

·实验研究·

本文引用: 朱冰瑶, 曾令聪, 刘倩宏, 李江伟, 吴 凯, 陈 雄, 彭清华, 姚小磊. 除风益损汤对兔角膜损伤后瘢痕形成及 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 1942-1950.

除风益损汤对兔角膜损伤后瘢痕形成及 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白表达的影响

朱冰瑶^{1,2,4,5}, 曾令聪^{1,3,4}, 刘倩宏⁴, 李江伟⁴, 吴 凯⁴, 陈 雄⁴, 彭清华⁴, 姚小磊^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 深圳市中西医结合医院, 广东 深圳 518104; 3. 郴州市中医院, 湖南 郴州 423000; 4. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 5. 广州中医药大学深圳中西医结合临床医学院, 广东 深圳 518104

[摘要] **目的** 探讨除风益损汤对兔角膜损伤后瘢痕形成及转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、果蝇母本抗生存因子蛋白 3(small mothers against decapentaplegic 3, Smad3)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)蛋白表达的影响。**方法** 取健康月龄新西兰兔 48 只, 按随机数字法将其分成 4 组, 每组 12 只, 设为空白组、模型组、除风益损汤组(以下简称中药组)、重组牛碱性成纤维细胞生长因子滴眼组(以下简称贝复舒组); 中药组予除风益损汤灌胃, 1 次/d, 空白组、模型组、贝复舒组予等体积生理盐水灌胃, 1 次/d, 贝复舒组予重组牛碱性成纤维细胞生长因子滴眼液滴眼, 3 次/d; 建模后各组于 7、14、28 d 在高倍显微镜下观察角膜损伤修复情况, 共聚焦激光断层扫描观察角膜细胞, Masson 染色观察角膜组织病理改变, Western blot 检测角膜组织中 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白表达。**结果** 眼前节拍照: 可见兔角膜 7、14、28 d 时中药组、贝复舒组角膜损伤面积较模型组角膜损伤面积明显减小。共聚焦激光断层扫描角膜浅层细胞: 在建模后 28 d, 模型组呈现出大量瘢痕组织, 同时存在肌成纤维细胞; 中药组和贝复舒组可见成纤维细胞及角膜基质细胞, 以及极少量瘢痕组织。角膜混浊度分级: 与空白组比较, 模型组在建模后 7、14、28 d 的角膜混浊度分级均明显升高($P<0.01$), 呈时间相关性, 但 28 d 时模型组的角膜混浊度分级出现回落, 与模型组相比, 中药组和贝复舒组在建模后 7、14、28 d 的角膜混浊度分级均明显降低($P<0.01$), 且呈时间相关性($P<0.01$)。Masson 切片染色: 在建模后 28 d, 空白组可见角膜上皮整齐连续排列, 基质层纤维排列整齐, 染色致密, 厚度均一; 模型组伤口处角膜上皮细胞不连续分布, 且角膜前部基质浅蓝色胶原纤维排列紊乱, 呈不连续状态, 厚度不一, 角膜后部基质浅蓝色胶原纤维排列较混乱, 呈紊乱纤维束; 中药组可见角膜前部基质浅蓝色胶原纤维较模型组排列有序, 稍疏松, 呈连续状态, 角膜后部基质浅蓝色胶原纤维排列有序; 贝复舒组见角膜前部基质浅蓝色胶原纤维较模型组排列有序, 稍疏松, 呈连续状态, 仍存在纤维束, 角膜后部基质浅蓝色胶原纤维排列有序。Western blot 检测: 与模型组比较, 中药组、贝复舒组的角膜组织中 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白表达在 7、14、28 d 时均显著降低($P<0.05$)。**结论** 除风益损汤能促进角膜损伤修复, 抑制角膜瘢痕化, 并对 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白产生影响。

[关键词] 除风益损汤; 角膜瘢痕化; 角膜修复; 转化生长因子- β 1; 果蝇母本抗生存因子蛋白 3; α -平滑肌肌动蛋白

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.002

Effects of Chufeng Yisun Decoction on scar formation and protein expressions of TGF- β 1, Smad3, and α -SMA in rabbits after corneal injury

ZHU Bingyao^{1,2,4,5}, ZENG Lingcong^{1,3,4}, LIU Qianhong⁴, LI Jiangwei⁴, WU Kai⁴, CHEN Xiong⁴,
PENG Qinghua⁴, YAO Xiaolei^{1*}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Shenzhen Hospital of

[收稿日期] 2024-05-18

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174443、81860870); 湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30527); 湖南省卫生健康委员会高层次人才计划(2022 年); 湖南省中医药科研计划项目(2021023); 湖南中医药大学一流学科开放基金项目(2021ZYX05)。

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

Integrated Chinese and Western Medicine, Shenzhen, Guangdong 518104, China; 3. Chenzhou Municipal Hospital of TCM, Chenzhou, Hunan 423000, China; 4. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 5. Shenzhen Clinical School of Integrated Chinese and Western Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518104, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of Chufeng Yisun Decoction (CFYSD) on scar formation and protein expressions of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), small mothers against decapentaplegic 3 (Smad3), and α -smooth muscle actin (α -SMA) after corneal injury in rabbits. **Methods** Forty-eight healthy New Zealand rabbits of the same age were divided into four groups using the random number method, namely blank group, model group, CFYSD group, and eye drop group with recombinant bovine basic fibroblast growth factor (hereinafter referred to as the "Beifushu group"), with 12 rabbits in each group. CFYSD group was given adult equivalent dose of CFYSD via gavage once a day, while blank, model, and Befushu groups were given the same volume of normal saline via gavage once a day; additionally, Befushu group was administered with eye drops containing recombinant bovine basic fibroblast growth factor three times a day. At 7, 14, and 28 days after modeling, corneal injury and repair were observed under a high-power microscope, corneal cells were examined by confocal laser tomography, pathological changes of corneal tissue were observed by Masson staining, and the protein expressions of TGF- β 1, Smad3, and α -SMA in corneal tissue were determined by Western blot. **Results** Photographs of the anterior segment showed that at 7, 14, and 28 days after modeling, the corneal lesion area in CFYSD and Befushu groups was significantly smaller than that in model group. Confocal laser tomography of superficial corneal cells revealed that at 28 days after modeling, model group exhibited a large amount of scar tissue, along with the presence of myofibroblasts. In contrast, CFYSD and Befushu groups showed fibroblasts and corneal stromal cells, with only minimal scar tissue present. Corneal opacity grading showed that compared with blank group, the corneal opacity grade of model group significantly increased at 7, 14, and 28 days after modeling ($P < 0.01$), showing a time-dependent correlation; however, it then fell at 28 days, which may be due to the self-healing ability of rabbit cornea. Compared with model group, the corneal opacity grades of CFYSD and Befushu groups were significantly reduced at 7, 14, and 28 days after modeling ($P < 0.01$), and the reduction trend increased over time, showing a time-dependent correlation ($P < 0.01$). Masson staining revealed that at 28 days after modeling, blank group showed neatly and continuously arranged corneal epithelium and orderly aligned stromal fibers, with uniform thickness and dense staining. In model group, the corneal epithelial cells in the lesion were distributed discontinuously; the light blue-stained collagen fibers in the anterior corneal stroma were disordered and discontinuous with uneven thickness, and those in the posterior stroma were also arranged in a chaotic manner, appearing as disordered fiber bundles. Compared with model group, the light blue-stained collagen fibers in the anterior stroma in CFYSD group were more orderly and slightly looser, appearing continuous, and those in the posterior stroma were also arranged orderly. Compared with model group, the light blue-stained collagen fibers in the anterior stroma in Befushu group were more orderly, slightly looser, and continuous, with fiber bundles still present, and those in the posterior stroma were also arranged orderly. Western blot showed that at 7, 14, and 28 days after modeling, the protein expression of α -SMA in the corneal tissue was the highest in model group, while it was significantly lower in CFYSD and Befushu groups than that in model group ($P < 0.05$); similarly, the protein expressions of TGF- β 1 and Smad3 were also the highest in model group at these time points, while they were significantly lower in CFYSD and Befushu groups than those in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** CFYSD can promote the repair of corneal injury, inhibit corneal scarring, and exert effects on TGF- β 1, Smad3, and α -SMA protein expressions.

[Keywords] Chufeng Yisun Decoction; corneal scarring; corneal repair; transforming growth factor- β 1; small mothers against decapentaplegic 3; α -smooth muscle actin

角膜具有保护眼球的作用,是位于眼球前壁无血管透明组织,其透明性主要由细胞外基质中的胶原纤维有序排列所维持^[1]。角膜常因外伤或有害因素导致角膜损伤,随后机体将产生正常的生理反应即

角膜损伤修复来维持角膜的生理功能。角膜损伤修复延迟有可能导致角膜瘢痕化,对视力产生重大影响,严重者可致失明^[2-3]。这主要是由于角膜基质的纤维化造成的,肌成纤维细胞的产生和持续存在是角膜

基质纤维化的重要因素^[4]。转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 是一种作用广泛的细胞因子, 它的激活启动了胶原纤维积累的程序, 其信号的失调与组织纤维化密切相关^[5], 对角膜组织损伤修复非常重要。TGF- $\beta 1$ 能刺激成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 肌成纤维细胞能合成和分泌的 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA), 能促进伤口修复, 加重瘢痕化的产生^[6]。果蝇母本抗生存因子蛋白 3 (small mothers against decapentaplegic 3, Smad3) 是 TGF- β 信号转导的重要介质, 将细胞外 TGF- β 信号经胞质传导到细胞核内的重要中介, 该传导通路的活跃程度与瘢痕化亦密切相关^[7]。

角膜损伤修复中所生瘢痕类似于中医学之“翳证”。翳有广义和狭义之分, 狭义的翳专指角膜(黑睛)上的混浊, 广义的翳则包括眼内各组织的混浊性病变^[8]。由于黑睛受损后, 常以翳障的形式表现出来, 所以临床上所说的“翳”多指其狭义, 即角膜混浊。翳又分新翳和老翳。新翳表现为黑睛广泛混浊、表面粗糙、边缘模糊, 具有向周围和深部组织发展的趋势, 并伴有不同程度白睛混赤、畏光流泪、疼痛难睁等症状, 类似于角膜炎症性混浊^[9]。老翳即宿翳, 常表现为表面光滑、边缘清楚, 无发展趋势, 类似西医角膜溃疡愈合后形成的瘢痕, 可分为角膜云翳、角膜斑翳及角膜白斑^[10]。《原机启微·风热不治之病》谓“翳犹疮也”, 认为翳之所生, 多因“风热不制”及“七情五贼劳役饥饱”所致^[11]。除风益损汤出自《原机启微》, 具有疏风清热、养血活血之功效。多项研究表明, 除风益损汤能减少眼外伤后角膜炎症的产生及促进角膜组织的愈合, 同时对减轻术后角膜水肿也有较好的疗效^[12-14]。

有研究报道, 中医药对治疗角膜瘢痕有较好的疗效, 但对中医药治疗角膜瘢痕的具体作用途径及相关机制的研究不多, 亦不够深入^[15-16]。因此, 本研究基于临床疗效及文献阅读的基础之上, 通过建立兔角膜损伤模型, 进行动物实验, 探讨除风益损汤对角膜损伤修复后瘢痕化及其相关因子 TGF- $\beta 1$ 、Smad3、 α -SMA 的影响; 为中医药治疗本病的方药选择提供理论支持, 为同类研究提供技术借鉴。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康月龄雄性普通级纯种新西兰白兔 48 只, 体重 1.8~2.5 kg, 由湖南中医药大学实验动物中心统

一购买, 实验兔均无角膜疾病, 在普通级动物房饲养, 饲养温度为 22~26 °C, 湿度为 42%~70%。所有实验动物经湖南中医药大学动物实验管理与福利伦理委员会批准(审批号: LL20210921001)。

1.2 实验药物

除风益损汤组成: 熟地黄 3 g, 当归 3 g, 白芍 3 g, 川芎 3 g, 藁本 2.1 g, 前胡 2.1 g, 防风 2.1 g。药物购自湖南中医药大学第一附属医院, 产地四川新绿色药业科技发展有限公司, 该药为颗粒剂, 根据每次实验用量, 分袋密封包装, 室温条件下储存。重组牛碱成纤维细胞生长因子滴眼液(株海亿胜生物制药有限公司, 批号: XY0637); 盐酸左氧氟沙星眼用凝胶(湖北远大天天明制药有限公司, 批号: XY3595)。

1.3 主要试剂

二甲苯、无水乙醇、95%乙醇(西陇科学股份有限公司, 批号: 33535、32061、32061); Masson 三色染色液(塞尔维生物, 批号: G1006); 中性树脂胶(康为世纪, 批号: CW0136); cocktail(上海源叶有限公司, 批号: 10557); 脱脂奶粉(伊利, 批号: 66196131T); TEMED、Trise-Base、溴酚蓝、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、PMSF(美国 Amresco 公司, 批号: Amresco00761、Exp2017/12、B0449-5G、Exp2016109、Amresco00172、329-98-6); Hcl(信阳市化学试剂厂, 批号: GB622-89); SDS、甘油、甲醇、NaCl、KCl、Na₂HPO₄·12H₂O、KH₂PO₄(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 30166428、10010618、10014118、10016318、10020318、10017618、10019718); 甘氨酸、三硫叔糖醇(DTT)、Tris-base、Glycine(兰杰柯, 批号: Exp2017106、Amresco0281、BS083、BL603B); 蛋白 marker(北京全氏金生物技术有限公司, 批号: DM111); PVDF 膜(0.45 μ m)(密理博, 批号: IPVH00010); ECL 底物液(赛默飞, 批号: NCI5079); 戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司, 批号: P3761); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(碧云天, 批号: P0010S); α -SMA、Smad3 (Affinity, 批号: AF1032、AF6362); TGF- β (proteintech, 批号: 21898-1-AP); 荧光素钠(广西梧州制药股份有限公司, 批号: XY7321); 眼球固定液(武汉卡诺斯科技有限公司, 批号: R30102)。

1.4 主要仪器

组织脱水机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司, 型号: KD-TS3S1); 石蜡包埋机(德国 Leica, 型号: HistoCore Arcadia); 摊片机(德国 Leica HI1210, 型号: Leica); 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司, 型号: HGZF-101-1); 显微镜(日本

OLYMPUS,型号: CX43);电泳仪(上海 Tanon,型号: EPS300);水平摇床(ORBITAL,型号: SHAKER TS-1000);pH 计(德国 Metter-Toledo GmbH 公司,型号: LP115);电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司,型号: CPA);磁力搅拌器(江苏省金坛市中大仪器厂,型号: T8-1);酶标仪(赛默飞,型号: muLISKAN-MK3);月形隧道刀头(宿迁天工医疗,型号: 2.8 mm 月形刀);共焦激光断层扫描仪(德国 Heidelberg Engineering GmbH,型号: HRT3);7×-50×倍三目显微镜(深圳市海约电子有限公司,型号: HY-0750A);4800 万像素高清相机(深圳市海约电子有限公司,型号: HY-0750A);角膜环钻(淮安中林东晟医疗器械有限公司,型号: 直径 6 mm)。

1.5 实验方法

1.5.1 实验造模 根据所查阅的文献及临床基础,参照 CONNON 及王丽等^[17-18]的方法,对造模方法稍作改良,予 48 只健康月龄雄性新西兰兔,体质量 1.8~2.5 kg,适应性喂养 1 周后,空白组不做处理,将模型组、中药组、贝复舒组置于固定箱中固定,使用 10%戊巴比妥钠(1.5~4 mL/kg)缓慢推入耳缘静脉进行全身麻醉,观察实验兔意识,待双眼瞬目反射消失后,将实验兔用手术孔巾包裹置于手术台上,并滴用 0.4%盐酸奥布卡因进行眼部表面麻醉,用直径为 6 mm 角膜环钻在角膜中央进行旋转按压,在角膜上留下一直径为 6 mm 左右的圆形印记,并按照印记使用 2.8 mm 的月形隧道刀进行角模板层分离,剔除 100~150 μm 厚度角膜表层,且不穿通角膜,形成一直径 6 mm 左右,深 100~150 μm 的角膜损伤区,术后角膜损伤模型兔均以盐酸左氧氟沙星眼用凝胶滴眼进行术后预防感染,角膜情况均符合条件后进行后续实验。

1.5.2 实验分组 采用随机数字表法将普通雄性新西兰兔分为空白组、模型组、除风益损汤组(中药组)、重组牛碱成纤维细胞生长因子滴眼组(贝复舒组),共 4 组,每组 12 只。

1.5.3 动物给药 中药组予除风益损汤溶液灌胃,用生理盐水配制成 0.1 g/mL 除风益损汤溶剂。根据人与动物体表面积折算,人用剂量 50 mL/d,计算出兔等效剂量为 0.304 g/(kg·d),实验兔每日服用约 5 mL。贝复舒组予重组牛碱成纤维细胞生长因子滴眼液滴双眼,3 次/d;空白组、模型组、贝复舒组均以等剂量生理盐水常规喂养。

1.6 动物处理及指标检测

分别在空白组、模型组、中药组、贝复舒组 7、14、28 d 时取 4 只实验兔以空气栓塞处死,即刻摘除双眼球,其中 4 只眼球放入试管保存于-80 ℃冰箱用于蛋白检测,剩余 4 只眼球放入眼球固定液固定用于制备病理切片。

1.6.1 眼前节拍照及角膜上皮荧光素染色观察角膜损伤修复情况 造模成功后 7、14、28 d 分别在高倍显微镜下对兔角膜进行直接拍照以观察实验兔角膜损伤修复情况;使用质量分数为 2%的荧光素钠溶液滴眼进行角膜染色,在高倍显微镜下使用钴蓝光灯照射进行拍照,观察角膜上皮损伤修复情况。

1.6.2 共聚焦激光断层扫描观察角膜细胞 将 4 组新西兰兔分别在 7、14、28 d 予共聚焦激光断层扫描仪检查,予以奥布卡因滴眼液进行双眼表面麻醉 3 次,用左氧氟沙星凝胶滴于共聚焦激光头表面,并盖上无菌接触帽;固定实验兔眼,使其贴近于共聚焦激光断层扫描仪的激光头,观察并采集角膜细胞图像。

1.6.3 角膜混浊分级评估角膜瘢痕程度 在造模 7、14、28 d 后,使用盲法,在裂隙灯显微镜观察下对 4 组实验兔进行兔角膜混浊程度的临床评分,临床评分标准参考文献[19],评分细则及具体标准见表 1。

表 1 角膜混浊评分标准
Table 1 Scoring criteria for Corneal Opacity

评分/分	角膜混浊程度
0	角膜完全清晰无混浊
0.5	在裂隙灯生物显微镜下可以倾斜照射可见细微轻度混浊
1	角膜混浊明显,但不会影响观察虹膜的细微结构
2	角膜足够混浊造成虹膜的细微结构不能辨认
3	角膜中度混浊遮挡虹膜及晶状体结构
4	角膜完全混浊

1.6.4 Masson 染色观察角膜组织病理结构变化 将已固定好的角膜组织经脱水、透明、包埋、切片。将切片浸入 Masson A 液中室温浸泡过夜,再将切片浸泡于 Masson A 液内于 65 ℃烤箱内孵育 30 min,自来水洗 30 s,同时将 Masson D 液及 Masson F 液放于 65 ℃烤箱内预热。将 Masson B 液与 Masson C 液等体积混合,切片入混合液内浸染 1 min,流水稍洗。将切片经 1%盐酸乙醇分化 1 min 左右,自来水稍洗,将切片入 Masson D 液浸染 6 min,观察组织呈现亮红色。将切片稍微沥干水分后放入 Mas-

son E 液浸泡约 1 min。观察到胶原纤维呈浅红色,纤维呈红色即可。切片稍微沥干 Masson E 液后,不经水洗,直接入 Masson F 液染色。切片经连续三缸无水乙醇依次脱水,最后经两缸二甲苯透明,中性树脂胶封片,最后显微镜下进行拍照记录。

1.6.5 Western blot 检测角膜组织中 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 相对蛋白表达情况 准备 1×TBST, 10×电泳缓冲液, 10×电转缓冲液, 5%牛奶封闭液, 用 RIPA 强裂解液稀释 PMSF, 配制裂解液; 取角膜组织, PBS 洗涤后用 RIPA 裂解液进行匀浆, BCA 法测定蛋白浓度; 提取上样量, 按照要求配制分离胶与浓缩胶后完成电泳。接着将蛋白条带与 PVDF 膜及滤纸一同放入转膜缓冲液完成转膜, 用含 5%脱脂奶粉的 TBST(封闭液)浸泡 PVDF 膜, 室温摇床封闭 2 h。稀释相应的一抗, 使 PVDF 膜浸泡于一抗 α -SMA(Affinity, AF1032, 1:1 000)、TGF- β (proteintech, 21898-1-AP, 1:2 000)、Smad3(Affinity, AF6362, 1:1 000)孵育液中, 4℃孵育过夜。用封闭液稀释 HRP 标记二抗 1:1 000 稀释, TBST 充分洗涤 PVDF 膜, 5 min/次 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中, 37℃摇床孵育 2 h。制备 AB 液, 加入 AB 混合液, 用化学发光成像系统曝光 30/60 s, 观察结果并保存图片。

1.7 统计学方法

实验数据采用 SPSS 25.0 软件分析, 计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 多组间定量资料或数值变量资料比较符合正态性及方差齐性则采用单因素方差分析及多重比较; 不满足正态性及方差齐性则采用 *Kruskal-Wallis H* 检验, 两两比较。均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计图使用 GraphPad Prism 8 绘制。

2 结果

2.1 眼前节拍照观察角膜损伤修复情况

在造模后 7 d 时, 模型组与空白组相比角膜表面不平整, 白色光环及虹膜未能清晰显现; 中药组与模型组相比, 角膜表面均不平整, 白色光环及虹膜均未能清晰显现; 贝复舒组与中药组相比, 角膜表面均不平整, 白色光环及虹膜均未能清晰显现; 模型组、中药组、贝复舒组兔角膜均存在大面积荧光素着染。在造模后 14 d 时, 模型组与空白组相比角膜表面不平整, 白色光环及虹膜未能清晰显现; 中药组与模型组相比, 角膜表面稍平整, 白色光环及虹

膜均能更清晰显现; 贝复舒组与中药组相比, 角膜表面均仍有不平整, 白色光环及虹膜均未能清晰显现; 中药组、贝复舒组与模型组相比, 兔角膜荧光素着染减少。在造模后 28 d 时, 模型组与空白组相比角膜表面不平整, 白色光环及虹膜未能清晰显现; 中药组与模型组相比, 角膜表面更平整, 白色光环及虹膜均能更清晰显现; 贝复舒组与中药组相比, 角膜表面均仍稍有不平整, 白色光环及虹膜均能较清晰显现; 模型组仍存在小范围兔角膜荧光素着染, 中药组、贝复舒组未出现兔角膜荧光素着染。模型组、中药组、贝复舒组随着时间的推移, 在造模后 7、14、28 d 时, 模型组其角膜表面仍不平整, 白色光环及虹膜均不能清晰显现, 兔角膜荧光素染色逐渐减少; 中药组、贝复舒组其角膜表面均趋于平整, 白色光环及虹膜均趋于清晰显现, 并在造模后 28 d 时未出现兔角膜荧光素染色。详见图 1。

2.2 共聚焦激光断层扫描角膜浅层基质细胞

在造模后 7 d 时, 模型组、中药组、贝复舒组均见大量细长状成纤维细胞(fibroblast)及炎性细胞。在造模后 14 d 时, 模型组与空白组相比, 存在大量成纤维细胞和炎性细胞, 同时出现磨砂样、不透明瘢痕组织; 中药组与模型组相比, 可见成纤维细胞和炎性细胞减少, 并可见少量角膜基质细胞, 同时出现少量磨砂样、不透明瘢痕组织; 贝复舒组与中药组相比, 均可见成纤维细胞和炎性细胞, 并可见少量角膜基质细胞, 同时出现少量磨砂样、不透明瘢痕组织。在造模后 28 d 时, 模型组与空白组相比, 呈现出大量瘢痕组织, 同时存在肌成纤维细胞(myofibroblast), 隐约透见零星角膜基质细胞; 中药组与模型组相比, 可见成纤维细胞及角膜基质细胞, 以及极少量瘢痕组织; 贝复舒组与中药组相比, 均可见成纤维细胞及角膜基质细胞, 以及极少量瘢痕组织。详见图 2。

2.3 不同时间点兔角膜混浊分级

与空白组比较, 模型组在造模后 7、14、28 d 的角膜混浊分级均明显升高($P < 0.01$), 但 28 d 时模型组的角膜混浊分级出现回落, 这可能是由于兔角膜的自愈能力导致的; 与模型组相比, 中药组和贝复舒组在造模后 7、14、28 d 的角膜混浊分级均明显降低($P < 0.01$), 且降低趋势随时间而增大, 具有时间相关性($P < 0.01$)。详见表 2。

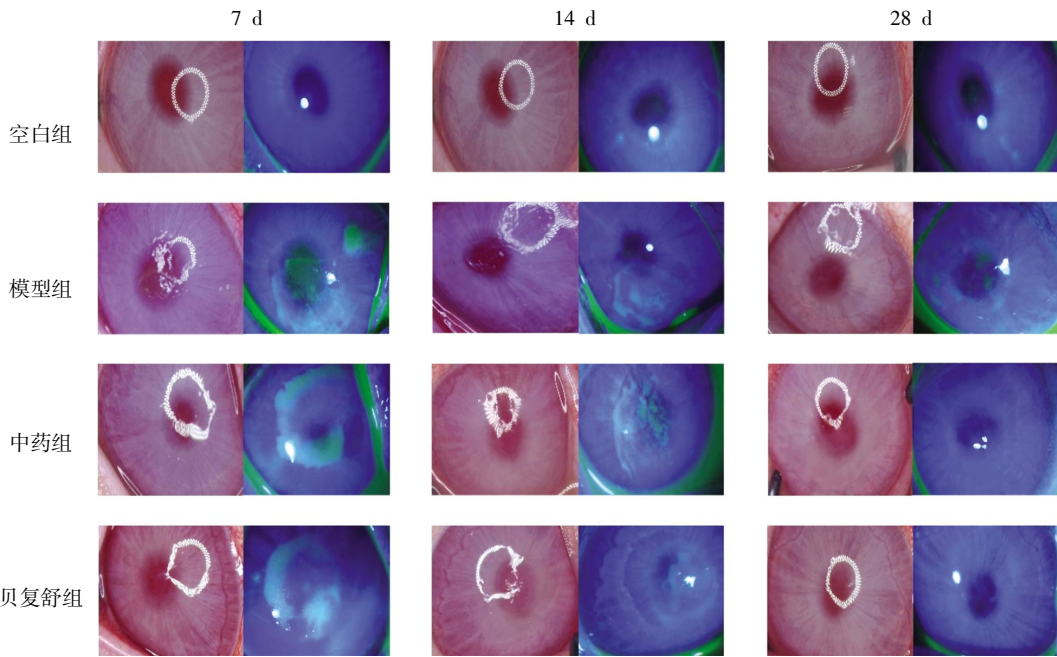


图 1 造模后 7、14、28 d 各组兔角膜眼前节照片及 2%角膜荧光素染色照片($\times 1.5$)

Fig.1 Photographs of the anterior segments of the rabbit corneas and their 2% corneal fluorescein staining at 7, 14, and 28 days ($\times 1.5$)

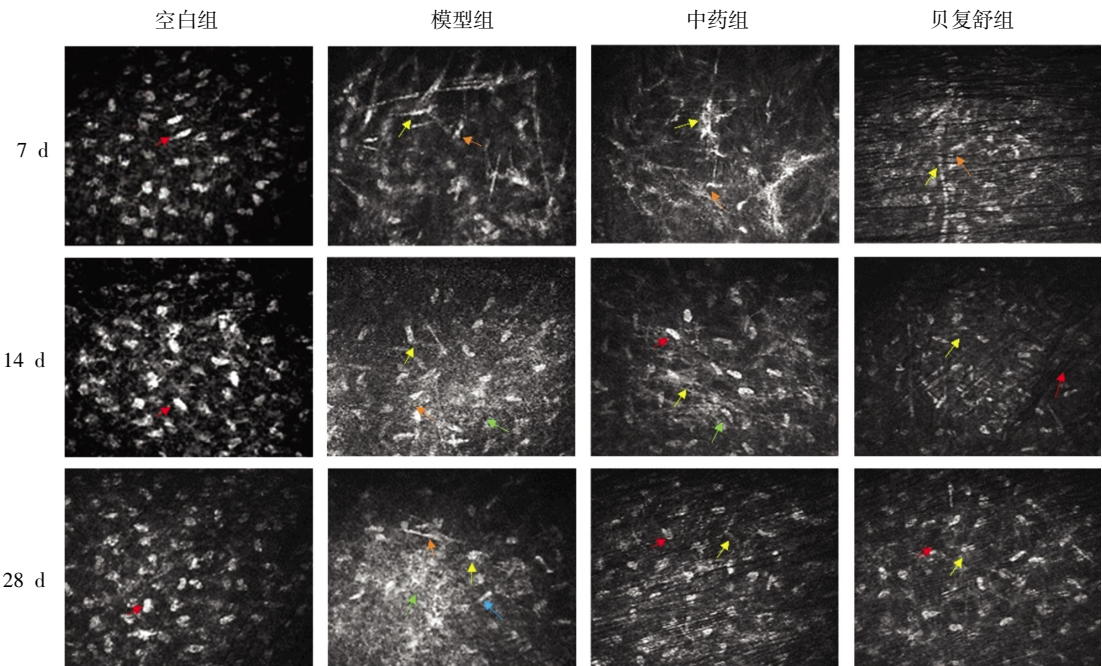


图 2 各组兔造模后 7 d、14 d、28 d 共聚焦激光断层扫描观察角膜细胞($\times 800$)

Fig.2 Images of corneal cells by confocal laser tomography at 7, 14, and 28 days in each group ($\times 800$)

注:红色箭头表示角膜基质细胞,黄色箭头表示成纤维细胞,橘色箭头表示炎性细胞,蓝色箭头表示肌成纤维细胞,绿色箭头瘢痕组织。

2.4 Masson 染色观察角膜组织中胶原纤维排列情况

Masson 染色可见,空白组角膜上皮整齐连续排列,基质层纤维排列整齐,染色致密,厚度均一(图 3A);模型组伤口处角膜上皮细胞不连续分布,且角

膜前部基质浅蓝色胶原纤维排列紊乱,呈不连续状态,厚度不一,角膜后部基质浅蓝色胶原纤维排列较混乱,呈紊乱纤维束(图 3B);中药组可见角膜前部基质浅蓝色胶原纤维较模型组排列有序,稍疏松,

表 2 造模后各组角膜混浊分级

Table 2 Corneal opacity grading in each group after modeling

组别	造模第 7 d	造模第 14 d	造模第 28 d
空白组	0.13±0.25	0.13±0.25	0.13±0.25
模型组	3.75±0.50**	3.50±0.57**	1.75±0.50**
中药组	3.00±0.81** ^{##}	2.50±0.57** ^{##}	0.75±0.28** ^{##}
贝复舒组	3.25±0.50** ^{##}	2.50±0.57** ^{##}	0.63±0.25** ^{##}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

呈连续状态,角膜后部基质浅蓝色胶原纤维排列有序(图 3C);贝复舒组见角膜前部基质浅蓝色胶原纤维较模型组排列有序,稍疏松,呈连续状态,仍存在纤维束,角膜后部基质浅蓝色胶原纤维排列有序(图 3D)。

2.5 Western blot 检测角膜组织中 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白相对表达量

在造模后 7、14 d 时,模型组与空白组相比,TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白相对表达量升高($P<0.05$);在经过治疗后,中药组、贝复舒组与模型组相比,TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白相对表达量显著降低($P<0.05$)。在角膜损伤后 28 d 时,模型组与空白组相比,TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白相对表达量升高;在经过治疗后,中药组、贝复舒组与模型组相比,TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白相对表达量显

著降低($P<0.05$)。并可见 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白表达量在角膜损伤后 7、14、28 d 时各组均逐渐减少。详见图 4。

3 讨论

视力障碍影响着全球超过 22 亿人,其中超过 10 亿病例是可以预防或者通过治疗进行恢复^[20]。其中由感染或损伤引起的纤维化瘢痕组织聚集,从而导致角膜混浊是角膜疾病致盲的主要原因^[21-22]。角膜损伤修复后出现的瘢痕不仅在美观上影响患者,最主要的是影响患者的生活、工作。

中医学认为角膜组织属于黑睛范畴^[23],五轮学说中属“风轮”。黑睛暴露于外,易受外伤及邪毒侵袭,又因为黑睛上无血络营养保护,抵抗力较低,一旦发生病变,容易遗留翳膜^[24]。黑睛透明则能透视万物,一旦受损,混浊生翳,则遮挡视物,影响视力。《伤科汇纂》^[25]指出:“大凡伤损症,有外邪乃乘虚而入。”古人认为风为百病之长,由于致伤物体多较污秽,破损处易被邪毒侵袭,所以致伤后不仅经络、气血、组织受损,还可有邪毒为患。“有伤必有瘀”,各种外伤是形成瘀血的一个常见而重要的原因,早在《灵枢·邪气脏腑病形》就有“有所堕坠,恶血留内”的记载。《论退翳法》认为:“翳者,气血津凝而不行,结聚而成云翳”,“经络凝结,

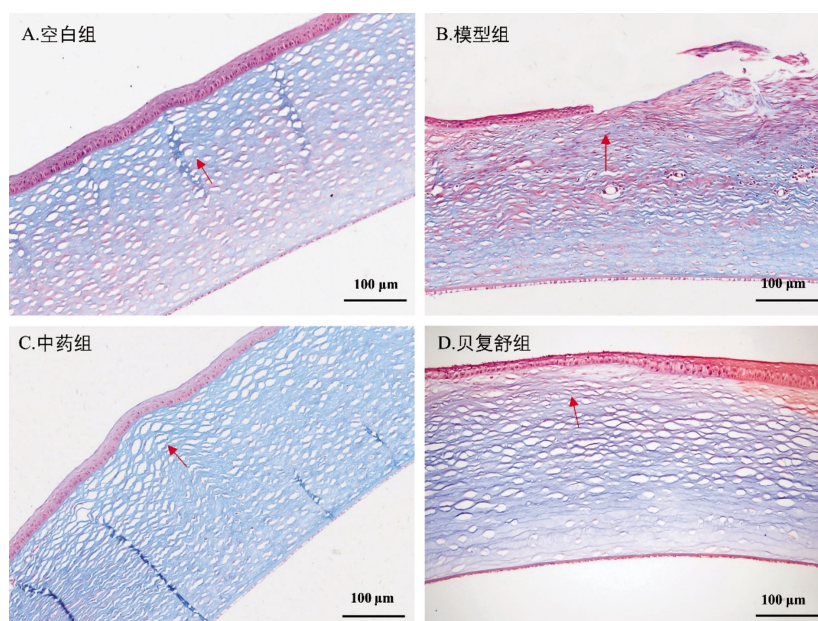


图 3 Masson 染色观察造模后 28 d 各组兔角膜组织中胶原纤维分布

Fig.3 Masson staining pictures of collagen fiber distribution in corneal tissue of each group at 28 days

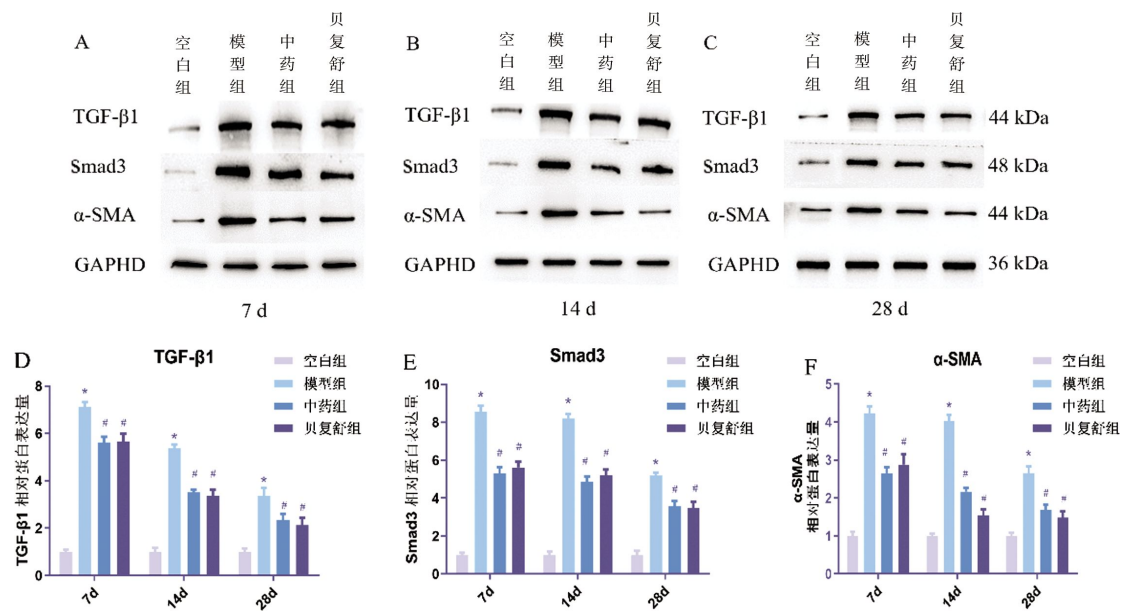


图 4 TGF-β1、Smad3、α-SMA 蛋白相对表达量

Fig.4 Relative protein expression levels of TGF-β1, Smad3, and α-SMA

注: A、B、C 各组 TGF-β1、Smad3、α-SMA 蛋白条带图; D、E、F 各组 TGF-β1、Smad3、α-SMA 相对蛋白表达量比较柱状图。与空白组比较, *P<0.05; 与模型组比较, #P<0.05。

气血不得升降,非发散之剂云翳不得升”。故祛风发散,退翳明目。由此认为,由角膜损伤导致的翳证的病机为瘀血积目、风热攻目。

除风益损汤由熟地黄、当归、白芍、川芎、藁本、前胡、防风组成,主治血虚生翳膜之证,又能够促进伤口的修复。该方以熟地黄补肾水为君,黑睛为肾之子,此虚则补其母;以当归补血,因目为血所养,今伤目则病,白芍药补血又补气,为血病则气亦病也,为臣;川芎治血虚头痛,藁本通血去头风,为佐;前胡、防风通疗风邪,俾不凝留,为使。该方是四物汤化裁而来,四物汤具有养血活血效果,故除风益损汤也具备,又除风益损汤中加入了系列风药,使得全方生血而不滞、行血而不过^[12]。肝血得以畅达目窍达到治疗之功。在不断地临床实践中发现,对于眼部外伤等,一味地用活血化瘀类中药效果往往并不佳,但若在方中加入祛风药、归肝经类中药则全方效用显著增强^[26],从而达到疏风清热、养血活血之功。

本研究发现,眼前节拍照及角膜荧光素染色中,随着时间的推移,实验兔经过除风益损汤中药汤剂灌胃治疗和贝复舒滴眼治疗后,在造模后 7、14、28 d 时,中药组和贝复舒组与模型组相比兔角膜表面均趋于平整,白色光环及虹膜均更清晰显现;在造模后 28 d 时明显可见中药组和贝复舒组兔角

膜荧光素染色为阴性,而模型组仍存在少量兔角膜荧光素染色。以上结果说明,除风益损汤和重组牛碱成纤维细胞生长因子滴眼液对兔角膜损伤修复具有促进作用。

通过共聚焦激光断层扫描不同时期的兔角膜浅层基质发现:模型组在造模后 7、14 d 时浅层角膜基质中会出现大量的成纤维细胞及炎性细胞,在造模后 28 d 时出现大量磨砂样、不透明瘢痕组织及肌成纤维细胞;而中药组和贝复舒组在造模后 7 d 时存在大量成纤维细胞和炎性细胞,经过治疗后,在造模后 14、28 d 时发现,成纤维细胞和炎性细胞逐量减少,且磨砂样、不透明状瘢痕组织生成不明显。肌成纤维细胞能促使 α-SMA 生成,α-SMA 的沉积会导致瘢痕的产生,而在通过中药及贝复舒治疗后造模后 28 d 的角膜浅层基质很少发现肌成纤维细胞。在角膜混浊度分级中,发现与空白组比较,模型组在造模后 7、14、28 d 的角膜混浊分级均明显升高,且呈时间相关性,但造模后 28 d 时模型组的角膜混浊分级出现回落,这可能是由于兔角膜的自愈能力导致的;与模型组相比,中药组和贝复舒组在造模后 7、14、28 d 的角膜混浊分级均明显降低,且时间越长角膜混浊分级越低。以上结果说明,除风益损汤和重组牛碱成纤维细胞生长因子滴眼液能降低兔角膜损伤后的混浊程度,从而降低瘢痕

的产生。角膜基质主要是由胶原纤维构成,角膜的透明与胶原纤维的有序排列密不可分,基质层细胞主要为角膜基质细胞,是一种成纤维细胞,角膜损伤能激活角膜基质细胞生成成纤维细胞,加速分泌胶原至基质中^[27]。在 Masson 病理切片染色中发现:中药组和贝复舒组较模型组角膜基质中的胶原纤维排列更整齐、更有序,其排列方式更趋近于空白组,且角膜上皮恢复,呈连续状,而模型组中角膜上皮未愈合,且角膜前部基质浅蓝色胶原纤维排列紊乱,呈不连续状态,厚度不一,角膜后部基质浅蓝色胶原纤维排列较混乱,呈紊乱纤维束。在造模后 7、14、28 d 中,各组 TGF- β 1、Smad3 蛋白相对表量模型组最高,在经过治疗后,中药组、贝复舒组中 TGF- β 1、Smad3 蛋白相对表达量逐渐降低,并且均明显低于模型组中 TGF- β 1、Smad3 蛋白相对表达量。这有可能是因为中药中的某种物质,与 TGF- β 1 相结合,使该蛋白表达减少,又 TGF- β 1 蛋白表达的降低能减少肌成纤维细胞的产生,导致 α -SMA 因子分泌减少,从而抑制角膜损伤后瘢痕化的产生。以上结果说明,除风益损汤和重组牛碱成纤维细胞生长因子滴眼液能够促进角膜损伤修复,并能减少角膜损伤后瘢痕化。

综上所述,除风益损汤能有效促进角膜损伤修复,抑制角膜瘢痕化产生,并影响 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 蛋白的相对表达。

参考文献

- [1] 张璐,李妍,胡竹林. 角膜基质细胞的表型转化及其预防瘢痕形成的研究[J]. 国际眼科纵览, 2018, 42(3): 194-198.
- [2] SUGIOKA K, FUKUDA K, NISHIDA T, et al. The fibrinolytic system in the cornea: A key regulator of corneal wound healing and biological defense[J]. *Experimental Eye Research*, 2021, 204: 108459.
- [3] OIE Y, KOMOTO S, KAWASAKI R. Systematic review of clinical research on regenerative medicine for the cornea[J]. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 2021, 65(2): 169-183.
- [4] 袁检宝. 角膜损伤修复与基质重塑的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(4): 317-320.
- [5] KIM K K, SHEPPARD D, CHAPMAN H A. TGF- β 1 signaling and tissue fibrosis[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2018, 10(4): a022293.
- [6] CASTRO N, GILLESPIE S R, BERNSTEIN A M. Ex vivo corneal organ culture model for wound healing studies[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(144): e58562.
- [7] WU W J, WANG X Q, YU X Q, et al. Smad3 signatures in renal inflammation and fibrosis[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18(7): 2795-2806.
- [8] 郭承伟. 退翳明目在眼科的应用[J]. 中国中医眼科杂志, 2004, 14(3): 164-165.
- [9] 曾明葵. 目翳证治[J]. 辽宁中医杂志, 1995(1): 24-25.
- [10] 孙宏睿, 戴乐舒, 叶姗姗, 等. 退翳明目中药治疗角膜混浊的研究进展[J]. 中国中医眼科杂志, 2020, 30(9): 678-680, 684.
- [11] 郭承伟. 退翳明目在眼科的应用[J]. 中国中医眼科杂志, 2004, 14(3): 164-165.
- [12] 李严为. 除风益损汤联合小牛血眼用凝胶对眼化学性伤后角膜损伤恢复的临床疗效观察[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- [13] 陈向东, 聂辅娇, 彭清华, 等. 除风益损汤治疗眼穿通伤的临床疗效观察[J]. 中国医药指南, 2016, 14(11): 29-31.
- [14] 黄根山. 除风益损汤辅助青光眼白内障联合术后合并症疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2021, 37(8): 1362-1364.
- [15] 邵鹏超, 王丽杰. 积雪草提取物溶液治疗兔眼角膜瘢痕实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(7): 196-198.
- [16] 李红, 张作明, 杨新光. 退翳眼液对兔角膜瘢痕厚度及面积影响的实验研究[J]. 中国临床康复, 2004, 8(11): 2091-2093.
- [17] CONNON C J, MEEK K M. Organization of corneal collagen fibrils during the healing of trephined wounds in rabbits[J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2003, 11(1): 71-78.
- [18] 王丽. 生长因子修饰 PGCL 仿生组织工程角膜的制备及其对角膜损伤修复的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [19] TANDON A, SHARMA A, RODIER J T, et al. BMP7 gene transfer via gold nanoparticles into stroma inhibits corneal fibrosis in vivo[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66434.
- [20] DUARTE CAMPOS D F, ROHDE M, ROSS M, et al. Corneal bioprinting utilizing collagen-based bioinks and primary human keratocytes[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2019, 107(9): 1945-1953.
- [21] FUEST M, YAM G H F, PEH G S L, et al. Advances in corneal cell therapy[J]. *Regenerative Medicine*, 2016, 11(6): 601-615.
- [22] SHOJAATI G, KHANDAKER I, SYLAKOWSKI K, et al. Compressed collagen enhances stem cell therapy for corneal scarring[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2018, 7(6): 487-494.
- [23] 彭清华. 中医眼科学[M]. 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 127.
- [24] 李点. 论翳之证治[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(4): 697-700.
- [25] 胡廷光. 伤科汇纂[M]. 12 卷. 北京: 人民卫生出版社, 1962: 79.
- [26] 罗再琼. 风药在眼科血瘀病证的应用及思考[J]. 中国中医眼科杂志, 2000, 10(3): 183.
- [27] SHIRAISHI A, CONVERSE R L, LIU C Y, et al. Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by in vivo particle-mediated gene transfer[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1998, 39(13): 2554-2561.

(本文编辑 苏维)