

·方药研究·

本文引用:陈立浩,时健,刘倩宏,姚小磊,蒋鹏飞.菊花总黄酮对去势所致干眼雄兔泪腺组织中 AR、AR mRNA、Bax mRNA 及形态学的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(4):406-411.

菊花总黄酮对去势所致干眼雄兔泪腺组织中 AR、AR mRNA、Bax mRNA 及形态学的影响

陈立浩^{1,2}, 时健¹, 刘倩宏¹, 姚小磊^{3*}, 蒋鹏飞¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病湖南省重点实验室,湖南长沙 410208;

3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] 目的 考察菊花总黄酮治疗去势雄兔干眼的具体机制。方法 采取随机数字法将 150 只雄兔分为 15 组,编号分别为 A1、A3、A5、B1、B3、B5、C1、C3、C5、D1、D3、D5、E1、E3、E5,每组 10 只,A-E 组中序号对应干预时间,其中 A 组不做任何干预处理,B 组行假去势术,C、D、E 组行双侧去势术建立雄激素水平缺乏型干眼模型。A、B、C 组均用生理盐水灌胃,D 组行雄激素(丙酸睾酮)肌肉注射,E 组用菊花总黄酮灌胃。分别于治疗后的 1、3、5 月,将动物处死。观察:(1)雄激素样效应 以免疫组织化学法测定泪腺组织中雄激素受体(androgen receptor,AR)光密度,辅以 RT-PCR 技术测定 AR mRNA 表达,以观察泪腺组织中 AR 上调情况;(2)细胞凋亡 以 RT-PCR 技术测定泪腺中细胞凋亡相关基因蛋白 Bax mRNA 的表达;(3)形态学改变 使用透射电镜观察泪腺超微结构变化。结果 (1)雄激素样效应:E 组与 C 组相比,其泪腺组织中 AR 明显上调($P<0.01$),AR mRNA 表达率明显增长($P<0.01$);(2)细胞凋亡:E 组 Bax mRNA 表达率与 C 组比较下降明显($P<0.01$);(3)形态学改变:E 组在干预后,线粒体肿胀减轻,丢失或成空泡变,而 C 组线粒体肿胀,局灶凋亡坏死,凋亡明显。结论 菊花总黄酮具有较好的雄激素样效应,能够抑制 Bax mRNA 凋亡,恢复泪腺组织形态。它有望应用于由雄激素水平下降所致干眼的临床治疗中。

[关键词] 干眼;去势雄兔;菊花总黄酮;雄激素样效应;Bax mRNA;形态学

[中图分类号]R285.5;R777.2¹¹

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.04.005

Effects of Total Flavonoids from Chrysanthemum on AR, AR mRNA, Bax mRNA and Morphology in Lacrimal Gland of Castrated Dry Eye Male Rabbits

CHEN Lihao^{1,2}, SHI Jian¹, LIU Qianhong¹, YAO Xiaolei^{3*}, JIANG Pengfei¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Eye, Ear, Nose and Throat Diseases in Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China;

3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To explore the specific mechanism of total flavonoids from chrysanthemum in the treatment of castrated male rabbit dry eyes. **Methods** A total of 150 male rabbits were randomly divided into 15 groups with random number method, and numbered A1, A3, A5, B1, B3, B5, C1, C3, C5, D1, D3, D5, E1, E3, E5, with 10 rabbits in each group. There was no intervention in group A. Sham castration was given in group B. Bilateral castration was performed

[收稿日期]2019-12-30

[基金项目]国家自然科学基金地区基金项目(81260550);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目(ZK1801YK015);中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);湖南省中医五官科学重点学科建设项目;湖南中医药大学中医学国内一流建设学科项目。

[作者简介]陈立浩,男,在读硕士研究生,研究方向:眼表与泪液疾病。

[通讯作者]*姚小磊,男,主任医师,副教授,博士研究生导师,E-mail:yxllshh@126.com。

in groups C, D and E. Group A, B and C were given normal saline. Group D was given testosterone propionate intramuscular injection, and group E was given total flavonoids of chrysanthemum by gavage. The animals were killed 1, 3 and 5 months after treatment. (1) For the observation of androgen like effect, androgen receptor (AR) density in lacrimal gland was measured by immunohistochemistry, and AR mRNA expression was measured by RT-PCR to observe the up-regulation of AR in lacrimal gland. (2) For the observation of apoptosis, Bax mRNA expression in lacrimal gland was measured by RT-PCR. (3) For the observation of morphological changes, ultrastructural structural changes of lacrimal gland were observed by transmission electron microscopy. **Results** (1) androgen like effect: compared with the model group C, the AR in lacrimal gland of group E was significantly up-regulated ($P<0.01$), and the AR mRNA expression rate was significantly increased ($P<0.01$). (2) Apoptosis: the Bax mRNA expression rate of group E was significantly decreased ($P<0.01$) compared with that of group C. (3) Morphological changes: after the intervention, the swelling of mitochondria in Group E was reduced, and the mitochondria in group C were lost or vacuolized, while the swelling of mitochondria, focal apoptosis and necrosis in group C was obvious. **Conclusion** The total flavone from chrysanthemum has a better androgen like effect, which can inhibit Bax mRNA apoptosis and restore lacrimal gland morphology. It is expected to be used in the clinical treatment of dry eye caused by the decrease of androgen level.

[**Keywords**] dry eye disease; castrated male rabbit; total flavones from chrysanthemum; androgen-like effect; Bax mRNA; morphology

干眼是一种以眼睛干涩感为主要症状的眼科疾病。本病发病率很高,占眼科门诊量的30%以上^[1],这引起社会的广泛关注。现代研究认为,老年尤其是女性可因机体内部雄激素水平下降而导致干眼^[2-3]。部分中药可替代激素治疗干眼,且副作用较后者低,在干眼治疗领域前景广阔。相关研究已经证实密蒙花提取物具备拟雄激素效应,可治疗因激素水平下降诱发的干眼。例如密蒙花总黄酮^[4-7]及在此研究基础上密蒙花提取物滴眼液^[8-14]、密蒙花颗粒剂^[15-17]等相关研究均为此提供了相关证据。为扩大替代激素的中药提取物的可选择性,开发新的干眼临床药物,基于菊花可清肝明目的中医学认知,本课题组对抗白菊的提取物——菊花总黄酮进行研究。本次实验旨在从雄激素受体(androgen receptor, AR)、Bax mRNA、泪腺组织形态学3个方面,进一步探究菊花总黄酮治疗雄激素水平下降所致干眼的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 实验动物选取2月龄健康雄兔150只(品种为日本大耳白兔,上海斯莱克实验动物有限公司提供,动物合格证号:2012-0361, SPF级,远交系),体质量:2~2.5 kg。

1.1.2 实验药物 杭白菊总黄酮(生产批号:JH130804,产自苏州工业技术研究院,用80%浓度的乙醇溶液提取,并经大孔树脂纯化制得,总黄酮质量分数

为8.55%),配成浓度为1.80 mg/mL。

1.1.3 试剂与耗材 芦丁试剂(成都曼斯特生物科技有限公司), Trizol(日本 TAKARA 公司), 免疫组织化学试剂盒、显色剂、RNA 酶抑制剂 RNasin(来源于大肠杆菌表达的鼠源基因)、多聚甲醛(武汉博士德生物工程有限公司), 氯仿、异丙醇(武汉谷歌生物科技有限公司)。

1.1.4 主要实验设备 Shandon 325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司), Motic B5 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司), TU-1901 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), EYELA SB-1100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司), DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司), DLSB-5/20 低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司), iQ5 Real-Time PCR Detection System(美国 Bio-Rad 公司), 日立 H-600 透射式电子显微镜(上海百贺仪器科技有限公司)。

1.1.5 AR 引物 从 NCBI 中检索基因序列信息(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>; provided in the public domain by the National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD), 并利用 primer5 软件设计引物。引物来源于日本 Takara 公司。正向链:5'-TCCACCTCCTCCAAGGACAGT-3', 反向链:5'-CCAA-CGCCTCCACACCCAA-3'; β -actin: 正向链:5'-TCCTTCTGGGCATGGAGTC-3', 反向链:5'-GGAT-GTCCACGTCG CACTTC-3'; Bax 引物: 正向链:5'-

CGAGTGTCTCCGGCGAATTG-3', 反向链:5'-ATG-GTGAGCGAGGCGGTGAG-3'。扩增引物长度分别为56 bp、152 bp、48 bp。

1.2 方法

1.2.1 动物及分组 取健康2月龄雄性日本大耳白兔150只,采取随机数字法将其分为A1、A3、A5、B1、B3、B5、C1、C3、C5、D1、D3、D5、E1、E3、E5共15组,每组10只。A、B、C、D、E分别代表正常组、假手术组、模型组、雄激素对照治疗组和菊花总黄酮治疗组,1、3、5分别代表干预1、3、5个月。

1.2.2 干眼模型的建立 采用去势方法对雄性日本大耳白兔进行造模^[5]。A组为空白组,不做特殊处理;B组行假去势术作为对照,只切开阴囊,不切除睾丸;C、D、E组行双侧睾丸切除术(ORX),切除雄兔的双侧睾丸及附睾。去势后饲养1月、3月、5月分别表示建立轻度、中度、重度干眼模型。

1.2.3 干预方法 造模手术后1周开始干预。A、B、C组以生理盐水按5 000 mg/kg灌胃,每日1次;D组以1:4麻油稀释后的雄激素(丙酸睾酮注射液)按500 mg/kg大腿肌肉注射,每3日1次;E组以1%菊花总黄酮混悬液(杭白菊总黄酮63.6 mg溶解于生理盐水10 mL)按5 g/kg灌胃,每日1次。A-E组中序号对应相应的干预时间,1、3、5组分别灌胃1、3、5个月。实验过程中,使用常规饲料喂养雄兔。

1.2.4 取材 处死动物(采用静脉空气注射法),并即刻摘除泪腺。将泪腺剪为3份:一份4%多聚甲醛保存、常规石蜡包埋,并利用石蜡切片机连续切片,适用于免疫组织化学方法检测;一份低温保存,用于RT-PCR检测;一份戊二醛保存,供电镜观察用。

1.2.5 检测指标 (1)免疫组织化学法测定雄兔泪腺组织中雄激素受体(androgen receptor, AR)光密度。将泪腺组织的石蜡切片脱蜡至水,使用蒸馏水洗涤(2 min×2次)。按照武汉博士德生物工程有限公司生产的免疫组化染色剂试剂盒说明书进行操作。染色成功后,使用免疫组化测量软件系统进行测量及半定量分析:随机统计各组5~7个高倍视野中AR数值,以该值除以组数,结果即为AR的平均光密度值。系统参数:像素点长2.105 μm,窗口面积1.271×10⁶ μm²。(2)RT-PCR法测定AR mRNA、Bax mRNA的表达。检测AR mRNA:取冷冻组织

100 mg提取总RNA,浓度调为1 μg/μL;将2 μg总RNA在20 μL反应体系中逆转录成cDNA;取其于40 μL反应体积(10×Buffer 4 μL、dNTP 0.8 μL、MgCl₂ 3.2 μL、5 U/μL TaqDNA多聚酶 0.3 μL、模板 4 μL、上下游引物各 0.3 μL、去离子水 27.1 μL)中进行PCR反应,热循环运行参数为AR:93 ℃ 3 min,进入循环,93 ℃ 45 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s;29个循环,72 ℃ 10 min。β-actin:94 ℃ 3 min,进入循环,94 ℃ 45 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s;29个循环后,72 ℃ 5 min;扩增后显影、摄影,以AR mRNA光密度值与β-actin mRNA光密度值的相对比值为AR mRNA的相对表达量。Bax mRNA的检测及分析方法同上。(3)透射电镜检测泪腺组织形态学的变化。将泪腺组织从戊二醛固定液中取出后,以PBS漂洗3次,再以1%锇酸后固定,透射电镜观察泪腺超微结构变化。

1.3 统计学分析

使用统计软件SPSS 24.0进行统计学分析,资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,行双侧检验。对于单因素多样本(同一时间,但不同组别)的实验数据,首先进行正态性检验、方差齐性检验,数据若呈正态分布且方差齐,则采用方差分析;如果数据非正态分布,或方差不齐,则采用非参数检验(Kruskal-Wallis检验),并进行数据间两两比较。对于治疗前后的两组数据,若满足正态性,比较用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 代表数据间的差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AR、AR mRNA的表达情况

2.1.1 AR的表达 免疫组织化学法测定泪腺组织中的AR光密度情况。对各组雄兔泪腺组织中AR情况进行平均光密度测定。经统计学分析发现,C组在去势后与A组测量值相比差异有统计学意义($P < 0.01$);这表明C组AR光密度已经显著降低,造模成功。通过C组组间比较可发现,去势的雄兔在饲养3月、5月后的泪腺组织AR光密度测量值与饲养1月组差异有统计学意义($P < 0.05$);这表明如果去势雄兔不经治疗干预,其自身AR光密度呈降低趋势,提示雄激素水平下降时应该及时采取干预措施。E组、D组均与C组AR光密度差异有统

计学意义 ($P < 0.01$), 表明杭白菊总黄酮具备和雄激素丙酸睾酮相似的效应。Motic B5 系统显微摄像则能够清晰地看到各组间 AR 光密度情况, 佐证了这一结论。见表 1, 图 1。

表 1 各组雄兔泪腺组织中 AR 的平均光密度测量值 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	1 个月后	3 个月后	5 个月后
A	16.40±4.06**	16.30±3.12**	16.20±3.10**
B	16.30±3.12**	16.20±3.51**	16.10±2.24**
C	7.20±1.30 ^{##}	4.00±0.84 ^{△##}	3.60±0.61 ^{△##}
D	11.00±1.17***	12.10±0.50***	10.80±0.38***
E	13.80±1.02***	12.40±0.44***	12.80±0.47***

注: 与 C 组比较, ** $P < 0.01$; 与 A 组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与饲养 1 月同组比较, [△] $P < 0.05$

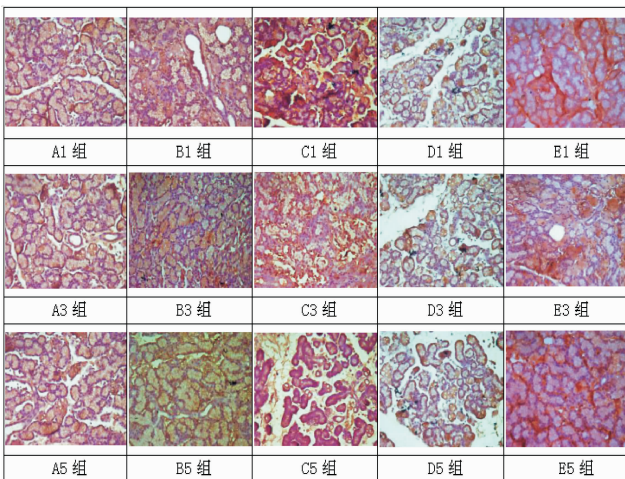
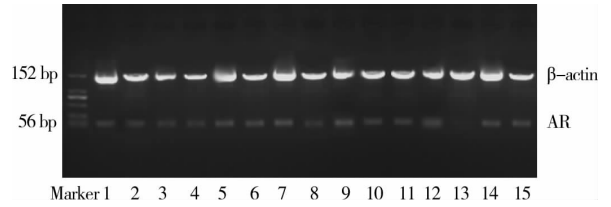


图 1 各组雄兔泪腺组织的 AR 显微图 (免疫组化, ×400)

2.1.2 AR mRNA 的表达 AR mRNA 的 RT-PCR 摄影结果见图 2。各组雄兔 AR mRNA 的相对表达量情况见表 2。RT-PCR 实验后, 通过对各组 AR mRNA 相对表达量进行分析。经方差分析发现, C 组 AR mRNA 表达较其他组明显下降 ($P < 0.01$), 表明模型组动物 AR 基因表达活性已经明显下降, 提示造模成功。经方差分析, D 组去势后经丙酸睾酮治疗, AR mRNA 表达与 C 组比较上调明显 ($P < 0.01$); E 组去势后经菊花总黄酮治疗, AR mRNA 表达与 C 组比较上调明显 ($P < 0.01$), 表明杭白菊总黄酮有较好的拟雄激素效应。经方差分析, D 组与 E 组去势后经丙酸睾酮及菊花总黄酮治疗, AR mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 这表明杭白菊总黄酮的作用与丙酸睾酮类似。



注: 摄影编号 1-15 依次代表 A1、B1、C1、D1、E1、A3、B3、C3、D3、E3、A5、B5、C5、D5、E5 组

图 2 各组雄兔泪腺组织 AR mRNA 的 RT-PCR 电泳摄影图

表 2 各组雄兔泪腺组织 AR mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	时间		
	1 个月后	3 个月后	5 个月后
A	3.32±0.12**	3.82±0.13**	3.11±0.21**
B	3.33±0.23**	3.77±0.73**	3.58±0.53**
C	2.21±0.27	1.15±0.29	0.21±0.01
D	3.32±0.22**	3.72±0.33**	3.61±0.71**
E	3.12±0.42**	4.78±0.34**	4.22±0.33**

注: 与 C 组比较, ** $P < 0.01$

2.2 Bax mRNA 的表达

Bax mRNA 的 RT-PCR 摄影结果见图 3, 各组雄兔泪腺组织 Bax mRNA 相对表达量结果见表 3。RT-PCR 实验后, 通过对各组 Bax mRNA 相对表达量进行分析。经方差分析发现, C 组 Bax mRNA 表达较其他组明显增强 ($P < 0.01$), 表明模型组动物 Bax 基因表达活性开始增强, 启动细胞凋亡。经方差分析, D 组去势后经丙酸睾酮治疗, Bax mRNA 表达与 C 组比较下降明显 ($P < 0.01$); E 组去势后经菊花总黄酮治疗, Bax mRNA 表达与模型组 C 组比较下降明显 ($P < 0.01$), 表明菊花总黄酮有较好的拟雄激素效应。经方差分析, D 组与 E 组去势后经丙酸睾酮及菊花总黄酮治疗, Bax mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明菊花总黄酮的效应类似于丙酸睾酮。

2.3 泪腺组织形态学的改变

泪腺的透射电镜观察结果见图 4。

A 组: 可见结构清楚、核仁明显、核膜完整的泪腺细胞。细胞表面具有微绒毛结构与连接紧密的腺上皮细胞, 细胞内可见丰富的粗面内质网、大量分泌泡。B 组: 所见与 A 组泪腺组织形态相似。C 组: C1 组与 A 组相似; C3 组可见核膜皱缩, 线粒体有

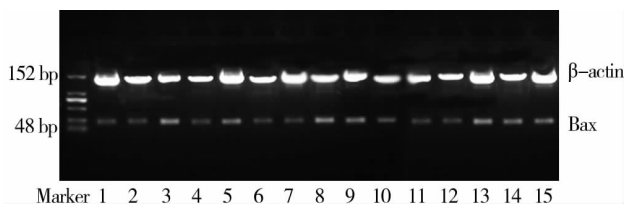


图3 各组雄兔泪腺组织 Bax mRNA 的 RT-PCR 摄影
注:摄影编号 1-15 依次代表 A1、B1、C1、D1、E1、A3、B3、C3、D3、E3、A5、B5、C5、D5、E5 组

图 3 各组雄兔泪腺组织 Bax mRNA 的 RT-PCR 摄影

表 3 各组雄兔泪腺组织 Bax mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	1 个月后	3 个月后	5 个月后
A	1.22±0.45**	1.42±0.44**	1.66±0.19**
B	1.32±0.23**	1.77±0.33**	1.78±0.38**
C	5.71±0.77	6.28±0.56	6.01±0.79
D	2.25±0.82**	3.25±0.40**	3.60±0.77**
E	4.52±0.42**	4.78±0.34**	3.88±0.33**

注:与 C 组比较,** $P<0.01$

肿胀,局部出现变性坏死;C5 组可见核膜皱缩,局部灶变性坏死(溶酶体呈现出黑洞状),线粒体肿胀,细胞间隙变宽,细胞边呈现坏死状,局部凋亡坏死,出现核固缩与染色质边集(凋亡明显)。D 组:D1 组可见空泡改变,细胞间隙增宽;D3 组可见管腔微绒毛有脱落,线粒体嵴丢失,有空泡样改变,管腔有局灶性病变,线粒体肿胀,有脂滴样变,核固缩(凋亡相对明显);D5 组可见线粒体轻肿胀,核轻肿胀,局部水肿变性,核坏死概率大。E 组:E1 组可见线粒体肿胀,空泡变明显;E3 组可见内质网相对丰富,染色质边集;E5 组可见线粒体肿胀减轻,丢失或成空泡变。

3 讨论

中医学认为菊花可入肝经,清肝明目。因此,菊花在现代被广泛应用于干眼的治疗,但是其“明目”的现代机制不甚清楚。本课题组先前研究:菊花总黄酮可以通过抑制去势雄兔泪腺细胞 Fas、FasL 的凋亡^[18],以及 Bax、Bcl-2 的凋亡^[19],来达到治疗干眼的目的。本次实验研究在细胞凋亡方面,使用 RT-PCR 法观察 Bax mRNA 凋亡,进一步验证了凋亡机制。同时从雄激素样效应、泪腺组织形态学两方面支持了菊花总黄酮能够治疗干眼这一假说。本次研究显

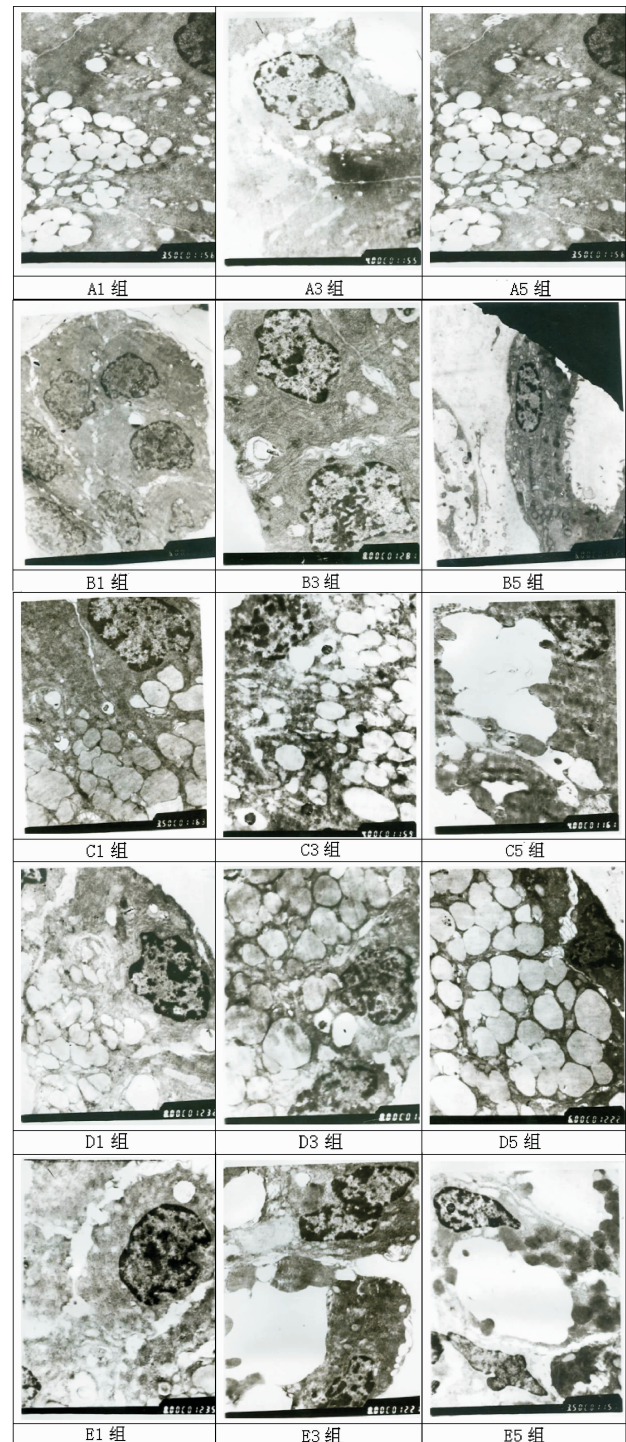


图 4 各组兔泪腺的透射电镜观察($\times 600$)

示:菊花总黄酮具有较好的雄激素样效应,它能够抑制泪腺组织中 Bax mRNA 凋亡、恢复泪腺组织形态。菊花总黄酮的这些作用或可有助于雄兔的泪液分泌以及泪膜稳定,以达到治疗干眼的目的。它有望应用于由雄激素水平下降所致的干眼的临床治疗中。

至此,菊花总黄酮治疗雄激素缺乏所致干眼的机制基本得到揭示。课题组将深入研究并开发菊花

总黄酮的衍生产品,例如菊花提取物滴眼液、菊花颗粒剂等产品,最终目的为将菊花总黄酮进行“学-研-产”的转化,并推广应用于临床。

参考文献

- [1] 马佰凯,刘容均,齐虹.基于国际干眼新共识的干眼研究进展[J].中华眼科医学杂志(电子版),2018,8(1):36-43.
- [2] VANESSA S, KAVYASRI V, CLAUDIA Z, et al. Sex hormone regulation of tear lipocalin in the rabbit lacrimal gland[J]. *Experimental Eye Research*, 2008,87(3):184-190.
- [3] UCHINO M, YOKOI N, UCHINO Y, et al. Prevalence of dry eye disease and its risk factors in visual display terminal users: the Osaka study[J]. *American Journal of Ophthalmology*, 2013, 156(4):759-766.
- [4] 李怀凤,彭清华,姚小磊,等.密蒙花总黄酮对去势雄鼠干眼症模型角膜和泪腺组织中 TNF- α 、IL-1 β 表达的影响[J].*国际眼科杂志*, 2009,9(7):1248-1251.
- [5] 陈佳文,彭清华,姚小磊,等.密蒙花总黄酮对去势雄鼠干眼症泪腺 TGF- β_1 及其基因表达的影响[J].*眼科研究*,2010,28(4):311-314.
- [6] 姚小磊,彭清华,吴权龙.密蒙花提取物治疗兔去势所致干眼症[J].*眼视光学杂志*,2008,10(1):21-26.
- [7] 李怀凤,彭清华,姚小磊,等.密蒙花总黄酮对去势雄鼠干眼症模型角膜和泪腺组织的保护作用[J].*中国中医眼科杂志*,2010,20(1): 1-6.
- [8] 彭清华,姚小磊,吴权龙,等.密蒙花提取物滴眼剂对实验性干眼症大鼠泪腺组织细胞凋亡的影响(英文)[J].*中西医结合学报*,2010,8 (3):244-249.
- [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] 张又玮,覃良艳,彭晓芳,等.密蒙花滴眼液对去势雄兔干眼泪腺组织中 ICAM-1、IL-6、IL-17 表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2019,39(4):448-452.
- [11] 彭清华,姚小磊,彭俊,等.密蒙花提取物对干眼症雄兔泪腺局部炎症反应影响的研究[J].*中华中医药学刊*,2010,28(7):1351-1356.
- [12] 吴权龙,彭清华,姚小磊,等.密蒙花提取物滴眼剂对实验性干眼症大鼠泪腺组织形态学的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2009,29 (5):22-25.
- [13] 彭清华,姚小磊,彭俊,等.密蒙花提取物滴眼剂对实验性干眼症鼠泪腺组织细胞凋亡的影响[J].*国际眼科杂志*,2010,10(1):40-43.
- [14] 王芬,彭清华,李海中,等.密蒙花总黄酮含药血浆对干眼症细胞模型 Bax mRNA 及 Bcl-2 mRNA 表达的影响[J].*国际眼科杂志*,2012,12(10):1836-1840.
- [15] 欧阳云,彭俊,彭清华,等.密蒙花颗粒剂对去势雄兔泪腺细胞凋亡因子 Bax、Bcl-2、Fas 和 FasL 的影响[J].*中国中西医结合杂志*,2017,37(7):858-862.
- [16] 彭俊,欧阳云,谭涵宇,等.密蒙花颗粒剂对去势雄兔泪腺细胞 TNF- α 及 IL-1 β 表达的影响[J].*中华中医药杂志*,2018,33(3):874-877.
- [17] 蒋鹏飞,彭俊,彭清华.密蒙花颗粒对去势诱导的干眼症兔泪腺细胞 IL-12 及 IL-6 的影响[J].*北京中医药大学学报*,2019,42(6): 477-482.
- [18] 姚小磊,彭清华,陈启雷,等.菊花总黄酮对去势导致干眼症雄兔泪腺细胞 Fas、FasL 表达的影响[J].*国际眼科杂志*,2014,14(10): 1749-1754.
- [19] 姚小磊,彭清华,陈启雷,等.菊花总黄酮对去势导致雄兔干眼症泪腺细胞 Bax、Bcl-2 表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2014,34 (7):12-17.

(本文编辑 杨瑛)