

本文引用: 曾令聪, 吴 凯, 朱冰瑶, 刘倩宏, 陈 雄, 彭清华, 姚小磊. 除风益损汤对兔角膜损伤后自噬相关因子及 TGF- β 1、MMP-2 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(2): 212-219.

除风益损汤对兔角膜损伤后自噬相关因子及 TGF- β 1、MMP-2 表达的影响

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

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

3. 郴州市中医医院, 湖南 郴州 424499; 4. 深圳市中西医结合医院, 广东 深圳 518033

[摘要] **目的** 探讨除风益损汤对兔角膜损伤的修复作用及对自噬相关因子和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的影响。**方法** 随机将 84 只新西兰大白兔分为 6 组, 具体为空白组、模型组、中药组、自噬促进组、自噬抑制组、自噬促进+中药组、自噬抑制+中药组, 每组 12 只, 每一组下又分为 3 个亚组, 每个亚组 4 只, 分别供造模后第 7、14、28 天检测。动物模型建立后各组在第 7、14、28 天观察角膜以及角膜荧光素染色情况, 记录角膜混浊评分, 采用激光共焦断层扫描仪观察角膜基质层修复情况, 用 Western blot 检测角膜中 TGF- β 1、微管相关蛋白轻链 3(LC3)比值、MMP-2 的蛋白表达。**结果** (1)角膜基质激光共焦断层扫描结果: 除空白组外, 其余各组角膜在造模后第 7 天均有成纤维细胞浸润及胶原沉积。随着时间的推移, 中药组、自噬促进组、自噬促进+中药组中成纤维细胞及胶原沉积较其他组减少。(2)显微镜观察白兔角膜情况: 空白组白兔的角膜在第 7、14、28 天皆清晰透明。其余各组白兔的角膜在第 7 天均出现混浊, 荧光素着色, 随着时间推移荧光素着色范围缩小, 角膜混浊逐渐消退。角膜混浊评分显示, 与模型组相比, 第 28 天自噬抑制组、自噬抑制+中药组评分较高($P<0.05$)。(3)LC3-II/I: 与模型组相比, 各时间段中药组、自噬促进组 LC3-II/I 表达均升高($P<0.05$), 自噬抑制组表达降低($P<0.05$)。(4)TGF- β 1: 与模型组相比, 各时间段中药组、自噬促进组表达均较低($P<0.05$), 自噬抑制组表达较高($P<0.05$)。(5)MMP-2: 与模型组相比, 各时间段中药组、自噬促进组表达均较低($P<0.05$), 自噬抑制组表达较高($P<0.05$)。**结论** 除风益损汤、氯化锂可以促进角膜损伤的愈合, 有助于减少瘢痕形成, 其机制是通过促进自噬和调控 TGF- β 1、MMP-2 的水平来实现的。

[关键词] 除风益损汤; 角膜损伤; 自噬; 微管相关蛋白轻链 3; 转化生长因子- β 1; 基质金属蛋白酶-2

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.02.004

Effects of Chufeng Yisun Decoction on autophagy related factors and expressions of TGF- β 1 and MMP-2 after corneal injury in rabbits

ZENG Lingcong^{1,3}, WU Kai^{1,2}, ZHU Bingyao^{1,4}, LIU Qianhong^{1,2}, CHEN Xiong^{1,2},

PENG Qinghua^{1*}, YAO Xiaolei^{1,2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Chenzhou Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chenzhou, Hunan 424499, China; 4. Shenzhen Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Shenzhen, Guangdong 518033, China

[Abstract] **Objective** To investigate the repair effects of Chufeng Yisun Decoction on corneal injury in rabbits and its

[收稿日期] 2024-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174443); 湖南省教育厅“芙蓉学者”奖励计划(2022 年); 湖南省卫生健康委高层次人才计划(2023 年); 湖南省眼疾病(中医)临床医学研究中心(2023SK4038); 湖南中医药大学一流学科开放基金(2021ZYX05)。

[通信作者] * 姚小磊, 男, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: yxlshh@126.com; 彭清华, 男, 博士, 教授、主任医师, 博士研究生导师, E-mail: pqh410007@126.com。

impact on autophagy related factors, as well as the expressions of TGF- β 1, and MMP-2. **Methods** A total of 84 New Zealand white rabbits were randomized into six groups, including blank group, model group, Chinese medicines group, autophagy promotion group, autophagy inhibition group, autophagy promotion+Chinese medicines group and autophagy inhibition+Chinese medicines group, with 12 rabbits in each group. Each group was further divided into three subgroups of four rabbits each, for observations and testing at 7, 14, and 28 days post-modeling. After establishing the animal model, the corneal condition and corneal fluorescein staining were observed on days 7, 14, and 28 in each group, and the corneal opacity score was recorded. A confocal laser scanning microscopy was used to observe the repair of the corneal stroma. Western blot was employed to determine the expressions of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), the ratio of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-II/I, and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the cornea. **Results** (1) Confocal laser scanning of the corneal stroma: Except for the blank group, all other groups showed fibroblast infiltration and collagen deposition in the cornea on day 7 post-modeling. Over time, the Chinese medicines group, autophagy promotion group, and autophagy promotion+Chinese medicines group exhibited reduced fibroblast and collagen deposition compared to the other groups; (2) Microscopic observation of rabbit corneas: The corneas of rabbits in the blank group were clear and transparent on days 7, 14, and 28. The corneas of rabbits in all other groups were hazy and stained with fluorescein on day 7, with the fluorescein staining area decreasing and corneal opacity gradually fading over time. Corneal opacity score showed that, compared with the model group, the autophagy inhibition and autophagy inhibition+Chinese medicines groups had higher scores on day 28 ($P<0.05$). (3) LC3-II/I: Compared with the model group, the LC3-II/I expression was higher in the Chinese medicines and autophagy promotion groups at all time points ($P<0.05$), while it was lower in the autophagy inhibition group ($P<0.05$). (4) TGF- β 1: Compared with the model group, the TGF- β 1 expression was lower in the Chinese medicines and autophagy promotion groups at all time points ($P<0.05$), while it was higher in the autophagy inhibition group ($P<0.05$). (5) MMP-2: Compared with the model group, the MMP-2 expression was lower in the Chinese medicines and autophagy promotion groups at all time points ($P<0.05$), while it was higher in the autophagy inhibition group ($P<0.05$). **Conclusion** Chufeng Yisun Decoction and lithium chloride can promote the healing of corneal injuries and help reduce scar formation, and their mechanisms involve promoting autophagy and regulating the levels of TGF- β 1 and MMP-2.

[**Keywords**] Chufeng Yisun Decoction; corneal injury; autophagy; microtubule-associated protein light chain 3; transforming growth factor- β 1; matrix metalloproteinase-2

角膜位于眼球结构最外层,易受到物理、化学、感染等外界因素的损伤,各种原因导致的角膜损伤,皆可使角膜过度纤维化而形成瘢痕,最终导致角膜盲。角膜混浊或角膜瘢痕在全球范围内影响超 1000 万人,是全球致盲的主要原因^[1]。在临床上,对于角膜瘢痕引起的视力障碍主要以角膜移植术为主要治疗手段,但手术风险高、价格昂贵,且存在术后移植排斥的风险^[2]。因此,寻找风险较小、经济的有效治疗方法来促进角膜损伤后修复及减少瘢痕形成至关重要。

角膜损伤修复过程是一个多因子参与的过程,现有的研究发现,转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β , TGF- β 1)在角膜修复过程中起重要的作用:能诱导伤口中成纤维细胞分化为不透明的肌成纤维细胞促进伤口愈合^[3];同时促使肌成纤维细胞分泌大量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM),其中 ECM 中的金属蛋白酶-2(matrix metallo-

proteinase-2, MMP-2)沉积^[4-5]。大量的肌成纤维细胞、MMP-2 的沉积能降低角膜透明度^[3],进而损害视力。而自噬过程存在于角膜损伤修复整个过程,当自噬体或者溶酶体活性降低,角膜组织中有害因素或者过剩因子及蛋白积累,最终导致角膜瘢痕^[6]。研究发现,氯化锂通过调节自噬水平来影响 TGF- β 1 的表达^[7]。因此,通过调节自噬活性来减少 TGF- β 1、MMP-2 的表达来抑制角膜瘢痕的形成。

中医学认为角膜损伤所产生的角膜瘢痕“翳”的范畴,《眼科秘诀·论退翳法》中“翳者,气血津凝而不行,结聚而成云翳”,归结为角膜气血津液运行失常是“翳”产生的病机,而外伤是导致气血津液运行失常最常见原因。中医学拥有庞大的药物资源,在眼表损伤的治疗中已取得良好的成效,除风益损汤便是代表之一。除风益损汤出自《原机启微》:“主治目为物所伤”为中医治疗眼部外伤的常用代表方剂。本方由熟地黄、当归、白芍、川芎、藁本、前胡、防风组成,

具有养血活血、祛风明目之功,现代常用于眼外伤及眼科术后,预防及治疗气血津液运行失常产生翳障的常用方剂,使用除风益损汤有助于调整气血运行,从而促进角膜的修复^[8-10]。故除风益损汤理论上可减少“翳”的形成。本实验将以新西兰大白兔为实验对象,从 TGF- β 1、MMP-2 以及自噬相关因子着手,研究除风益损汤是否有助于减少角膜损伤后瘢痕的形成,并探讨其机制,旨在为除风益损汤在角膜损伤中的应用提供理论依据和技术借鉴。

1 材料

1.1 动物

健康成年的普通级新西兰兔 84 只,雄性,体重 2.0~2.5 kg,许可证号:SCXK(湘)2020-0005,购自湖南太平生物科技有限公司。均在 20~25 °C 环境中以普通饲料喂养,本研究方案已通过湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批(编号:LL20210921001)。

1.2 药物配制

除风益损汤组成:熟地黄、当归、白芍药、川芎各 3 g;藁本、前胡、防风各 2.1 g,药物购自湖南中医药大学第一附属医院,厂家为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。

根据 NIE 等^[7]的报道,发现 20 mmol/L 氯化锂处理过的角膜基质细胞活性高,故将 0.84 g 氯化锂颗粒溶于 100 mL 生理盐水中用于角膜板层注射。0.5 mg/mL 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-Ma):将 5 mg 3-Ma 溶解于 10 mL 生理盐水中。

1.3 主要试剂与仪器

TGF- β 抗体、LC3 抗体、MMP-2 抗体(Proteintech,批号:21898-1-AP,14600-1-AP,10373-2-AP);氯化锂(阿法丁,批号:7447418);3-甲基腺嘌呤(MCE,批号:HY-19312);戊巴比妥钠(Sigma,批号:P3761);脱脂奶粉(伊利,批号:66196131T);三疏叔糖醇(Biosharp,批号:Amresco0281);SDS、甘油、甲醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:30166428、10010618、10014118);TEMED、Tris-Base、溴酚蓝、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、PMSF(Amresco,批号:Amresc00761、Exp2017/12、BO449-5G、Exp2016109、Amresc00172、329-98-6);PVDF 膜(Millipore,批号:IPVH00010);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)

(上海碧云天生物有限公司,批号:P0010S);电泳仪(Tanon,批号:EPS300);酶标仪(Thermo,批号:muLI-SKANMK3);4 °C 离心机(Eppendorf,批号:Centrifuge 5415R);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 $\times$ ~50 $\times$ 倍三目显微镜、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)。

2 方法

2.1 分组

取 84 只健康雄性新西兰大白兔,随机分为 7 组,每组 12 只,具体为空白组、模型组、中药组、自噬促进组、自噬抑制组、自噬促进+中药组、自噬抑制+中药组。分别供造模后 7、14、28 d 检测。

2.2 兔角膜损伤模型制备

根据所查阅文献及临床基础,参照 CONNON^[11]及徐路星^[12]的方法,对于造模方式进行改良,予空白组不做处理,其他组制作成兔角膜损伤动物模型。造模方法:将新西兰大白兔固定于兔固定箱中,剔除双耳及双眼周围毛发,充分暴露耳缘静脉及眼周皮肤,将 10%戊巴比妥钠溶液以耳缘静脉注射的方式麻醉白兔,待白兔麻醉后置其于干净手术台,常规消毒铺巾,以奥布卡因滴眼剂滴眼表面麻醉 3 次。在显微镜下使用 6 mm 的角膜环钻在角膜中央进行旋转按压,留下直径约 6 mm 的圆形印迹,使用 2.8 mm 月形隧道刀剔除角膜厚度约 100 μ m,造成直径为 6 mm,深度为 100 μ m 左右的圆形角膜创面。

2.3 干预方法

造模完成后,空白组、模型组不做特殊干预。参照由新英^[13]的方法稍作改良,使用 32G 注射针头在自噬促进组、自噬促进+中药组角膜的 3 点、6 点、9 点、12 点位置注射 20 mmol/L 氯化锂溶液,每个方位注射 0.05 mL。使用 32G 注射针头在自噬抑制组和自噬抑制+中药组角膜的 3 点、6 点、9 点、12 点位置注射 0.5 mg/mL 的 3-MA 溶液,每个方位注射 0.05 mL。术后均予以左氧氟沙星凝胶抗感染。中药组、自噬促进+中药组、自噬抑制+中药组每天予以中药汤剂灌胃 5 mL。

2.4 观测指标

分别在造模后第 7、14、28 天对白兔进行角膜激光共焦断层扫描仪检查、高倍显微镜眼前段观察。之后处死动物,剪取角膜组织低温保存以供 Western blot 检测。

2.4.1 角膜激光共焦断层扫描仪检查 在造模 7、14、28 d 后,对新西兰大白兔进行激光共焦断层扫描仪检查。将新西兰大白兔置于兔固定箱中并放于稳定平台,予以奥布卡因滴眼剂滴眼进行表面麻醉 3 次。将左氧氟沙星凝胶涂于角膜显微镜镜头表面,盖上无菌接触帽。将兔头固定,并贴近于激光共焦断层扫描仪的激光摄像头。调整激光头位置,使激光摄像头光束位于角膜损伤病灶区域后向前缓慢推进激光摄像头。当前接触帽与角膜之间相距 5~10 mm 时,再缓慢调整激光摄像头的位置,让角膜接触帽中央对准角膜激光束反射光点。然后缓慢旋转推进激光摄像头,让角膜与角膜接触帽之间保持一种轻微的接触。系统上设定焦距平面为 0,拧动激光扫描旋钮改变焦平面,观察并采集不同深度的角膜图像。

2.4.2 高倍显微镜眼前段观察 在造模 7、14、28 d 后,对新西兰大白兔进行高倍显微镜观察。将新西兰大白兔置于兔固定箱中并放于稳定平台。予以奥布卡因滴眼剂进行表面麻醉 3 次后放开睑器。调整显微镜位置,使视野落于角膜表面,充分暴露角膜及角膜创面区域。调整显微镜焦距,观察兔角膜并采集图像。然后用 2% 荧光素钠滴眼液对兔角膜进行染色,显微镜转换为钴蓝色灯,调整显微镜焦距,观察并采集图像。

2.4.3 角膜混浊评分来评估角膜瘢痕的程度 在造模 7、14、28 d 后,对 7 组新西兰大白兔进行裂隙灯生物显微镜观察下观察角膜混浊及基本情况临床评分,临床评分根据 SHARMA 等^[14]和 FANTES 等^[15]报道的量表进行分级,评分细则及具体标准。详见表 1。

2.4.4 Western blot 检测 TGF- β 1、LC3-II/I、MMP-2 蛋白表达 准备 1 $\times$ TBST、10 $\times$ 电泳缓冲液、10 $\times$ 电转缓冲液、5% 牛奶封闭液,使用 RIPA 强裂解液稀释 PMSF,配制裂解液,按每 60 mg 组织粉末加入 150 μ L RIPA 裂解液振荡混匀后放入冰盘上,摇床上摇 1 h。将裂解溶液放入 4 $^{\circ}$ C 的低温冰箱中 12 000 r/min 离心 5 min,取上清进行蛋白定量。采

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

用上海碧云天生物有限公司 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。将不同浓度蛋白上样、电泳、转膜、封闭,加入对应的一抗在摇床孵育一夜。第 2 天回收一抗,清洗后加入对应的二抗,室温孵育 2 h。洗去多余二抗,制备 AB 液,加入 AB 混合液,用化学发光成像系统曝光 30/60,观察结果并保存图片。

2.5 统计学分析

应用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。定量结果采用“ $\bar{x}\pm s$ ”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 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 角膜基质激光共焦断层扫描结果

空白组在 3 次测量时间点皆显示角膜基质层的基质细胞分布均匀,细胞呈椭圆状、细胞核高反光,细胞间网状连接,细胞间未见胶原沉积。模型组在造模后第 7 天显示基质细胞密度降低并被细长状成纤维细胞代替并伴有炎症细胞浸润,细胞间联系模糊;在第 14 天时,角膜基质见成纤维细胞浸润;第 28 天时,基质层见大量肌成纤维细胞及胶原沉积。中药组在造模 7 天后显示基质中有成纤维细胞浸润;第 14 天可见成纤维细胞及胶原沉积,第 28 天可见少量成纤维细胞浸润及胶原沉积。自噬促进组在造模第 7 天时可见少许炎症细胞、成纤维细胞;第 14 天可见少许成纤维细胞;第 28 天可见少量成纤维细胞及胶原沉积。自噬抑制组在造模后第 7 天可见基质细胞密度降低,可见瘢痕;第 14 天可见大量成纤维细胞及胶原沉积;第 28 天可较多胶原沉积。

自噬促进+中药组在造模第 7 天基质细胞密度较低,少量胶原沉积;第 14 天可基质中少量成纤维细胞浸润;第 28 天可见少量成纤维细胞及胶原沉积。自噬抑制+中药组在造模第 7 天可见大量成纤维细胞及炎症细胞浸润;第 14 天可见基质间存在成纤维细胞及少量胶原沉积;第 28 天可见成纤维细胞及肌成纤维细胞,角膜见褶皱现象。详见图 1。

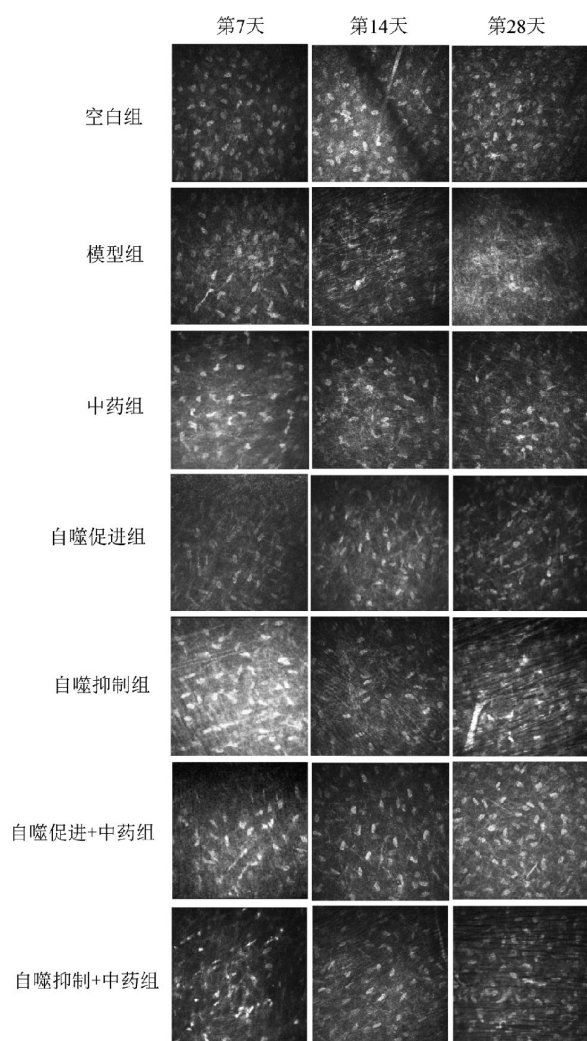


图 1 各组白兔各时间段角膜浅层基质变化($\times 800$)

Fig.1 Changes in the superficial stroma of cornea in each group of white rabbits at different time periods ($\times 800$)

3.2 显微镜眼前节形态表现

3.2.1 显微镜下角膜情况 空白组角膜在第 7、14、28 天皆清晰透明。其余各组第 7 天均出现角膜混浊,角膜不平整呈半透明状,荧光素着染,随着时间推移荧光素着染范围缩小,角膜混浊逐渐消退。在第 28 天,各组荧光素着染范围较第 7 天减小,角膜混浊减轻。其中,模型组角膜表层不均匀,角膜混浊伴有轻微的荧光着染,中药组及自噬促进组在角膜

混浊程度较模型组轻,可模糊透见虹膜纹理。自噬促进+中药组角膜混浊程度较其余各组明显减轻,可模糊透见虹膜纹理。自噬抑制组在建模后第 7、14、28 天角膜出现质地不均匀的混浊,不能窥见虹膜结构,尤其在第 28 天时角膜中央可见新生血管蔓延,中央周围可见不均匀的角膜瘢痕。自噬抑制+中药组在建模后第 28 天角膜混浊程度接近于模型组。详见图 2。

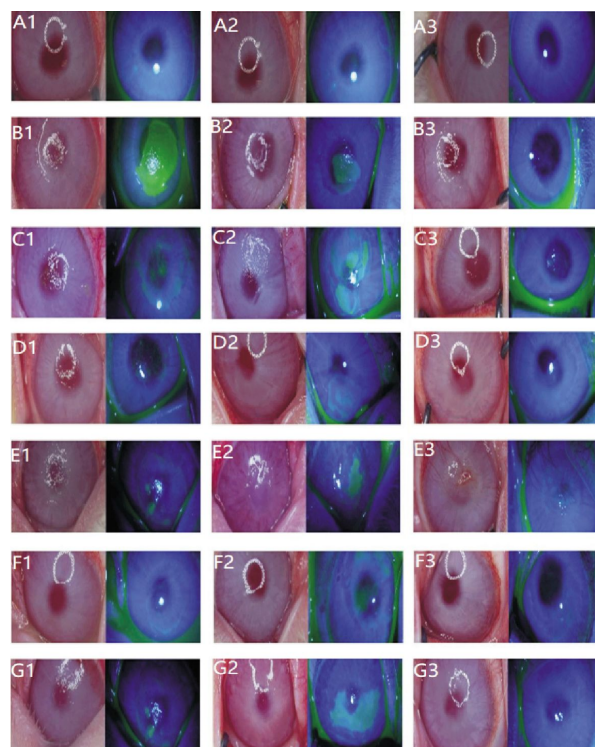


图 2 各组白兔各时间段角膜混浊及荧光染色情况($\times 1.5$)

Fig.2 Corneal opacity and fluorescent staining in each group of white rabbits at different time periods ($\times 1.5$)

注:A 为空白组;B 为模型组;C 为中药组;D 为自噬促进组;E 为自噬抑制组;F 为自噬促进+中药组;G 为自噬抑制+中药组;1 为第 7 天;2 为第 14 天;3 为第 28 天。

3.2.2 角膜混浊评分 与空白组比较,模型组在造模后第 7、14、28 天的角膜混浊程度均有升高($P < 0.05$)。与模型组相比较,自噬促进+中药组在造模后第 7、14、28 天角膜混浊程度均均有降低($P < 0.05$),而自噬抑制组在造模后第 7、14、28 天的角膜混浊明显高于模型组($P < 0.05$)。详见表 2。

3.3 Western blot 检测 TGF- $\beta 1$ 、LC3、MMP-2 相关蛋白表达

与空白组相比,各时间段模型组 LC3-II/I 蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比,各时间段中药组、自噬促进组 LC3-II/I 表达均升高($P < 0.05$),

表 2 建模后各组白兔角膜混浊比较($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 2 Comparison of corneal opacity among different groups of white rabbits after modeling

组别	造模第 7 天	造模第 14 天	造模第 28 天
空白组	0.13±0.25	0.13±0.25	0.13±0.25
模型组	1.75±0.50 ^a	1.75±0.50 ^a	1.75±0.50 ^a
中药组	1.75±0.50 ^a	1.75±0.50 ^a	1.75±0.50 ^a
自噬促进组	1.25±0.50 ^a	1.25±0.50 ^a	1.25±0.50 ^a
自噬抑制组	2.50±1.00 ^{ad}	2.50±1.00 ^{adcl}	2.50±1.00 ^{adcl}
自噬促进+中药组	0.88±0.25 ^{bcd}	0.88±0.25 ^{bde}	0.88±0.25 ^{bde}
自噬抑制+中药组	2.00±0.00 ^{ef}	2.00±0.00 ^{acdef}	2.00±0.00 ^{acdef}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与中药组比较,^c $P<0.05$;与自噬促进组比较,^d $P<0.05$;与自噬抑制组比较,^e $P<0.05$;与自噬促进+中药组比较,^f $P<0.05$ 。

自噬抑制组表达降低($P<0.05$)。与中药组相比,各时间段自噬促进+中药组 LC3-II/I 表达较高($P<0.05$),自噬抑制+中药组表达较低($P<0.05$)。

与空白组相比,各时间段模型组 TGF- β 1、MMP-2 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,各时

间段中药组、自噬促进组 TGF- β 1、MMP-2 蛋白表达均较低($P<0.05$),自噬抑制组表达较高($P<0.05$)。与中药组对比,各时间段自噬促进+中药组 TGF- β 1、MMP-2 蛋白表达降低($P<0.05$),自噬抑制+中药组 TGF- β 1、MMP-2 蛋白表达升高($P<0.05$)。详见图3—4。

4 讨论

角膜损伤修复过程是一个由胶原蛋白、糖胺聚糖、基质金属蛋白酶等多因子参与的过程^[3]。而 MMP-2 作为 MMPs 重要成员之一,在该过程中发挥重要作用。当角膜基质受到创伤后,在创伤区周围激活的角膜基质细胞会进行凋亡来防止在角膜损伤修复过程中有害因素对周围角膜组织结构产生不良影响^[16]。部分激活的角膜基质细胞会在 TGF- β 1 等作用下分化为角膜成纤维细胞并迁移至损伤区域,在 TGF- β 1 的作用下诱导成纤维细胞向不透明的肌成纤维细胞转化并促进 ECM 分泌^[5]。角膜基质混

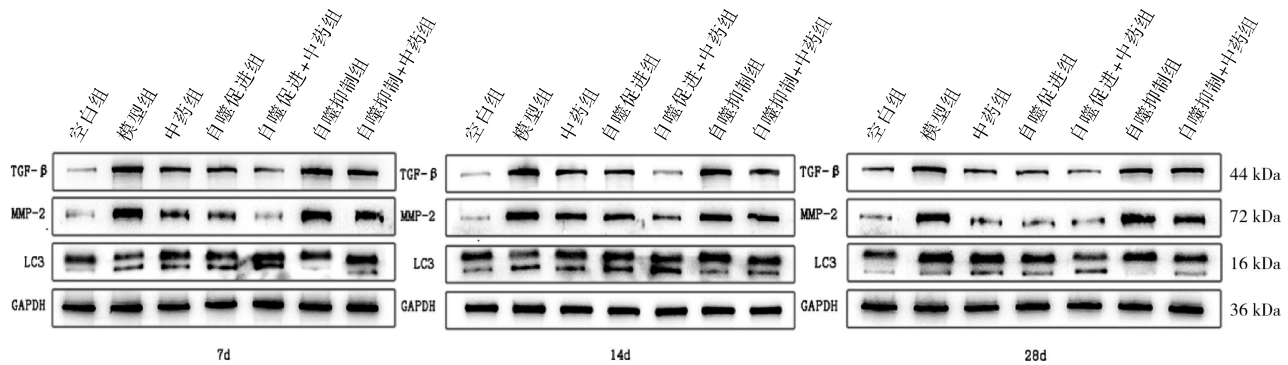


图 3 第 7、14、28 天各组 LC3-II/LC3-I、TGF- β 1、MMP-2 蛋白条带图

Fig.3 Protein bands of LC3-II/LC3-I, TGF- β 1, and MMP-2 in each group on days 7, 14, and 28

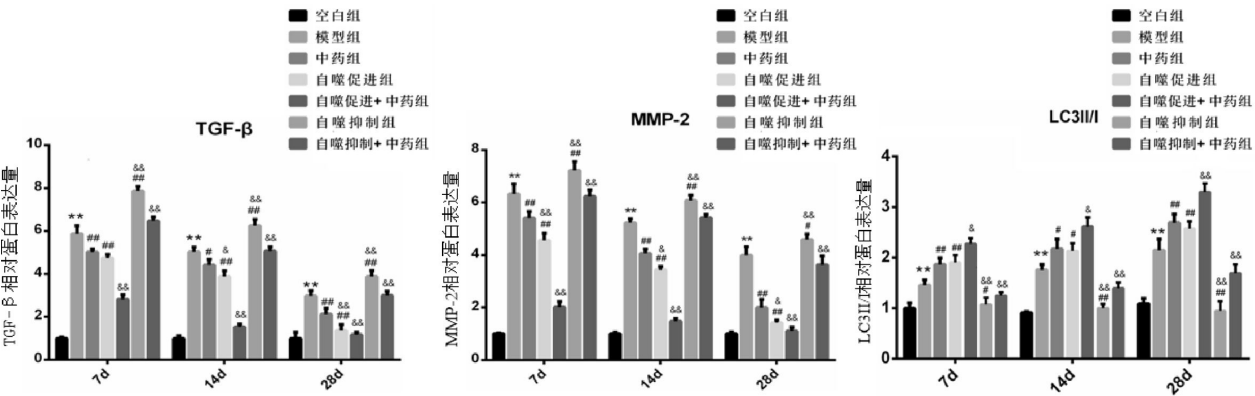


图 4 第 7、14、28 天各组白兔 LC3-I/II、TGF- β 1、MMP-2 蛋白表达量比较图

Fig.4 Comparison charts of LC3-I/II, TGF- β 1, and MMP-2 protein expression levels among different groups of white rabbits on days 7, 14, and 28

注:与空白组相比,^{**} $P<0.05$;与模型组相比,^{##} $P<0.05$;与中药组相比,^{△△} $P<0.05$ 。

浊/瘢痕主要是 ECM 的沉积以及肌成纤维细胞存在的结果^[17]。当组织修复到一定程度,成纤维细胞开始凋亡,肌成纤维细胞侵袭并充满创伤处最终形成瘢痕,经过数月或数年的修复,规则正常的 ECM 逐渐取代肌成纤维细胞及其产生的混浊 ECM^[18]。该过程中肌成纤维细胞也会向成纤维细胞转化,异常 ECM 被重吸收,角膜细胞重新组成基质,角膜透明度逐渐恢复^[19]。角膜伤口愈合过程中基质中 ECM 沉积过多和出现异常的肌成纤维细胞,将会产生角膜瘢痕,自噬可能有助于减少或清除多余的 ECM 来减轻瘢痕增生。有研究报道,在角膜疾病中角膜成纤维细胞中的蛋白质如 LC3A/B 和 LAMP-1 在角膜伤口表达增加^[20],氯化锂原本是一种广泛应用于精神和神经系统疾病的治疗药物,近期发现氯化锂能在一定程度上促进自噬^[21-22],CHOI 等^[23],发现氯化锂能增加角膜基质中成纤维细胞 LC3II/I 的比例,同时还 TGF- β 1 的表达随着氯化锂的浓度增加而减少。常鸣^[24]等在使用哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路抑制剂雷帕霉素作用于小鼠角膜瘢痕后发现,自噬水平的提高降低角膜成纤维细胞转化为肌成纤维细胞的标志 α -SMA 的表达,以及 TGF- β 1 的表达^[24],从而减轻角膜瘢痕。

角膜归属于中医学黑睛范畴,黑睛常暴露于外,易受外伤及邪毒侵袭,络脉受损,目珠流失气血,致气血不足、瘀血留滞,风热邪气乘虚而入,留存于黑睛致气机郁滞^[25]。《伤科汇纂·外邪篇》言“大凡伤损症,有外邪乃乘虚而入”,并且《原机启微·卷二》曰“翳之所生,多因风热不制”,说明角膜损伤后易感风热之邪。《眼科秘诀·论退翳法》载:“翳者,气血津凝而不行,结聚而成云翳。”综合认为,角膜损伤所产生的翳证的病机为气血失和,风热侵袭。除风益损汤由四物汤加藁本、前胡、防风组成,方中四物汤补血养血、活血明目,配合藁本、前胡、防风祛风散邪,使得全方补血而不滞、行血而不过。诸药合用,养血活血、祛风明目,促使气血得以畅达目窍用以疗养。

本研究发现,眼前节照相及角膜荧光素染色、角膜混浊评分中,随着时间推移,实验兔在中药除风益损汤剂灌胃治疗和 LiCl 板层角膜注射治疗及联合治疗对比模型组角膜混浊程度较轻,虹膜纹理更为清晰。而通过 3-MA 板层角膜注射治疗对比模型组角膜混浊程度更重,虹膜纹理模糊。以上说明除

风益损汤和 LiCl 板层角膜注射对兔角膜损伤修复有促进作用,且提高自噬水平能促进角膜损伤修复。通过激光共焦断层扫描在不同时间进行观察,发现模型组在造模第 7、14 天时间段内存在炎症细胞及大量成纤维细胞浸润,造模 28 d 可见成纤维细胞浸润及胶原沉积,而中药组、自噬促进组、自噬促进+中药组成纤维细胞浸润、胶原沉积少,而自噬抑制组对比模型组胶原沉积更多。以上说明成纤维细胞浸润和 LiCl 板层角膜注射能减少成纤维细胞的转化,减轻胶原沉积从而减轻角膜瘢痕。在 Western blot 检测发现实验兔 LC3- II/I 随时间推移升高,本实验中自噬促进+中药组 LC3- II/I 表达明显高于各建模组,中药组、自噬促进组中 LC3- II/I 较模型组高说明除风益损汤和 LiCl 板层角膜注射能促进角膜自噬水平。而 TGF- β 1、MMP-2 表达在自噬促进+中药组、中药组、自噬促进组中均低于模型组,且随着时间的推移而减少,而自噬抑制组 TGF- β 1、MMP-2 表达高于模型组,这与 XU 等^[26]在角膜损伤予以治疗后 MMP-2 降低相似,由此可知除风益损汤和 LiCl 板层角膜注射能减少 TGF- β 1、MMP-2 表达,从而减少角膜瘢痕。与空白组相比,模型组 TGF- β 1、MMP-2 蛋白在各时间段表达均升高,TGF- β 1、MMP-2 增加以促进角膜瘢痕的形成完成角膜基质的重塑,自噬增加以清除多余的 ECM,抑制炎症反应。与模型组相比,中药组和自噬促进组在 3 个时间段的 LC3- II/I 蛋白表达升高,TGF- β 1、MMP-2 蛋白表达降低。提示除风益损汤和氯化锂可增加角膜中的自噬效应,自噬活性的升高帮助角膜恢复正常的 ECM,限制细胞应激。同时降低 TGF- β 1、MMP-2 减少瘢痕的形成。相反,自噬抑制组与模型组相比,各时间段 LC3- II/I 表达降低,TGF- β 1、MMP-2 表达升高,提示 3-MA 降低了角膜中的自噬,细胞持续处于应激状态,不利于角膜透明度的恢复和伤口的愈合。与中药组相比,各时间段自噬促进+中药组增加自噬更明显,降低 TGF- β 1 与 MMP-2 的效果也更加显著,自噬抑制+中药组则相反,提示促进自噬有利于除风益损汤发挥更好的修复角膜的作用。

综上所述,角膜损伤后可以调控 TGF- β 1、MMP-2 和自噬水平来影响角膜愈合及瘢痕的形成。本实验通过宏观和微观的观察角度,以及分子水平的检

测检测,发现除风益损汤、氯化锂对于角膜损伤愈合起到促进作用,并能减少瘢痕形成,其机制可通过促进自噬和调控 TGF- β 1、MMP-2 的水平来实现,二者合用效果更佳。

参考文献

- [1] FLAXMAN S R, BOURNE R R A, RESNIKOFF S, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: A systematic review and meta-analysis[J]. The Lancet Global Health, 2017, 5(12): e1221–e1234.
- [2] MATHEWS P M, LINDSLEY K, ALDAVE A J, et al. Etiology of global corneal blindness and current practices of corneal transplantation: A focused review[J]. Cornea, 2018, 37(9): 1198–1203.
- [3] ZAHIR-JOUZDANI F, SOLEIMANI M, MAHBOD M, et al. Corneal chemical burn treatment through a delivery system consisting of TGF- β 1 siRNA: in vitro and in vivo[J]. Drug Delivery and Translational Research, 2018, 8(5): 1127–1138.
- [4] 张露, 李霞. TGF- β 在角膜损伤修复中的时间和空间分布[J]. 眼科新进展, 2017, 37(2): 184–188.
- [5] 靳荷, 李霞. TGF- β 在角膜瘢痕形成及无瘢痕愈合中的作用[J]. 眼科新进展, 2014, 34(11): 1087–1090.
- [6] KEMPURAJ D, MOHAN R R. Autophagy in extracellular matrix and wound healing modulation in the Cornea[J]. Biomedicine, 2022, 10(2): 339.
- [7] NIE D Y, PENG Y, LI M, et al. Lithium chloride (LiCl) induced autophagy and downregulated expression of transforming growth factor β -induced protein (TGFB1) in granular corneal dystrophy[J]. Experimental Eye Research, 2018, 173: 44–50.
- [8] 蒋鹏飞, 彭俊, 陈向东, 等. 除风益损汤加减治疗眼内异物取出术后 18 例[J]. 现代中医药, 2020, 40(1): 104–107.
- [9] 黄根山. 除风益损汤辅治青光眼白内障联合术后并发症疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2021, 37(8): 1362–1364.
- [10] 王龙龙, 宋若会, 孟磊, 等. 除风益损汤加减方对翼状胬肉术后眼表损伤修复的作用探究[J]. 中医药临床杂志, 2024, 36(3): 570–574.
- [11] CONNOR 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.
- [12] 徐路星. 兔角膜穿通伤早期上皮基底膜再生及其对角膜基质纤维化的调控作用[D]. 南宁: 广西医科大学, 2020.
- [13] 由新英. 角膜病灶层切除联合术中基质内注射 0.2% 氟康唑治疗真菌性角膜溃疡[D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [14] SHARMA A, MEHAN M M, SINHA S, et al. Trichostatin a inhibits corneal haze in vitro and in vivo[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009, 50(6): 2695–2701.
- [15] FANTES F E, HANNA K D, WARING G O 3rd, et al. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys[J]. Archives of Ophthalmology, 1990, 108(5): 665–675.
- [16] MARTIN L M, JEYABALAN N, TRIPATHI R, et al. Autophagy in corneal health and disease: A concise review[J]. The Ocular Surface, 2019, 17(2): 186–197.
- [17] ESPANA E M, BIRK D E. Composition, structure and function of the corneal stroma[J]. Experimental Eye Research, 2020, 198: 108137.
- [18] 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.
- [19] 杨怡, 牛阳, 袁玲. 人角膜基质细胞的表型研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2022, 40(9): 874–879.
- [20] MARTÍNEZ-CHACÓN G, VELA F J, CAMPOS J L, et al. Autophagy modulation in animal models of corneal diseases: A systematic review[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2020, 474(1/2): 41–55.
- [21] HUANG L, YIN X, CHEN J, et al. Lithium chloride promotes osteogenesis and suppresses apoptosis during orthodontic tooth movement in osteoporotic model via regulating autophagy[J]. Bioactive Materials, 2021, 6(10): 3074–3084.
- [22] XIAO Y N, FAN M Y, JIN W, et al. Lithium chloride ameliorated spatial cognitive impairment through activating mTOR phosphorylation and inhibiting excessive autophagy in the repeated cerebral ischemia–reperfusion mouse model[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020, 20(5): 109.
- [23] CHOI S I, KIM B Y, DADAKHUJAEV S, et al. Inhibition of TGFB1p expression by lithium: Implications for TGFB1-linked corneal dystrophy therapy[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2011, 52(6): 3293–3300.
- [24] 常鸣, 贺司宇, 岳娟, 等. mTOR 通路抑制剂雷帕霉素对真菌性角膜炎小鼠角膜瘢痕化的影响[J]. 眼科新进展, 2020, 40(6): 520–523.
- [25] 李江伟, 姚小磊, 彭俊, 等. 彭清华教授运用宣散退翳法治疗外伤性角膜损伤术后经验[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1627–1631.
- [26] XU X Y, LIU T X, LI H X. Effect of collagen cross-linking on alkali burn-induced corneal neovascularization in rabbits[J]. Journal of Ophthalmology, 2018, 2018: 7325483.

(本文编辑 苏维)