

本文引用: 谢思健, 马小丫, 唐逸飞, 杜佳琪, 冯 娟, 赖 娟, 伍竞涛, 姜尚萍, 彭清华. 润目汤熏蒸对水液缺乏型干眼兔泪液分泌、角膜泪腺形态及炎症相关蛋白表达水平的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 1991-1998.

润目汤熏蒸对水液缺乏型干眼兔泪液分泌、角膜泪腺形态及炎症相关蛋白表达水平的影响

谢思健¹, 马小丫¹, 唐逸飞², 杜佳琪³, 冯 娟⁴, 赖 娟¹, 伍竞涛¹, 姜尚萍⁵, 彭清华^{1*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 西安交通大学, 陕西 西安 710049; 3. 中南大学湘雅三医院, 湖南 长沙 410013;

4. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361023; 5. 宁乡市中医医院, 湖南 长沙 410000

[摘要] **目的** 观察润目汤中药熏蒸对水液缺乏型干眼兔泪液分泌、角膜泪腺形态及炎症相关蛋白表达水平的影响。**方法** 取健康新西兰大白兔 30 只, 随机分为 5 组(空白对照组、蒸馏水组、阳性对照组、联合治疗组和中药熏蒸组), 每组 6 只。空白对照组不予处理, 其余各组用 1% 硫酸阿托品眼用凝胶连续滴眼 3 d。造模成功后(实验第 4 天开始), 空白对照组在正常环境中常规喂养。蒸馏水组给予中药熏蒸治疗仪加热蒸馏水熏蒸眼部对照处理; 阳性对照组予以玻璃酸钠滴眼液滴眼, 1 次 1 滴, 4 次/d; 联合治疗组采用润目汤熏蒸和玻璃酸钠滴眼液联合滴眼治疗; 中药熏蒸组采用中药熏蒸治疗仪加热润目汤水煎液熏蒸眼部, 1 次/d, 15 min/次。同时各组均滴 1% 硫酸阿托品滴眼液以维持模型, 直至实验结束。在实验第 0、3、7、10、13 天分别进行泪液分泌试验(Schirmer I test, S I T)、角膜荧光素钠染色(corneal fluorescein staining, CFS)评分; 第 3、13 天进行角膜共聚焦显微镜检查; 第 13 天处死动物。在光镜下观察角膜上皮形态学变化, 电镜下观察角膜上皮及泪腺组织形态学变化; 采用 Western blot 检测角膜组织中白细胞介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达。**结果** 与空白对照组比较, 在第 7、10 天, 蒸馏水组和联合治疗组 S I T 降低($P<0.01$), 各组 CFS 评分升高($P<0.05$); 在第 13 天, 蒸馏水组 S I T 降低($P<0.01$), 蒸馏水组和阳性对照组 CFS 评分升高($P<0.05$)。与蒸馏水组比较, 在第 7 天, 阳性对照组和中药熏蒸组 S I T 升高($P<0.01$), 联合治疗组 CFS 评分降低($P<0.05$); 在第 10、13 天, 阳性对照组、中药熏蒸组 S I T 升高($P<0.01$)、CFS 评分降低($P<0.01$)。与阳性对照组比较, 在第 7 天, 联合治疗组 S I T 降低($P<0.05$); 在第 10 天, 联合治疗组 CFS 升高($P<0.05$)。与联合治疗组比较, 在第 7、10 天, 中药熏蒸组 S I T 升高($P<0.05$)。与空白对照组比较, 阳性对照组、中药熏蒸组和联合治疗组兔角膜前基质神经密度有所恢复, 细胞形态也接近空白对照组; 未见明显的角膜上皮组织损伤, 基底细胞排列整齐, 形态与空白对照组接近。联合治疗组泪腺上皮细胞胞浆分泌丰富、角膜完整有序, 最接近于空白对照组。与空白对照组比较, 蒸馏水组 IL-1 α 和 TNF- α 表达量升高($P<0.01$); 与蒸馏水组比较, 阳性对照组、中药熏蒸组和联合治疗组兔角膜中 IL-1 α 表达量下降($P<0.01$), 中药熏蒸组和联合治疗组 TNF- α 表达量下降($P<0.01$)。与阳性对照组比较, 中药熏蒸组和联合治疗组 TNF- α 表达量下降($P<0.05$)。**结论** 润目汤熏蒸可促进泪液分泌, 减少角膜上皮与泪腺组织损伤, 降低 IL-1 α 、TNF- α 表达, 抑制局部炎症反应。

[关键词] 润目汤; 中药熏蒸; 水液缺乏型干眼; 炎症因子; 白细胞介素-1 α ; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.008

Effects of Runmu Decoction steaming on tear secretion, corneal and lacrimal gland morphology and expressions of inflammation-related proteins in rabbits with aqueous-deficient dry eye

XIE Sijian¹, MA Xiaoya¹, TANG Yifei², DU Jiaqi³, FENG Xian⁴, LAI Juan¹, WU Jingtao¹,
JIANG Shangping⁵, PENG Qinghua^{1*}

[收稿日期] 2024-05-06

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目(21C0249); 湖南中医药大学校级科研基金项目(Z2023XJYB24); 湖南中医药大学本科生科研创新基金项目(2024BKS005)。

[通信作者] * 彭清华, 男, 博士, 二级教授, 博士研究生导师, E-mail: pqh410007@126.com。

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China; 3. The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410013, China; 4. School of Medicine, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361023, China; 5. Ningxiang Hospital of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410000, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Runmu Decoction steaming on tear secretion, corneal and lacrimal gland morphology, and expression levels of inflammation-related proteins in rabbits with aqueous-deficient dry eye. **Methods** Thirty healthy New Zealand white rabbits were randomized into blank control group, distilled water group, positive control group, combined treatment group, and Chinese medicine steaming group, with six rabbits in each group. The blank control group received no treatment, while the remaining groups were treated with 1% atropine sulfate ophthalmic gel in the eyes for 3 consecutive days. After successful modeling (starting from the 4th day of the experiment), the blank control group was fed routinely in a normal environment. The distilled water group was given distilled water that had been heated by a Chinese medicine steaming apparatus for steaming the eyes as a control treatment. The positive control group was treated with sodium hyaluronate eye drops, one drop each time, four times a day. The combined treatment group was treated with both steaming with Runmu Decoction and sodium hyaluronate eye drops. The Chinese medicine steaming group was treated with Runmu Decoction that had been heated for steaming the eyes using the Chinese medicine steaming apparatus for 15 minutes each time, once a day. Meanwhile, 1% atropine sulfate eye drops were administered to all groups to maintain the model until the end of the experiment. Schirmer I test (SIT) and corneal fluorescein sodium staining (CFS) scoring were conducted on the 0th, 3rd, 7th, 10th, and 13th days of the experiment. Corneal confocal microscopy was performed on the 3rd and 13th days. The animals were sacrificed on the 13th day. The morphological changes of the corneal epithelium were observed using a light microscope, and the histomorphological changes of the corneal epithelium and lacrimal glands were observed using an electron microscope. The expression levels of interleukin-1 α (IL-1 α) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the corneal tissue were measured by Western blot. **Results** Compared with the blank control group, on the 7th and 10th days, the SIT values of the distilled water and combined treatment groups decreased ($P<0.01$), and the CFS scores of all groups increased ($P<0.05$). On the 13th day, the SIT value of the distilled water group decreased ($P<0.01$), and the CFS scores of the distilled water and positive control groups increased ($P<0.05$). Compared with the distilled water group, on the 7th day, the SIT values of the positive control and Chinese medicine steaming groups increased ($P<0.01$), and the CFS score of the combined treatment group decreased ($P<0.05$). On the 10th and 13th days, the SIT values of the positive control and Chinese medicine steaming groups increased ($P<0.01$), while their CFS scores decreased ($P<0.01$). Compared with the positive control group, on the 7th day, the SIT value of the combined treatment group decreased ($P<0.05$); on the 10th day, its CFS score increased ($P<0.05$). Compared with the combined treatment group, on the 7th and 10th days, the SIT value of the Chinese medicine steaming group increased ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the density of corneal anterior stroma nerves in the positive control, Chinese medicine steaming, and combined treatment groups recovered to some extent, and the cell morphology was also close to that of the blank control group. No obvious corneal epithelial tissue damage was observed, and the basal cells were neatly arranged, with the morphology similar to that of the blank control group. The abundant cytoplasmic secretion of the lacrimal glands and intact, orderly corneas of the combined treatment group were the closest to those of the blank control group. Compared with the blank control group, the expression levels of IL-1 α and TNF- α in the distilled water group increased ($P<0.01$). Compared with the distilled water group, the expression level of IL-1 α in the corneas of the positive control, Chinese medicine steaming, and combined treatment groups decreased ($P<0.01$), and that of TNF- α in the Chinese medicine steaming and combined treatment groups decreased ($P<0.01$). Compared with the positive control group, the expression level of TNF- α in the Chinese medicine steaming and combined treatment groups decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Steaming with Runmu Decoction can promote tear secretion, reduce the damage to corneal epithelium and lacrimal gland tissue, lower the expressions of IL-1 α and TNF- α , and thereby inhibit the local inflammatory reaction.

[Keywords] Runmu Decoction; Chinese medicine steaming; aqueous-deficient dry eye; inflammatory factors; interleukin-1 α ; tumor necrosis factor- α

干眼,是由于泪液的量、质或流体动力学异常引起泪膜不稳定和(或)眼表微环境失衡,从而导致眼部不适症状及视功能障碍的慢性眼表疾病^[1]。干眼常见症状包括眼干、眼涩、异物感、畏光、对环境刺激敏感等,很大程度上影响人们的生活质量^[2]。干眼还可造成视力下降,继发感染、角膜溃疡或穿孔等,可能导致患者出现焦躁不安、抑郁等负面情绪^[3]。因此,干眼的治疗显得尤为重要。国内外流行病学报告显示,全世界干眼的发病率为5%~50%,中国成年人的患病率约为21%,呈逐年上升趋势^[4-5]。西医治疗干眼多选用人工泪液替代疗法、抗炎治疗、激素替代治疗、手术等方法。中医学认为,干眼属“白涩证”“神水将枯”“燥证”等范畴,《审视瑶函·内障》谓其“视珠外神水枯涩,而不润莹”。中医疗法主要为运用辨证论治方法,调理脏腑气血,疏通经络,促进眼周血液循环,包括针刺、中药内治、中药外治、针药结合等。其中,中药熏蒸是中医眼科治疗干眼的常用外治方法,在促进泪液分泌,缓解眼睛干涩、疼痛,减轻异物及烧灼感等方面效果较为显著,且具有不良反应少、患者依从性高等优点^[6-8]。

炎症反应是干眼的重要病理机制^[9-11]。水样液缺乏型干眼的主要机制为眼表上皮细胞(角膜上皮和结膜上皮)高渗激活眼表炎症级联反应[如激活促丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)]信号通路,使炎症细胞因子[如白细胞介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)]水平升高,加重角膜、结膜炎症反应,诱发干眼^[12-14]。

本研究拟从角膜泪腺形态及炎症相关蛋白表达水平方面,观察润目汤熏蒸法对于干眼的影响,并探讨其作用机制,为寻求更安全有效的干眼治疗方法提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

3~4月龄健康新西兰大白兔,雌雄各半,体重1.5~2.0 kg,常规喂养。动物质量合格证编号:1107301911000007,由湖南太平生物科技有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2015-0004。动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心,相对湿度为50%~55%,温度为21~26℃,1笼1兔,普通级兔用饲料

自由取食、自由饮水,保持环境干净、整洁、安静。本研究经湖南中医药大学伦理委员会审查通过,审批号:LLBH-201907230014。

1.2 药物

1%硫酸阿托品眼用凝胶(规格:2.5 g/支,沈阳兴齐眼药股份有限公司,国药准字:H20022295,批号:180801);玻璃酸钠滴眼液(0.1%,规格:10 mL,德国乌斯法玛药品有限公司,进口药品注册证号:H20150150,批号:307662);熏蒸药润目汤由麦冬、当归、地骨皮、白蒺藜、菊花、桑叶、玫瑰花、鬼针草、冰片组成,中药均采购于湖南中医药大学第一附属医院中药房,参照临床中医眼科的熏蒸药物煎煮方法,利用常压煎药机技术^[15],统一规范煎煮而成。

1.3 主要试剂与仪器

Schirmer 试验滤纸(天津晶明新技术开发有限公司,批号:20150040);荧光素钠(广州明兴制药厂,批号:XY19118);4%多聚甲醛溶液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:CR1802175);2.5%戊二醛固定液(电镜专用)(飞净生物科技有限公司,批号:20180918);小鼠 IL-1 α 单克隆抗体(批号:20010)、小鼠 TNF- α 单克隆抗体(批号:20161)均购自美国 ProMab Biotechnologies 公司; β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:4790)。

共聚焦显微镜自动扫描仪(德国海德堡公司,型号:HRT3);中药熏蒸治疗仪(河南华康宏力医疗器械有限公司,型号:HKHL-XZ-110);手持裂隙灯(苏州六六视觉科技股份有限公司,型号:YZ3);多功能电泳仪、垂直电泳槽及制胶组件(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY-600HE、JY-SCZ2+);多功能荧光成像仪(武汉晶中生物科技有限公司,型号:Odyssey CLX)。

2 方法

2.1 模型建立、分组及干预

从30只实验动物中,随机选取24只,从实验第1天开始予以1%硫酸阿托品眼用凝胶,每天滴双眼4次(8:00、12:00、16:00、20:00),每次1滴。实验第3天进行模型鉴定。采用泪液分泌试验(Schirmer I test, S I T)、角膜荧光素钠染色(corneal fluorescein staining, CFS)评分作为鉴定模型是否建立成功的标准^[16-18]。造模成功后,将其分为阳性对照组、中药熏

蒸组、联合治疗组、蒸馏水组,每组 6 只;另取 6 只大白兔作为空白对照组。各治疗组在造模成功后仍同时滴用 1%硫酸阿托品眼用凝胶,每天滴双眼 4 次,以维持模型,直至实验结束。

空白对照组在正常环境中常规喂养。其余组于造模成功后开始给药,阳性对照组予以玻璃酸钠滴眼液滴眼,1 次 1 滴,4 次/d;中药熏蒸组采用中药熏蒸治疗仪加热润目汤水煎液熏蒸眼部,1 次/d,15 min/次;联合治疗组同时采用润目汤熏蒸和玻璃酸钠滴眼液滴眼治疗,方法同前;蒸馏水组给予中药熏蒸治疗仪加热蒸馏水熏蒸眼部对照处理。

2.2 取材

活体检测之后,麻醉法处死各组动物。每组取 1 只兔角膜、泪腺固定在 4%多聚甲醛中,用于光镜观察;每组取 1 只兔泪腺固定在 2.5%戊二醛中,用于电镜观察;每组取 3 只兔角膜,液氮速冻后,−80 ℃保存,用于 Western blot 法检测 IL-1 α 与 TNF- α 表达水平。

2.3 检测指标

2.3.1 S I T 检测 各组在干预第 0、3、7、10、13 天,使用泪液检测滤纸条检测泪液分泌量。将纸条一端折弯 5 mm,置于下睑内侧 1/3 结膜囊内,其余部分悬垂于皮肤表面。手动令兔眼闭合 5 min 后读取、记录滤纸湿润长度(不包括反折部分的长度),测量单位为 mm。对每只眼重复测试 3 次,取其平均值为最终结果。每组检查均由同一人完成,每次检查时间、地点、照明亮度、湿度及温度相同。

2.3.2 CFS 评分检测 各组在干预第 0、3、7、10、13 天,将兔固定在保定盒中,用 2%液态荧光素滴至结膜囊。手动令兔瞬目使荧光素均匀分布于眼表,固定眼睑后用裂隙灯对每只眼进行测试,观察兔角膜上皮是否染色,染色阳性提示角膜上皮细胞的完整性被破坏。荧光素染色评分采用 12 分法^[19]:将角膜分为 4 个象限,每个象限 0~3 分。无染色为 0 分;1~30 个点状着色为 1 分;大于 30 个点状着色但染色为融合为 2 分;出现角膜点状着色融合、丝状物及溃疡等为 3 分。选取清晰度良好的照片进行评分,取平均值为最终结果。

2.3.3 角膜活体共聚焦显微镜观察 将干眼兔的下颌及前额固定于显微镜检查托架上,用 25%乌拉坦麻醉,在物镜表面涂上唯地息透明凝胶,筛选角膜各层图像存盘,分别在实验第 3、13 天时检查角膜前基

质神经密度和角膜基质细胞形态。

2.3.4 角膜及泪腺的光镜观察 将兔处死后,取角膜和泪腺组织在 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察各上皮细胞层和基质层形态。

2.3.5 泪腺的电镜观察 取部分兔泪腺组织,于 2.5%戊二醛固定 24 h 后,透射电镜观察分泌泡形态和超微结构。

2.3.6 IL-1 α 与 TNF- α 表达水平检测 各组干预后,取兔角膜组织用裂解液裂解,BCA 试剂盒分别检测各组蛋白浓度,按最低浓度配平,加入上样缓冲液,再置于 100 ℃金属浴加热 10 min,使蛋白充分变性。经电泳、转膜、封闭后,将膜与一抗 IL-1 α (1:1 000)、TNF- α (1:1 000)和 β -actin(1:8 000)抗体置于 4 ℃孵育过夜。用 TBST 洗膜 5 次后,将二抗(1:10 000)与膜置于室温摇床上孵育 1 h。ECL 显影曝光,用 Quantity One 灰度分析软件进行图像定量分析,测定目的蛋白的相对光密度值(integrated optical density, IOD)。以 β -actin 为内参蛋白,计算目的蛋白 IOD 与内参蛋白 IOD 的比值,以此表示蛋白相对含量。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计学软件对数据进行分析,实验数据为计量资料,均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。服从正态分布的多组间均数比较采用单因素方差分析,方差齐者进一步两两比较采用 LSD 法,方差不齐者用 Dunnett T3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组泪液指标检测结果

3.1.1 各组 S I T 比较 实验第 0 天,各组 S I T 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与空白对照组比较,实验第 3 天其余各组 S I T 明显降低($P < 0.01$),表明模型建立成功。与空白对照组比较,在第 7、10 天,蒸馏水组、联合治疗组 S I T 降低($P < 0.01$),在第 13 天,蒸馏水组 S I T 降低($P < 0.01$)。与蒸馏水组比较,在第 7 天,阳性对照组和中药熏蒸组 S I T 升高($P < 0.01$);在第 10、13 天,阳性对照组、联合治疗组、中药熏蒸组 S I T 升高($P < 0.01$)。与阳性对照组比较,在第 7 天,联合治疗组 S I T 降低($P < 0.05$)。与联合治疗组比较,在第 7、10 天,中药熏蒸组 S I T 升高($P < 0.05, P < 0.01$)。详见表 1。

3.1.2 各组 CFS 评分比较 实验第 0 天,各组 CFS 评分差异无统计学意义($P>0.05$)。实验第 3 天,与空白对照组比较,其余各组 CFS 评分升高($P<0.01$),表明模型建立成功。与空白对照组比较,在第 7、10 天,蒸馏水组、阳性对照组、联合治疗组、中药熏蒸组 CFS 评分升高($P<0.05$, $P<0.01$);在第 13 天,蒸馏水组和阳性对照组 CFS 评分升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与蒸馏水组比较,在第 7 天,联合治疗组 CFS 评分降低($P<0.05$);第 10、13 天,阳性对照组和中药熏蒸组 CFS 评分降低($P<0.01$);第 13 天,联合治疗组 CFS 评分降低($P<0.01$)。与阳性对照组比较,在第 10 天,联合治疗组 CFS 评分升高($P<0.05$)。详见表 2。

由中药熏蒸组典型大白兔 CFS 图片示例可知,中药熏蒸组在第 3 天染色最明显,提示用阿托品造模后的眼表损伤。第 7 天眼表染色区域颜色变浅,第 10 天未见明显染色区域,第 13 天已无染色区域,提示其眼表损伤已基本恢复。详见图 1。

3.2 各组形态学观察结果

3.2.1 角膜共聚焦显微镜观察 空白对照组角膜基质可观察到粗大、分叉较多的基质神经;蒸馏水组兔角膜中基底下神经纤维密度降低,且角膜基质细胞异形性明显,说明可能存在高反光的脱屑细胞增多;阳性对照组、联合治疗组和中药熏蒸组兔角膜前基质神经密度有所恢复,细胞形态也接近空白对照组。详见图 2。

表 1 各组不同时段 SIT 比较($\bar{x}\pm s$,mm)
Table 1 Comparison of SIT values in different periods among different groups ($\bar{x}\pm s$, mm)

组别	实验第 0 天	实验第 3 天	实验第 7 天	实验第 10 天	实验第 13 天
空白对照组	17.42±4.08	17.25±6.73	16.83±4.28	17.75±3.44	18.08±3.58
蒸馏水组	18.33±3.50	7.92±1.83**	9.17±1.80**	7.00±1.86**	6.42±2.11**
阳性对照组	18.92±2.06	8.83±1.27**	14.58±1.51 [#]	15.17±3.64 [#]	17.67±4.16 [#]
联合治疗组	16.75±1.42	8.67±2.06**	10.92±4.46* [‡]	12.58±5.02* [‡]	16.58±3.40 [#]
中药熏蒸组	17.67±5.50	7.08±3.27**	15.08±4.83 [‡] △	15.83±2.89 [‡] △	18.42±3.09 [#]

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与蒸馏水组比较,[#] $P<0.01$;与阳性对照组比较,^{*} $P<0.05$;与联合治疗组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

表 2 各组不同时段 CFS 评分比较($\bar{x}\pm s$,分)
Table 2 Comparison of CFS scores in different periods among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	实验第 0 天	实验第 3 天	实验第 7 天	实验第 10 天	实验第 13 天
空白对照组	2.50±1.17	1.33±1.15	1.42±1.90	1.17±1.47	2.00±1.71
蒸馏水组	2.08±1.34	5.50±2.65**	5.58±2.94**	5.33±1.72**	6.08±2.50**
阳性对照组	2.00±1.28	5.58±3.15**	4.67±3.42**	2.33±1.23* [#]	3.92±1.31* [#]
联合治疗组	2.33±1.15	6.17±1.89**	3.42±2.02* [‡]	4.25±2.30* [‡]	3.08±1.44 [#]
中药熏蒸组	1.58±1.44	6.67±1.87**	4.67±2.90**	3.25±2.45* [‡]	3.00±2.49 [#]

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与蒸馏水组比较,[#] $P<0.05$,[‡] $P<0.01$;与阳性对照组比较,^{*} $P<0.05$ 。

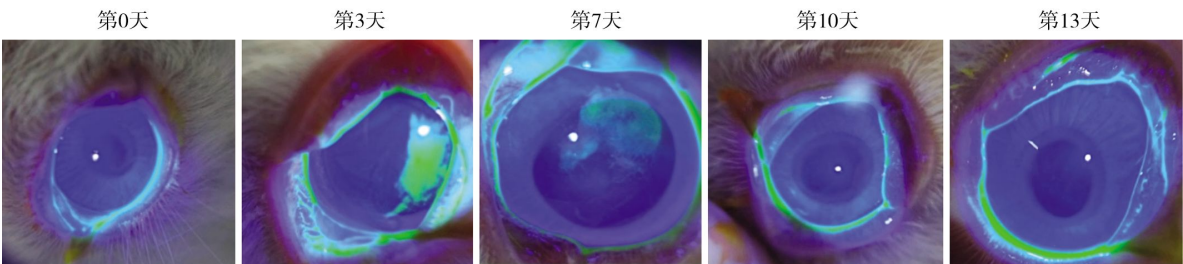


图 1 中药熏蒸组典型大白兔 CFS 图片示例

Fig.1 Pictures of typical CFS of the white rabbits in the Chinese medicine steaming group

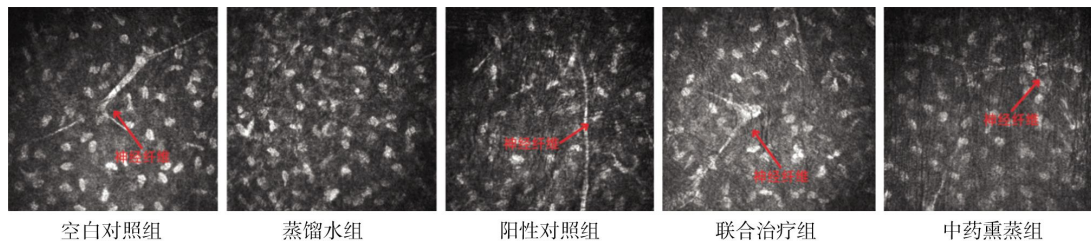


图 2 各组角膜共聚焦显微镜观察结果

Fig.2 Corneal confocal microscopic observation in each group

3.2.2 角膜光镜观察 空白对照组角膜上皮细胞排列整齐;蒸馏水组可见角膜上皮存在丝状剥脱,且上皮组织损伤严重,基底细胞排列紊乱;而阳性对照组、联合治疗组以及中药熏蒸组较少见上述损伤,形态与空白对照组接近。详见图 3。

3.2.3 泪腺光镜观察 空白对照组泪腺未见腺泡萎缩或腺泡纤维化,未见腺泡周围纤维化,细胞核周围和血管周围未见多形核细胞或淋巴细胞浸润;蒸馏水组腺泡细胞大小、形态不规则,腺泡细胞存在萎缩,细胞呈聚集状,部分细胞边界不清,细胞核形态异常;阳性对照组可见少量腺泡细胞萎缩和纤维化;中药熏蒸组仅有极少量腺泡细胞萎缩融合;联合治疗组腺泡细胞排列较为整齐紧密,腔内黏液增多,较蒸馏水组改善,最为接近空白对照组。详见图 4。

3.2.4 泪腺电镜观察 空白对照组分泌泡数量多、密度大;蒸馏水组分泌泡减少且萎缩,炎症情况严重;阳性对照组分泌泡数量接近蒸馏水组,内质网疏松;中药熏蒸组分泌泡有融合,相较于蒸馏水组增多,较蒸馏水组改善;联合治疗组分泌泡相比空白对照组增多,排列整齐、紧密,较蒸馏水组显著改善,最

接近空白对照组。详见图 5。

3.3 各组兔角膜 IL-1 α 、TNF- α 表达量比较

与空白对照组比较,蒸馏水组 IL-1 α 、TNF- α 表达量增加($P<0.01$)。与蒸馏水组比较,阳性对照组、联合治疗组和中药熏蒸组 IL-1 α 表达量下降($P<0.01$),联合治疗组和中药熏蒸组 TNF- α 表达量下降($P<0.01$)。与阳性对照组比较,联合治疗组和中药熏蒸组 TNF- α 表达量下降($P<0.05$)。详见图 6、表 3。

4 讨论

目前,干眼按照泪液成分或功能可分为水液缺乏型干眼、脂质异常干眼、泪液动力学异常干眼、黏蛋白异常型干眼和混合型干眼^[1]。动物的水液缺乏型干眼模型一般通过局部滴用一定浓度的阿托品制备^[16-18],阿托品通过阻断乙酰胆碱与 M 受体结合,抑制副交感神经,导致泪液分泌减少,形成水液缺乏型干眼^[19-21]。干眼归属于中医学“白涩症”“神水将枯”“燥证”等范畴,最早记载见于明代傅仁宇所著的《审视瑶函·白痛》,其载“不肿不赤,爽快不得,沙涩昏朦,名曰白涩”。《证治准绳·杂病·七窍门》描述其

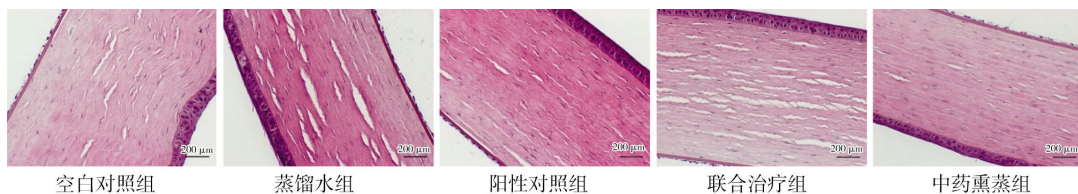


图 3 各组角膜光镜观察结果(HE,×200)

Fig.3 Observation of corneal epithelium in each group by light microscope (HE, ×200)

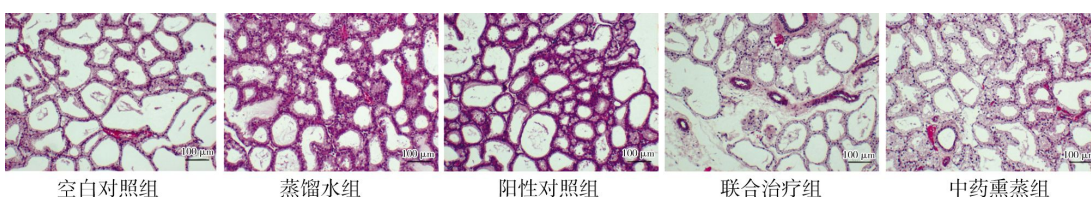


图 4 各组泪腺光镜观察结果(HE,×100)

Fig.4 Observation of lacrimal gland in each group by light microscope (HE, ×100)

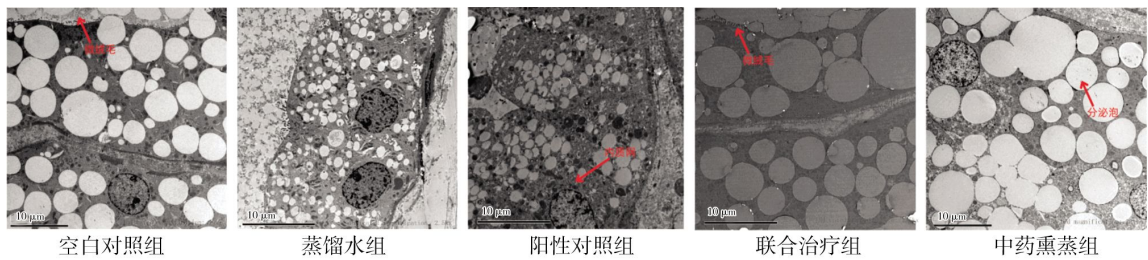


图 5 各组泪腺电镜观察结果(×2 500)

Fig.5 Observation of lacrimal gland in each group by electron microscope (×2,500)

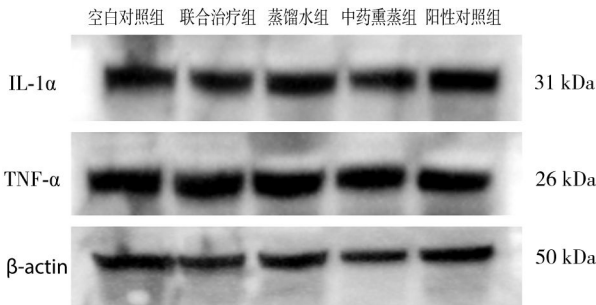


图 6 各组 IL-1α、TNF-α 蛋白条带图

Fig.6 Bands of IL-1α and TNF-α protein in each group

表 3 各组 IL-1α、TNF-α 表达量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Comparison of the expression levels of IL-1α and TNF-α among different groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	IL-1α	TNF-α
空白对照组	0.484±0.049	0.475±0.107
蒸馏水组	0.672±0.017**	0.619±0.033**
阳性对照组	0.524±0.032 ^{##}	0.570±0.007
联合治疗组	0.470±0.039 ^{##}	0.455±0.400 ^{##}
中药熏蒸组	0.483±0.025 ^{##}	0.470±0.012 ^{##}

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与蒸馏水组比较,^{##} $P<0.01$;与阳性对照组比较,[§] $P<0.05$ 。

“神珠外神水干涩而不莹润”,治疗上提出“治惟滋阴养水,略带抑火,以培其本”的原则。六淫邪气外袭、情志不畅、嗜食肥甘厚腻、热病后期均可影响脏腑功能,导致气血津液的生成、输布失常,从而使目窍受累,引发干眼^[14-16]。而久居干燥秽浊之室,劳心劳力,用眼过度,则多表现为阴津耗伤、肺阴亏虚,致使白睛失于濡养。本研究采用经验方“润目汤”进行中药熏蒸,其功效为滋阴润肺、祛风明目。本方当归、麦冬为君药,滋阴养血;臣药白蒺藜、菊花、桑叶,清肝明目;加玫瑰花、鬼针草以增滋阴清热、清肝明目之功;借冰片芳香走窜之力,共奏滋阴清热明目之效。已有研究证明,中药熏蒸不需要通过机体全身代谢

循环而直接作用于眼部,疗效更为迅速^[22],其利用现代化的熏蒸设备发挥热效应的作用,扩张眼部毛细血管,促进血液循环,还在局部发挥中药药性,增加药物在结膜囊中的浓度,共同达到促进泪液分泌、调节炎症介质消散的目的^[22-24]。

炎症反应是水液缺乏型干眼的关键病理机制,已有研究发现,干眼患者中 IL-1α 和 TNF-α 等细胞因子水平的高表达可能抑制神经递质的释放,导致眼表感觉神经活动减弱,从而使泪液分泌减弱^[13-14]。TNF-α 是包括炎症反应在内的许多生理和病理过程中发挥关键作用的关键因子,其高表达可引发眼表的一系列炎症反应,诱发干眼的发生和发展。

基于上述证据,本研究通过设立 5 个实验组,比较不同治法对角膜上皮和泪腺形态学的影响,及对角膜和泪腺组织 IL-1α 和 TNF-α 蛋白表达的影响,从而评估润目汤对于干眼的疗效。由实验结果可知,本研究的中药熏蒸疗法在增加泪液分泌方面效果最为显著,在促进角膜生长愈合方面效果较好,但需经过一定治疗周期方能显现;玻璃酸钠滴眼液、中药熏蒸和联合治疗这 3 种方法均可促进角膜、泪腺细胞生长,可恢复角膜前基质神经密度;单独使用蒸馏水熏蒸反而会导致泪液分泌减少、角膜上皮细胞和基底细胞受损、泪腺炎症情况加重,以及引起角膜基质细胞异形,影响泪膜稳定,加重干眼;除蒸馏水组以外,其他组兔角膜中 IL-1、TNF-α 表达量下降,以中药熏蒸组下降较为显著。

综上所述,本研究发现,润目汤熏蒸对水液缺乏型干眼兔有明显疗效,且优于玻璃酸钠滴眼液和联合治疗的效果。润目汤熏蒸能降低 IL-1α 和 TNF-α 水平,从而抑制局部炎症反应,起到增加泪液分泌、延长泪膜破裂时间等作用,这可能是其治疗干眼的有效机制之一。

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: 治疗(2020 年)[J]. 中华眼科杂志, 2020, 56(12): 907-913.
- [2] RODA M, CORAZZA I, BACCHI REGGIANI M L, et al. Dry eye disease and tear cytokine levels—a meta-analysis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(9): 3111.
- [3] 何欣琰, 孙晓敏, 蔡洁. 强脉冲激光治疗对中重度睑板腺功能障碍相关性干眼患者情绪、心理的影响[J]. 国际精神病学杂志, 2021, 48(6): 1098-1101.
- [4] STAPLETON F, ALVES M, BUNYA V Y, et al. TFOS DEWS II epidemiology report[J]. The Ocular Surface, 2017, 15(3): 334-365.
- [5] 邵毅, 胡瑾瑜, 应平. 干眼炎症诊疗规范: 2023 欧洲专家共识解读[J]. 眼科新进展, 2024, 44(2): 85-88.
- [6] 魏界城. 滋阴补肾汤加减联合中药熏蒸治疗蒸发过强型中度干眼症疗效观察[J]. 河南中医, 2022, 42(1): 101-105.
- [7] 张丹丹, 杨迎新, 马朝廷, 等. 中药熏蒸疗法治疗干眼症的临床效果分析[J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(S2): 75.
- [8] 迟凯耀, 赵磊, 左韬. 中医外治法治疗干眼的研究进展[J]. 中医眼耳鼻喉杂志, 2020, 10(3): 158-160.
- [9] BARABINO S, ARAGONA P, DI ZAZZO A, et al. Updated definition and classification of dry eye disease: Renewed proposals using the nominal group and Delphi techniques[J]. European Journal of Ophthalmology, 2021, 31(1): 42-48.
- [10] BAIULA M, SPAMPINATO S. Experimental pharmacotherapy for dry eye disease: A review[J]. Journal of Experimental Pharmacology, 2021, 13: 345-358.
- [11] TSUBOTA K, YOKOI N, SHIMAZAKI J, et al. New perspectives on dry eye definition and diagnosis: A consensus report by the Asia dry eye society[J]. The Ocular Surface, 2017, 15(1): 65-76.
- [12] 金子群, 纪海峰, 张明杰, 等. 眼表病理生理改变在干眼中的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2022, 22(1): 83-86.
- [13] 丁宁, 邓伟民, 高卫萍. 炎症介质在干眼发病机制中的作用和抗炎治疗进展[J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(11): 1881-1886.
- [14] LIU Z, CHEN D, CHEN X, et al. Autophagy activation protects ocular surface from inflammation in a dry eye model in vitro[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(23): 8966.
- [15] 吴声振, 雷凯君. 两煎常压煎药机不同煎煮条件对复方丹参汤剂质量的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(5): 519-521, 531.
- [16] 施炜, 李桥, 王育良, 等. 阿托品滴眼液制作兔干眼模型的研究[J]. 临床眼科杂志, 2011, 19(5): 455-457.
- [17] 徐雯, 刘雪, 高卫萍. 针药结合对兔干眼模型角膜及泪腺形态学的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31(6): 541-545.
- [18] 宋硕, 王若男, 谢金华, 等. 干眼病临床发病机制及与动物模型的相关性研究进展[J]. 世界临床药物, 2021, 42(4): 296-302, 320.
- [19] LI N, DENG X G, GAO Y, et al. Establishment of the mild, moderate and severe dry eye models using three methods in rabbits[J]. BMC Ophthalmology, 2013, 13: 50.
- [20] LABBÉ A, LIANG H, MARTIN C, et al. Comparative anatomy of laboratory animal corneas with a new-generation high-resolution in vivo confocal microscope[J]. Current Eye Research, 2006, 31(6): 501-509.
- [21] LAGALI N S, GRIFFITH M, SHINOZAKI N, et al. Innervation of tissue-engineered corneal implants in a porcine model: A 1-year in vivo confocal microscopy study[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007, 48(8): 3537-3544.
- [22] 胡锦涛, 刘新泉, 朱华英. 干眼症的中医疗法[J]. 吉林中医药, 2017, 37(1): 103-107.
- [23] 惠春艳. 养肝汤熏蒸联合耳穴治疗干眼症临床观察[J]. 四川中医, 2017, 35(2): 162-164.
- [24] 苏艳, 吴玉玲, 廖良, 等. 杞菊甘露散熏蒸法对肝肾不足型干眼患者视觉相关生存质量的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2014, 24(6): 406-410.

(本文编辑 周旦)