

本文引用:王超群,李 点,刘慧萍,李 玲.养阴润目丸对干眼模型大鼠结膜上皮细胞中 Caspase-3、Caspase-6 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(7):848-850.

养阴润目丸对干眼模型大鼠结膜上皮细胞中 Caspase-3、Caspase-6 表达的影响

王超群¹,李 点^{1*},刘慧萍²,李 玲²

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

〔摘要〕目的 研究养阴润目丸对干眼模型大鼠结膜上皮细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-6(Caspase-6)表达的影响。**方法** 将50只SD雄性大鼠按随机数字法分成5组,10只/组,分别为正常组、假手术组、模型组、养阴润目丸组、杞菊地黄丸组。模型组、养阴润目丸组、杞菊地黄丸组3组均采用去势法建立干眼模型。各组予以相应干预,干预30d后,取大鼠结膜上皮组织,采用Tunel法检测Caspase-3、Caspase-6的阳性表达率。**结果** 养阴润目丸组和杞菊地黄丸组结膜上皮细胞中Caspase-3、Caspase-6的阳性表达明显低于模型组($P<0.05$)。**结论** 养阴润目丸对干眼的作用机制可能是与降低结膜上皮细胞中Caspase-3、Caspase-6的表达活性从而阻断相关细胞凋亡级联反应相关。

〔关键词〕 养阴润目丸;干眼;结膜上皮细胞;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-6

〔中图分类号〕R285.5;R276.7

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.07.012

Effects of Yangyin Runmu Pills on the Expression of Caspase-3 and Caspase-6 in Conjunctival Epithelial Cells in a Rat Model of Dry Eye

WANG Chaoqun¹, LI Dian^{1*}, LIU Huiping², LI Ling²

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To study the effects of Yangyin Runmu Pills on the expression of Cysteine aspartase-3 (Caspase-3) and Cysteine aspartase-6 (Caspase-6) in conjunctival epithelial cells in a rat model of dry eye. **Methods** A total of 50 Sprague-Dawley (SD) male rats were randomly divided into 5 groups: normal group, sham operation group, model group, Yangyin Runmu Pills group, Qiju Dihuang Pills group, with 10 rats in each group. The model group, the Yangyin Runmu Pills group and the Qiju Dihuang Pills group were prepared as the models of dry eye by using the method of ovariectomy. Each group was given corresponding intervention. After 30d intervention, the conjunctival epithelial tissues were taken to test the positive expressive rate of Caspase-3 and Caspase-6 by Tunel assay. **Results** The positive expressive rates of Caspase-3 and Caspase-6 in conjunctival epithelial cells in the Yangyin Runmu Pills group and the Qiju Dihuang Pills group were significantly lower than that of the model group ($P<0.05$). **Conclusion** The mechanism of action of Yangyin Runmu Pills on dry eye may be related to the inhibition of Caspase-3 and Caspase-6 expressive activities in conjunctival epithelial cells, thereby blocking the correlation of related apoptosis cascade reactions.

〔Keywords〕 Yangyin Runmu Pills; dry eye; conjunctival epithelial cells; Caspase-3; Caspase-6

〔收稿日期〕2018-08-13

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81674030);长沙市科技局科技计划项目(Kq1606005);湖南省发展与改革委员会科研项目(湘财企指[2016]65号)。

〔作者简介〕王超群,女,医学硕士,研究方向:眼表疾病的中西医防治与健康管理。

〔通讯作者〕*李 点,女,主任医师,E-mail:1103968933@qq.com。

干眼(dry eye disease, DED)是眼表的一种多因子疾病,特征是泪膜稳态的丧失并伴有眼表症状,其病因包括泪膜不稳定、泪液高渗性、眼表炎症与损伤和神经感觉异常^[1]。干眼是眼科常见病,老年人患病多与自身因素相关,其患病率随年龄呈线性增长^[2]。近年来随着手机、电脑、角膜接触镜的普及使用,睡眠时间的减少,空气污染等多种因素的影响,干眼的患病率逐步呈年轻化趋势^[3-5]。项目组前期研究表明^[6-7],对于干眼的治疗,养阴润目丸具有良好临床疗效,而养阴润目丸治疗干眼的有效作用机制尚不明确,本项目组拟通过建立干眼动物模型,研究养阴润目丸对大鼠结膜上皮细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-6(Caspase-6)的表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 7~8 周健康 SD 雄性大鼠 50 只,体质量 180~200 g,由湖南省长沙市斯莱克景达实验有限公司提供(动物许可证号:SCXK(湘)2014-0002)。所有动物均通过泪液分泌试验、泪膜破裂时间筛查,检查正常方可使用。统一饲养于湖南中医药大学 SPF 级动物实验中心,控制室温(23±2)℃,相对湿度 53%~57%。

1.2 药品及主要试剂

养阴润目丸(湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供),杞菊地黄丸(九芝堂股份有限公司,201505001)、Caspase-3(PB0183)、Caspase-6(BA3328)、4%多聚甲醛(AR1069)、Tunel 检测试剂盒(MK1020)均来自武汉博士德公司。泪液检测滤纸条(天津晶明新技术开发有限公司,20150903)。

1.3 主要仪器

Shandon 325 型石蜡切片机(英国珊顿公司),MIAS 医学图像分析系统(北航公司),研究型正置显微镜(olympus)。

1.4 分组与给药方法

按随机数字表法将 50 只 SD 雄性大鼠分成 5 组,10 只/组,分别为正常组、假手术组、模型组、养阴润目丸组、杞菊地黄丸组。正常组不做任何处理,假手术组只切开阴囊而不切除睾丸及附睾,模型组、养阴润目丸组、杞菊地黄丸组 3 组大鼠参照干眼动物模型的操作^[8-9],切除睾丸及附睾。术后常规消毒、保温、分笼饲养。养阴润目丸组、杞菊地黄丸组分别以药物 0.94 g/kg 与生理盐水混悬液灌胃,1 次/d;正常组、假手术组、模型组 3 组分别以生理盐水灌胃,1

次/d,连续灌胃 30 d。

1.5 Tunel 法检测 Caspase-3、Caspase-6

各组大鼠治疗 30 d 后,用 10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔麻醉,剪刀分离大鼠眼球周边组织并剥离出眼球结膜上皮,4%多聚甲醛固定后冷存待检。常规石蜡包埋、切片。3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min,蒸馏水洗 2 min×2 次,Proteinase K(1:200 稀释)消化 10 min,滴加标记缓冲液(20 μL)2 h 后,PBS(pH 7.2~7.6)洗 2 min×3 次,滴加封闭液室温保存 30 min,滴加生物素化抗地高辛抗体(1:100 稀释),室温孵育 10 min 后,PBS(pH 7.2~7.6)洗 2 min×3 次,滴加 Caspase-3 或 Caspase-6 抗体(1:100 稀释),室温孵育 30 min,PBS(pH 7.2~7.6)洗 5 min×3 次,然后 DAB 显色、复染、脱水、封片。高倍镜下观察每张涂片,至少观察 5 个视野以上,计数视野内的细胞总数,如细胞核中有明显的棕黄色或棕褐色颗粒即为阳性表达,即凋亡的细胞,分别计算其阳性细胞比率。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。如符合正态性及方差齐性,则用多因素方差分析两两比较法;如不符合正态性及方差齐性,则用非参多重比较法。以 $P<0.05$ (双侧检验)为有统计学差异。

2 结果

治疗 30 d 后,正常组、假手术组结膜上皮细胞核内几乎无明显棕黄色或棕褐色,即 Caspase-3、Caspase-6 几乎无阳性表达;养阴润目丸组和杞菊地黄丸组结膜上皮部分细胞核内可见棕黄色沉着,及 Caspase-3、Caspase-6 存在不同程度阳性表达,分别与正常组、假手术组比较,结膜上皮细胞凋亡阳性比率差异均有统计学意义($P<0.05$),但养阴润目丸组与杞菊地黄丸组比较差异均无统计学意义($P>0.05$);模型组结膜上皮细胞核内可见大量棕黄色沉着,即 Caspase-3、Caspase-6 大量阳性表达,结膜上皮细胞凋亡阳性比率分别同养阴润目丸组和杞菊地黄丸组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1、图 1-2。

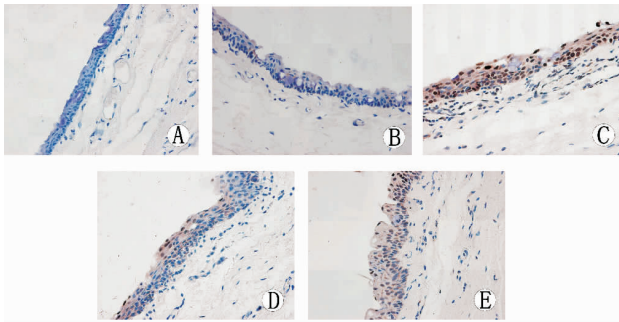
3 讨论

已有研究表明^[10],角结膜上皮细胞的凋亡,被认为是损伤眼表正常形态与功能的主要途径。处于细胞凋亡下游的蛋白酶家族 Caspases 家族在凋亡早期启动并传递凋亡信号,于凋亡晚期作用于不同凋亡底物,使其产生细胞皱缩、DNA 断裂等凋亡特征现

表1 各组大鼠结膜上皮细胞中 Caspase-3、Caspase-6 的阳性表达 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

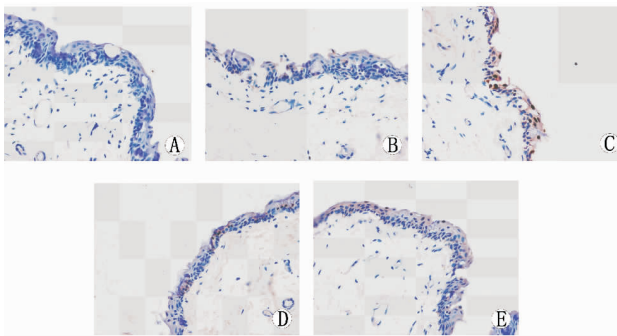
组别	Caspase-3	Caspase-6
正常组	0.060±0.008	0.057±0.008
假手术组	0.085±0.010	0.072±0.006
模型组	0.510±0.031 [#]	0.461±0.019 [#]
养阴润目丸组	0.324±0.025 ^{**}	0.260±0.024 ^{**}
杞菊地黄丸组	0.376±0.019 ^{**}	0.325±0.023 ^{**}
F 值	87.93	101.2
P 值	0.000	0.000

注:与假手术组分别比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$



注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.养阴润目丸组;E.杞菊地黄丸组

图1 各组大鼠结膜上皮细胞中 Caspase-3 表达光镜图 (DAB, ×400)



注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.养阴润目丸组;E.杞菊地黄丸组

图2 各组大鼠结膜上皮细胞中 Caspase-6 表达光镜图(DAB, ×400)

象^[11]。Caspases-3 是细胞凋亡效应子,其降解凋亡标志底物的活性最强^[12],是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。而 Caspases-6 能被上游的启动子激活,作用于凋亡标志底物使细胞发生生化及形态学改变。Caspases-3 和 Caspases-6 之间的相互活化可能与 Caspase 的级联放大效应有关^[13]。因此,通过干预 Caspases-3、Caspases-6 蛋白酶的表达,就有可能阻断其相关细胞凋亡通路级联反应的发生发展。

干眼属于中医学“白涩症”范畴。临床表现为“不肿不赤,不得爽快,沙涩昏朦,名曰白涩”(《审视

瑶函》)。中医学认为,“泪乃肝之液”(《银海精微》),“肾主津液,润养目珠”,当肝肾亏虚,泪液分泌不足,目失滋润,则致干眼。养阴润目丸具有滋养肝肾、生津润燥功效,治疗干眼,临床疗效显著。本研究发现,以模型组与正常组、假手术组比较,大鼠结膜上皮细胞中 Caspases-3、Caspases-6 阳性表达率均有显著性差异,证实细胞凋亡机制与干眼的发生发展关系密切。经过养阴润目丸的干预后,大鼠结膜上皮细胞中 Caspases-3、Caspases-6 的阳性表达率要明显低于模型组,由此我们推断,通过降低 Caspases-3、Caspases-6 的表达活性,以阻断相关细胞凋亡级联反应,可能是养阴润目丸有效治疗干眼的作用机制,其关键因素是否是养阴润目丸中的某些有效成分或是滋养肝肾治法,还有待进一步探索。

参考文献

- [1] NISON J D, CRAIG J P, AKPEK E K, et al. TFOS DEWS II introduction[J]. *Ocular Surface*, 2017,15(3):269-275.
- [2] GUO B, LU P, CHEN X M, et al. Prevalence of dry eye disease in Mongolians at high altitude in China:the Henan eye study[J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 2010,17(4):234-241.
- [3] 卢媛媛,许璐洁,蔡龙龙,等.西安市某高校大学生干眼调查研究[J]. *中国地方病防治杂志*,2018,33(2):195-197.
- [4] 胡青.眼科门诊40岁以下人群干眼患病情况及危险因素分析[J]. *世界最新医学信息文摘*,2018,18(45):250-251.
- [5] 黄桦,邹文进.视频显示终端使用时间与儿童干眼的关系[J]. *广东医学*,2018,39(5):701-709.
- [6] 李点,王超群.养阴润目丸治疗干眼症的临床观察[J]. *南京中医药大学学报*,2016,32(4):386-388.
- [7] 金灿,李点,吕佳.养阴润目丸治疗干眼的临床研究[J]. *中药导报*,2018,24(6):387-389.
- [8] 张燕,谢军,徐艺攻,等.去势大鼠干眼症模型眼表损伤的研究[J]. *生物医学工程研究*,2013,32(2):97-100.
- [9] 彭俊,欧阳云,谭涵宇,等.密蒙花滴眼液对去势雄兔干眼症泪腺细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的影响[J]. *湖南中医药大学学报*,2017,37(5):469-472.
- [10] DONG Z H, WANG D C, LIU T T, et al. The roles of MAPKs in rabbit nucleus pulposus cell apoptosis induced by high osmolality [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2014,18(19):2835-2845.
- [11] RONGVAUX A, JACKSON R, ARMAN C C, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA [J]. *Cell*,2014,159(7):1563-1577.
- [12] 熊建卫,戴闽,郝亮,等.金属离子刺激人单核细胞分泌 TNF- α 并诱导其凋亡与 Caspase-3 激活的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*,2009,23(3):299-302.
- [13] 赵瑞杰,李引乾,王会,等.Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J]. *中国畜牧杂志*,2010,46(17):73-78.

(本文编辑 杨 瑛)