

· 基础研究 ·

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 的影响欧阳云[△] 彭俊 彭清华 谭涵宇 李文娟 吴权龙

摘要 **目的** 观察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,探讨密蒙花颗粒剂对去势雄兔干眼症模型的疗效。**方法** 将密蒙花原药材制备成颗粒剂。将 30 只健康成年新西兰长耳白兔(雄性),随机分为空白组(A 组),模型组(B 组),密蒙花颗粒剂组(C 组),安慰剂组(D 组),睾酮组(E 组)5 组,每组 6 只。除 A 组外其余 4 组实验用兔行双侧睾丸及附睾切除术。除 A、B 组外,从术后第 3 日开始 C 组予密蒙花颗粒剂,按 100 mg/kg 灌胃,3 次/日;D 组予生理盐水 20 mL 灌胃,3 次/日;E 组按 2 mg/kg 在大腿肌肉处注射丙酸睾酮注射液,每 3 日注射 1 次。各组实验用兔,分别于术前和术后第 4 周各进行 1 次 Schirmer I 试验(Schirmer I test, S I T)和泪膜破裂时间(tear break-up time, BUT)测定。用药观察 4 周后采用空气栓塞法处死各组兔子,摘取双眼泪腺组织,采用免疫组化法对泪腺细胞凋亡因子 Bax、Bcl-2、Fas 和 FasL 的表达进行检测,并观察泪腺组织结构形态图。**结果** (1)S I T 及 BUT 结果:与本组术前及术后 A 组比较,B、D 组 S I T 及 BUT 均明显下降($P < 0.01$);与 B、D 组术后比较,C、E 组 S I T 及 BUT 升高,且差异均有统计学意义($P < 0.01$)。(2)Bax、Bcl-2、Fas、FasL 表达:与 A 组比较,B、D 组 Bax、Fas、FasL 表达均明显增多,Bcl-2 表达明显减少($P < 0.01$);与 B、D 组比较,C、E 组 Bax、Fas、FasL 表达均明显减少,Bcl-2 表达明显增多($P < 0.01$)。(3)Bax、Bcl-2、Fas、FasL 表达观察结果:A 组:泪腺结构清晰,未见 Bax、Bcl-2、Fas、FasL 表达;B 组:泪腺结构模糊,Bax、Fas、FasL 均大量表达于细胞膜和细胞浆中,呈棕黄色颗粒,Bcl-2 仅少量表达;C 组:泪腺结构清晰,散见 Bax、Fas、FasL 表达,Bcl-2 大量表达于细胞膜和细胞浆中,呈棕黄色颗粒;D 组:泪腺结构模糊,Bax、Fas、FasL 均大量表达于细胞膜和细胞浆中,呈棕黄色颗粒,Bcl-2 仅少量表达;E 组:泪腺结构清晰,散见 Bax、Fas、FasL 表达,Bcl-2 未见表达。**结论** 密蒙花颗粒剂具有与雄激素相似的抑制泪腺细胞凋亡因子 Bax、Fas 和 FasL 表达,同时上调 Bcl-2 的作用,能抑制雄激素缺乏所致兔泪腺细胞的凋亡,维持泪腺基础分泌量,但其作用弱于雄激素。

关键词 密蒙花颗粒剂;去势雄兔;泪腺细胞;细胞凋亡因子

Effect of Buddleia Granule on Bax, Bcl-2, Fas, and FasL of Lacrimal Gland Cells of Castrated Male Rabbits OUYANG Yun, PENG Jun, PENG Qing-hua, TAN Han-yu, LI Wen-juan, and WU Quan-long Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410007)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Buddleia Granule (BG) on apoptosis factors (Bax, Bcl-2, Fas, and FasL) of lacrimal gland cells of castrated male rabbits, and to study its effect on dry eye model of castrated male rabbits. **Methods** Buddleia raw materials were made into granules. Totally 30 healthy adult New Zealand rabbits were randomly divided into blank group (Group A), model

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(No. 30772824, No. 81574031);湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目资助;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(湘发改投资[2014]658号);长沙市科技计划重大专项(No. K1501014-31)。

作者单位:湖南中医药大学第一附属医院眼科(长沙 410007)

通讯作者:彭清华, Tel: 0731-88458010, 13574833598, E-mail: pqh410007@126.com

[△]现在江苏省盐城市中医院眼科(江苏 224001)

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170428. 094

group (Group B), BG group (Group C), the placebo group (Group D), testosterone group (Group E), 6 rabbits in each group. Bilateral testis and epididymis were cut off to rabbits of Group B to E. The rabbits of Group C were given BG according to 100 mg/kg by gastrogavage, 3 times per day. Those in Group D were given normal saline, 20 mL each time, 3 times per day. Those in Group E were injected with Testosterone Propionate Injection (2 mg/kg) in thigh muscle, once injection per every 3 days. All rabbits were tested Schirmer I test (SIT) and tear break-up time (BUT) before operation and 4 weeks after operation. After 4 weeks, all rabbits were scarified by air embolism and bilateral lacrimal glands clipped. Expressions of inflammatory factors (Bax, Bcl-2, Fas, and FasL) from lacrimal gland cells were checked by immunohistochemical staining method. The morphology of lacrimal gland was also observed. Results (1) Results of SIT and BUT: Compared with before operation and Group A after operation, SIT and BUT were significantly decreased in Group B and D after operation ($P < 0.01$). After operation, as compared with Group B and D, SIT and BUT were significantly increased in Group C and E, with statistical difference ($P < 0.01$). (2) Expressions of Bax, Bcl-2, Fas, and FasL: Compared with Group A, the expression of Bax, Fas, and FasL were obviously increased, but Bcl-2 was decreased obviously in Group B and D ($P < 0.01$). Compared with Group B and D, the expressions of Bax, Fas, and FasL were decreased, but Bcl-2 was increased obviously in Group C and E, with statistical difference ($P < 0.01$). (3) The results of Bax, Bcl-2, Fas, FasL expressions: Group A: The structure of lacrimal gland was clear. The expressions of Bax, Bcl-2, Fas, FasL were not found. Group B and D: The structure of lacrimal gland was indistinct. Bax, Fas, and FasL were expressed in cell membrane and cytoplasm heavily, showing brownish granules with yellow. The expression of Bcl-2 was only expressed in a large amount. Group C: The structure of lacrimal gland was clear. The expression of Bax, Bcl-2, Fas, and FasL were expressed scarcely. Bcl-2 was expressed in cell membrane and cytoplasm heavily, showing brownish granules with yellow. Group E: The structure of lacrimal gland was clear. The expression of Bax, Bcl-2, Fas, and FasL were expressed in a small amount. Bcl-2 was not found. Conclusions Compared with androgen, BG had a similar effect of depressing the expression of Bax, Fas, FasL and increasing the expressions of Bcl-2. It could inhibit the apoptosis of lacrimal gland cells in castrated male rabbits, maintain the basic secretion. But its effect was slightly weaker than that of the androgen.

KEYWORDS Buddleia Granule; castrated male rabbit; lacrimal gland cell; apoptosis factor

干眼又称角结膜干燥症,是指任何原因引起的泪液质或量异常,或动力学异常导致的泪膜稳定性下降,并伴有眼部不适和(或)眼表组织病变特征的多种疾病的总称^[1]。干眼为常见眼表病,多为双眼发病,流行病学及临床研究发现,其发病率远较人们想象的要高^[2]。

本研究前期的临床及动物实验中均证实密蒙花对干眼症具有良好的治疗效果,本实验通过将密蒙花、枸杞、菊花制备成密蒙花颗粒剂,用于治疗去势雄兔所致雄激素减少性干眼症动物模型,探讨密蒙花颗粒剂对雄激素减少所致干眼症泪腺细胞凋亡因子 Bax、Bcl-2、Fas、FasL 的影响。

材料与方法

1 动物 选用 30 只健康成年新西兰长耳白兔,雄性,体重 1.5 ~ 2.0 kg,湖南中医药大学动物实验中

心提供,实验动物质量合格证号: SCXK (湘) 2009 - 0012。

2 药物 密蒙花颗粒剂由湖南中医药大学药物制剂教研室按密蒙花:枸杞:菊花 = 1:1:1 药物质量比组成,将原药材粉碎,第一次加 15 倍量水,浸泡 1.5 h 回流提取 1.5 h,第二次加 10 倍量水回流提取 1.0 h。将水提取液减压浓缩,喷雾干燥(温度 180 ℃)制备而成,1 g 颗粒剂相当于生药量 3.676 g。丙酸睾酮注射液(1 mL:25 mg):天津金耀药业有限公司;注射用青霉素钠(每支 40 万 U):广州白云山天心制药股份有限公司;氯化钠注射液(500 mL:4.5 g):江苏亚邦生缘药业有限公司;水合氯醛分析纯(250 g):天津市科密欧化学试剂有限公司;灭菌注射用水(500 mL):上海长征富民金山制药有限公司。

3 试剂及仪器 Harris 苏木素、伊红、3% 过氧乙酸均为北京中杉金桥生物技术公司产品;兔抗兔

Bax、Bcl-2、Fas、FasL 单克隆抗体(各 200 $\mu\text{g/mL}$)、过氧化物酶标记链酶白卵素(strept avidin-biotin complex, SABC)免疫组织化学试剂盒及 DAB 显色剂均为武汉博士德生物工程有限公司产品;Schirmer 试验滤纸、荧光素钠眼科检测试纸均为天津晶明新技术开发有限公司产品。YZ5H 型裂隙灯显微镜、YZ11D 型直接检眼镜均为苏州六六视觉科技股份有限公司产品;GB11241-89 恒温水浴箱(北京医疗设备厂)、Leica RM2125RTS 型石蜡切片机(德国 Leica 公司)、B1Digital 数码显微镜(德国 Motic 公司)、Image Pro Plus 6.0 计算机图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司)等,以上实验所用相关器材均由湖南中医药大学组织形态学实验室和眼科实验室提供。

4 方法

4.1 实验动物分组 按照随机数字表法分成 5 组,每组 6 只。分别为空白组(简称 A 组),模型组(简称 B 组),密蒙花颗粒剂组(简称 C 组),安慰剂组(简称 D 组),睾酮组(简称 E 组)5 组。

4.2 干眼症动物模型的建立 除 A 组外,余 4 组兔子均参照参考文献[3, 4]方法行双侧辜丸及附睾切除术。术后测量模型兔 Schirmer I 试验(Schirmer I test, SIT)和泪膜破裂时间(tear break-up time, BUT),当 SIT < 10 mm, BUT < 12 s 则造模成功。

4.3 给药方法 除 A、B 组外,从术后第 3 天开始 C 组予密蒙花颗粒剂,按 100 mg/kg 剂量溶于 20 mL 温开水中灌胃(按人与兔体表面积换算^[5]),每天 3 次;D 组予生理盐水 20 mL 灌胃,每天 3 次;E 组按 2 mg/kg 在大腿肌肉处注射丙酸睾酮注射液(按人与兔体表面积换算^[5]),每 3 天注射 1 次。

4.4 SIT 及 BUT 测定 参照参考文献[6]方法,各组兔子均于造模前 1 天和术后第 3 天及第 4 周最后 1 天行 SIT 和 BUT 测定。Schirmer I 试验:按照说明书用法,将滤条按标记线折叠后一端置于下睑内眦 1/3 处结膜囊内,另一端垂挂在下睑外部,轻闭双眼,5 min 后取出滤纸,2 min 后观察并记录滤纸湿长。BUT 测定:将荧光素钠试纸轻置于下睑结膜囊内 3 s 后取出,将裂隙灯显微镜调至钴蓝光观察泪膜破裂时间并记录。

4.5 去势雄兔泪腺细胞凋亡因子 Bax、Bcl-2、Fas、FasL 表达 采用免疫组织化学检测法。所有兔子在术后常规饲养 4 周后,采用空气栓塞法处死,冰台上迅速摘取双眼泪腺,置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后,室温下经脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋及切

片,切片厚度 5 μm 。按免疫组化试剂盒说明书进行操作,光学显微镜下,每组任意选取 12 张切片,每张切片随机观察 5 个 200 倍视野,拍照并精确选取视野内所有阳性颗粒,采用 Image-pro Plus 6.0 分析软件求出平均光密度值,用于定量表达免疫组化阳性反应程度。

4.6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验,治疗前后比较采用配对样本 *t* 检验。计数资料采用 χ^2 检验,方差不齐者进行秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组雄兔去势手术前后 SIT 值及 BUT 值比较(表 1) 与本组术前比较,B、D 组 SIT 及 BUT 明显下降($P < 0.01$);与 A 组比较,B、D 组术后 SIT 及 BUT 亦明显下降($P < 0.01$);与 B 组比较,C、E 组 SIT 及 BUT 升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 D 组比较,C、E 组 SIT 及 BUT 升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 各组雄兔去势前后 SIT 值及 BUT 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	时间	SIT(mm)	BUT(s)
A	6 × 2	术前	14.75 ± 2.26	14.33 ± 2.42
		术后	14.50 ± 1.45	14.08 ± 1.88
B	6 × 2	术前	14.83 ± 2.04	14.42 ± 1.38
		术后	7.75 ± 1.54 ^{*△}	6.75 ± 1.66 ^{*△}
C	6 × 2	术前	14.77 ± 1.68	14.67 ± 1.89
		术后	14.27 ± 1.14 ^{△○}	14.30 ± 1.38 ^{△○}
D	6 × 2	术前	14.67 ± 1.92	14.25 ± 2.42
		术后	7.50 ± 1.62 ^{*△}	6.83 ± 1.70 ^{*△}
E	6 × 2	术前	14.83 ± 1.59	14.75 ± 2.22
		术后	14.33 ± 1.15 ^{△○}	14.50 ± 1.24 ^{△○}

注:与本组术前比较,^{*} $P < 0.01$;与 A 组治疗后比较,[△] $P < 0.01$;与 B 组治疗后比较,[▲] $P < 0.01$;与 D 组治疗后比较,[○] $P < 0.01$

2 各组雄兔术后泪腺细胞中 Bax、Bcl-2、Fas、FasL 表达比较(表 2) 与 A 组比较,B、D 组 Bax、Fas、FasL 表达均明显增多,Bcl-2 表达明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 B 组比较,C、E 组 Bax、Fas、FasL 表达均明显减少,Bcl-2 表达明显增多,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 D 组比较,C、E 组 Bax、Fas、FasL 表达均明显减少,Bcl-2 表达明显增多,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

3 各组术后 Bax、Bcl-2、Fas、FasL 表达观察结果(图 1-4) A 组:泪腺结构清晰,未见 Bax、Bcl-2、

表 2 术后各组雄兔泪腺细胞中 Bax、Bcl-2、Fas、FasL 平均光密度值比较 (A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Bcl-2	Fas	FasL
A	6×2	0.14±0.08	0.35±0.12	0.27±0.07	0.23±0.06
B	6×2	0.55±0.31*	0.15±0.16*	0.62±0.08*	0.59±0.18*
C	6×2	0.21±0.16 ^{△▲}	0.64±0.17 ^{△▲}	0.32±0.12 ^{△▲}	0.28±0.09 ^{△▲}
D	6×2	0.57±0.28*	0.13±0.10*	0.66±0.18*	0.50±0.16*
E	6×2	0.17±0.02 ^{△▲}	0.38±0.16 ^{△▲}	0.30±0.11 ^{△▲}	0.25±0.09 ^{△▲}

注:与 A 组比较,* $P<0.01$;与 B 组比较,[△] $P<0.01$;与 D 组比较,[▲] $P<0.01$

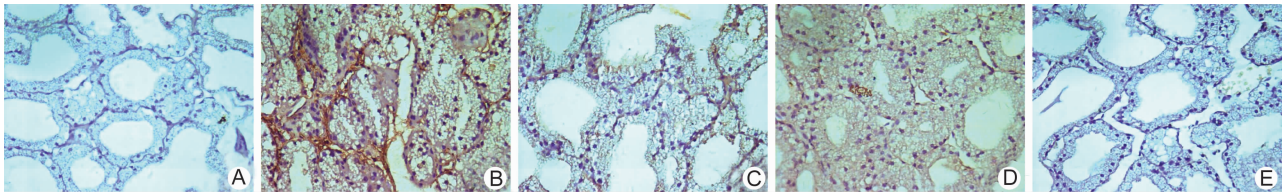


图 1 各组术后 Bax 表达观察 (免疫组化染色, ×200)

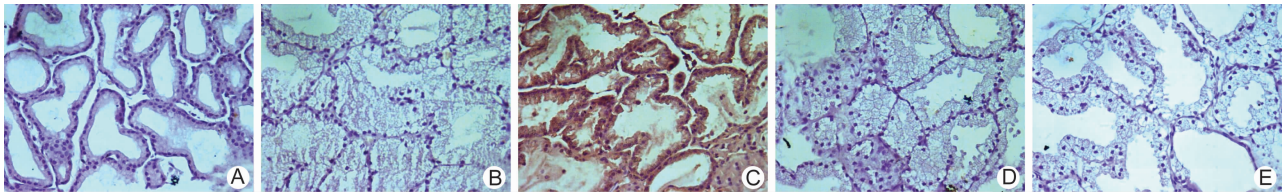


图 2 各组术后 Bcl-2 表达比较 (免疫组化染色, ×200)

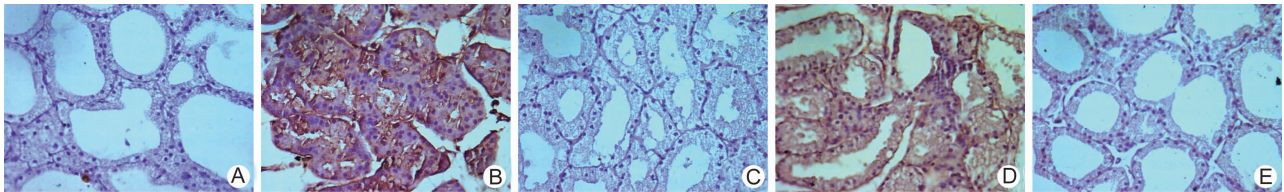


图 3 各组术后 Fas 表达观察 (免疫组化染色, ×200)

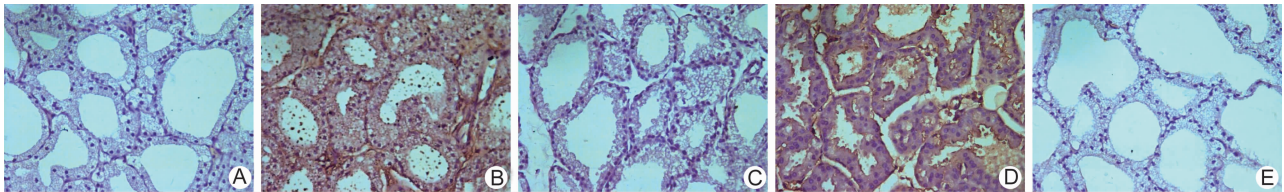


图 4 各组术后 FasL 表达观察 (免疫组化染色, ×200)

Fas、FasL 表达;B 组:泪腺结构模糊,Bax、Fas、FasL 均大量表达于细胞膜和细胞浆中,呈棕黄色颗粒,Bcl-2 仅少量表达;C 组:泪腺结构清晰,散见 Bax、Fas、FasL 表达,Bcl-2 大量表达于细胞膜和细胞浆中,呈棕黄色颗粒;D 组:泪腺结构模糊,Bax、Fas、FasL 均大量表达于细胞膜和细胞浆中,呈棕黄色颗粒,Bcl-2 仅少量表达;E 组:泪腺结构清晰,散见 Bax、Fas、FasL 表达,Bcl-2 未见表达。

讨 论

2007 年国际干眼病专题研究会赋予干眼病的最

新定义是:泪液和眼球表面的多因素疾病,能引起患眼不适、视觉障碍和泪膜不稳定,损害眼球表面。该病伴有泪膜渗透性增加和眼表炎症^[7]。与传统的干眼病定义相比,该定义强调了炎症在干眼病发病中的重要作用。尽管引起干眼症的起始病因不同,但一旦进入进展阶段,炎症成为干眼症发病机制中最关键的因素,而细胞凋亡、神经调节及性激素等也共同参与了干眼症的发病过程。干眼症时泪腺和眼表上皮细胞的凋亡异常增加,干眼症患者眼表和泪液中的促凋亡因子(Bax、Fas、FasL 等)和致炎因子(IL-1、TNF-α)的表达增加均可激活凋亡通路^[8]。

干眼属中医学“白涩症”范畴,又名“干涩昏花症”及“神水将枯症”、“神气枯瘁”。一般认为干眼因肝肾亏损,阴血不足,目失濡养所致。密蒙花颗粒由密蒙花、枸杞、菊花组方而成,其中密蒙花味甘,性微寒,归肝经,具有清热泻火养肝,明目退翳之功效,主治目赤翳障、目昏干涩、肝虚目暗、视物昏花等症^[9-11],为君药;枸杞滋补肝肾、养阴明目^[9],为臣药;菊花味甘苦,性微寒,归肺、肝经,长于平肝、清热、明目^[9],为佐药。现代研究发现密蒙花、枸杞及菊花中的主要活性成分为黄酮类物质,具有抗氧化、抗炎等活性^[12-14],某些黄酮类化合物具有拟雄激素作用^[15],可以用于治疗因性激素水平下降所致的疾病。本实验前期研究证实,密蒙花总黄酮可起到拟雄激素效应,可显著抑制雄激素水平降低后大鼠干眼症的发生,抑制泪腺细胞凋亡,维持泪腺基础分泌量和泪腺的稳定性^[16-23]。

目前干眼症的治疗以药物为主,临床常用的药物为人工泪液,该类药物主要是缓解患者眼部的不适,无法从根本上改变干眼症的病理状态。本研究证实密蒙花颗粒剂具有类激素效应,能抑制雄激素缺乏所致兔泪腺细胞凋亡因子 Bax、Fas、FasL 表达,上调 Bcl-2 的表达,从而抑制泪腺细胞凋亡,维持泪腺基础分泌量,但其作用弱于雄激素。本研究既为干眼症的治疗提供一种新的天然药物,又可以避免长期使用雄激素所带来的不良反应,具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 赵堪兴,杨培增主编.眼科学[M].第7版.北京:人民卫生出版社,2008:77-80.
- [2] 彭清华主编.中西医结合眼科学[M].北京:中国中医药出版社,2010:299.
- [3] 魏世辉,王志军主编.眼科实验动物学[M].北京:人民军医出版社,2010:94.
- [4] 马轶群,王传富,刘美光.去势雄兔干眼病模型角膜上皮细胞凋亡及相关基因表达的研究[J].眼科研究,2004,22(3):286-289.
- [5] 罗永煌主编.药理学实验教程[M].北京:科学出版社,2015:9.
- [6] 张梅,陈家祺,刘祖国.干眼症检查的进展[J].眼科研究,2001,19(2):184-187.
- [7] Lemp M, Baudouin C, Baum J, et al. The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop [J]. Ocul Surf, 2007, 5(2): 75-92.
- [8] Brignole F, De Saint-Jean M, Goldschild M, et al. Expression of Fas-FasL ligand antigens and apoptotic marker APO2.7 by the human conjunctival epithelium. Positive correlation the class II HLA DR expression in inflammatory ocular surface disorders [J]. Exp Eye Res, 1998, (67): 687-697.
- [9] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2005:230,245,542.
- [10] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中国药典·一部[M].广州:广东科技出版社,1995:291.
- [11] 徐国钧,施大文,沈联德,等主编.生药学[M].北京:人民卫生出版社,1986:313.
- [12] 韩澎,崔亚君,郭洪祝,等.密蒙花化学成分及其活性研究[J].中草药,2004,35(10):1086-1091.
- [13] 谢占芳,张倩倩,朱凌佳,等.菊花化学成分及药理活性研究进展[J].河南大学学报,2015,34(4):291-300.
- [14] 侯学谦,祝婉芳,曲玮,等.枸杞化学成分及药理活性研究进展[J].海峡药学,2016,28(8):1-7.
- [15] 黄秀兰,周亚伟,王伟.淫羊藿黄酮类化合物药理研究进展[J].中成药,2005,27(6):19-781.
- [16] 彭清华,姚小磊,吴权龙,等.密蒙花提取物滴眼对干眼症去势鼠泪腺组织雄激素受体数量的影响[J].国际眼科杂志,2010,10(2):203-208.
- [17] 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[J].湖南中医药大学学报,2009,29(5):22-25.
- [18] 姚小磊,彭清华,吴权龙.密蒙花提取物治疗兔去势所致干眼症[J].眼视光学杂志,2008,10(1):21-26.
- [19] 李怀凤,彭清华,姚小磊.密蒙花总黄酮对去势雄鼠干眼症模型角膜和泪腺组织中 TNF- α 、IL-1 β 表达的影响[J].国际眼科杂志,2009,9(7):1248-1251.
- [20] 李秀兰,孙光洁,戴树培,等.密蒙花/结香有效成分的抑菌作用[J].西北药学杂志,1996,11(4):165-166.
- [21] 彭清华,姚小磊,彭俊,等.密蒙花提取物对干眼症雄兔泪腺局部炎症反应影响的研究[J].中华中医药学刊,2010,28(7):1351-1356.
- [22] 陈佳文,彭清华,姚小磊.密蒙花总黄酮对去势雄鼠干眼症泪腺 TGF- β_1 及其基因表达的影响[J].眼科研究,2010,28(4):311-314.
- [23] 姚小磊,彭清华,吴权龙,等.密蒙花提取物对去势导致干眼症白兔泪腺细胞凋亡的影响[J].中国中医眼科杂志,2007,17(3):139-144.

(收稿:2015-11-19 修回:2017-03-23)

责任编辑:段碧芳

英文责编:张晶晶