

# 密蒙花滴眼液对去势雄兔干眼结膜炎性因子 IL-1 $\beta$ 和黏蛋白 5AC 及 P38MAPK 表达的影响

彭晓芳<sup>1,2</sup>, 彭清华<sup>1</sup>, 彭俊<sup>3</sup>, 周亚莎<sup>1</sup>, 张又玮<sup>1</sup>, 覃艮艳<sup>1</sup>

引用:彭晓芳,彭清华,彭俊,等. 密蒙花滴眼液对去势雄兔干眼结膜炎性因子 IL-1 $\beta$  和黏蛋白 5AC 及 P38MAPK 表达的影响. 国际眼科杂志 2020;20(3):426-431

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(No.30772824, 81574031);湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目资助[No.湘卫人发(2013)13号];湖南省科技厅科研基金资助项目(No.2015SF2016-6);湖南省发展改革委科研基金资助项目(No.湘发改投资[2014]658号);长沙市科技计划重大专项(No.K1501014-31);湖南中医药大学研究生创新项目(No.2016CX19);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目[No.国中医药发(2009)30号];湖南中医药大学中医学国内一流建设学科[No.湘教通(2018)469号];中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室建设项目(No.2017TP1018);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(No.2018TP2008)

作者单位:<sup>1</sup>(410208)中国湖南省长沙市,湖南中医药大学;<sup>2</sup>(410100)中国湖南省长沙市,长沙市中医医院长沙市第八医院;<sup>3</sup>(410007)中国湖南省长沙市,湖南中医药大学第一附属医院眼科

作者简介:彭晓芳,女,毕业于湖南中医药大学,硕士,研究方向:中医药防治眼表疾病。

通讯作者:彭清华,博士,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:中医药防治眼底病、青光眼、眼表疾病. Pqh410007@126.com

收稿日期:2019-03-15 修回日期:2020-02-23

## 摘要

目的:观察不同浓度的密蒙花滴眼液对去势雄兔干眼结膜炎性因子 IL-1 $\beta$ 、黏蛋白 5AC (MUC5AC) 及 P38MAPK 表达的影响,从而探讨密蒙花滴眼液对干眼的疗效。

方法:将 36 只雄兔随机分为:空白组、模型组、密蒙花滴眼液低浓度组(1mg/mL)、中浓度组(1.5mg/mL)、高浓度组(3mg/mL)、睾酮组。除空白组外各组均行睾丸及附睾切除建立干眼动物模型,造模成功后,空白组和模型组不予以处理,密蒙花滴眼液低浓度组(1mg/mL)、中浓度组(1.5mg/mL)、高浓度组(3mg/mL)给予密蒙花不同浓度滴眼液,3次/d,睾酮组按 0.5mL/kg 剂量在大腿肌肉处注射丙酸睾酮,每 3d 1 次,各组分别于造模前和用药 4wk 后在全身麻醉下检测荧光素染色、Schirmer I 试验(SIt)和泪膜破裂时间(BUT)。用药 4wk 后处死兔子,取其双眼球结膜组织,采用免疫组织化学染色法检测结膜中 IL-1 $\beta$ 、MUC5AC、P38MAPK 的表达。

结果:密蒙花滴眼液低浓度组、中浓度组、高浓度组用药 4wk 后,SIt 值明显高于模型组,BUT 值明显长于模型组,角膜荧光素染色阳性较模型组有明显改善(均  $P < 0.01$ )。密蒙花滴眼液低浓度组、中浓度组、高浓度组结膜 IL-1 $\beta$ 、

P38MAPK 的阳性表达低于模型组,MUC5AC 的表达高于模型组( $P < 0.01$ ),密蒙花滴眼液高浓度组优于低浓度、中浓度组。

结论:密蒙花滴眼液具有类雄激素效果,对于去势雄兔干眼可以下调干眼结膜组织中 IL-1 $\beta$ 、P38MAPK 的表达,增加 MUC5AC 的表达,从而减少干眼结膜组织的炎症浸润,维持泪膜稳定性,但其作用弱于雄激素。密蒙花滴眼液中、高浓度组对于干眼治疗作用强于低浓度组,高浓度组优于中浓度组。

关键词:干眼;密蒙花滴眼液;白介素-1 $\beta$ ;黏蛋白 5AC;P38 丝裂原激活蛋白激酶

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.3.06

## Effects of butterflybush flower eye drops on expression of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , Mucin 5AC and P38MAPK in castrated male rabbits

Xiao-Fang Peng<sup>1,2</sup>, Qing-Hua Peng<sup>1</sup>, Jun Peng<sup>3</sup>, Ya-Sha Zhou<sup>1</sup>, You-Wei Zhang<sup>1</sup>, Gen-Yan Qin<sup>1</sup>

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.30772824, 81574031); “225” Engineering Project of High Lever Health Professionals of Hunan Province [Xiang wei ren fa (2013) No. 13]; Hunan Science and Technology Department Research Fund Project (No. 2015SF2016-6); Hunan Province Development and Reform Commission Research Fund Project (Xiangfa Reform Investment [2014] No.658); Changsha Science and Technology Plan Major Project (No.K1501014-31); Hunan University of Chinese Medicine Graduate Innovation Project (No. 2016CX19); Key Discipline Project of Ophthalmology of Traditional Chinese Medicine of State Administration of TCM (Traditional Chinese Medicine Fa [2009] No.30); The Domestic First-class Discipline Construction Project of Chinese Medicine of Hunan University (Xiang Jiao Tong [2018] No.469); Hunan Provincial Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Traditional Chinese Medicine (No.2017TP1018); Hunan Engineering Technology Research Center for the Prevention and Treatment of Otorhinolaryngologic Diseases and Protection of Visual Function with Chinese Medicine (No.2018TP2008).

<sup>1</sup>Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China; <sup>2</sup>The Traditional Chinese Medicine Hospital of Changsha; The No.8 Hospital of Changsha, Changsha 410100, Hunan Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

**Correspondence to:** Qing-Hua Peng. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China. Pq410007@126.com

Received:2019-03-15 Accepted:2020-02-23

## Abstract

• **AIM:** To observe the effects of butterflybush flower eye drops at different concentrations on expression of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , Mucin 5AC (MUC5AC) and P38MAPK in castrated male rabbits, and to explore the therapeutic effect of that drops on dry eyes.

• **METHODS:** Thirty - six male rabbits were randomly divided into blank group (A), model group (B), low concentrations butterflybush flower eye drops group (C, 1mg/mL), the medium concentrations drops group (D, 1.5mg/mL), the high concentrations drops group (E, 3mg/mL), and testosterone group (F). In addition to group A, the testes and epididymis were removed from each group to establish a dry eye animal model. After successful modeling, groups A and B remain unchanged. Groups C, D, and E were given different concentrations of butterflybush flower eye drops, 3 times/d. In group F, testosterone propionate was injected into the muscles of the thigh at a dose of 0.5mL/kg once every 3d. Fluorescein staining, Schirmer I test (S | t) and tear film break time (BUT) were measured under general anesthesia in each group, treatment. After 4wk of treatment, the rabbits were sacrificed and the conjunctival tissues of the eyes were taken. The expression of IL-1 $\beta$ , mucin 5AC and P38MAPK in the conjunctiva was detected by immunohistochemical staining.

• **RESULTS:** Among low concentrations butterflybush flower eye drops group, the medium concentrations drops group and the high concentrations drops group, the S | t value was significantly higher than that of model group, and BUT was significantly longer than model group. The positive staining of corneal fluorescein was significantly improved compared with model group, which was statistically significant ( $P < 0.01$ ). Among IL-1 $\beta$  and P38MAPK in the conjunctiva of high concentrations butterflybush flower eye drops group, the medium concentrations drops group and the low concentrations drops group, the positive expressions were lower than those in model group, and the expression of MUC5AC was higher than that in group model group ( $P < 0.01$ ). In addition, the high concentrations drops group was superior to the low and the medium concentrations drops group.

• **CONCLUSION:** Butterflybush flower eye drops have androgen - like effect. For castrated dry eyes of male rabbits, they can down - regulate the expression of IL-1 $\beta$  and P38MAPK in dry conjunctival tissue and increase the expression of MUC5AC, thus reducing inflammation infiltration in dry conjunctival tissue and maintaining tear film stability, but their effect is weaker than that of androgen. To the treatment of dry eyes, the middle and high concentration groups of the drops had stronger effects than the low one, and the high

concentration group was better than the medium one.

• **KEYWORDS:** dry eyes; butterflybush flower eye drops; IL-1 $\beta$ ; Mucin 5AC; P38MAPK

**Citation:** Peng XF, Peng QH, Peng J, *et al.* Effects of butterflybush flower eye drops on expression of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , Mucin 5AC and P38MAPK in castrated male rabbits. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(3):426-431

## 0 引言

干眼是一种常见的眼表疾病,其病因复杂,尚无明确的病因,临床病程发展缓慢<sup>[1]</sup>,干眼发病率极高<sup>[2]</sup>,是近年眼科的研究重点、热点及难点。临床实践中,对于干眼的认识不断深入,2017年TFOS DEWS II对于干眼的定义进行了修改,干眼的新定义为:眼表的一种多因子疾病,特征是泪膜稳态的丧失并伴有眼表症状,其病因包括泪膜不稳定、泪液高渗性、眼表炎症与损伤和神经感觉异常<sup>[3]</sup>。目前干眼现有的治疗方法并不理想,各类西药均有各自的局限性,疗效不满意,甚至造成许多副作用<sup>[4-5]</sup>。

密蒙花是中国药典收载药品,也是眼科临床常用中药<sup>[6]</sup>。密蒙花有效成分为黄酮。我们基于中医古籍理论支持以及大量临床观察,制备了自制药物密蒙花滴眼液治疗干眼,并进行大量实验研究。前期临床及实验研究表明,密蒙花可以抑制泪腺细胞的凋亡<sup>[7-8]</sup>、显著调节泪腺局部炎症反应,参与抗干眼<sup>[9-10]</sup>。但密蒙花滴眼液对结膜炎性因子表达、泪膜稳定性的影响尚无研究。

故本实验通过对雄兔行双侧睾丸、附睾切除术,成功建立干眼模型后,使用不同浓度的密蒙花滴眼液对雄兔进行治疗,观察其对去势导致干眼雄兔结膜局部炎症因子IL-1 $\beta$ 、黏蛋白5AC (MUC5AC)及P38MAPK表达的影响,从这些方面来评价密蒙花滴眼液对于干眼的疗效,从而为中医药治疗干眼提供现代理论依据和新的治疗方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取健康成年,无全身疾患的新西兰长耳大白兔36只,雄性,体质量1.5~2.0kg,湖南中医药大学动物实验中心提供,常规饲料喂养,自由进食。实验前行常规眼科检查(裂隙灯、眼底镜),排除内外疾患方进入实验。密蒙花总黄酮和总苯丙素提取物由中南大学湘雅医院药剂科从密蒙花中提取;密蒙花不同浓度滴眼液由湖南中医药大学药学院制备;丙酸睾酮注射液(天津金耀药业有限公司);注射用青霉素钠(广州白云山天心制药股份有限公司);3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水(中杉金桥);磷酸盐缓冲液、25%乌拉坦(湖南福滋堂生物公司);荧光素钠眼科检测试纸(天津晶明新技术开发有限公司);DAB显色剂(重庆生物技术有限公司)。本实验得到湖南中医药大学动物伦理委员会审批。

**1.2 方法** 将36只健康成年雄兔按照随机排列表法分成6组,每组6只,空白组、模型组、密蒙花滴眼液低浓度组(1mg/mL)、中浓度组(1.5mg/mL)、高浓度组(3mg/mL)、睾酮组。除了空白组外,其余组均参照马轶群等<sup>[11]</sup>的方法,行双侧睾丸切除术(ORX),将模型组、密蒙花滴眼液低浓度组(1mg/mL)、中浓度组(1.5mg/mL)、高浓度组(3mg/mL)、睾酮组五组实验兔以25%乌拉坦注射液0.4mL/100mg耳缘静脉麻醉,雄兔取仰卧位,四肢张开并固定,下腹部褪毛剂褪毛,阴囊皮下加用2%利多卡因局

表1 各组兔造模前和用药4wk后S I t值比较

( $\bar{x} \pm s$ , mm/5min)

组别	造模前		用药4wk后		t	P
	眼数	S I t	眼数	S I t		
空白组	12	15.50±4.32	12	18.42±2.07	-2.47	>0.05
模型组	12	13.83±5.17	12	2.42±2.02	6.15	<0.01
低浓度组	12	15.50±3.50	12	8.92±1.38	5.92	<0.05
中浓度组	12	16.67±4.77	10	13.92±4.40	1.65	>0.05
高浓度组	12	16.42±4.27	12	14.50±3.94	1.61	>0.05
鞣酐组	12	15.60±3.63	10	11.50±3.53	2.72	>0.05

注:低浓度组为密蒙花滴眼液 1mg/mL;中浓度组为密蒙花滴眼液 1.5mg/mL;高浓度组为密蒙花滴眼液 3mg/mL。

部麻醉,碘伏消毒,铺无菌巾单,将一侧睾丸由腹腔挤入阴囊并捏紧。用消毒刀片将阴囊切一小口,用力挤出睾丸,结扎精索静脉及输精管,切除睾丸及附睾,连续缝合阴囊皮肤后局部涂碘酊预防感染。另侧睾丸及附睾同法切除。术中静脉滴注生理盐水 100mL,内加青霉素 40 万 U,术后连续 3d 肌肉注射青霉素针 40 万 U,预防感染。造模 8wk 后检查模型。各组动物均由同一人检查,各组动物每次检查时间、地点、照明温度、湿度及亮度相同。模型制作成功标准:检查干眼模型兔眼角结膜外观干燥,泪液量少, Schirmer I 试验值 (S I t) 均 < 10mm/5min (空白组均 > 10mm/5min); BUT 均 < 10s; 荧光素染色见角膜点、片状着色。实验过程中,密蒙花滴眼液中浓度组及鞣酐组各死亡 1 只。其余兔造模成功后,空白组和模型组不予以处理,密蒙花滴眼液低浓度组 (1mg/mL)、中浓度组 (1.5mg/mL)、高浓度组 (3mg/mL) 给予密蒙花不同浓度滴眼液,3 次/d,鞣酐组按 0.5mL/kg 剂量在大腿肌肉处注射丙酸鞣酐,每 3d 1 次,用药时间为 4wk。常规喂养。各组分别于造模前及用药 4wk 后,用 25% 乌拉坦全身麻醉后,对兔子进行 Schirmer I 试验、BUT 及角膜荧光素染色检测。用药后 4wk 当天不予以治疗,全身麻醉下以空气栓塞法处死,即刻取出球结膜,放入多聚甲醛中固定 24h,常规石蜡包埋切片,采用免疫组织化学方法严格按照说明书操作检测 IL-1 $\beta$ 、MUC5AC、P38MAPK。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,计量资料实验结果以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。若满足正态性和方差齐性,则采用单因素方差分析法,并进一步采用 LSD-t 检验法两两比较。自身治疗前后比较采用配对样本 t 检验。等级资料多个独立样本采用 Kruskal-Wallis H 检验及多重比较,以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组兔造模前和用药 4wk 后 S I t 值比较** 造模前各组 S I t 值比较差异无统计学意义 ( $F = 0.64, P > 0.05$ )。空白组、密蒙花滴眼液中浓度组、高浓度组、鞣酐组自身前后对比差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。密蒙花滴眼液低浓度组和模型组自身前后比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。用药 4wk 后,各组之间 S I t 值比较差异有统计学意义 ( $F = 37.94, P < 0.01$ )。模型组与其余各组比较差异均有统计学意义 ( $t_{模型组vs空白组} = 12.65, P_{模型组vs空白组} < 0.01$ ;  $t_{模型组vs低浓度组} = 5.14, P_{模型组vs低浓度组} < 0.01$ ;  $t_{模型组vs中浓度组} = 9.09, P_{模型组vs中浓度组} < 0.01$ ;  $t_{模型组vs高浓度组} = 9.55, P_{模型组vs高浓度组} < 0.01$ ;  $t_{模型组vs鞣酐组} = 7.18, P_{模型组vs鞣酐组} < 0.01$ )。密蒙花滴眼液低浓度组与中浓度组、高浓度组比较差异均有统计学意义

表2 各组雄兔用药4wk后角膜荧光素染色情况比较

组别	眼			
	-	+	++	+++
空白组	12	0	0	0
模型组	0	2	7	3
低浓度组	0	8	3	1
中浓度组	0	8	2	0
高浓度组	0	9	3	0
鞣酐组	0	9	1	0

注:低浓度组为密蒙花滴眼液 1mg/mL;中浓度组为密蒙花滴眼液 1.5mg/mL;高浓度组为密蒙花滴眼液 3mg/mL。

( $t_{低浓度组vs中浓度组} = 3.95, P_{低浓度组vs中浓度组} < 0.05$ ;  $t_{低浓度组vs高浓度组} = 4.41, P_{低浓度组vs高浓度组} < 0.05$ ;)。但密蒙花滴眼液中浓度组与高浓度组比较差异无统计学意义 ( $t_{中浓度组vs高浓度组} = 0.46, P_{中浓度组vs高浓度组} > 0.05$ )。见表 1。

**2.2 各组兔用药 4wk 后角膜荧光素染色情况比较** 造模前,各组大鼠角膜均透明、润泽,荧光素染色阴性;造模成功用药 4wk 后,模型组、密蒙花滴眼液各浓度组、鞣酐组均有着染,其中,模型组着染最明显。对大鼠角膜荧光素染色情况采用 Kruskal-Wallis H 检验方法,结果显示各组之间差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 45.314, P < 0.01$ )。见表 2。

**2.3 各组兔造模前和用药 4wk 后 BUT 值比较** 造模前各组 BUT 值比较差异无统计学意义 ( $F = 0.60, P < 0.01$ )。空白组、密蒙花滴眼液各浓度组及鞣酐组自身前后对比差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。模型组自身前后比较, BUT 值明显减小,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。用药 4wk 后,各组之间比较差异有统计学意义 ( $F = 32.91, P < 0.01$ )。模型组与其余各组比较差异均有统计学意义 ( $t_{模型组vs空白组} = 10.51, P_{模型组vs空白组} < 0.05$ ;  $t_{模型组vs低浓度组} = 6.31, P_{模型组vs低浓度组} < 0.01$ ;  $t_{模型组vs中浓度组} = 8.74, P_{模型组vs中浓度组} < 0.01$ ;  $t_{模型组vs高浓度组} = 9.06, P_{模型组vs高浓度组} < 0.01$ ;  $t_{模型组vs鞣酐组} = 11.04, P_{模型组vs鞣酐组} < 0.01$ )。密蒙花滴眼液低浓度组与中浓度组、高浓度组比较差异均有统计学意义 ( $t_{低浓度组vs中浓度组} = 2.42, P_{低浓度组vs中浓度组} < 0.05$ ;  $t_{低浓度组vs高浓度组} = 2.51, P_{低浓度组vs高浓度组} < 0.05$ )。但密蒙花滴眼液中浓度组与高浓度组比较差异有统计学意义 ( $t_{中浓度组vs高浓度组} = 1.21, P_{中浓度组vs高浓度组} < 0.05$ )。密蒙花高浓度组与鞣酐组比较差异有统计学意义 ( $t_{高浓度组vs鞣酐组} = 2.31, P_{高浓度组vs鞣酐组} < 0.05$ )。见表 3。

## 2.4 免疫组织化学分析

**2.4.1 各组兔用药 4wk 后 IL-1 $\beta$  水平比较** 各组兔用药 4wk 后 IL-1 $\beta$  水平比较,差异有统计学意义 ( $F = 62.731, P < 0.01$ )。模型组与其余各组比较差异均有统计学意义

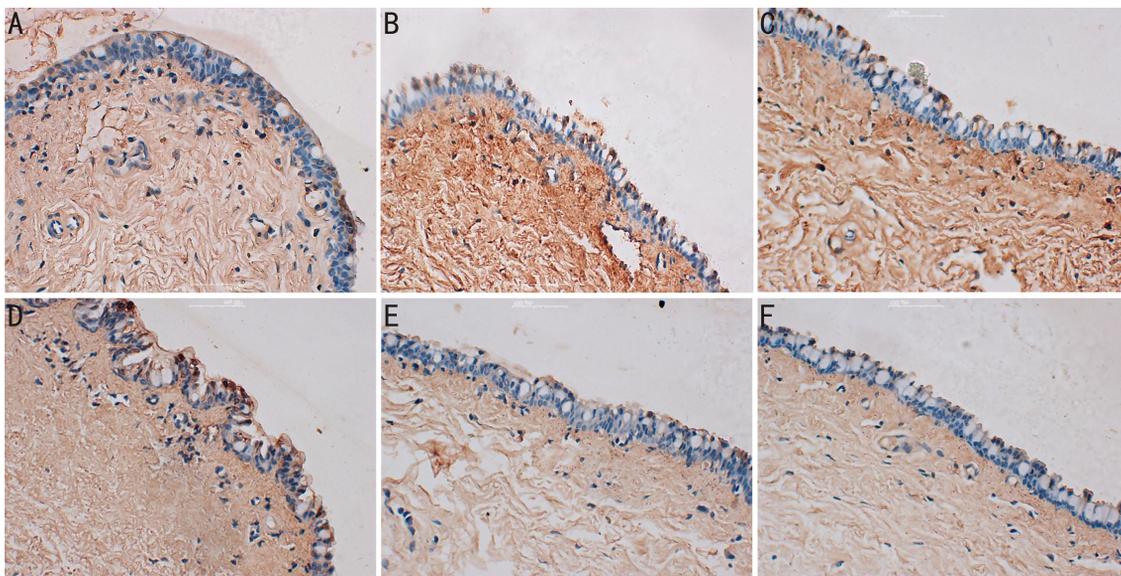


图1 用药4wk后免疫组化观察 IL-1 $\beta$  的表达( $\times 400$ ) A:空白组结膜上皮细胞中可见极少量 IL-1 $\beta$  阳性表达;B:模型组结膜上皮可见大量棕黄色颗粒沉着,阳性表达明显增多;C:密蒙花滴眼液低浓度组结膜上皮细胞阳性表达较空白组增多,但较模型组少;D:密蒙花滴眼液中浓度组结膜上皮细胞可见少量 IL-1 $\beta$  阳性表达,但较模型组明显减少;E:密蒙花滴眼液高浓度组结膜上皮细胞中可见少量阳性表达,较模型组明显减少;F:鞣酐组结膜上皮细胞中可见少量阳性表达,较密蒙花滴眼液高浓度少。

表3 各组兔造模前和用药4wk后 BUT 比较

( $\bar{x} \pm s, s$ )

组别	造模前		用药4wk后		<i>t</i>	<i>P</i>
	眼数	BUT	眼数	BUT		
空白组	12	14.42 $\pm$ 2.31	12	14.33 $\pm$ 2.31	0.36	>0.05
模型组	12	13.67 $\pm$ 2.42	12	6.00 $\pm$ 1.95	11.50	<0.01
低浓度组	12	13.75 $\pm$ 2.42	12	11.00 $\pm$ 1.95	2.98	>0.05
中浓度组	12	13.25 $\pm$ 2.73	10	12.92 $\pm$ 1.78	0.34	>0.05
高浓度组	12	14.75 $\pm$ 2.63	12	13.90 $\pm$ 1.93	1.67	>0.05
鞣酐组	12	14.17 $\pm$ 2.12	10	14.75 $\pm$ 1.66	-0.83	>0.05

注:低浓度组为密蒙花滴眼液 1mg/mL;中浓度组为密蒙花滴眼液 1.5mg/mL;高浓度组为密蒙花滴眼液 3mg/mL。

表4 用药4wk后各组兔结膜细胞中 IL-1 $\beta$  和 MUC5AC 及 P38MAPK 平均光密度值

$\bar{x} \pm s$

组别	眼数	IL-1 $\beta$	MUC5AC	P38MAPK
空白组	12	0.157 $\pm$ 0.028	0.300 $\pm$ 0.048	0.162 $\pm$ 0.015
模型组	12	0.335 $\pm$ 0.036	0.122 $\pm$ 0.017	0.350 $\pm$ 0.033
低浓度组	12	0.250 $\pm$ 0.019	0.183 $\pm$ 0.015	0.283 $\pm$ 0.010
中浓度组	10	0.223 $\pm$ 0.028	0.222 $\pm$ 0.028	0.254 $\pm$ 0.011
高浓度组	12	0.222 $\pm$ 0.030	0.227 $\pm$ 0.030	0.250 $\pm$ 0.013
鞣酐组	10	0.199 $\pm$ 0.020	0.235 $\pm$ 0.032	0.227 $\pm$ 0.007

注:低浓度组为密蒙花滴眼液 1mg/mL;中浓度组为密蒙花滴眼液 1.5mg/mL;高浓度组为密蒙花滴眼液 3mg/mL。

( $t_{\text{模型组vs空白组}} = 16.18, P_{\text{模型组vs空白组}} < 0.01; t_{\text{模型组vs低浓度组}} = 7.64, P_{\text{模型组vs低浓度组}} < 0.01; t_{\text{模型组vs中浓度组}} = 10.18, P_{\text{模型组vs中浓度组}} < 0.01; t_{\text{模型组vs高浓度组}} = 10.27, P_{\text{模型组vs高浓度组}} < 0.01; t_{\text{模型组vs鞣酐组}} = 12.36, P_{\text{模型组vs鞣酐组}} < 0.01$ );密蒙花滴眼液低浓度组与中浓度组、高浓度组、鞣酐组比较,IL-1 $\beta$  表达增加,差异均有统计学意义 ( $t_{\text{低浓度组vs中浓度组}} = 2.55, P_{\text{低浓度组vs中浓度组}} < 0.05; t_{\text{低浓度组vs高浓度组}} = 2.64, P_{\text{低浓度组vs高浓度组}} < 0.05; t_{\text{低浓度组vs鞣酐组}} = 4.73, P_{\text{低浓度组vs鞣酐组}} < 0.05$ );密蒙花滴眼液中浓度组和高浓度组比较差异无统计学意义( $t = 0.09, P > 0.05$ );密蒙花滴眼液高浓度组与鞣酐组比较差异有统计学意义( $t = 3.09, P < 0.05$ ),见表4及图1。

2.4.2 各组兔用药4wk后 MUC5AC 水平比较 各组兔用药4wk后 MUC5AC 水平比较差异有统计学意义( $F =$

46.098,  $P < 0.01$ )。模型组与其余各组比较差异均有统计学意义( $t_{\text{模型组vs空白组}} = 14.79, P_{\text{模型组vs空白组}} < 0.01; t_{\text{模型组vs低浓度组}} = 4.93, P_{\text{模型组vs低浓度组}} < 0.01; t_{\text{模型组vs中浓度组}} = 8.09, P_{\text{模型组vs中浓度组}} < 0.01; t_{\text{模型组vs高浓度组}} = 8.45, P_{\text{模型组vs高浓度组}} < 0.01; t_{\text{模型组vs鞣酐组}} = 9.18, P_{\text{模型组vs鞣酐组}} < 0.01$ );密蒙花滴眼液低浓度组与中浓度组、高浓度组、鞣酐组比较,阳性表达减少,均有统计学意义 ( $t_{\text{低浓度组vs中浓度组}} = 3.16, P_{\text{低浓度组vs中浓度组}} < 0.05; t_{\text{低浓度组vs高浓度组}} = 3.52, P_{\text{低浓度组vs高浓度组}} < 0.05; t_{\text{低浓度组vs鞣酐组}} = 4.28, P_{\text{低浓度组vs鞣酐组}} < 0.05$ );密蒙花滴眼液中浓度组和高浓度组、鞣酐组比较差异均无统计学意义( $t_{\text{中浓度组vs高浓度组}} = 0.36, P_{\text{中浓度组vs高浓度组}} > 0.05; t_{\text{中浓度组vs鞣酐组}} = 1.09, P_{\text{中浓度组vs鞣酐组}} > 0.05$ );密蒙花滴眼液高浓度组与鞣酐组比较差异无统计学意义( $t = 0.73, P > 0.05$ ),见表4及图2。

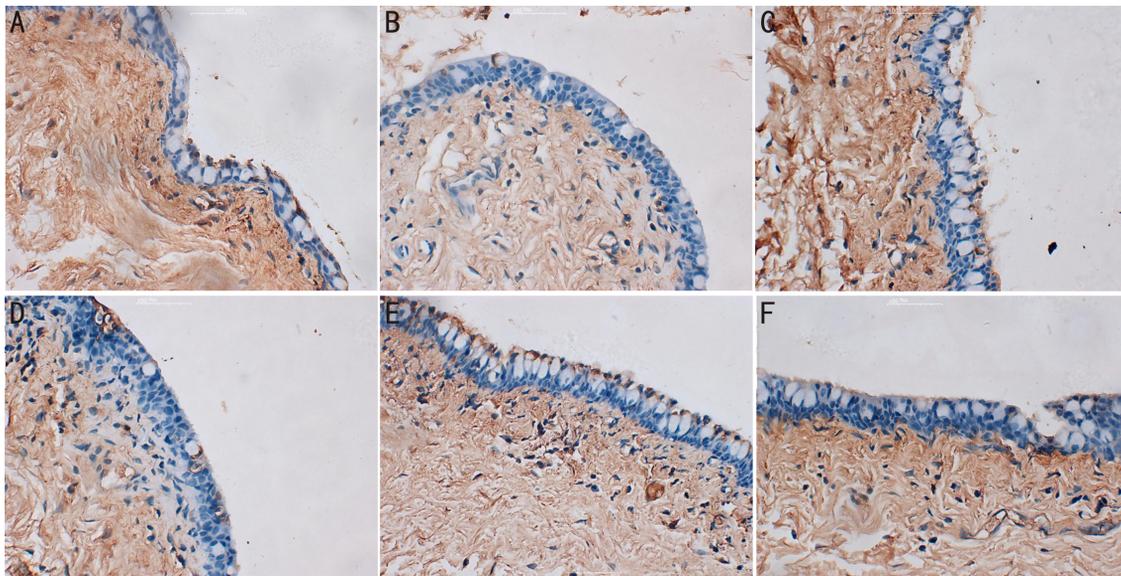


图2 用药4wk后免疫组化观察 MUC5AC 的表达( $\times 400$ ) A:空白组结膜上皮细胞中可见大量 MUC5AC 阳性表达,高于其它各组; B:模型组结膜上皮可见极少量 MUC5AC,阳性表达明显减少;C:密蒙花滴眼液低浓度组结膜上皮细胞阳性表达较空白组少,但较模型组多;D:密蒙花滴眼液中浓度组结膜上皮细胞可见较多阳性表达,较模型组明显增多;E:密蒙花滴眼液高浓度组结膜上皮细胞中可见较多阳性表达,较模型组明显增多;F:鞣酐组结膜上皮细胞中可见大量阳性表达。

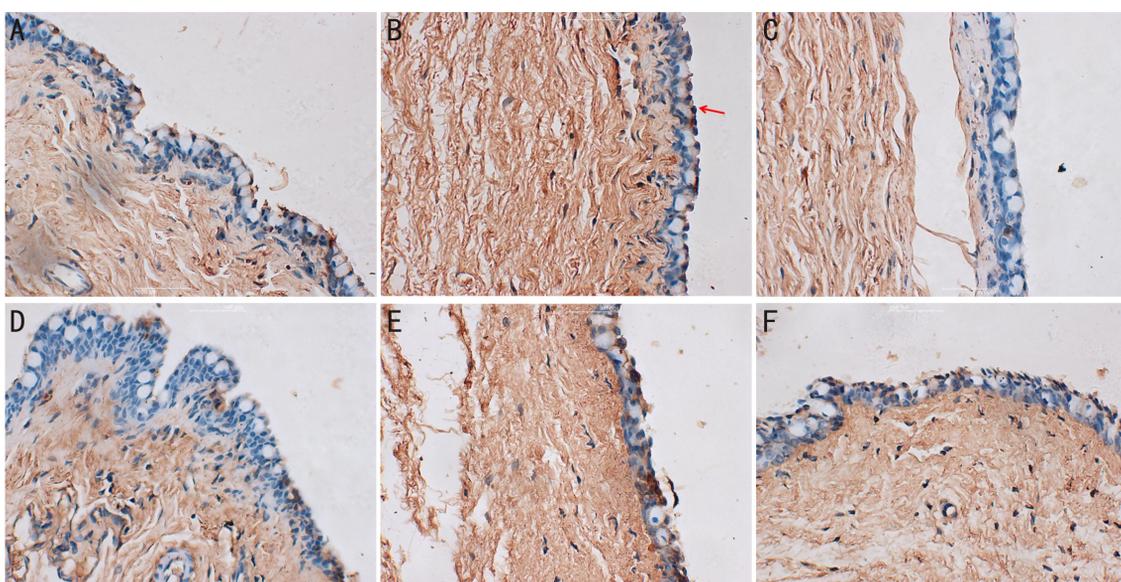


图3 用药4wk后免疫组化观察 P38MAPK 的表达( $\times 400$ ) A:空白组结膜上皮细胞中可见极少量 P38MAPK 阳性表达;B:模型组结膜上皮可见大量棕黄色颗粒沉着,阳性表达明显增多(箭头示);C:密蒙花滴眼液低浓度组结膜上皮细胞阳性表达较空白组增多,但较模型组少;D:密蒙花滴眼液中浓度组结膜上皮细胞可见少量阳性表达,但较模型组明显减少;E:密蒙花滴眼液高浓度组结膜上皮细胞中可见少量阳性表达,较模型组明显减少;F:鞣酐组结膜上皮细胞中可见少量阳性表达,较高浓度少。

2.4.3 各组兔用药4wk后 P38MAPK 水平比较 各组兔用药4wk后 P38MAPK 水平比较,差异有统计学意义( $F=162.058, P<0.01$ )。模型组与其余各组比较差异均有统计学意义( $t_{\text{模型组vs空白组}}=27.24, P_{\text{模型组vs空白组}}<0.01; t_{\text{模型组vs低浓度组}}=9.65, P_{\text{模型组vs低浓度组}}<0.01; t_{\text{模型组vs中浓度组}}=13.91, P_{\text{模型组vs中浓度组}}<0.01; t_{\text{模型组vs高浓度组}}=14.40, P_{\text{模型组vs高浓度组}}<0.01; t_{\text{模型组vs鞣酐组}}=17.87, P_{\text{模型组vs鞣酐组}}<0.01$ )；密蒙花滴眼液低浓度组用药4wk后 P38MAPK 水平与中浓度组、高浓度组、鞣酐组比较,阳性表达增加,均有统计学意义( $t_{\text{低浓度组vs中浓度组}}=4.26, P_{\text{低浓度组vs中浓度组}}<0.05; t_{\text{低浓度组vs高浓度组}}=4.75, P_{\text{低浓度组vs高浓度组}}<0.05; t_{\text{低浓度组vs鞣酐组}}=8.22, P_{\text{低浓度组vs鞣酐组}}<0.05$ )；密蒙花滴眼液中浓度组和高浓度组比较差异无统计学意义( $t=0.48, P>0.05$ )；密蒙花滴眼液中浓度组与鞣酐组比较差异有统计学意义( $t=8.22, P<0.05$ )；密蒙花滴眼液高浓度组与鞣

酐组比较,差异有统计学意义( $t=3.47, P<0.05$ )，见表4和图3。

### 3 讨论

目前干眼的病因尚未明确,干眼的致病因素多而复杂,包括有眼表炎症、性激素失衡、神经机能障碍、维生素A缺乏和免疫功能紊乱等,其中,炎症在干眼发病机制中的重要性已得到充分证明。多种炎症因子通过交互构成的细胞因子网络,使眼表组织炎症反应加重。2017年TFOS DEWS II在生物性别、社会性别及激素报告中详细论述了性激素(如雄激素和雌激素)、下丘脑-垂体激素、胰岛素、胰岛素样生长因子1、糖皮质激素和甲状腺激素对性别相关的眼部差异的影响,其中性激素的作用尤为重要<sup>[12-13]</sup>。本实验以此为依据,通过免疫组织化学分析发现,去势雄兔干眼模型组结膜中可见大量炎症细胞浸润,IL-1 $\beta$ 有较

强的阳性表达,说明干眼发病过程中结膜组织有炎症浸润。密蒙花滴眼液各浓度治疗后,炎性细胞表达较模型组明显减少,充分说明密蒙花滴眼液对于干眼表炎症有改善作用,但作用弱于雄激素。同时,密蒙花中、高浓度组对于炎症改善作用强于低浓度组。

泪液渗透压的升高和泪膜不稳定是干眼发生的两大核心机制,如眼表上皮的杯状细胞可以分泌成胶型黏蛋白,黏蛋白的作用很多,如影响细胞生长、分化、免疫、减少摩擦、润滑眼表、减少干燥环境对黏膜上皮细胞的损害,从而对泪膜稳定性的维持具有重要作用。黏蛋白主要有7种,而黏蛋白MUC5AC是构成泪膜黏液层的最主要成分,在维持眼表稳定方面发挥着主要作用<sup>[14-15]</sup>。本实验发现干眼病程中结膜上皮杯状细胞分泌MUC5AC量较空白组减少,经过密蒙花滴眼液局部治疗后,增加了结膜中MUC5AC的表达,同时,密蒙花中、高浓度组对于眼表MUC5AC的分泌作用高于低浓度组。

MAPK参与指导细胞对各种刺激的反应,如促细胞分裂素、渗透压、热休克和促炎细胞因子。它们调节细胞功能,包括增殖、基因表达、分化、有丝分裂、细胞存活和细胞凋亡<sup>[16]</sup>。本实验对去势后结膜中P38MAPK表达进行比较,发现去势雄兔模型组结膜中可见大量P38MAPK阳性表达,说明P38MAPK与干眼密切相关。密蒙花滴眼液各浓度滴双眼治疗后,密蒙花滴眼液通过下调P38MAPK蛋白含量,从而下调炎症因子的表达,其中密蒙花中、高浓度组作用强于低浓度组。我们认为密蒙花滴眼剂可能是通过干预P38MAPK通路,来阻断相关炎症反应,从而改善眼表症状,但具体的调节机制有待进一步的研究。

总之,密蒙花滴眼液可以下调去势雄兔干眼结膜组织中IL-1 $\beta$ 、P38MAPK的表达,增加MUC5AC的表达,从而减少干眼结膜组织的炎症浸润,维持泪膜稳定性,本研究表明密蒙花滴眼液对于干眼有一定的疗效,为干眼治疗提供了新思路,有广阔的应用前景。但具体的作用机制还有待进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 Steven P, Cursiefen C. Anti-inflammatory treatment in dry eye disease. *Klin Monbl Augenheilkd* 2012;229(5):500-505
- 2 邵毅. 国际眼科新共识(TFOS DEWS II)解读. *眼科新进展* 2018;38(1):1-12
- 3 Nelson JD, Craig JP, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II introduction. *Ocul Surf* 2017;15(3):269-275
- 4 刘祖国, 陈家祺. 眼表疾病学. 北京:人民卫生出版社 2003:286-294
- 5 曾金雄. 中老年男子雄激素部分缺乏研究进展与中药可能干预途径的探讨. *中国中医药信息杂志* 2003;10(5):3-5
- 6 石璐, 谢国勇, 王飒, 等. 密蒙花的药学研究进展. *中国野生植物资源* 2016;35(3):39-45
- 7 吴权龙, 彭清华, 姚小磊, 等. 密蒙花提取物滴眼剂对实验性干眼症大鼠泪腺组织形态学的影响. *湖南中医药大学学报* 2009;29(5):22-25
- 8 欧阳云, 彭俊, 彭清华. 密蒙花颗粒剂对去势雄兔泪腺细胞凋亡因子Bax、Bcl-2、Fas和FasL的影响. *中国中西医结合杂志* 2017;37(2):91-95
- 9 姚小磊, 彭清华, 吴权龙, 等. 密蒙花提取物对去势导致干眼症兔泪腺细胞凋亡的影响. *中国中医眼科杂志* 2007;17(3):139-144
- 10 彭俊, 欧阳云, 谭涵宇, 等. 密蒙花滴眼液对去势雄兔干眼症泪腺细胞炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL- $\beta$ 的影响. *湖南中医药大学学报* 2017;37(5):11-14
- 11 马轶群, 王传富, 刘美光. 去势雄兔干眼病模型角膜上皮凋亡及相关基因表达的研究. *眼科研究* 2004;22(3):286-289
- 12 Sullivan DA, Rocha EM, Aragona P, et al. TFOS DEWS II sex, gender, and hormones report. *Ocul Surf* 2017;15(3):284-333
- 13 Eckstein AK, Finkenrath A, Heiligenhaus A, et al. Dry eye syndrome in thyroid-associated ophthalmopathy: lacrimal expression of TSH receptor suggests involvement of TSH R-specific autoantibodies. *Acta Ophthalmol Scand* 2004;82(3):291-297
- 14 吴德佩, 杨军. 针刺对干眼症患者泪液黏蛋白5AC表达的影响. *中国中医眼科杂志* 2012;22(4):267-269
- 15 祁俏然, 沈光林, 马晓萍. *国际眼科杂志* 2016;16(4):100-104
- 16 Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiology Rev* 2001;81(2):807