

本文引用: 李玲, 李点, 张婷, 姚蕾, 李炎. 养阴润目丸对苯扎氯铵诱导的干眼兔模型结膜上皮细胞焦亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1570-1575.

养阴润目丸对苯扎氯铵诱导的干眼兔模型 结膜上皮细胞焦亡的影响

李玲¹, 李点^{2*}, 张婷², 姚蕾², 李炎²

1.湖南中医药大学中医学院,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007

〔摘要〕目的 研究养阴润目丸对干眼兔结膜上皮细胞焦亡的调控作用。方法 将40只雌雄各半的健康普通级新西兰兔采用随机数字表法,取8只作为空白组,剩余32只均采用双眼局部滴注0.1%苯扎氯铵溶液制备干眼模型,模型成功后随机分为空白组,模型组,养阴润目丸低、中、高剂量组,每组8只。养阴润目丸低、中、高剂量组分别按剂量0.435、0.869、1.738 g·(kg·d)⁻¹给予养阴润目丸水溶液灌胃。连续灌胃2周后,分别进行泪液分泌试验(Schirmer's test, SIT)、泪膜破裂时间(break up time, BUT)和角膜荧光素染色评分;取兔结膜上皮细胞,透射电镜下观察结膜上皮的细胞形态;Western blot检测结膜中NOD样受体家族核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1(cysteine aspartate-specific proteinase-1, Caspase-1)、消化道皮肤素D(Gasdermin D, GSDMD)蛋白表达;ELISA法检测兔血清中炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)含量。结果 与空白组相比,模型组实验兔SIT明显减少、泪膜BUT明显缩短、角膜荧光素染色评分明显升高($P<0.01$, $P<0.05$);兔结膜上皮细胞超微结构可见明显肿胀、变形、破裂、皱缩等细胞损伤;兔结膜上皮细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD的蛋白表达明显升高($P<0.05$);兔血清中IL-1 β 、IL-18含量明显增多($P<0.05$)。与模型组相比,养阴润目丸各剂量组SIT明显增多、泪膜BUT明显延长、角膜荧光素染色评分明显降低($P<0.05$);兔结膜上皮细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD的蛋白表达明显降低($P<0.05$);兔血清中IL-1 β 、IL-18含量明显减少($P<0.05$)。结论 养阴润目丸可以通过降低干眼兔结膜上皮细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白表达,抑制结膜上皮细胞发生焦亡,减少炎症细胞因子IL-1 β 、IL-18分泌,从而阻断相关级联反应,起到增加泪液分泌量、延长泪膜BUT等作用,最终治疗苯扎氯铵诱导的干眼。

〔关键词〕 干眼;养阴润目丸;苯扎氯铵;结膜上皮细胞;细胞焦亡

〔中图分类号〕R276.7

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.09.004

Effects of Yangyin Runmu Pill on pyroptosis of conjunctival epithelial cell induced by benzalkonium chloride in a rabbit dry-eye model

LI Ling¹, LI Dian^{2*}, ZHANG Ting², YAO Lei², LI Yan²

1. College of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔Abstract〕 Objective To study the effects of Yangyin Runmu Pill (YYRMP) on pyroptosis of conjunctival epithelial cells in dry-eye rabbits. **Methods** Eight rabbits were randomly selected among 20 male and 20 female New Zealand rabbits as the

〔收稿日期〕2023-03-01

〔基金项目〕国家自然科学基金面上项目(81674030);教育部产学研合作协同育人项目(22100443904328)。

〔第一作者〕李玲,女,高级实验师,硕士,研究方向:眼科疾病的中医药防治。

〔通信作者〕*李点,女,教授,主任医师,博士研究生导师,E-mail:1103968933@qq.com。

blank group. The remaining 32 rabbits were used to prepare the dry-eye models by local infusion of 0.1% benzalkonium chloride solution into both eyes. After successful modeling, they were randomly subdivided into blank group, model group, and low-, medium-, and high- dose YYRMP groups, with 8 rabbits in each group. The low-, medium-, and high-dose YYRMP groups were treated with YYRMP solution by gavage at dosages of 0.435, 0.869, and 1.738 $\text{g} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$, respectively. After continuous gavage for 2 weeks, Schirmer's test (SIT), break up time (BUT), and corneal fluorescence staining score were performed respectively; rabbit conjunctival epithelial cells were observed by transmission electron microscopy. The expressions of NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3), cysteine aspartate-specific proteinase⁻¹ (Caspase-1), and Gasdermin D (GSDMD) protein in the conjunctiva were checked by Western blot; the content of serum inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18) in rabbit serum was determined by ELISA. **Results** Compared with the blank group, the experimental rabbits in the model group showed significantly lower SIT, shorter tear film BUT, and higher fluorescence staining scores ($P < 0.01$, $P < 0.05$); the ultrastructure of rabbit conjunctival epithelial cells showed obvious swelling, deformation, rupture, shrinkage, and other cellular damage; the protein expressions of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD and the content of IL-1 β , IL-18 increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the experimental rabbits in YYRMP groups showed higher SIT, longer tear film BUT, and lower fluorescence staining scores ($P < 0.05$); the protein expressions of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD in rabbit conjunctival epithelial cells were reduced ($P < 0.05$); the content of IL-1 β and IL-18 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** YYRMP can reduce the expressions of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD proteins in conjunctival epithelial cells of dry-eye rabbits, inhibit conjunctival epithelial cell apoptosis, and reduce the secretion of IL-1 β and IL-18, thereby blocking related cascade reactions. YYRMP increases tear secretion, prolongs tear film BUT, and ultimately treats dry eyes induced by benzalkonium chloride.

[**Keywords**] dry eye; Yangyin Runmu Pill; benzalkonium chloride; conjunctival epithelial cells; pyroptosis

干眼为多种因素引起的慢性眼表疾病,是由泪液的质、量及动力学异常导致的泪膜不稳定或眼表微环境失衡,可伴有眼表炎症反应、组织损伤及神经异常,造成眼部多种不适症状和(或)视功能障碍^[1-3]。常以眼干燥感、异物感、灼烧感、疲劳感和视力波动等眼部不适为临床表现。目前,有大样本研究调查发现,近年来干眼的发病率呈现上升的趋势,且人群趋于低龄化^[4-5]。研究表明,炎症是干眼发生发展的核心机制之一,眼表炎症与泪液渗透压升高具有显著相关性^[6]。而中医学认为干眼的病机大多以肝肾不足,津液亏虚,目失润养为主。以“补养肝肾”为组方原则的养阴润目丸是湖南中医药大学第一附属医院眼科治疗干眼的院内制剂,已在临床安全、有效地使用多年^[7-8]。本研究以苯扎氯铵溶液诱导的干眼兔为研究对象,旨在探究养阴润目丸对干眼兔结膜上皮细胞焦亡的干预作用和疗效机制,为中医药治疗干眼提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康普通级新西兰兔 40 只,雌雄各半,体质量 1.5~2.5 kg,购自湖南中医药大学动物实验

中心(合格证号:SZ-20190826-雄性、SZ-20190821-雌性),动物实验伦理审批号:LLBH-202007310001。对所有实验兔进行排查,选择泪液分泌量正常、泪膜破裂时间(break up time, BUT)正常、裂隙灯检查无眼疾者纳入实验。饲养于湖南中医药大学实验动物中心,相对湿度为 50%~55%,实验室室温为 21~26 $^{\circ}\text{C}$,1 笼 1 兔,自由饮食,环境干净整洁、安静。普通级兔用饲料自由取食。

1.1.2 药物制备 养阴润目丸为院内制剂,由生地、黄、当归、枸杞子、沙参、白芍、黄精、石斛、牡丹皮、菊花、黄芪和甘草组成,规格为 1 g 丸剂,相当于 8.4 g 生药。成人用药方法:10 g/次,1 天 2 次。备案号:湘药制备字 Z20210461000,由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。

1.1.3 主要试剂及仪器 2%荧光素钠(批号:XY19118)、0.1%苯扎氯铵溶液(批号:H20063993)均购自广州明兴制药厂;泪液检测滤纸条(天津晶明新技术开发有限公司,批号:0102);白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)ELISA 试剂盒(批号:E-EL-M0055c)、白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)ELISA 试剂盒(批号:E-EL-M0062c)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; β -actin 抗体(批号:AG07197903)、

NOD样受体家族核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3 (NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3, NLRP3)抗体(批号:AI10305354)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1(cysteine aspartate-specific proteinase-1, Caspase-1)抗体(批号:BA03228585)、消化道皮肤素D(Gasdermin D, GSDMD)抗体(批号:BA03226742)、山羊抗兔IgG(批号:BJ08079044)均购自北京博奥森生物技术有限公司。

手持裂隙灯显微镜(苏州六六视觉科技股份有限公司,型号:YZ2);化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon X6);多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司,型号:Synergy2);透射电镜(日本日立公司,型号:HT7700)。

1.2 动物分组与造模

40只兔在实验前适应性喂养1周,采用随机数字表法,取8只作为空白组,剩余32只用于制备模型,造模方法^[9]为:双眼局部滴注0.1%苯扎氯铵溶液造模14d,每天2次。在第15天时对动物的双眼进行泪液分泌试验(Schirmer's test, SIT)、泪膜BUT、角膜荧光素染色评分等检查,出现SIT明显减少、泪膜BUT明显缩短、角膜荧光素染色评分明显升高,则判断模型复制成功^[9]。随机将上述模型兔分为模型组和养阴润目丸低、中、高剂量组,每组8只。

1.3 给药方法

根据人的临床常用剂量,按人(70 kg)与兔(2 kg)体表面积换算养阴润目丸给药兔的临床等效剂量^[10],计算过程为:人(70 kg)的体表面积换算系数 $R_{人}=384.2$,兔(2 kg)的体表面积换算系数 $R_{兔}=33.39$,人(70 kg)的养阴润目丸临床常用剂量 $D_{人}=20$ g,因此,兔(2 kg)的养阴润目丸临床等效剂量 $D_{兔}=D_{人} \times R_{兔} \div R_{人}=1.738$ g,即兔的临床等效剂量为 $0.869 \text{ g} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 。养阴润目丸低、中、高剂量组分别按剂量 0.435 、 0.869 、 $1.738 \text{ g} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 给予养阴润目丸水溶液灌胃,连续灌胃2周;空白组和模型组予以等体积蒸馏水 $100 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,连续灌胃2周。每天给药时间固定,其他时间正常喂养。

1.4 样本收集及指标检测

在造模前、治疗前、治疗后3个时段,进行SIT、泪膜BUT和角膜荧光素染色评分检测,均由同一组实验人员完成,每次检查时间、地点、环境均一致。末次实验后,局部消毒,耳缘静脉采血并分离血清,

静脉注射空气处死;同时无菌条件下取双侧泪腺及结膜组织,分别置入液氮冻存及2.5%戊二醛中固定标本待检。

1.4.1 SIT测量^[11] 在造模前后,固定各组实验兔后,将两条Schirmer试纸前段5 mm反折于兔双眼下眼睑内侧中、外1/3结膜囊内,5 min后测量滤纸被渗湿的长度,记为SIT长度,测量3次取平均值。

1.4.2 泪膜BUT检测^[11] 固定各组实验兔后,将1滴20%荧光素钠滴入兔结膜囊内,待兔眼睑闭合数次使得荧光素均匀分布后,手动使角膜充分暴露于裂隙灯显微镜钴蓝光下,观察自末次瞬目至泪膜上第一个破裂点出现的时长,记为泪膜BUT时间,记录3次取平均值。

1.4.3 角膜荧光素染色评分检测^[11] 固定各组实验兔后,将1滴20%荧光素钠滴入兔结膜囊内,待兔眼睑数次闭合使得荧光素均匀分布后,用生理盐水冲洗结膜囊,立即在裂隙灯显微镜钴蓝光下观察角膜染色情况,以常用角膜荧光素钠染色评级法^[12]进行分级:未染色为阴性(-),轻度点状染色 <5 点或不超1个象限为轻度(+),点状染色 >5 点但 <30 点或 ≤ 2 个象限为中度(++),染色融合成片,波及3个象限或角膜中央光学区为重度(+++)。4个等级分别按0~3分评分。

1.4.4 电镜观察细胞形态 将2.5%戊二醛固定的兔结膜组织清洗后,用1%锇酸 4°C 固定3 h,梯度丙酮脱水,Epon812环氧树脂与丙酮溶液浸透30 min后 37°C 包埋12 h,半薄切片光镜观察定位后,做超薄切片(50~100 nm),经柠檬酸铅和醋酸铀双重染色后透射电镜观察、拍片。

1.4.5 Western blot检测兔结膜组织中NLRP3、Caspase-1、GSDMD的蛋白表达 取冷冻保存的兔结膜组织50 mg,清洗后放入玻璃匀浆器内,加入蛋白裂解液,制备蛋白质样品并进行蛋白定量,置于 -80°C 冰箱保存备用。取50 μg 蛋白样本预变性,用SDS-PAGE垂直电泳恒压分离,电泳后进行恒压湿性转膜将总蛋白转移至PVDF膜上;加入5%脱脂奶粉溶液室温封闭1~2 h;缓冲液洗膜3次后,加入NLRP3、Caspase-1、GSDMD抗体稀释液(1:1 000), 4°C 孵育过夜;洗膜3次后,加入二抗稀释液(1:5 000),室温孵育1~2 h;洗膜3次后加入ECL化学发光液,显色,曝光压片,观察结果,拍照;用Image J软

件对蛋白条带进行灰度值分析,以 β -actin 为内参,计算目标蛋白的相对表达水平。

1.4.6 ELISA 法检测兔血清中 IL-1 β 、IL-18 的含量

分别将各组实验兔血清标本和标准品加入相应反应孔,37 °C 孵育 60 min;洗板 5~6 次,置于滤纸,轻拍至无残留液体,除空白孔外,样品孔加入一抗工作液后封板,继续孵育 20 min,洗板 5~6 次;所有孔内加入酶标抗体工作液孵育 10 min,洗板 5~6 次;所有孔内加入底物工作液孵育 5 min 后加入终止液,立即在波长为 450 nm 的酶标仪上检测,并绘制曲线,依据吸光值算出血清样本中 IL-1 β 、IL-18 的浓度。

1.5 统计学方法

数据使用 SPSS 22.0 统计软件进行处理。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,对样本先进行方差齐性检验,方差齐时,用 *One-Way ANOVA* 检验,并用 *LSD* 法进行组间的多重比较;方差不齐时,用非参数秩和检验,先用 *Kruskal-Wallis H test* 比较总的差异,再用 *Mann-Whitney U* 进行两组之间的比较。

2 结果

2.1 各组兔 SIT 比较

造模前,各组组间 SIT 差异无统计学意义 ($P>0.05$),符合实验要求。治疗前,与空白组相比,模型兔 SIT 均明显减少 ($P<0.05$),表明造模成功,具有可比性。与治疗前相比,治疗后各剂量组 SIT 明显增高 ($P<0.05$)。治疗后,与空白组相比,模型组 SIT 降低 ($P<0.05$);与模型组相比,各剂量组 SIT 明显增高 ($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 各组造模前、治疗前、治疗后 SIT 变化 ($\bar{x}\pm s$, mm/5 min)

组别	n	造模前	治疗前	治疗后
空白组	16	15.50 \pm 2.89	15.06 \pm 2.87	15.06 \pm 2.30
模型组	16	14.87 \pm 3.03	7.00 \pm 2.68*	7.00 \pm 2.73*
低剂量组	16	15.13 \pm 2.98	7.13 \pm 2.92*	9.31 \pm 2.96 \square
中剂量组	16	14.75 \pm 2.95	6.87 \pm 2.80*	10.81 \pm 2.80 \square
高剂量组	16	15.19 \pm 2.83	7.13 \pm 2.77*	13.18 \pm 2.86 \square

注:与治疗前相比, $\square P<0.05$;与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

2.2 各组兔泪膜 BUT 比较

造模前,各组组间泪膜 BUT 差异无统计学意义 ($P>0.05$),符合实验要求。治疗前,与空白组相比,模型兔泪膜 BUT 均明显减少 ($P<0.05$),表明造模成功,具有可比性。与治疗前相比,治疗后各剂量组泪膜 BUT 明显延长 ($P<0.05$)。治疗后,与空白组相比,

模型组泪膜 BUT 降低 ($P<0.05$);与模型组相比,各剂量组泪膜 BUT 随剂量升高而明显延长 ($P<0.05$),具有剂量依赖性。详见表 2。

表 2 各组造模前、治疗前、治疗后泪膜 BUT 变化 ($\bar{x}\pm s$, s)

组别	n	造模前	治疗前	治疗后
空白组	16	13.75 \pm 2.79	13.62 \pm 2.55	13.56 \pm 2.45
模型组	16	13.18 \pm 2.83	7.00 \pm 2.56*	6.38 \pm 3.07*
低剂量组	16	13.50 \pm 2.78	6.50 \pm 2.78*	8.75 \pm 2.14 \square
中剂量组	16	13.68 \pm 2.86	7.25 \pm 2.21*	10.68 \pm 2.36 \square Δ
高剂量组	16	13.81 \pm 3.14	6.56 \pm 2.71*	12.50 \pm 2.73 \square Δ \blacktriangle

注:与治疗前相比, $\square P<0.05$;与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与低剂量组相比, $\Delta P<0.05$;与中剂量组相比, $\blacktriangle P<0.05$ 。

2.3 各组兔角膜荧光素染色评分比较

造模前,各组兔角膜荧光素染色评分均为阴性,评分为 0 分,符合实验要求。治疗前,与空白组相比,模型组兔角膜荧光素染色评分增多 ($P<0.05$),表明造模成功。与治疗前相比,治疗后中、高剂量组兔角膜荧光素染色评分不同程度降低 ($P<0.05$)。治疗后,与空白组相比,模型组兔角膜荧光素染色评分增多 ($P<0.05$);与模型组相比,中、高剂量组兔角膜荧光素染色评分不同程度降低 ($P<0.05$)。详见表 3。

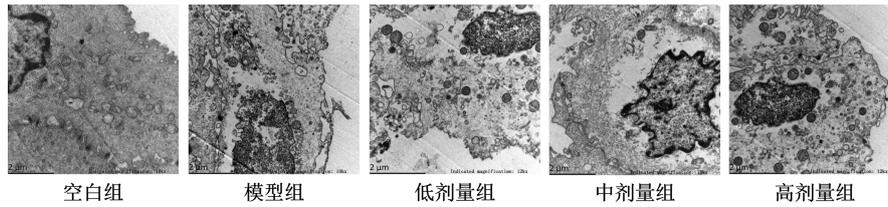
表 3 各组治疗前后角膜荧光素染色评分分级比较 (例, $n=16$)

组别	时间	-	+	++	+++	评分
空白组	治疗前	16	0	0	0	-
	治疗后	16	0	0	0	-
模型组	治疗前	1	3	10	2	1.81 \pm 0.75*
	治疗后	2	2	11	1	1.69 \pm 0.79*
低剂量组	治疗前	1	4	10	1	1.69 \pm 0.70
	治疗后	1	10	4	1	1.31 \pm 0.70
中剂量组	治疗前	1	3	10	2	1.81 \pm 0.75
	治疗后	2	12	2	0	1.00 \pm 0.52 \square
高剂量组	治疗前	1	3	10	2	1.81 \pm 0.75
	治疗后	4	10	2	0	0.88 \pm 0.62 \square

注:与治疗前相比, $\square P<0.05$;与空白组相比,* $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

2.4 各组兔结膜组织细胞超微结构观察

治疗 2 周后,透射电镜结果显示:空白组见整齐排列的结膜上皮,桥粒连接紧密,细胞膜完整,可见丰富的微绒毛和微皱襞结构,细胞质内细胞器完整;细胞核扁平。模型组、低剂量组、中剂量组结膜上皮细胞可见不同程度肿胀、变形、破裂,桥粒连接不紧

图 1 各组细胞透射电镜观察图($\times 2000$)

密,微绒毛和微皱襞结构减少,细胞膜出现破裂、内陷、皱缩,细胞核缩小,染色质边聚或断裂,细胞器肿胀或丢失,部分细胞可见自噬体。高剂量组大多数细胞形态较好,桥粒连接较空白组疏松,少数可见细胞膜孔洞,微绒毛肿胀,细胞内少数细胞出现肿胀、变形、破裂。详见图 1。

2.5 各组兔结膜组织中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白相对表达量的比较

治疗 2 周后,与空白组相比,模型组结膜组织中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$);与模型组相比,低剂量组 NLRP3、GSDMD 蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$),中、高剂量组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$);与低剂量组相比,中、高剂量组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$);与中剂量组相比,高剂量组 Caspase-1、GSDMD 蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$)。详见表 4、图 2。

表 4 各组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NLRP3/ β -actin	Caspase-1/ β -actin	GSDMD/ β -actin
空白组	8	0.23 \pm 0.02	0.47 \pm 0.02	0.25 \pm 0.03
模型组	8	0.66 \pm 0.07*	0.94 \pm 0.07*	0.46 \pm 0.05*
低剂量组	8	0.48 \pm 0.03 [#]	0.92 \pm 0.06	0.37 \pm 0.03 [#]
中剂量组	8	0.37 \pm 0.03 ^{#Δ}	0.70 \pm 0.04 ^{#Δ}	0.22 \pm 0.02 ^{#Δ}
高剂量组	8	0.34 \pm 0.02 ^{#Δ}	0.38 \pm 0.04 ^{#Δ}	0.19 \pm 0.01 ^{#Δ}

注:与空白组相比,* $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与低剂量组相比, Δ $P<0.05$;与中剂量组相比, \blacktriangle $P<0.05$ 。

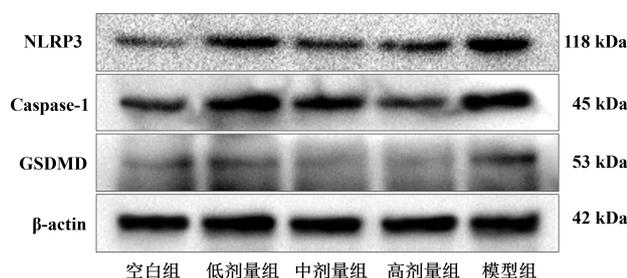


图 2 各组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白条带图

2.6 各组兔血清中 IL-1 β 、IL-18 含量的比较

治疗 2 周后,与空白组相比,模型组 IL-1 β 和 IL-18 的含量明显增多($P<0.05$)。与模型组相比,各剂量组 IL-1 β 和 IL-18 的含量明显减少($P<0.05$)。详见表 5。

表 5 治疗后各组兔血清中 IL-1 β 、IL-18 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1 β /(pg/mL)	IL-18/(pg/mL)
空白组	8	84.26 \pm 9.26	184.65 \pm 15.76
模型组	8	130.22 \pm 13.85*	245.53 \pm 23.48*
低剂量组	8	116.35 \pm 8.27	226.43 \pm 21.01
中剂量组	8	101.94 \pm 5.09 [#]	204.93 \pm 10.11 [#]
高剂量组	8	96.69 \pm 11.42 [#]	198.19 \pm 3.08 [#]

注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.01$ 。

3 讨论

干眼是一种与眼表炎症相关的多因素疾病。目前,对于干眼治疗以补充人工泪液和局部抗炎为主,这些药物可以缓解部分患者的症状,但效果难以维持。对于一些重度干眼患者,常规治疗效果不佳。因此,寻找治疗干眼的新方法、新药物具有重要的临床意义^[13]。养阴润目丸以《重楼秘钥》中的养阴清肺汤为基础化裁加减而来,以生地黄、枸杞子、当归为君药,滋阴养血,补养肝肾;臣药沙参和石斛滋阴清热生津、白芍柔肝敛阴、黄精益气滋阴;牡丹皮、菊花和黄芪为佐药,平肝清热生津;甘草调和诸药。全方滋补肝肾、清热润肺、生津润目,用于治疗干眼临床效果显著^[7-8]。本研究结果表明,苯扎氯铵诱导兔干眼模型后,动物表现出典型的干眼症状:泪液分泌量减少,泪膜破裂,结膜上皮细胞病理性损伤,血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-18 含量增多。经养阴润目丸干预后,干眼兔的泪液分泌量明显增多,泪膜 BUT 时间延迟,血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-18 含量明显减少,结膜上皮细胞病理损伤明显缓解。

细胞焦亡是一种程序性细胞死亡,以细胞不断肿胀大直至细胞膜破裂,导致细胞内容物的释放进而激活强烈的炎症反应。细胞焦亡可分为两种途径^[14]:

依赖 Caspase-1 的经典途径和依赖 Caspase-4/5/11 的非经典途径,其中依赖 Caspase-1 的细胞焦亡研究更为广泛。当机体细胞受到刺激时,NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和 Caspase-1 组合,激活 NLRP3 炎症小体复合物的形成,导致 Caspase-1 裂解活化,活化的 Caspase-1 将 IL-1 β 和 IL-18 前体分别裂解为成熟的 IL-1 β 和 IL-18^[15-16]。此外,活化的 Caspase-1 通过切割 GSDMD 得到 GSDMD 的 N 端结构片段。活化的 GSDMD 易位到细胞膜,与内膜脂质结合,最终形成膜孔,导致细胞内 IL-1 β 和 IL-18 的释放,并导致促炎反应^[17]。通过激活 Caspase-1 来促进 IL-1 β 和 IL-18 的释放是细胞焦亡和促炎反应的必要环节,在细胞焦亡过程中发挥着重要作用。YU 等^[18]发现,老年性白内障患者的晶状体中,Caspase-1、IL-1 β 的 mRNA 和蛋白表达明显高于正常人群,在晶状体上皮细胞中加入 Caspase-1 抑制剂后可显著抑制 Caspase-1 和 IL-1 β 的 mRNA 转录和蛋白表达水平。这些研究表明,当眼表组织出现炎症因子激活与释放时,将发生炎症反应,因此,通过干预 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的表达及 IL-1 β 、IL-18 水平,抑制细胞焦亡,就有可能阻断相关级联反应。本研究发现,苯扎氯铵诱导兔干眼模型后,兔结膜上皮细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的蛋白表达明显升高,血清中 IL-1 β 、IL-18 含量明显增多,兔结膜上皮细胞超微结构可见明显肿胀、变形、破裂、皱缩等细胞病理性损伤。养阴润目丸干预后,能有效抑制兔结膜上皮细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的蛋白表达,减少 IL-1 β 、IL-18 分泌,缓解结膜上皮细胞病理损伤。

综上所述,养阴润目丸可以通过降低干眼兔结膜上皮细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达,抑制结膜上皮细胞发生焦亡,减少炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-18 分泌,从而阻断相关级联反应,起到增加泪液分泌量、延长泪膜破裂时间等作用,最终治疗苯扎氯铵诱导的干眼,但其有效成分及作用机制还需进一步探讨。

参考文献

- [1] 亚洲干眼协会中国分会, 海峡两岸医药卫生交流协会眼科学专业委员会眼表与泪液病学组, 中国医师协会眼科医师分会眼表与干眼学组. 中国干眼专家共识:定义和分类(2020年)[J]. 中华眼科杂志, 2020, 56(6): 418-422.
- [2] HAKIM F E, FAROOQ A V. Dry eye disease: An update in 2022[J]. JAMA, 2022, 327(5): 478-479.
- [3] 邢悦, 张晓梅. 干眼病因的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(18): 49-54.
- [4] 高芳. 干眼流行病学调查及相关危险因素分析[J]. 山西中医药大学学报, 2020, 21(5): 367-369, 373.
- [5] 黄勤竹, 陈如, 周洁, 等. 中国 18 岁以下青少年干眼患病率 meta 分析[J]. 世界临床药物, 2022, 43(4): 449-453.
- [6] 程验, 刘焱焱, 魏苗, 等. 泪液渗透压在干眼发病机制中的作用及诊疗进展[J]. 国际眼科杂志, 2023, 23(1): 84-89.
- [7] 李点, 金灿, 张湘晖, 等. 养阴润目丸治疗干眼的临床研究[J]. 中医药导报, 2018, 24(14): 66-68.
- [8] 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.
- [9] 王双勇, 田英, 程燕, 等. 不同浓度玻璃酸钠对新西兰兔干眼眼表变化的影响[J]. 国际眼科杂志, 2015, 15(10): 1705-1708.
- [10] 陈主初, 吴端生. 实验动物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2011: 183-186.
- [11] 吕佳. 养阴润目丸对干眼模型大鼠结膜上皮细胞中 Caspase-3、6 的表达及细胞凋亡的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
- [12] 王婷婷, 黄巧红, 林鑫鑫, 等. 不同单次剂量中波紫外线照射对大鼠角膜的影响[J]. 中国医学物理学杂志, 2023, 40(4): 473-479.
- [13] 吕怡, 刘培, 蒋鹏飞, 等. 干眼所致疼痛的中医病机分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(10): 1551-1554.
- [14] ZHANG J, WIRTZ S. Does pyroptosis play a role in inflammatory-related disorders? [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18): 10453.
- [15] XIN X, YANG K, LIU H, et al. Hypobaric hypoxia triggers pyroptosis in the retina via NLRP3 inflammasome activation[J]. Apoptosis, 2022, 27(3-4): 222-232.
- [16] 廉艺童, 刘志敏, 聂辅娇, 等. 益肝明目汤对糖尿病视网膜水肿模型大鼠 NLRP3/Caspase-1 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(3): 421-429.
- [17] 汪蒙蒙, 韩岚, 刘竹青, 等. 细胞凋亡、细胞焦亡、坏死性凋亡异同与交互[J]. 生命的化学, 2020, 40(11): 1932-1940.
- [18] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 128.

(本文编辑 周旦)