

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.23.004

甲基沿阶草酮甲对干眼症小鼠的治疗作用及机制*

王珏 苏丽萍 严岩 李雪会 张婕 韩静[△]

(空军军医大学唐都医院眼科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨甲基沿阶草酮甲(Methyl ophiopogonanone A, MOA)对干眼症(Dry eye disease, DED)小鼠的治疗作用及机制。**方法:**将雄性 BALB/c 小鼠(7~8 周龄, 体重 18-22 g)随机分为 5 组($n=12$): 对照组、DED 组、DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组。对照组为正常小鼠, 其他组小鼠双眼滴入质量浓度为 0.2% 的苯扎氯铵溶液诱导 DED 模型小鼠, 每日 1 次, 连续 6 周。建模后, 对照组和 DED 组小鼠腹腔注射 0.5 mL 的 1% 二甲基亚砷溶液, DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组小鼠依次腹腔注射 0.5 mL 剂量为 10、20 和 40 mg/kg 的 MOA, 每天 1 次, 共给药 28 天。治疗结束后, 检测各组小鼠的泪液分泌量和角膜荧光素钠染色分级, 并进行角膜苏木素伊红(Hematoxylin and eosin, HE)染色、结膜过碘酸-雪夫(Periodic acid-Schiff, PAS)染色和角膜 TUNEL 染色。通过 Western blot 检测角膜 K10 蛋白表达水平。检测角膜氧化应激指标丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)水平。通过实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应检测角膜中肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bcl2-associated X, Bax)和 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)的 mRNA 水平。**结果:**与对照组比较, DED 组小鼠的泪液分泌量降低($P<0.05$), 角膜荧光素钠染色分级升高($P<0.05$), 角膜出现明显病变, 结膜杯状细胞数量降低($P<0.05$)。角膜 Bcl-2 mRNA 相对表达量、SOD 水平降低($P<0.05$), 角膜 TUNEL 阳性率、Bax mRNA 相对表达量、K10 蛋白相对表达量、MDA、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平升高($P<0.05$)。与 DED 组比较, DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组的泪液分泌量升高($P<0.05$), 角膜荧光素钠染色分级降低($P<0.05$), 角膜病变减轻, 结膜杯状细胞数量升高($P<0.05$)。角膜 TUNEL 阳性率、Bax mRNA、K10 蛋白相对表达量、MDA、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平降低($P<0.05$), Bcl-2 mRNA 相对表达量、SOD 水平升高($P<0.05$)。**结论:**甲基沿阶草酮甲有效减轻干眼症小鼠的症状及眼表病变, 其机制可能与抑制杯状细胞凋亡和氧化应激及炎症反应有关。

关键词:干眼症; 甲基沿阶草酮甲; 杯状细胞; 氧化应激; 炎症

中图分类号: R-33; R777.34 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2023)23-4420-07

Therapeutic Effect and Mechanism of Methyl Ophiopogonanone A on Dry Eye Disease in Mice*

WANG Jue, SU Li-ping, YAN Yan, LI Xue-hui, ZHANG Jie, HAN Jing[△]

(Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To explore the therapeutic effect and mechanism of methyl ophiopogonanone A (MOA) on dry eye disease (DED) rats. **Methods:** Male BALB/c mice (7~8 weeks old, weight 18-22 g) were randomly divided into 5 groups ($n=12$): control group, DED group, DED+10MOA group, DED+20MOA group and DED+40MOA group. Except the mice in control group, mice in other groups were given benzalkonium chloride solution with a mass concentration of 0.2% in both eyes to induce DED model mice, once a day for 6 weeks. After modeling, mice in the control group and DED group were intraperitoneally injected with 0.5 mL of 1% dimethyl sulfoxide solution, and mice in DED+10MOA group, DED+20MOA group and DED+40MOA group were intraperitoneally injected with 0.5 mL 10, 20 and 40 mg/kg/d MOA, once a day for 28 days. After treatment, the tear secretion and corneal fluorescein sodium staining grade of mice in each group were detected, and corneal hematoxylin and eosin (HE) staining, conjunctival periodic acid-Schiff (PAS) staining and corneal TUNEL staining were performed. The expression level of corneal K10 protein was detected by Western blot. The levels of corneal oxidative stress indicators malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were detected. The mRNA levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), Bcl2-associated X (Bax) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) in cornea were detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. **Results:** Compared with control group, the tear secretion in DED group decreased ($P<0.05$), the grading of corneal fluorescein sodium staining increased ($P<0.05$),

* 基金项目: 陕西省科技攻关重点研发计划项目(2021SF-158); 唐都医院科技创新发展基金资助项目(2019LCYJ014)

作者简介: 王珏(1985-), 女, 硕士, 副主任医师, 主要研究方向: 眼眶病、眼肿瘤和干眼, E-mail: sdfluo85WT@163.com

[△] 通讯作者: 韩静(1978-), 女, 硕士生导师, 副教授, 主要研究方向: 白内障、玻璃体视网膜疾病和眼外伤等各类复杂眼病,

E-mail: hanjing.cn@163.com

(收稿日期: 2023-03-07 接受日期: 2023-04-03)

corneal lesions appeared, the number of conjunctival goblet cells decreased ($P<0.05$), corneal Bcl-2 mRNA relative expression level and SOD level decreased ($P<0.05$), corneal TUNEL positive rate, Bax mRNA relative expression level, K10 protein relative expression level, MDA, TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels increased ($P<0.05$). Compared with DED group, the tear secretion in DED+10MOA group, DED+20MOA group and DED+40MOA group increased ($P<0.05$), the grading of corneal fluorescein sodium staining decreased ($P<0.05$), the corneal lesions were alleviated, the number of conjunctival goblet cells increased ($P<0.05$). The positive rate of TUNEL, Bax mRNA, relative expression level of K10 protein, MDA, TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels decreased ($P<0.05$), while the relative expression level of Bcl-2 mRNA and SOD level increased ($P<0.05$). **Conclusions:** Methyl ophiopogonanone A effectively alleviates the symptoms and ocular surface lesions in mice with dry eye disease, and its mechanism may be related to the inhibition of goblet cell apoptosis, oxidative stress, and inflammation.

Key words: Dry eye disease; Methyl ophiopogonanone A; Goblet cells; Oxidative stress; Inflammation

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R777.34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)23-4420-07

前言

干眼症(Dry eye disease, DED)是一种多因素引起的泪膜和眼表疾病,可导致多种眼表病理变化,如结膜杯状细胞丢失、角膜上皮缺损、上皮鳞状化和新生血管形成,主要临床表现为眼睛干涩、有异物感、眼痒、畏光、视力波动等。目前,人工泪液是干眼症常规治疗的首选,但其对重症疗效不佳,且无法逆转病变。环孢霉素、激素等药物虽然具有一定疗效,但存在副作用。因此,仍需要开发新型无副作用、疗效好的干眼症治疗药物。

麦冬是一味具有多种药理活性的传统中药,中医多以麦冬配伍其他药物治疗干眼症,疗效良好^[1-2]。然而,麦冬中治疗干眼症的主要化学成分尚不明确。甲基沿阶草酮甲(Methyl ophiopogonanone A, MOA)是麦冬中含量较高的高异黄酮类化合物,分子量 342.34,分子式 $C_{19}H_{18}O_6$ (图 1)^[3],具有抗氧化、抗炎、抗细胞凋亡、抗高脂血症、心脑血管保护等活性^[4-6]。结膜杯状细胞的主要功能是分泌粘蛋白,其数量减少是干眼症的主要特征之一^[7]。研究表明麦冬高异黄酮可促进大鼠结膜杯状细胞增殖,但尚无甲基沿阶草酮甲在体内治疗干眼症的相关报道。因此,本研究旨在探讨甲基沿阶草酮甲对于干眼症动物模型的治疗作用及可能机制,以前为干眼症的药物开发提供候选药物。

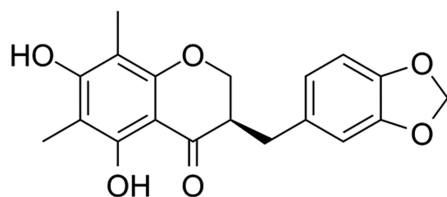


图 1 甲基沿阶草酮甲(MOA)的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of methyl ophiopogonanone A (MOA)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 甲基沿阶草酮甲(货号:HY-N2437,纯度:98.01%)(美国 Med Chem Express 公司);苯扎氯铵(货号:63449-41-2)(北京索莱宝科技有限公司);荧光素钠(货号:46960)(美国 Sigma-Aldrich 公司);酚红棉线(货号:20220511)

(天津晶明新技术开发有限公司);二甲基亚砜(货号:D2650)(美国 Sigma 公司);苏木素伊红(Hematoxylin-eosin staining, HE)染色试剂盒(货号:C0105M)、过碘酸-雪夫(Periodic acid-schiff, PAS)染色试剂盒(货号:C0142S)、L 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色试剂盒(货号:C1088)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒(货号:S0131S)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)试剂盒(货号:S0101S)(碧云天生物技术研究);PrimeScriptTMRT 试剂盒(货号:RR064A-1)、SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(货号:RR820A)(日本 TAKARA 公司);角膜 K10 蛋白(Cytokeratin 10, K10)一抗(货号:ab76318)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗(货号:ab8245)、HRP 标记的 IgG 二抗(货号:ab6721)(英国 Abcam 公司)。

1.1.2 实验动物 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠(7~8 周龄,体重 18~22 g)购自陕西师范大学[SCXK(陕)2021-002]。小鼠在 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、55 $\pm$ 5%湿度、12 h 明暗交替环境中饲养 7 d 以适应新环境,自由进食和饮水。然后进行后续实验,实验期间饲养环境保持恒定。本研究动物实验操作符合动物福利规范,并经过空军军医大学唐都医院动物医学伦理委员会审批通过(伦审 2021-DL-1026)。

1.2 方法

1.2.1 干眼症小鼠模型的建立 参考文献^[8]方法,通过双眼滴入苯扎氯铵溶液建立干眼症小鼠模型。取 55 只小鼠进行建模,小鼠双眼滴入质量浓度为 0.2%的苯扎氯铵溶液,滴眼量为 5 μ L/眼,每日 1 次,连续 6 周。观察到泪液分泌量明显低于正常小鼠且角膜荧光素钠染色分级为 4 级时表示建模成功。

1.2.2 动物分组及给药处理 55 只小鼠中共有 49 只建模成功。建模后,将模型小鼠随机分为 4 组($n=12$):DED 组、DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组。另取 12 只未建模的健康小鼠作为对照组。对照组和 DED 组小鼠腹腔注射 0.5 mL 的 1%二甲基亚砜溶液,DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组小鼠依次腹腔注射 0.5 mL 10、20 和 40 mg/kg/d 的甲基沿阶草酮甲(溶于 1%二甲基亚砜),甲基沿阶草酮甲剂量参考文献^[4,9]设置。每天 1 次,共给药 28 天。

1.2.3 泪液分泌量测定 通过酚红棉线法^[9]测定泪液分泌量。小

鼠腹腔注射 30 mg/kg 戊巴比妥钠,麻醉固定。将小鼠下眼睑向下拉暴露下结膜囊,将酚红棉线放在下睑内侧约 1/3 结膜囊内 15 s。测量被泪液浸湿的酚红棉线红色部分长度,每眼重复测量 3 次取平均值。

1.2.4 角膜荧光素钠染色分级 将 1 μ L 的 0.1% 液体荧光素钠滴入小鼠结膜囊并闭合眼睑 3 次。90 s 后在裂隙灯显微镜下用钴蓝滤光片观察角膜荧光素钠染色并进行分级。参考文献^[10]进行等级评估:0 级:角膜无染色;1 级: $\leq 1/8$ 角膜染色;2 级: $\leq 1/4$ 角膜染色;3 级: $\leq 1/2$ 角膜染色;4 级: $\geq 1/2$ 角膜染色。

1.2.5 角膜 HE 染色和结膜 PAS 染色 摘除小鼠眼球,4% 多聚甲醛固定,常规制作 4 μ m 厚眼球石蜡切片。按照试剂盒说明进行角膜 HE 染色和结膜 PAS 染色。通过 HE 染色评价角膜形态。通过 PAS 染色评价结膜杯状细胞数量,杯状细胞被染成桃红色。随机选取 5 个高倍视野(400 倍),计数杯状细胞数量。

1.2.6 角膜 TUNEL 染色 眼球切片脱蜡至水后,滴加 20 μ g/mL 不含 DNase 的蛋白酶 K 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次。与 50 μ L TUNEL 检测液在 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min, PBS 洗涤 3 次。用 DAPI 复染,抗荧光淬灭封片液封片。奥林巴斯 Fluoview FV1000 共聚焦显微镜拍摄照片并统计 TUNEL 阳性率。

1.2.7 Western blot 检测 将角膜组织在冷 RIPA 缓冲液中匀浆,离心提取蛋白质。角膜蛋白质浓度通过 BCA 法测定。在 12% SDS-PAGE 上电泳分离等量的角膜蛋白质,然后电泳转移到 PVDF 膜上。在 5% 胎牛血清中封闭 1 h 后,将膜与 1:5000 稀释的 K10 和 GAPDH (内参)一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用含有 0.05% Tween-20 的 Tris 缓冲液洗涤 3 次后,将膜与 1:5000 稀释的 HRP 标记的 IgG 二抗室温孵育 60 min,通过 ECL 显色。通过 Image Lab 软件计算条带灰度值并进行半定量分析。

1.2.8 角膜组织氧化应激指标检测 将角膜组织剪碎匀浆,4 $^{\circ}$ C 3000 r/min 离心 10 min 分离上清液,按照试剂盒说明检测

角膜组织中氧化应激指标 MDA 和 SOD 水平。

1.2.9 RT-qPCR 检测 使用 TRIzol 提取角膜组织总 RNA。使用 PrimeScriptTMRT 试剂盒进行逆转录,使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒进行 RT-qPCR。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α):正向:5'-AGCCGATGGGTTGTACCTTGTCTA-3',反向:5'-TGAGATAGCAAATCGGCTGACGGT-3';白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β):正向:5'-TTGTGGCTGTGGAGAAGCTG-3',反向:5'-GCCGTCTTTCATACACAGG-3';白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6):正向:5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3',反向:5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3';B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X, Bax):正向:5'-GGCGAATTGGAGATGAACTG-3',反向:5'-AAAGTAGAAGAGGGCAACCA-3';B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2):正向:5'-AGGATTGTGGCCTTCTTTGA-3',反向:5'-ACCTACCCAGCCTCCGTTAT-3';GAPDH (内参):正向:5'-AACTTGGCATTGTGGAAGG-3',反向:5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'。

1.3 统计学分析

使用 SPSS21.0 软件分析数据,采用单因素方差分析和 LSD 检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲基沿阶草酮甲对干眼症小鼠泪液分泌量和角膜荧光素钠染色分级的影响

与对照组比较,DED 组小鼠的泪液分泌量降低,角膜荧光素钠染色分级升高 ($P < 0.05$)。与 DED 组比较,DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组小鼠的泪液分泌量呈甲基沿阶草酮剂量依赖性升高,角膜荧光素钠染色分级呈甲基沿阶草酮剂量依赖性降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

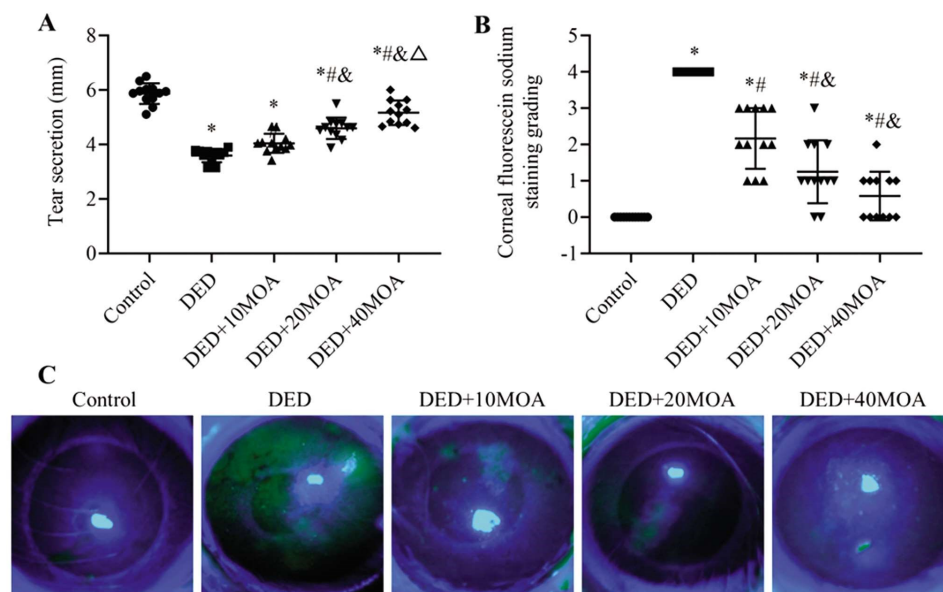


图 2 各组小鼠的泪液分泌量和角膜荧光素钠染色分级

Fig. 2 Tear secretion and corneal fluorescence sodium staining grade of mice in each group

Note: A: tear secretion volume; B: corneal fluorescent sodium staining grading; C: corneal fluorescent sodium staining; compared with Control group,

* $P < 0.05$; compared with DED group, [#] $P < 0.05$; compared with DED+10MOA group, ^{*} $P < 0.05$; compared with DED+20MOA group, [△] $P < 0.05$

2.2 甲基沿阶草酮甲对干眼症小鼠角膜形态和结膜杯状细胞数量的影响

角膜 HE 染色显示,对照组角膜形态正常。与对照组比较,DED 组角膜上皮细胞层表面粗糙且伴有空泡样细胞,角膜基

质出现炎症细胞浸润。与 DED 组比较,DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组的上述病变均减轻。见图 3A。

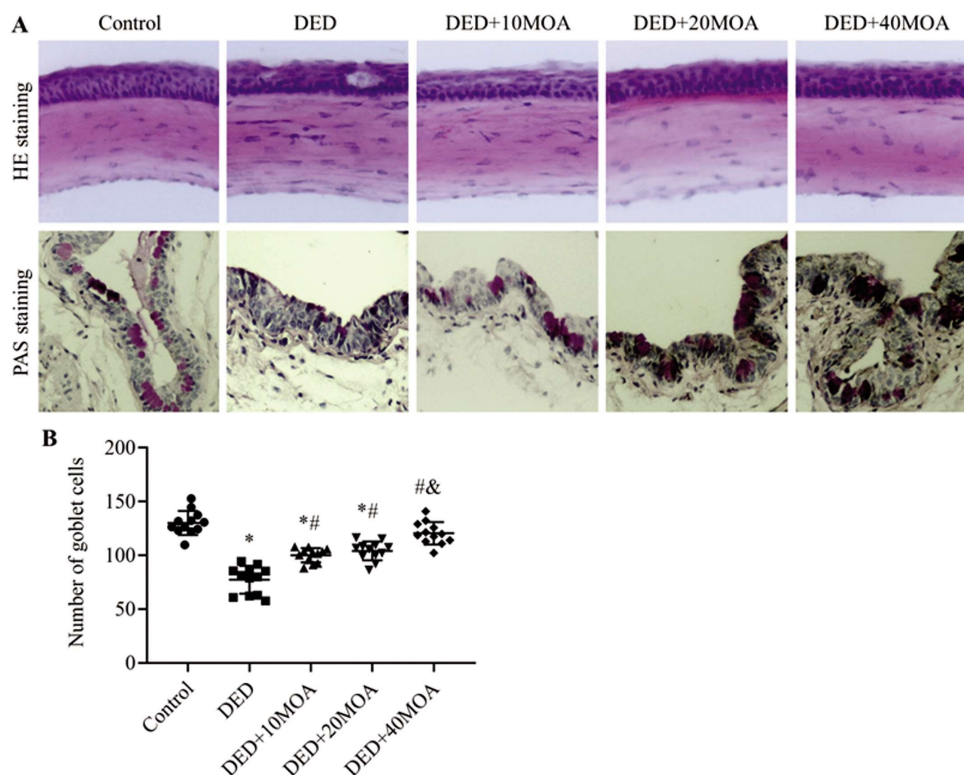


图 3 各组小鼠的角膜 HE 染色和结膜 PAS 染色

Fig. 3 Corneal HE staining and conjunctiva PAS staining in each group of mice

Note: A: corneal HE staining and conjunctival PAS staining images (400 $\times$); B: goblet cell number; compared with Control group, * $P<0.05$; compared with DED group, # $P<0.05$; compared with DED+10MOA group, & $P<0.05$; compared with DED+20MOA group, ^ $P<0.05$.

与对照组比较,DED 组的结膜杯状细胞数量降低($P<0.05$)。与 DED 组比较,DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组的结膜杯状细胞数量呈甲基沿阶草酮剂量依赖性升高($P<0.05$)。见图 3。

2.3 甲基沿阶草酮甲对干眼症小鼠角膜细胞凋亡的影响

与对照组比较,DED 组的角膜 TUNEL 阳性率升高($P<0.05$)。与 DED 组比较,DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组的角膜 TUNEL 阳性率呈甲基沿阶草酮剂量依赖性降低($P<0.05$)。见图 4。

与对照组比较,DED 组的角膜 Bax mRNA 相对表达量升高,角膜 Bcl-2 mRNA 相对表达量降低($P<0.05$)。与 DED 组比较,DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组的角膜 Bax mRNA 相对表达量呈甲基沿阶草酮剂量依赖性降低,角膜 Bcl-2 mRNA 相对表达量呈甲基沿阶草酮剂量依赖性升高($P<0.05$)。见图 5。

2.4 甲基沿阶草酮甲对干眼症小鼠眼表鳞状上皮化生的影响

与对照组比较,DED 组的角膜 K10 蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。与 DED 组比较,DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组的角膜 K10 蛋白相对表达量呈甲基沿阶草酮剂量依赖性降低($P<0.05$)。见图 6。

2.5 甲基沿阶草酮甲对干眼症小鼠角膜组织氧化应激的影响

与对照组比较,DED 组的角膜 MDA 水平升高,角膜 SOD 水平降低($P<0.05$)。与 DED 组比较,DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组的角膜 MDA 水平呈甲基沿阶草酮剂量依赖性降低,角膜 SOD 水平呈甲基沿阶草酮剂量依赖性升高($P<0.05$)。见图 7。

2.6 甲基沿阶草酮甲对干眼症小鼠角膜炎症因子表达的影响

与对照组比较,DED 组的角膜 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 水平升高($P<0.05$)。与 DED 组比较,DED+10MOA 组、DED+20MOA 组和 DED+40MOA 组的角膜 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 水平呈甲基沿阶草酮剂量依赖性降低($P<0.05$)。见图 8。

3 讨论

干眼症是一种常见的眼表慢性多因素疾病,其特征是无法产生高质量或足够数量的泪液来滋润眼睛^[1]。角膜荧光素钠染色是评价角膜损伤的有效方法。本研究结果显示甲基沿阶草酮甲剂量依赖性地升高了干眼症小鼠泪液分泌量并降低了角膜荧光素钠染色分级,有效缓解了干眼症小鼠症状,提示甲基沿阶草酮甲可能是一种治疗干眼症的麦冬高异黄酮。

眼睛的角膜表面提供了一个屏障,在视觉中也具有重要作

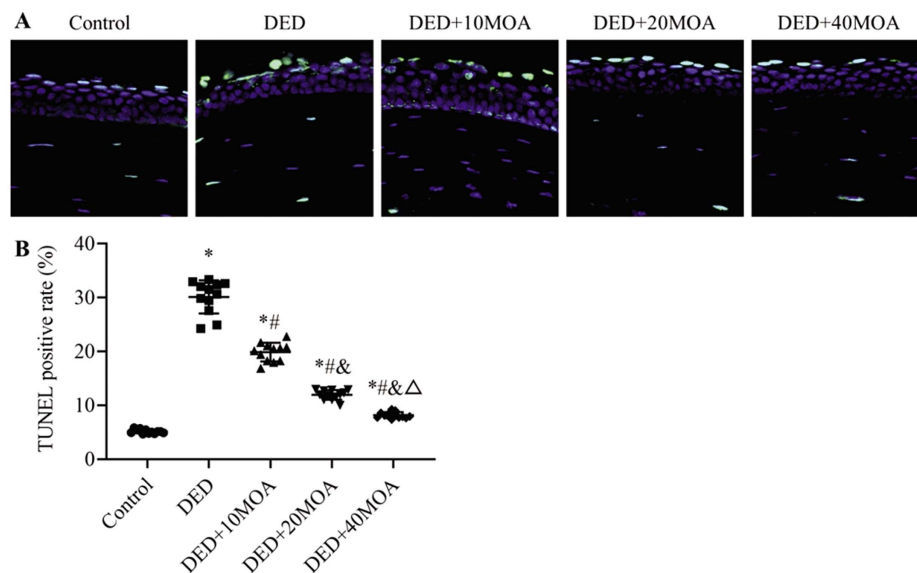


图4 各组小鼠的角膜 TUNEL 染色

Fig. 4 Corneal TUNEL staining of mice in each group

Note: A: TUNEL staining image (400x); B: positive rate of TUNEL; compared with Control group, * $P<0.05$; compared with DED group, # $P<0.05$; compared with DED+10MOA group, & $P<0.05$; compared with DED+20MOA group, Δ $P<0.05$.

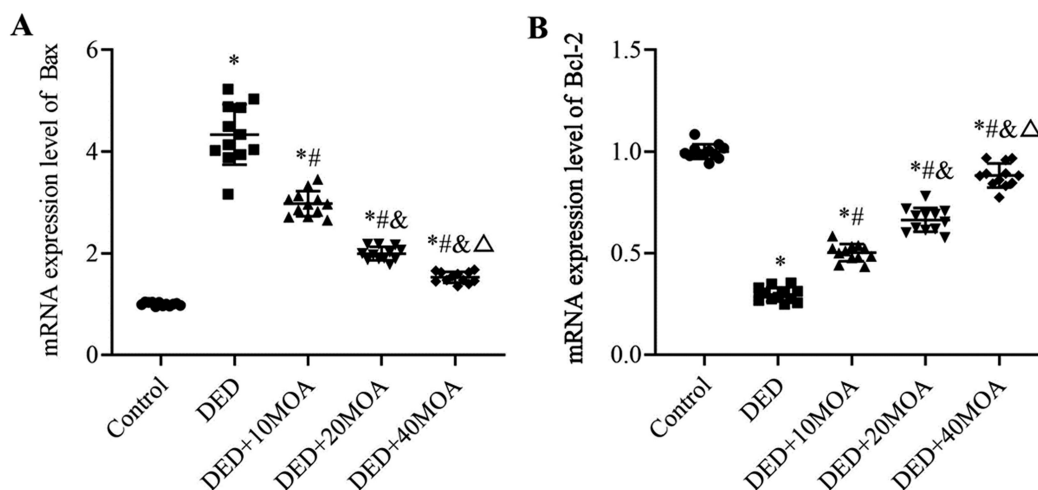


图5 各组小鼠的角膜 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达水平

Fig. 5 Corneal Bax and Bcl-2 mRNA levels of mice in each group

Note: A: relative mRNA expression level of Bax; B: relative mRNA expression level of Bcl-2; compared with Control group, * $P<0.05$; compared with DED group, # $P<0.05$; compared with DED+10MOA group, & $P<0.05$; compared with DED+20MOA group, Δ $P<0.05$.

用,可以保护眼眶结构免受紫外线照射以及传染性和有害物质的侵害。角膜上皮具有称为“泪膜”的分层结构,可滋润并防止角膜受损或感染^[12]。角膜上皮是一种高度敏感的组织,可为眼睛补充水分,并能够快速再生以治愈浅表眼外伤。在轻微外伤中,角膜细胞会在受伤后 24 h 内再生,并在 7 到 10 天内愈合,但在未经治疗的干眼症患者的角膜更深的层受到损害,需要更长的恢复时间^[13]。本研究结果显示甲基沿阶草酮甲剂量依赖性地减轻了干眼症小鼠角膜上皮细胞空泡化,角膜基质炎症细胞浸润等病变,并抑制了角膜细胞凋亡,从而缓解了苯扎氯铵诱导的角膜损伤。

结膜杯状细胞在维持眼表稳定性、润滑及保护眼表等方面起重要作用。结膜杯状细胞通过分泌粘蛋白形成粘液层,使结膜和角膜上皮层的表面由疏水性变为亲水性,从而维持眼表湿

润。干眼症患者往往结膜杯状细胞减少或丢失,粘蛋白分泌不足^[7]。本研究表明甲基沿阶草酮甲剂量依赖性地升高了干眼症小鼠结膜杯状细胞数量。其他学者报道麦冬高异黄酮可促进大鼠结膜杯状细胞增殖^[7],支持本研究结果。眼表鳞状上皮化生是包括干眼症在内的各种严重眼表炎症性疾病的标志^[14]。K10 是鳞状上皮化生的特异性标志物^[15]。眼表鳞状上皮化生的发生与杯状细胞丢失密切相关,杯状细胞丢失可引起非角化上皮化生为角化上皮。本研究表明,甲基沿阶草酮甲剂量依赖性地降低了干眼症小鼠角膜 K10 蛋白,从而减少了眼表鳞状上皮化生。

活性氧(ROS),例如超氧阴离子、过氧化氢和羟基自由基,是氧化代谢过程中的副产物。细胞中抗氧化和促氧化系统之间的平衡受到干扰时导致过度氧化应激反应,引起 ROS 的过量生成,破坏脂质、蛋白质、碳水化合物和核酸而导致细胞死亡。

氧化应激在干眼症发病机制中具有重要作用,局部或全身使用抗氧化剂可能在治疗干眼症方面具有广阔前景^[16,17]。线粒体中的氧化损伤会诱发与干眼症相关的泪腺损伤^[18]。泪膜和眼表中含有足量的SOD、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶,干眼症患者的泪膜和眼表中上述抗氧化酶活性降低^[19,20]。脂质过氧化标志物MDA在干眼症患者的泪膜和眼表中的表达增加^[21]。本研究显示甲基阶草酮甲剂量依赖性地降低了干眼症小鼠角膜MDA水平,升高了SOD水平,减轻了角膜氧化应激。

炎症和干眼症之间存在密切关系。细胞因子和受体介导的炎症在干眼症中普遍存在^[22]。泪膜高渗透压、泪膜不稳定与炎症反应相互影响,泪膜高渗透压导致眼表上皮细胞高渗透,刺激炎症级联反应,导致炎症细胞募集及炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的大量分泌^[23,24]。其他学者研究表明,甲基阶草酮具有明显的抗炎作用,可下调IL-6的表达^[25]。本研究表明甲基阶草酮甲剂量依赖性地降低了干眼症小鼠角膜TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平,从而抑制了角膜炎症。

综上所述,甲基阶草酮甲课有效减轻干眼症小鼠的症状及眼表病变,其机制可能与抑制杯状细胞凋亡、氧化应激和炎症有关,其可能作为治疗干眼症的候选药物。

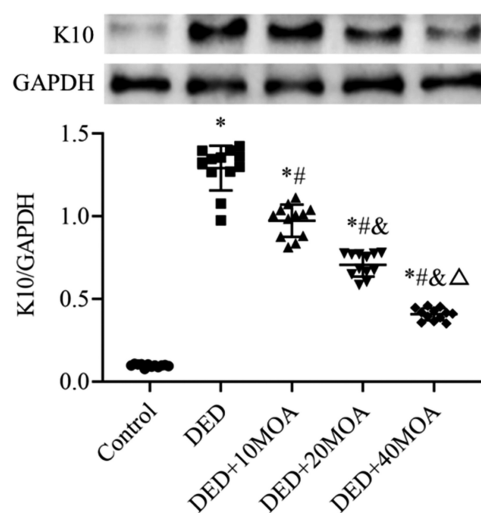


图6 各组小鼠的角膜K10蛋白相对表达量

Fig. 6 Relative expression of K10 protein in cornea of mice in each group

Note: Compared with Control group, * $P<0.05$; compared with DED group,

[#] $P<0.05$; compared with DED+10MOA group, [#] $P<0.05$;

compared with DED+20MOA group, ^Δ $P<0.05$.

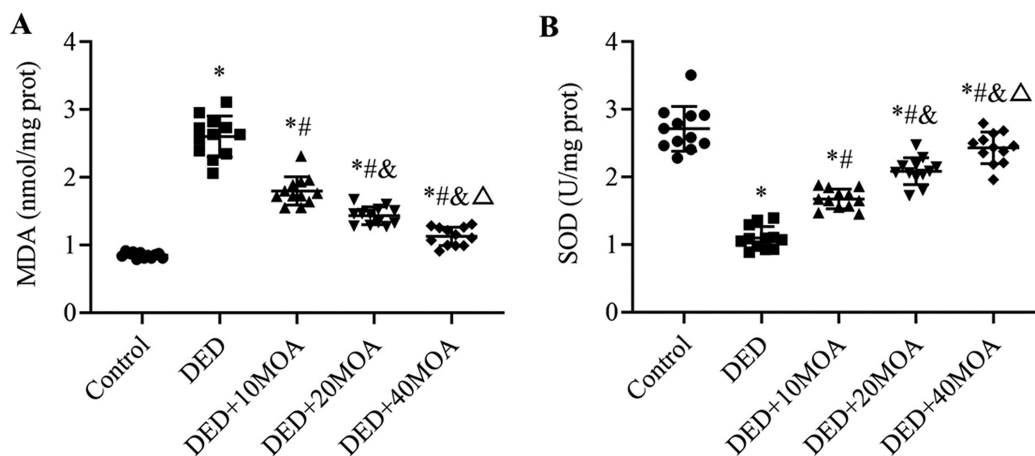


图7 各组小鼠的角膜MDA和SOD水平

Fig. 7 Corneal MDA and SOD levels of mice in each group

Note: A: MDA level; B: SOD level; compared with Control group, * $P<0.05$; compared with DED group, [#] $P<0.05$;

compared with DED+10MOA group, [#] $P<0.05$; compared with DED+20MOA group, ^Δ $P<0.05$.

参考文献(References)

- [1] 田月娥. 加味沙参麦冬汤治疗干眼症52例 [J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(5): 62
- [2] 卢玉燕, 钟新娜, 易昀敏, 等. 沙参麦冬汤加减方联合针刺治疗LASIK术后干眼症的疗效观察 [J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(4): 411-414
- [3] 曾品涛, 周慧, 郑一敏, 等. HPLC同时测定麦冬中3种高异黄酮含量 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(1): 71-74
- [4] He F, Xu BL, Chen C, et al. Methylophiopogonanone A suppresses ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis in mice via activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(6): 763-771
- [5] Li Z, Wu YY, Yu BX. Methylophiopogonanone A, an Ophiopogon homoisoflavonoid, alleviates high-fat diet-induced hyperlipidemia: assessment of its potential mechanism [J]. Braz J Med Biol Res, 2020, 53(3): e9201
- [6] Lin M, Sun W, Gong W, et al. Methylophiopogonanone A Protects against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury and Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption In Vitro [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124558
- [7] 朱培庆. 黄连麦冬提取物对体外培养大鼠结膜杯状细胞增殖作用及有效成分配伍筛选的实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2011
- [8] 陈宇, 马贤德, 刘昱麟, 等. 山茱萸对苯扎氯铵诱导的干眼症小鼠视黄醇转运调控作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3403-3408
- [9] 杜婧, 李勇, 高金荣, 等. 白介素1受体相关激酶1(IRAK1)和NF- κ B在苯扎氯铵诱导的干眼症小鼠角膜和结膜组织中的表达 [J]. 眼科新进展, 2019, 39(3): 223-228
- [10] Pauly A, Brignole-Baudouin F, Labbé A, et al. New tools for the

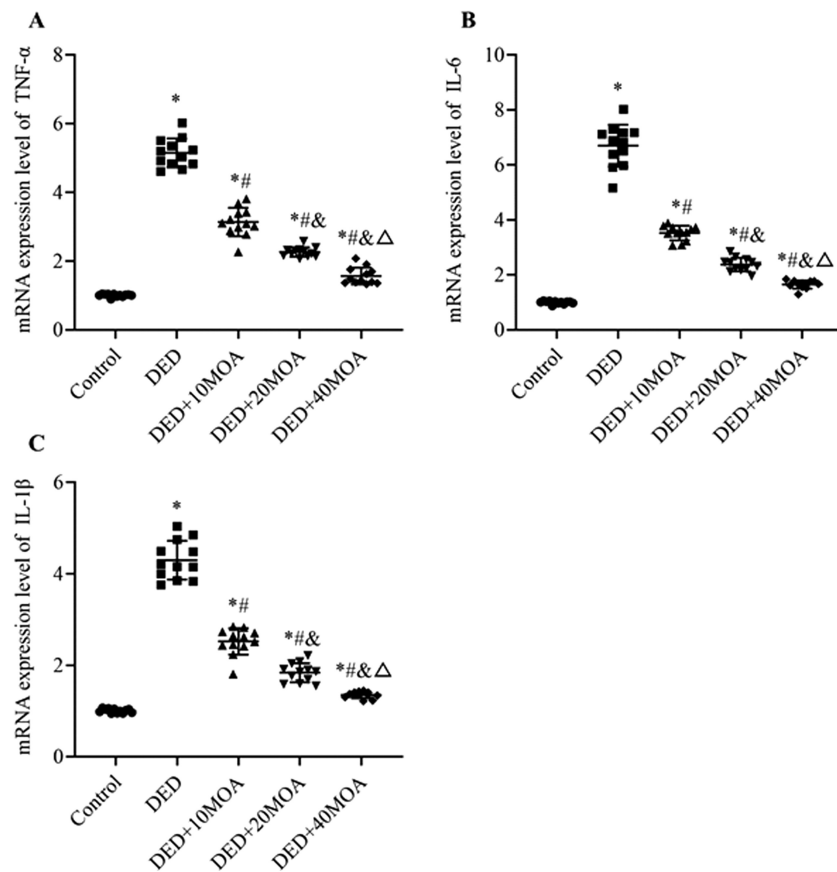


图 8 各组小鼠的角膜 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 表达水平

Fig. 8 mRNA levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in corneas of mice in each group

Note: A: Relative expression level of TNF- α mRNA; B: relative expression level of IL-1 β mRNA; C: relative expression level of IL-6 mRNA; compared with Control group, * P <0.05; compared with DED group, # P <0.05; compared with DED+10MOA group, & P <0.05; compared with DED+20MOA group, Δ P <0.05.

evaluation of toxic ocular surface changes in the rat [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(12): 5473-5483

- [11] Nelson JD, Craig JP, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II introduction [J]. Ocul Surf, 2017, 15(3): 269-275
- [12] Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, et al. TFOS DEWS II tear film report[J]. Ocul Surf, 2017, 15(3): 366-403
- [13] DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea [J]. J Cataract Refract Surg, 2011, 37(3): 588-598
- [14] Xiao X, Luo P, Zhao H, et al. Amniotic membrane extract ameliorates benzalkonium chloride-induced dry eye in a murine model[J]. Exp Eye Res, 2013, 115: 31-40
- [15] 肖启国, 周静, 周芳, 等. 米诺环素滴眼液对小鼠干眼的疗效及机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(25): 1-7
- [16] Li S, Lu Z, Huang Y, et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory micelles: break the dry eye vicious cycle[J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9 (17): e2200435
- [17] Navel V, Sapin V, Henrioux F, et al. Oxidative and antioxidative stress markers in dry eye disease: A systematic review and meta-analysis[J]. Acta Ophthalmol, 2022, 100(1): 45-57
- [18] Uchino Y, Kawakita T, Ishii T, et al. A new mouse model of dry eye disease: oxidative stress affects functional decline in the lacrimal gland[J]. Cornea, 2012, 31(Suppl 1): S63-67
- [19] Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. Cell Signal,

2012, 24(5): 981-990

- [20] Jee D, Park SH, Kim MS, et al. Antioxidant and inflammatory cytokine in tears of patients with dry eye syndrome treated with preservative-free versus preserved eye drops [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(8): 5081-5089
- [21] Choi W, Lian C, Ying L, et al. Expression of lipid peroxidation markers in the tear film and ocular surface of patients with non-sjogren syndrome: potential biomarkers for dry eye disease [J]. Curr Eye Res, 2016, 41(9): 1143-1149
- [22] Periman LM, Perez VL, Saban DR, et al. The immunological basis of dry eye disease and current topical treatment options [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2020, 36(3): 137-146
- [23] De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, et al. Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye [J]. Exp Eye Res, 2006, 83(3): 526-535
- [24] Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, et al. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome[J]. Am J Ophthalmol, 2009, 147(2): 198-205. e191
- [25] Kitahiro Y, Koike A, Sonoki A, et al. Anti-inflammatory activities of Ophiopogonis Radix on hydrogen peroxide-induced cellular senescence of normal human dermal fibroblasts [J]. J Nat Med, 2018, 72(4): 905-914