

本文引用: 赵盼, 钟缘, 黎冬冬, 龙达, 彭清华. 基于 NLRP3/Caspase-1 信号通路探讨除风益损汤对 PM_{2.5} 诱导干眼的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(9): 1783-1790.

基于 NLRP3/Caspase-1 信号通路探讨除风益损汤对 PM_{2.5} 诱导干眼的作用机制

赵盼^{1,2}, 钟缘^{1,2}, 黎冬冬¹, 龙达^{3*}, 彭清华^{1,2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病与视功能保护工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208; 3. 上海市第六人民医院, 上海 200233

〔摘要〕 **目的** 探讨除风益损汤通过调控核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)/胱天蛋白酶-1(Caspase-1)信号通路对细颗粒物(PM_{2.5})诱导干眼小鼠模型的作用。**方法** 将小鼠随机分成空白组(NC 组, 10 只)和造模组(30 只), 造模组予以双眼局部滴注 PM_{2.5} 悬浮液(5 mg·mL⁻¹)28 d 进行造模, 造模成功后再随机分为模型组(PM_{2.5} 组)、除风益损汤组(CFYSD 组)、NLRP3 抑制剂组(MCC950 组), 每组 10 只。CFYSD 组予以除风益损汤(7.3 g·kg⁻¹)灌胃, MCC950 组予以 MCC950(10 mg·kg⁻¹)腹腔注射, NC 组和 PM_{2.5} 组予以等量蒸馏水灌胃。给药 28 d 后, 检测各组小鼠泪液分泌量、泪膜破裂时间(TBUT)、角膜荧光染色评分, 后进行取材。HE 染色观察角膜组织病理变化, ELISA 检测血清活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶 2(SOD2)水平, Western blot 及 qPCR 检测角膜组织 NLRP3、Caspase-1、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18 的蛋白及 mRNA 表达水平。**结果** 与 NC 组相比, PM_{2.5} 组泪液分泌量减少、TBUT 缩短、角膜荧光染色评分增加($P<0.05$); 血清 ROS、MDA 水平升高, SOD2 水平下降($P<0.05$); 角膜组织 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 的蛋白及 mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。与 PM_{2.5} 组相比, CFYSD 组和 MCC950 组泪液分泌量增加、TBUT 延长、角膜荧光染色评分下降($P<0.05$); 血清 ROS、MDA 水平下降, SOD2 水平升高($P<0.05$); 角膜组织 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 的蛋白及 mRNA 表达水平下降($P<0.05$)。HE 染色结果显示, NC 组小鼠角膜组织各层结构清晰, 未见异常; 与 NC 组相比, PM_{2.5} 组小鼠角膜上皮细胞增生, 细胞排列紊乱; 与 PM_{2.5} 组相比, MCC950 组与 CFYSD 组小鼠在角膜结构完整性和细胞形态方面明显改善。**结论** 除风益损汤能增加 PM_{2.5} 诱导干眼小鼠模型的泪液分泌量、延长 TBUT、减轻角膜组织病理改变, 其作用机制可能为抑制氧化应激过程及 NLRP3/Caspase-1 信号通路的激活, 干预 NLRP3 炎症小体组装, 减少 IL-1 β 、IL-18 等促炎性细胞因子的成熟与释放, 从而调控炎症反应, 最终缓解干眼症状。

〔关键词〕 干眼; PM_{2.5}; 氧化应激; 除风益损汤; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; 胱天蛋白酶-1

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.09.005

Mechanism of action of Chufeng Yisun Decoction on PM_{2.5}-induced dry eye via the NLRP3/Caspase-1 signaling pathway

ZHAO Pan^{1,2}, ZHONG Yuan^{1,2}, LI Dongdong¹, LONG Da^{3*}, PENG Qinghua^{1,2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Engineering Technology Research Center for the Prevention and Treatment of Otorhinolaryngologic Diseases and Protection of Visual Function with Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the effects of Chufeng Yisun Decoction on a mouse model of dry eye induced by fine

〔收稿日期〕 2026-03-20

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81574031); 湖南省药食同源功能性食品工程技术研究中心开放基金项目(2018YSTY04); 湖南省教育厅科学研究项目(21A0238, 22A0241, 23A0300); 湖南中医药大学 2021 年“刘良院士工作站”指导项目(21YS002)。

〔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; 龙达, 女, 博士, 主任医师, E-mail: cajcajlongda@yeah.net。

particulate matter (PM_{2.5}) through regulation of the NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3(NLRP3)/cysteine aspartate specific protease-1 (Caspase-1) signaling pathway. **Methods** Mice were randomly divided into blank group (NC group, 10 mice) and modeling group (30 mice). The modeling group received topical instillation of PM_{2.5} suspension (5 mg·mL⁻¹) in both eyes for 28 d to establish the model. After successful modeling, the mice were randomly divided into model group (PM_{2.5} group), Chufeng Yisun Decoction group (CFYSD group), and NLRP3 inhibitor group (MCC950 group), with 10 mice in each group. The CFYSD group was administered Chufeng Yisun Decoction (7.3 g·kg⁻¹) by gavage, the MCC950 group was administered MCC950 (10 mg·kg⁻¹) by intraperitoneal injection, and the NC group and PM_{2.5} group were administered an equal volume of distilled water by gavage. After 28 d of administration, the tear secretion volume, tear film breakup time (TBUT), and corneal fluorescein staining score of mice in each group were measured, after which samples were collected. HE staining was used to observe pathological changes in corneal tissue; ELISA was used to determine serum levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase 2 (SOD2); and Western blot and qPCR were used to measure the protein and mRNA expression levels of NLRP3, Caspase-1, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), interleukin (IL)-1 β , and IL-18 in corneal tissue. **Results** Compared with the NC group, the PM_{2.5} group showed decreased tear secretion volume, shortened TBUT, and increased corneal fluorescein staining score ($P<0.05$); increased serum ROS and MDA levels and decreased SOD2 level ($P<0.05$); and increased protein and mRNA expression levels of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , and IL-18 in corneal tissue ($P<0.05$). Compared with the PM_{2.5} group, the CFYSD group and MCC950 group showed increased tear secretion volume, prolonged TBUT, and decreased corneal fluorescein staining score ($P<0.05$); decreased serum ROS and MDA levels and increased SOD2 level ($P<0.05$); and decreased protein and mRNA expression levels of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , and IL-18 in corneal tissue ($P<0.05$). HE staining results showed that the corneal tissue of mice in the NC group had clear structures in all layers with no abnormalities; compared with the NC group, mice in the PM_{2.5} group showed proliferation of corneal epithelial cells with disorganized cell arrangement; compared with the PM_{2.5} group, mice in the MCC950 group and CFYSD group showed marked improvement in corneal structural integrity and cell morphology. **Conclusion** Chufeng Yisun Decoction can increase tear secretion volume, prolong TBUT, and alleviate pathological changes in corneal tissue in a mouse model of PM_{2.5}-induced dry eye. Its mechanism of action may involve inhibiting oxidative stress and activation of the NLRP3/Caspase-1 signaling pathway, interfering with NLRP3 inflammasome assembly, and reducing the maturation and release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18, thereby regulating the inflammatory response and ultimately alleviating dry eye symptoms.

[**Keywords**] dry eye disease; PM_{2.5}; oxidative stress; Chufeng Yisun Decoction; NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; cysteine aspartate specific protease-1

干眼是由多因素作用引发的慢性眼表疾病,其核心特征在于泪膜稳定性下降及眼表微环境失调,进而诱发眼表炎症、组织损伤及神经异常^[1]。干眼诱因众多,除年龄及全身性疾病(如免疫系统疾病、糖尿病)外,环境因素的影响也日渐突出^[2]。细颗粒物(particulate matter 2.5, PM_{2.5})是主要的大气污染物之一,其空气动力学直径小于或等于 2.5 μm ,主要来源于燃料燃烧,成分复杂,含有大量有机物(如苯并芘和多环芳烃)及无机成分[如硫酸盐、硝酸盐和重金属(如铅和镍)等],可引起全身多系统疾病^[3]。流行病学调查及临床队列研究提示,PM_{2.5}暴露可造成眼表损伤,导致干眼发生^[4-5]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)/胱天蛋白

酶-1(cysteine aspartate specific protease-1, Caspase-1)信号通路被认为是PM_{2.5}暴露导致眼表疾病的重要机制之一^[6]。PM_{2.5}通过激活氧化应激及NLRP3/Caspase-1信号通路,促进白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-18的释放,进一步诱导角膜上皮细胞的炎症及细胞毒性反应,导致干眼症状加重^[7]。

除风益损汤源于倪维德的《原机启微》,主治“目为物所伤者”,是中医眼科治疗各类眼外伤的经典名方^[8]。PM_{2.5}在中医病因上属于外邪范畴,侵袭眼表导致干眼本质上属于异物伤眼,与术后干眼发病机制类似。本研究团队前期通过网络药理学、体内及体外实验研究发现,除风益损汤可通过多成分、多靶点、多通路修复角膜损伤^[9]。同时,药理学研究表明,其核心活性成分包括山柰酚、汉黄芩素、槲皮素、芍

药苷等,具有良好的抗氧化、抗炎作用^[10],与 PM_{2.5} 诱导干眼的关键病理特点相符,说明除风益损汤可能是治疗 PM_{2.5} 诱导干眼的经方,但尚未证实。

目前,干眼模型的主要制备方法包括药物(如苯扎氯铵)诱导、去泪腺诱导、去势诱导、环境干燥等^[11],其病理过程与 PM_{2.5} 暴露所致干眼存在本质差异。因此,本研究以 PM_{2.5} 诱导的干眼小鼠模型为研究对象,以除风益损汤为干预方式,探讨其对 PM_{2.5} 诱导干眼模型氧化应激及 NLRP3/Caspase-1 通路的调控作用,从分子水平揭示其抗氧化、抗炎作用,为环境污染相关眼表疾病的防治提供实验基础。

1 材料

1.1 实验动物

健康 SPF 级 8 周龄 C57 BL/6J 雌性小鼠 40 只,体质量 18~20 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(合格证号:430727221101837074)。本实验方案经湖南中医药大学实验动物中心伦理委员会批准(伦理批准号:LL2022072704)。

1.2 实验药材

除风益损汤药材购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,药物组成:前胡 10 g,当归 10 g,熟地黄 10 g,芍药 10 g,川芎 5 g,防风 10 g,藁本 10 g。药材经湖南中医药大学药学院夏新华教授鉴定,符合 2020 年版《中华人民共和国药典》相关要求。每剂饮片加水 300 mL,微火煎煮 2 次,每次煎煮 1 h,将 2 次煎液合并、过滤并浓缩至 30 mL,此时按生药量计算,药液浓度为 2.167 g·mL⁻¹。按体表面积换算公式^[12],将人临床剂量换算成小鼠等效剂量,得小鼠每日给药剂量为 7.3 g·kg⁻¹。

1.3 主要试剂

PM_{2.5}(上海泷悦湾生物科技有限公司,货号:BYNT-1649);荧光素钠液(天津晶明新技术开发有限公司,批号:20172200300);伊红、苏木素(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:AWB0136、AWI0001a);活性氧(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 2(superoxide dismutase 2, SOD2)ELISA 试剂盒(上海仁捷生物科技有限公司,批号:202307、202308、202308);MCC950(山东思科捷生物技术有限公司,货号:SJ-MX0058B);RIPA 裂解液、山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG(中国Abiow-

ell公司,货号:AWB0136、AWS0001、AWS0002);NLRP3、Caspase-1、IL-18 抗体(美国 Proteintech 公司,货号:27458-1-AP、22915-1-AP、10663-1-AP);凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、IL-1 β 抗体(英国 Abcam 公司,货号:ab307560、ab283818)。

1.4 主要仪器

显微镜(瑞士 HAAG-STREIT 公司,型号:H1650R);荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司,型号:PIKO-REAL96);电泳仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-2C);石蜡切片机(德国 Leica 公司,型号:YD-315);多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:MB-530);转膜仪(北京其林贝尔仪器制造有限公司,型号:L-901);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope6100)。

2 方法

2.1 动物造模及分组

将小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为空白组(NC 组,10 只)和造模组(30 只)。造模组予以双眼局部滴注 1 滴 5 mg·mL⁻¹ PM_{2.5} 悬浮液(将 10 mg PM_{2.5} 溶解于 2 mL 无菌的 PBS 中,用超声旋涡处理使其分布均匀,封盖标记后放置于 4 °C 冰箱内保存),每天 4 次,同一人操作,持续 28 d,构建 PM_{2.5} 诱导干眼小鼠模型^[13]。造模成功标准:泪液分泌试验(Schirmer I test, SIT)≤5.5 mm,泪膜破裂时间(tear break-up time, TBUT)≤4 s^[14]。筛选出符合模型标准的小鼠随机分为模型组(PM_{2.5} 组)、除风益损汤组(CFYSD 组)、NLRP3 抑制剂组(MCC950 组),每组 10 只。

2.2 干预方式

CFYSD 组予以 7.3 g·kg⁻¹ 除风益损汤灌胃, MCC950 组予以 10 mg·kg⁻¹ MCC950 腹腔注射^[15],NC 组和 PM_{2.5} 组予以等量蒸馏水灌胃。每组小鼠连续给药 28 d。

2.3 眼表体征采集

2.3.1 SIT 给药 28 d 后,采用酚红棉线法检测小鼠泪液分泌量。检测时,以 0.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,轻柔翻转其下眼睑,用显微镊将酚红棉线一端约 1 mm 长轻轻置入小鼠右眼下睑外侧 1/3 处睑结膜。计时 15 s 后取出棉线,立即用游标卡尺

测量被泪液染红部分的长度,每只小鼠重复测量 3 次。

2.3.2 TBUT 给药 28 d 后,采用荧光素钠染色测定 TBUT。将 0.1% 荧光素钠溶液滴于小鼠右眼角膜表面,注意避免滴管接触眼球,引导其自主瞬目 3 次后,轻柔撑开上下眼睑。在裂隙灯显微镜钴蓝光下以 40 倍放大观察,记录从最后一次瞬目到角膜表面出现首个荧光素染色的泪膜缺损区(即破裂点)的时间。每只小鼠重复测定 3 次。

2.3.3 角膜荧光染色评分 给药 28 d 后,采用荧光素钠染色评估角膜上皮损伤程度。将 0.1% 荧光素钠溶液滴入小鼠右眼结膜囊,引导其自主瞬目 3 次。于染色后 90 s,在裂隙灯显微镜钴蓝光下以 40 倍放大观察角膜荧光染色情况。将角膜划分为 4 个象限,按以下标准分别计分^[16]:0 分(无染色)、1 分(少量点状染色,<30 个)、2 分(点状染色 $\geq$ 30 个,未融合)、3 分(弥漫性点状染色,无斑块)、4 分(斑块状染色)。各象限得分之和为总分(满分 16 分)。

2.4 HE 染色

将眼球组织置于 4% 多聚甲醛中,用 75%、85%、95% 乙醇脱水,二甲苯透明 2 次,10 min/次,浸蜡后包埋,展片、烤片。二甲苯脱蜡,95%、85%、75% 乙醇水化各 5 min,苏木素染色,PBS 返蓝,伊红染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,晾干后用中性树胶封片。

2.5 ELISA 检测 ROS、MDA、SOD2 水平

取小鼠血清,将标准品稀释后,进行加样与孵育,孵育结束后加入酶标试剂,再次孵育后进行洗板,然后每孔依次加入显色 A 液和显色 B 液。显色完成后,往每孔加入终止液,终止显色反应,并在 15 min 内读数记录。

2.6 Western blot 检测 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平

将角膜组织置于冰上,用 RIPA 蛋白裂解液充分裂解,收集上清液,采用 BCA 法测定总蛋白浓度。加入 5 $\times$ 上样缓冲液,充分混匀,在 98 $^{\circ}$ C 条件下加热变性 5 min 后转膜、封闭。4 $^{\circ}$ C 下与一抗 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、 β -actin (NLRP3、ASC、IL-1 β 稀释比为 1:1 000;Caspase-1、IL-18、 β -actin 稀释比为 1:5 000)孵育过夜。次日经 TBST 充

分洗涤,加入 HRP 标记的二抗(1:5 000),再次洗涤后,采用 ECL 化学发光法显影。以 β -actin 为内参,使用 ImageJ 软件对条带进行灰度分析。

2.7 qPCR 检测 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达水平

取适量角膜组织,在匀浆器中进行彻底研磨。采用 TRIzol 法,从研磨后的组织中提取总 RNA,利用紫外分光光度计对 RNA 的浓度和纯度进行检测,之后将其逆转录为 cDNA。将 cDNA 稀释后加入 PCR 扩增反应体系,95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,退火、延伸 60 $^{\circ}$ C、30 s,循环 40 次。选择 β -actin 作为内参基因,并运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算,以确定目标基因的相对表达量。运用 Primer5 软件设计引物,由北京擎科合成引物。相关引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	序列	扩增长度/bp
NLRP3	正向 TGGCTTTTCACTTCAATCCACT	113
	反向 CCTCTTTGGCCTTGTAACCAG	
ASC	正向 AAGCATCCAGCACTCCGTCCAC	91
	反向 CAGAGTACAGCCAGAACAGGACAC	
Caspase-1	正向 TCCCAGTCAGTCTGGAATG	237
	反向 ACAAGGCACGGGACCTATG	
IL-1 β	正向 TTCTCCACAGCCACAATGAGT	189
	反向 TGAAATGCCACCTTTTGACAGT	
IL-18	正向 CCGTATTACTGCGGTTGT	142
	反向 GGCTGCCATGTCAGAAGA	
β -actin	正向 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	223
	反向 ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	

2.8 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件统计数据,正态分布资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,方差齐时,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐时,则使用 Dunnett T3 法。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠泪液分泌量比较

与 NC 组比较,PM_{2.5} 组泪液分泌量减少($P<0.05$)。与 PM_{2.5} 组比较,CFYSD 组、MCC950 组泪液分泌量增加($P<0.05$)。详见表 2。

3.2 各组小鼠 TBUT 比较

与 NC 组比较,PM_{2.5} 组 TBUT 缩短($P<0.05$)。与

表 2 各组小鼠泪液分泌量比较($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mm}$)

Table 2 Comparison of tear secretion volume among mice groups ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mm}$)

组别	泪液分泌量
NC 组	7.59±0.77
PM _{2.5} 组	2.09±0.31*
CFYSD 组	4.44±0.60*#
MCC950 组	6.24±0.56*#

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$;与 PM_{2.5} 组比较,* $P<0.05$ 。

PM_{2.5} 组比较,CFYSD 组、MCC950 组小鼠 TBUT 延长($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 各组小鼠 TBUT 比较($\bar{x}\pm s, n=10, \text{s}$)

Table 3 Comparison of TBUT among mice groups ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{s}$)

组别	TBUT
NC 组	8.48±0.50
PM _{2.5} 组	1.83±0.20*
CFYSD 组	3.52±0.19*#
MCC950 组	4.29±0.69*#

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$;与 PM_{2.5} 组比较,* $P<0.05$ 。

3.3 各组小鼠角膜荧光染色及评分比较

与 NC 组比较,PM_{2.5}组小鼠角膜荧光染色范围广,角膜荧光染色评分升高($P<0.05$)。与 PM_{2.5} 组比较,CFYSD 组、MCC950 组小鼠角膜染色范围缩小,角膜荧光染色评分降低($P<0.05$)。详见图 1、表 4。

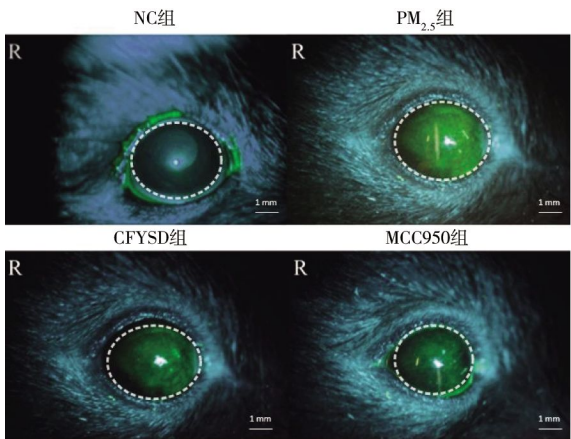


图 1 各组小鼠角膜荧光染色图

Fig.1 Corneal fluorescein staining images of mice in each group

3.4 各组小鼠角膜 HE 染色结果

NC 组小鼠角膜各层结构清晰完整,上皮细胞层光滑连续,前弹力层、基质层、后弹力层及内皮细胞层染色均匀,结构正常。与 NC 组比较,PM_{2.5} 组小

表 4 各组小鼠角膜荧光染色评分比较($\bar{x}\pm s, n=10, \text{分}$)

Table 4 Comparison of corneal fluorescein staining scores among mice groups ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{score}$)

组别	荧光染色评分
NC 组	1.80±0.92
PM _{2.5} 组	12.60±1.90*
CFYSD 组	6.40±1.43*#
MCC950 组	4.30±0.95*#

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$;与 PM_{2.5} 组比较,* $P<0.05$ 。

鼠角膜上皮细胞呈现明显增生,细胞排列紊乱,层次结构不清。与 PM_{2.5}组比较,CFYSD 组与 MCC950 组小鼠角膜结构完整性和细胞形态均有所改善,细胞排列较为规整,角膜上皮损伤减轻。详见图 2。

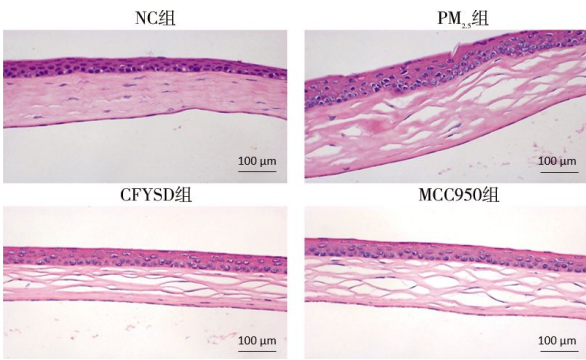


图 2 各组小鼠角膜 HE 染色图($\times 400$)

Fig.2 HE staining images of corneal tissue of mice in each group ($\times 400$)

3.5 各组小鼠血清 ROS、MDA、SOD2 水平比较

与 NC 组比较,PM_{2.5} 组血清 ROS、MDA 水平升高,SOD2 水平下降($P<0.05$)。与 PM_{2.5} 组比较,CFYSD 组与 MCC950 组血清 ROS、MDA 水平下降,SOD2 水平升高($P<0.05$)。详见表 5。

表 5 各组小鼠血清 ROS、MDA、SOD2 水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Comparison of serum ROS, MDA, and SOD2 levels among mice groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	ROS/(IU·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)	SOD2/(pg·mL ⁻¹)
NC 组	333.70±23.99	2.43±0.35	165.91±6.85
PM _{2.5} 组	678.60±61.57*	10.09±0.54*	109.81±12.17*
CFYSD 组	533.90±21.35*#	5.06±0.71*#	131.40±15.02*#
MCC950 组	539.10±33.61*#	4.16±0.31*#	143.71±21.85*#

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$;与 PM_{2.5} 组比较,* $P<0.05$ 。

3.6 各组小鼠角膜组织 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平比较

与 NC 组比较,PM_{2.5}组 NLRP3、Caspase-1、ASC、

IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与 PM_{2.5} 组比较,CFYSD 组与 MCC950 组小鼠 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。详见图 3、表 6。

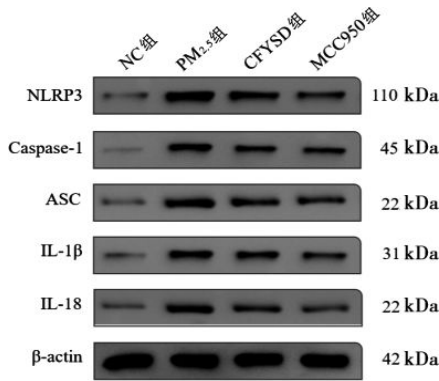


图 3 各组小鼠角膜组织 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 蛋白条带图

Fig.3 Protein banding diagram of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , and IL-18 in corneal tissue of mice in each group

3.7 各组小鼠角膜组织 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 的 mRNA 表达水平比较

与 NC 组比较,PM_{2.5} 组 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 mRNA 的表达水平升高($P<0.05$)。与 PM_{2.5} 组比较,CFYSD 组与 MCC950 组 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。详见表 7。

表 6 各组小鼠角膜组织 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Comparison of protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , and IL-18 in corneal tissue among mice groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	NLRP3/ β -actin	Caspase-1/ β -actin	ASC/ β -actin	IL-1 β / β -actin	IL-18/ β -actin
NC 组	0.03 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.03
PM _{2.5} 组	0.39 $\pm$ 0.03*	0.44 $\pm$ 0.03*	0.43 $\pm$ 0.02*	0.39 $\pm$ 0.04*	0.40 $\pm$ 0.05*
CFYSD 组	0.30 $\pm$ 0.04**	0.33 $\pm$ 0.03**	0.33 $\pm$ 0.02**	0.28 $\pm$ 0.02**	0.29 $\pm$ 0.05**
MCC950 组	0.23 $\pm$ 0.04**	0.24 $\pm$ 0.03**	0.25 $\pm$ 0.02**	0.17 $\pm$ 0.03**	0.19 $\pm$ 0.04**

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$;与 PM_{2.5} 组比较,** $P<0.05$ 。

表 7 各组小鼠角膜组织 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Comparison of mRNA expression levels of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , and IL-18 in corneal tissue among mice groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	NLRP3/ β -actin	Caspase-1/ β -actin	ASC/ β -actin	IL-1 β / β -actin	IL-18/ β -actin
NC 组	1.01 $\pm$ 0.05	0.93 $\pm$ 0.18	0.88 $\pm$ 0.11	1.15 $\pm$ 0.28	0.97 $\pm$ 0.13
PM _{2.5} 组	7.10 $\pm$ 0.39*	12.13 $\pm$ 1.04*	10.61 $\pm$ 1.04*	9.68 $\pm$ 1.43*	14.26 $\pm$ 1.16*
CFYSD 组	3.58 $\pm$ 0.24**	7.42 $\pm$ 0.61**	6.67 $\pm$ 0.95**	5.37 $\pm$ 0.62**	7.65 $\pm$ 1.13**
MCC950 组	2.31 $\pm$ 0.13**	3.62 $\pm$ 0.58**	3.54 $\pm$ 0.31**	3.50 $\pm$ 0.46**	3.48 $\pm$ 0.32**

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$;与 PM_{2.5} 组比较,** $P<0.05$ 。

4 讨论

干眼以白睛不赤不肿、自觉眼内干涩不适及视物模糊为主要表现,属中医学“白涩症”“神水将枯症”范畴,其病因复杂,多为六淫邪气侵扰、饮食失度、劳逸失衡、情志不遂等所致^[17]。研究表明,干眼环境病因与中医外邪属性具有关联性,并一一对应,如燥邪可对应干燥环境,热邪对应强烈的紫外线等,风邪则与空气污染相关^[18]。空气污染造成的眼表损伤是近年来研究的热点问题。

PM_{2.5} 是一种含多种成分、来源和毒性各异的空气污染物,其粒径小,比表面积大,作为细颗粒物沉积于眼表,通过破坏角膜与结膜上皮的微观结构,降低眼表平滑度和泪膜稳定性,还能机械性阻塞睑板腺导管开口^[19]。此外,PM_{2.5} 成分中包含多环芳烃、重金属等多种有害物质,可直接损伤眼表,导致角膜和结膜上皮细胞的炎症反应,并诱导眼表氧化应激的产生^[20]。Yu 等^[21]通过体外细胞与体内动物实验证实,PM_{2.5} 暴露可降低人角膜上皮细胞活性并诱导线粒体功能障碍,同时可引发小鼠角膜炎症反应,从而诱导干眼的发生。叶蕾^[13]经体外细胞实验筛选出 PM_{2.5} 抑制人角膜上皮细胞增殖和迁移的最强作用浓度(5 mg·mL⁻¹),并以此建立干眼小鼠模型,证实 PM_{2.5} 可损害泪膜功能、造成眼表结构损伤,其病变

特征与人类干眼临床表现高度相似。本研究成功构建了PM_{2.5}诱导干眼小鼠模型,与NC组相比,PM_{2.5}组小鼠泪液分泌量、TBUT显著减少,角膜荧光染色评分增加。

NLRP3炎症小体是机体先天免疫的重要调节因子,由NLRP3、Caspase-1前体和ASC组装而成,Caspase-1经自我裂解过程由前体转化为活性形式,并通过打孔蛋白在细胞膜上形成通道引发细胞焦亡进程,释放促炎性细胞因子IL-1 β 和IL-18,从而引起炎症反应^[22-23]。病毒、寄生虫和细菌等病原体,内质网应激以及氧化应激均可触发NLRP3炎症小体的激活^[24]。PM_{2.5}导致干眼的机制众多,多项研究表明,氧化应激是其主要的致病机制^[25]。Jia等^[26]研究表明,PM_{2.5}暴露导致的肺损伤通过激活NLRP3/Caspase-1信号通路增加促炎性细胞因子的释放,并且证实使用NLRP3抑制剂MCC950能够改善肺部炎症。本研究中,PM_{2.5}组小鼠血清ROS、MDA等氧化因子水平与NC组相比明显升高,同时PM_{2.5}暴露也会增加NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 和IL-18的表达。氧化应激及NLRP3/Caspase-1信号通路的激活,不仅能改变泪膜各层(脂质层、水液层和黏蛋白层)结构和功能,还能破坏角膜上皮细胞阻碍其正常的修复与再生过程,对泪腺组织也能产生损害;同时,它可能通过调控免疫细胞的功能,影响眼表局部免疫微环境稳态,共同参与干眼的发病^[27]。

从病因病机角度分析,PM_{2.5}侵袭眼表,属外源性异物伤目,其病机在于外邪客于眼表,致局部经络受损,气血运行不畅,瘀热滞留,致双目失于濡润,出现干涩不适诸症。除风益损汤主治“目为物所伤”,其方以四物汤为基础方化裁,配伍风药,使补血而不滞、行血而不过,共奏疏风清热、养血活血之效^[8]。除风益损汤在临床上广泛应用于各种眼外伤的治疗,如眼球穿通伤、玻璃体积血、眼钝挫伤等^[28]。除风益损汤也应用于各种眼科手术术后干眼治疗,尤其是白内障术后所致干眼^[29]。从药理学角度分析,除风益损汤的核心活性成分,如当归中的槲皮素、芍药中的芍药苷等,可通过NLRP3/Caspase-1信号通路作用于多系统疾病。槲皮素通过靶向热激蛋白90抑制NLRP3炎症小体活化,降低海马IL-6、IL-1 β 水平,减轻神经炎症^[30];芍药苷可通过调控NLRP3/GSDMD轴,减少炎症因子释放,改善类风湿关节炎症状^[31];山柰酚、汉黄芩素均可通过调控NLRP3信号通路发

挥良好的抗炎作用^[32]。除风益损汤的核心活性成分作用于NLRP3/Caspase-1信号通路均可发挥抗炎、抗氧化的作用。研究结果显示,与PM_{2.5}组相比,CFYSD组和MCC950组小鼠泪液分泌量、TBUT显著增加,角膜荧光染色评分显著下降;HE染色显示CFYSD组和MCC950组小鼠在角膜结构完整性和细胞形态方面较PM_{2.5}组明显改善;ELISA结果显示CFYSD组和MCC950组小鼠血清ROS、MDA水平下降,SOD2水平升高;Western blot及qPCR结果显示,CFYSD组和MCC950组NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18蛋白和mRNA表达水平均明显下降。以上结果均表明,除风益损汤能保护角膜上皮功能、维持泪膜稳态、减轻眼表炎症反应,从而改善干眼症状,其疗效较佳。

综上所述,除风益损汤可能通过抑制氧化应激过程及NLRP3/Caspase-1信号通路,干预NLRP3炎症小体的组装,减少IL-1 β 、IL-18等促炎性细胞因子的成熟与释放,从而调控干眼炎症反应,为中西医结合防治环境污染相关疾病提供了参考。本研究也存在不足之处,如使用PM_{2.5}悬浮液滴眼构建干眼模型无法模拟真实的大气污染情况。此外,未来研究可通过构建NLRP3条件性敲除和过表达小鼠模型,深入探讨其相关作用机制,为后续研究提供方向。

参考文献

- [1] 彭清华, 谢立科, 王育良, 等. 国际中医临床实践指南 干眼 (2021-12-14)[J]. 世界中医药, 2022, 17(16): 2235-2239, 2244.
- [2] Perez V L, Chen W, Craig J P, et al. TFOS DEWS III: executive summary[J]. American Journal of Ophthalmology, 2026, 282: 135-145.
- [3] Geslin M, Vachon J, Zhao N Z, et al. Systemic autoimmune rheumatic disease risk: association with long-term exposure to fine particulate matter[J]. Arthritis & Rheumatology, 2025, 77(12): 1778-1783.
- [4] Chu D D, Chen J, Yang C L, et al. Associations between air pollution and daily outpatient visits for dry eye disease and the effect modification of temperature[J]. BMC Public Health, 2025, 25(1): 1163.
- [5] Hao R, Zhang M Z, Zhao L M, et al. Impact of air pollution on the ocular surface and tear cytokine levels: a multicenter prospective cohort study[J]. Frontiers in Medicine, 2022, 9: 909330.
- [6] Niu L L, Li L P, Xing C, et al. Airborne particulate matter (PM_{2.5}) triggers cornea inflammation and pyroptosis via NLRP3 activation[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 207: 111306.

- [7] Mangan M S J, Olhava E J, Roush W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17(8): 588–606.
- [8] 倪维德, 吴少祯. 原机启微[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2021: 18.
- [9] 李江伟, 陈惠媚, 张文清, 等. 基于网络药理学及实验验证探讨除风益损汤治疗角膜损伤机制[J]. *中国中医药信息杂志*, 2024, 31(8): 23–28.
- [10] 于欣宁. 除风益损汤联合玻璃酸钠滴眼液治疗白内障术后干眼的临床研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2024.
- [11] Korkmaz I, Palamar M. Animal-based experimental models in dry eye research: current approaches and limitations[J]. *Experimental Eye Research*, 2026, 266: 110918.
- [12] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069–1072.
- [13] 叶蕾. 维生素 B₆ 滴眼液对 PM_{2.5} 诱导小鼠干眼的疗效初步研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [14] Mu N, Wang H, Chen D Y, et al. A novel rat model of dry eye induced by aerosol exposure of particulate matter[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2022, 63(1): 39.
- [15] Wang M, Peng J, Yang M, et al. Elevated expression of NLRP3 promotes cigarette smoke-induced airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Archives of Medical Science*, 2024, 20(4): 1281–1293.
- [16] 陈燕, 吴学志. 除风益损汤联合常规西药治疗白内障伴干眼临床研究[J]. *新中医*, 2019, 51(2): 97–99.
- [17] 刘祖国. 干眼[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 11.
- [18] 刘培, 蒋鹏飞, 周亚莎, 等. 干眼环境病因及中医外邪属性的理论探讨[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(1): 68–72.
- [19] Song S J, Hyun S W, Lee T G, et al. New application for assessment of dry eye syndrome induced by particulate matter exposure[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 205: 111125.
- [20] Gao Z X, Song X L, Li S S, et al. Assessment of DNA damage and cell senescence in corneal epithelial cells exposed to airborne particulate matter (PM_{2.5}) collected in Guangzhou, China[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2016, 57(7): 3093–3102.
- [21] Yu D H, Cai W T, Shen T Y, et al. PM_{2.5} exposure increases dry eye disease risks through corneal epithelial inflammation and mitochondrial dysfunctions[J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2023, 39(6): 2615–2630.
- [22] Lu X Q, Huang H T, Fu X D, et al. The role of endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome in liver disorders[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(7): 3528.
- [23] Kelley N, Jeltama D, Duan Y H, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13): 3328.
- [24] Zha Z W, Xiao D C, Liu Z H, et al. Endoplasmic reticulum stress induces ROS production and activates NLRP3 inflammasome via the PERK–CHOP signaling pathway in dry eye disease[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2024, 65(1): 34.
- [25] Upaphong P, Thonusin C, Wanichthanaoln O, et al. Consequences of exposure to particulate matter on the ocular surface: mechanistic insights from cellular mechanisms to epidemiological findings[J]. *Environmental Pollution*, 2024, 345: 123488.
- [26] Jia H, Liu Y, Guo D, et al. PM_{2.5}-induced pulmonary inflammation via activating of the NLRP3/caspase-1 signaling pathway[J]. *Environmental Toxicology*, 2021, 36(3): 298–307.
- [27] Lou Q, Pan L, Xiang S J, et al. Suppression of NLRP3/caspase-1/GSDMD mediated corneal epithelium pyroptosis using melatonin-loaded liposomes to inhibit benzalkonium chloride-induced dry eye disease[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2023, 18: 2447–2463.
- [28] 曾令聪, 吴凯, 朱冰瑶, 等. 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.
- [29] 胡瑛, 秦虹, 宿蕾艳, 等. 除风益损汤联合聚乙二醇滴眼液治疗白内障术后干眼的临床观察[J]. *中国中医眼科杂志*, 2018, 28(2): 109–111.
- [30] Adeoluwa O A, Olayinka J N, Adeoluwa G O, et al. Quercetin abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like symptoms by inhibiting neuroinflammation via microglial NLRP3/NF κ B/i-NOS signaling pathway[J]. *Behavioural Brain Research*, 2023, 450: 114503.
- [31] 毛婧, 谭敏, 郝佳瑶, 等. 细胞焦亡在类风湿关节炎中致病作用的新进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2025, 41(4): 1021–1025.
- [32] 崔馨予, 康惠琴, 贺佩鑫, 等. 中医药干预 NOD 样受体蛋白 3 炎症小体治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(7): 1321–1330.

(本文编辑 周 旦)