义(*P* < 0.05,图2)。

2.4 去势后小鼠角膜上皮 Muc1 和 Muc4 蛋白水平表达的影响 去势后 Muc1 与 Muc4 蛋白水平表达也有下降(图3~5),变化规律基本与其 mRNA 水平的变化一致。Muc1 在去势后第2wk 表达最低,而 Muc4 在去势后第1wk 表达降至最低。

3 讨论

世界干眼研究小组(DEWS)根据临床以及基础研究证据,已经阐明女性是干眼的易患因素^[6-7],女性干眼患者也高于男性,这与雄激素的保护作用有关。泪膜是一层仅为7μm 的动态薄膜,覆盖于眼表,对于维持眼表微环境意义重大。目前已知泪膜可分为三层,分别为脂质层、水样层、黏蛋白层,各层对维持泪膜稳定性均很重要;动物实验发现,雄激素可明显减少睑板腺分泌量,引起泪膜的脂质层功能异常,泪膜稳定性下降^[8-9];另有研究通过对去势后的雄兔眼表及泪膜的变化进行观察,发现雄激素水平降低,泪腺上皮细胞萎缩,导致泪液分泌减少^[10]。而泪膜中黏蛋白层,尤其是膜结合型 Mucins,其与角膜上皮细胞微绒毛形态对维持泪膜的稳定性具有更为重要的意义,膜结合型 Mucins 为极化跨膜大分子物质,疏水端跨膜固定于角膜上皮的微绒毛上,而亲水端形成一个长尾巴,游离在泪膜中,以此方式将疏水性的角膜上皮细胞与亲水性的泪膜水样层联系起来,二者共同作用才将泪膜通过瞬目运动均匀地涂布在角膜表面,同时保护上皮细胞免受瞬目摩擦带来的损伤,维持角膜上皮细胞的非角化特性^[11]。眼表主要的膜结合型 Mucins 为 Muc1 与 Muc4。有关雄激素对黏蛋白表达的影响已在体内多种组织细胞中得到证实,如在男性泌尿生殖道上皮细胞中表达多种黏蛋白,且受雄激素调节^[12],此外 DHT 可上调前列腺癌细胞(PC-3) Muc1 mRNA 表达^[13]。在眼部的研究相对较少。而本研究发现,去势后雄激素水平骤降,接近0μg/mL,小鼠角膜上皮中 Muc1 和 Muc4,无论是基因水平还是蛋白水平,均有下降;这与本课题组之前的体外研究结果一致^[4];体内实验结果还显示,随着去势时间的延长,Mucins 表达逐渐回升,我们考虑是存在其他途径的调控有关。

本研究利用 BUT 作为评价泪膜稳定性的指标,采用荧光素染色观察 BUT,该方法简便经济,适用于体内的动物实验。我们的结果显示,去势后体内睾酮含量几乎消失,BUT 明显缩短,并且随时间延长而加重;目前临床中

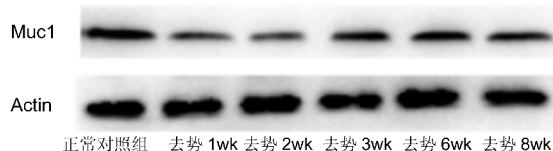


图3 去势后小鼠角膜上皮 Muc1 蛋白水平的表达变化。

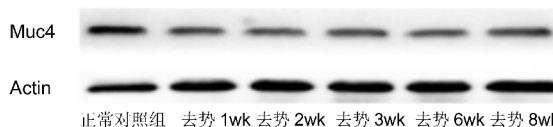


图4 去势后小鼠角膜上皮 Muc4 蛋白水平的表达变化。

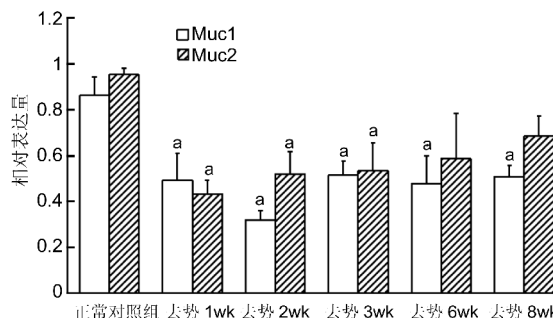


图5 去势后小鼠角膜上皮 Muc1 和 Muc4 蛋白水平表达的柱形图 ^a*P* < 0.05 vs 正常对照组。

主要用于评价泪膜稳定性的方法有:(1) BUT; BUT 的检查包括利用泪膜镜测得的非侵犯性 BUT 及利用荧光素的 BUT,操作简便,适合初步筛查以及动物实验;(2)角膜地形图^[14],该检测方法可以一定程度上对泪膜分布的情况作一描述,在泪膜分布出现异常或者波动时表现出异常的散光增加。在干眼患者的检测中发现,其角膜表面的规则相关性参数较正常人增高,并且随着干眼造成的眼表损伤程度的加重,参数增高,但由于采样面积等因素,预实验中数据稳定性与重复性不佳,故在本研究中未被采用。泪膜稳定性是对泪膜功能的一个综合评定,并且常与临床表现直接相关。本实验证实,在体内雄激素浓度下降后,BUT 明显缩短,同时 Muc1 和 Muc4 表达也下降。因此,推测雄激素可能通过影响角膜上皮细胞 Mucins 表达,最终影响泪膜稳定性,其中的具体机制需要进一步探索。我们知道 BUT 是一个综合性指标,而泪膜三层结构(脂质层、水样层、黏蛋白层)的任何一个或多个异常,均会影响 BUT,而本研究并未考虑到脂质层与水样层的差异,这是本文的不足之处,需要进一步补充研究。

综上所述,在体内雄激素可调控小鼠角膜上皮黏蛋白表达,并且雄激素水平变化影响 BUT 与泪膜稳定性。对以上现象的作用机制进行深入探索,将可能为干眼的研究和临床治疗开辟新的方向。

参考文献

- 1 胡道德,顾磊,刘焰,等. 干眼症的研究进展. 眼科新进展 2007;27(5):380-382
- 2 张宏,马俊旗,安晓,等. 围绝经期干眼患者眼表 CXCR3 表达与性激素的相关性分析. 眼科新进展 2013;33(9):839-842
- 3 Schirra F, Suzuki T, Dickinson DP, et al. Identification of steroidogenic enzyme mRNAs in the human lacrimal gland, meibomian gland, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 2006;25(4):438-442
- 4 黎黎,高鸽,郑璇,等. 二氢睾酮对小鼠角膜上皮细胞 Mucins 表达的影响. 眼科新进展 2014;34(8):701-704
- 5 黎黎,王双梅,郑璇,等. 去势雄性小鼠泪膜功能异常及角膜上皮细胞超微结构改变. 中华实验眼科 2016;34(2):103-107
- 6 The epidemiology of dry eye disease: report of the epidemiology subcommittee of the international Dry Eye WorkShop. *Ocul Surf* 2007;5(2):93-107
- 7 Yazdani C, McLaughlin T, Smeeding JE, et al. Prevalence of treated

dry eye disease in a managed care population. *Clin Ther* 2001;23(10):1672-1682

8 Suzuki T, Kinoshita Y, Tachibana M, et al. Expression of sex steroid hormone receptors in human cornea. *Curr Eye Res* 2001;22(1):28-33

9 Schirra F, Suzuki T, Richard SM, et al. Androgen control of gene expression in the mouse meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(10):3666-3675

10 罗丰年,张汗承,孙叙清,等. 去势雄兔泪液分泌及泪膜稳定性的改变. 中华眼科杂志 2001;37(6):458-461

11 Ashutosh S. Energetics of corneal epithelial cell-ocular mucus-tear film interactions; some surface-chemical pathways of corneal defense. *Biophys Chem* 1993;47(1):87-99

12 Russo CL, Spurr - Michaud S, Tisdale A, et al. Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia. *Hum Reprod* 2006;21(11):2783-2793

13 Evanqelou A, Letarte M, Marks A, et al. Androgen modulation of adhesion and antiadhesion molecules in PC - 3 prostate cancer cells expressing androgen receptor. *Endocrinology* 2002;143(10):3897-3904

14 李劫,赵悬,孙明,等. 干眼症对角膜地形图角膜厚度检测结果的影响. 国际眼科杂志 2011;11(4):735-736