

珍珠明目滴眼液改善高渗透导角膜上皮细胞损伤的作用机制研究

杜雪莹, 郑 姣, 顾小盼, 曲昌海*, 倪 健*

北京中医药大学中药学院, 北京 100029

摘 要: **目的** 探讨珍珠明目滴眼液(ZMED)对高渗透导人角膜上皮细胞(HCEC)损伤的保护作用及相关机制。**方法** 采用 110 mmol/L 氯化钠高渗溶液刺激离体培养的 HCEC 建立干眼损伤模型, 药物组分别给予不同稀释倍数的 ZMED; 分别采用 MTT 法、乳酸脱氢酶(LDH)实验检测 ZMED 对高渗透导损伤 HCEC 的保护作用; 采用流式细胞术分析各组细胞凋亡率; 采用 AO/EB 双染法和 Hoechst 荧光染色法观察各组细胞凋亡形态的差异; 通过 Western blotting 法检测 Caspase 凋亡通路上关键蛋白表达水平的变化。**结果** ZMED 可以明显增加高渗透导损伤的 HCEC 存活率并降低其 LDH 释放量; ZMED 稀释 25 倍以下作用于高渗透导 HCEC 后, 细胞凋亡率较模型组明显降低, 且凋亡的 HCEC 数量呈浓度依赖性减少; ZMED 给药后剪切态的 Caspase-9、Caspase-3、PARP 呈浓度依赖性下调。**结论** ZMED 对 110 mmol/L 氯化钠高渗溶液诱导损伤的 HCEC 有明显的保护作用, 该作用可能与其抑制线粒体介导的 Caspase-9/Caspase-3 细胞凋亡通路相关。

关键词: 珍珠明目滴眼液; 干眼; 人角膜上皮细胞; 高渗; 凋亡; 乳酸脱氢酶; Caspase-9; Caspase-3

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)16-3425-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.028

Study on effect and mechanism of Zhenzhu Mingmu Eye Drops protected HCEC against hypermeability-induced injury

DU Xue-ying, ZHENG Jiao, GU Xiao-pan, QU Chang-hai, NI Jian

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects and mechanism of Zhenzhu Mingmu Eye Drops (ZMED) on human corneal epithelial cells (HCEC) injury model induced by high permeability. **Methods** The dye eyes disease model was established using 110 mmol/L NaCl to stimulate HCEC, and different concentration of ZMED was given to the treatment group. MTT assay and lactate dehydrogenase (LDH) leakage were used to evaluate the protection effects of ZMED on HCEC. The effects of ZMED on apoptosis of HCEC were analyzed by flow cytometry. AO/EB double staining and Hoechst 33258 analysis were used as sensitive assays for apoptosis. Moreover, HCEC treated with ZMED were subjected to Western blotting for protein levels of Caspase-9, Caspase-3 and PARP. **Results** ZMED significantly increased cell viability of HCEC and decreased the LDH release in a dose-dependent manner. ZMED dramatically decreased the apoptosis rate. Furthermore, ZMED down-regulated the levels of cleaved Caspase-9, cleaved Caspase-3 and cleaved PARP. **Conclusion** ZMED could protect HCEC against hypermeability, which may be related to the inhibition of Caspase-9/Caspase-3 signaling pathways.

Key words: Zhenzhu Mingmu Eye Drops; dye eyes disease; human corneal epithelial cells; hyperosmolarity; apoptosis; lactate dehydrogenase; Caspase-9; Caspase-3

干眼症是指由于泪液质和量的异常或泪液流体力学异常而引起的泪膜不稳定和眼表损害, 从而导致眼部不适症状的一类疾病, 临床症状常见眼部干涩、有沙粒感、灼烧感、异物感、畏光、易疲倦, 且对外界刺激敏感, 是目前临床上最常见的眼表疾病^[1-3], 据统计, 我国干眼症的发病率高达 21%~

30%^[4]。近年来, 随着电脑和智能手机的普及以及人们用眼习惯的改变, 干眼症的发病呈现低龄化和逐年上升的趋势^[5]。但是与之相反的是, 干眼症的治疗并未引起人们的重视, 目前市面仅有的明确用于干眼症治疗的药物 Ikervis® (ciclosporin, 环孢素) 和 Xiidra® (lifitegrast 5%滴眼液), 主要针对干眼症

收稿日期: 2017-07-15

作者简介: 杜雪莹, 女, 硕士研究生。E-mail: 18811792675@163.com

*通信作者 倪 健, 男, 教授。E-mail: nijian@bucm.edu.cn

曲昌海, 男, 助理研究员。E-mail: quchanghai@bucm.edu.cn

并发严重角膜炎的患者, 缺少对于干眼症发病早期的干预和治疗^[6-7]。炎症和高渗分别是干眼症发病不同阶段的典型特征^[8], 针对早期干眼症或干眼症初发阶段来说, 高渗是其最典型的病程和病因, 尤其是对于泪液分泌过少型和泪液蒸发过快型干眼症, 由于自身或外界因素诱导眼表泪液缺乏, 造成眼表的局部高渗环境, 高渗对与其直接接触的角膜上皮细胞产生直接的损伤, 进而引起眼表的各种不适症状。根据这一发病机制, 利用体外培养的人角膜上皮细胞 (human corneal epithelial cells, HCEC), 通过高渗溶液诱导, 模拟干眼症的发生过程^[9-10], 可为干眼症治疗药物的高通量筛选和深入机制研究提供快速的评价和研究手段。

珍珠明目滴眼液 (Zhenzhu Mingmu Eye Drops, ZMED) 由珍珠和冰片组成, 辅料包括氯化钠、玻璃酸钠, 主要成分为蛋白多肽类^[11], 具有清热泻火、养肝明目的功效, 常用于视力疲劳症和慢性结膜炎等, 是眼外科的常用滴眼液。有研究表明, ZMED 可改善眼球微循环、缓解视疲劳症状^[12], 临床上采用 ZMED 离子导入治疗干眼症取得较好效果, 但其作用机制尚不明确^[13]。本研究基于高渗诱导 HCEC 损伤建立干眼症细胞模型, 全面考察 ZMED 对高渗诱导损伤的对抗和保护作用, 并在此基础上, 对其作用机制进行初步探讨, 以期对干眼症初发阶段的药物研究和作用机制阐明提供一定的参考和借鉴。

1 材料

1.1 试药和试剂

ZMED (胶体溶液, 苏州工业园区天龙制药有限公司, 批号 20161006); NaCl (北京化工厂, 批号 20150625); DMEM 基础培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素混合液、0.25%胰蛋白酶-EDTA 均购于美国 Corning 公司; 胰岛素、上皮生长因子 (EGF) 均购于美国 Cyagen 生物公司; MTT 购自北京拜尔迪生物科技有限公司; 细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit)、乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒 (LDH Cytotoxicity Assay Kit)、AO/EB 双染试剂盒、Hoechst33258 染色液均购于上海碧云天生物技术有限公司; β -actin 购于美国 Abgent 公司; Caspase-9、Caspase-3、PARP 购于美国 CST 公司; HRP-标记的羊抗鼠/兔购于 Santa Cruz 公司; 4%~12% Bis-Tris Nu-PAGE 凝胶购于美国 Invitrogen 公司; SuperECL Plus 超敏发光液购自北京普利莱基因技术公司。

1.2 仪器

MCO-18A2C (UV) 二氧化碳培养箱 (日本, SANYO); 多功能酶标仪 (美国, Perkinelmer); BD FACSCanto II 流式细胞仪 (美国, BD); FV1000 激光共聚焦扫描显微镜 (日本, 奥林巴斯); DMIL 荧光倒置显微镜 (德国, Leica 公司)。

1.3 细胞

HCEC, 上海复旦细胞生物库。

2 方法

2.1 细胞培养

HCEC 用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、10 ng/mL EGF、5 μ g/mL 胰岛素的 DMEM 培养液, 在 5% CO₂ 和 37 °C 条件下培养。

2.2 MTT 实验和 LDH 实验

取对数生长期的 HCEC, 以 5×10^4 个/mL 的密度接种到 96 孔板。细胞在孔板中培养 24 h 后, 在含有不同稀释度 ZMED 和 110 mmol/L NaCl 高渗盐溶液的细胞培养液中 37 °C 孵育 24 h。ZMED 用细胞培养液分别稀释 100、25、10 倍。以仅含 110 mmol/L NaCl 的细胞培养液中孵育分化的 HCEC 作为模型组。以正常细胞培养液孵育的细胞作为对照组。药物处理 24 h 后, 用 MTT 方法检测细胞存活率, 取细胞培养上清液检测细胞 LDH 释放量。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

HCEC 以 5×10^4 个/mL 的密度接种在 6 孔板中, 培养 24 h 后, 分别加入 110 mmol/L NaCl 高渗盐溶液和稀释 100、25、10 倍的 ZMED, 继续培养 24 h, Annexin V-FITC/PI 试剂盒染色后, 用流式细胞仪分析检测细胞, 计算 Q₂ 和 Q₄ 区凋亡率。

2.4 AO/EB 染色实验与 Hoechst 染色实验

HCEC 以 5×10^4 个/mL 的密度接种于共聚焦培养皿中, 培养 24 h 贴壁后, 设置模型组和不同稀释倍数的给药组 (分组及药物处理方法同“2.2”项), 继续培养 24 h 后, 用 PBS 清洗残余培养基和未贴壁细胞, 分别用 AO/EB 和 Hoechst 试剂进行荧光染色, 于激光共聚焦显微镜下观察细胞荧光。

2.5 Western blotting 法检测相关蛋白表达

细胞分组及药物处理同“2.2”项, 细胞经过裂解和蛋白变性后, 用 4%~12% Bis-Tris Nu-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质。用湿转法将蛋白质转移到 PVDF 膜, 加入合适稀释度的一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗后加入合适稀释度的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温孵育 2 h。TBST 漂洗后

曝光和显影。

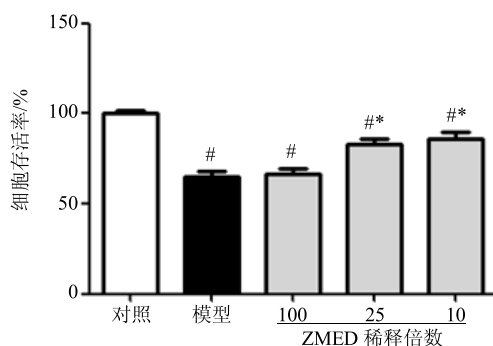
2.6 统计学分析

采用 Graphpad Prism 软件进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两组数据间差异比较采用 Student's *t* 检验。

3 结果

3.1 对高渗透导损伤的 HCEC 存活率和 LDH 的影响

分别采用 MTT 法和 LDH 法检测不同稀释度的 ZMED 对 110 mmol/L 高渗盐溶液诱导的 HCEC 损伤的改善作用。结果显示, 高渗盐溶液显著抑制了 HCEC 的增殖 ($P < 0.05$), 而随着 ZMED 浓度的增加 (即稀释倍数减少), 细胞存活率显著升高, ZMED 稀释 10、25 倍组与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 见图 1。此外, 高渗盐溶液还增加了细胞膜的通透性, 从而使 LDH 的释放量显著增高 ($P < 0.05$), 且 ZMED 能浓度依赖性地降低细胞 LDH 释放量, ZMED 稀释 10、25 倍组与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 见图 2。以上结果提示, ZMED 能显著改善高渗透导的 HCEC 损伤。



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, 下同
$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group, same as below

图 1 ZMED 对 110 mmol·L⁻¹ NaCl 损伤的 HCEC 存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Effect of ZMED on survival rate of HCEC cells injured by 110 mmol·L⁻¹ NaCl ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

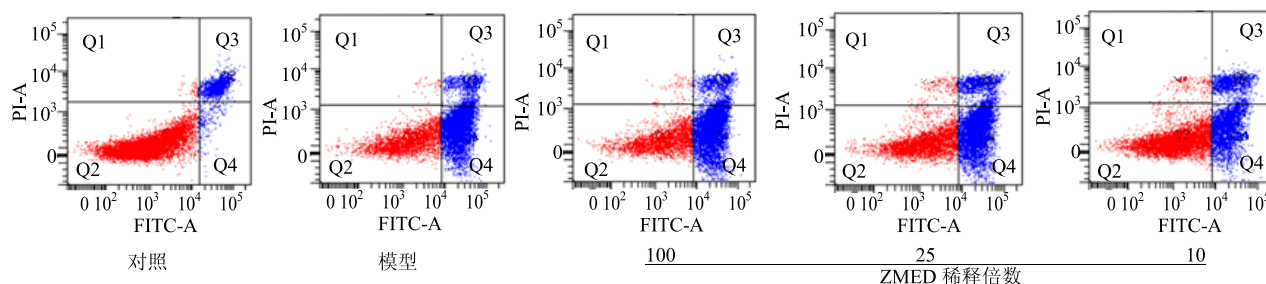


图 3 ZMED 对 110 mmol·L⁻¹ NaCl 损伤的 HCEC 凋亡的影响

Fig. 3 Effects of ZMED on apoptosis of HCEC injured by 110 mmol·L⁻¹ NaCl

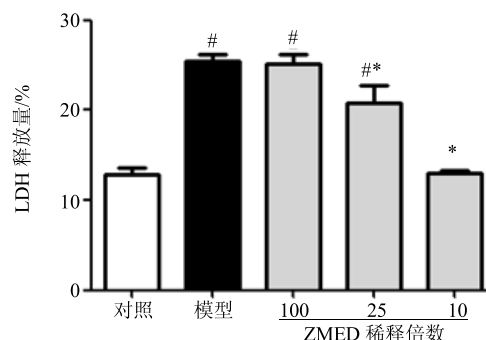


图 2 ZMED 对 110 mmol·L⁻¹ NaCl 损伤的 HCEC LDH 释放的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 2 Effect of ZMED on LDH release of HCEC injured by 110 mmol·L⁻¹ NaCl ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.2 对高渗透导损伤的 HCEC 凋亡率的影响

HCEC 分别经 110 mmol/L 的高渗盐溶液和高渗基础上稀释 100、25、10 倍的 ZMED 处理, 经 Annexin V-FITC/PI 染色, 利用流式细胞仪分析细胞凋亡率。结果见图 3 和 4。110 mmol/L 的高渗盐溶液显著诱导了 HCEC 的凋亡 ($P < 0.05$), 而经稀释 25 倍和 10 倍的 ZMED 作用 24 h 后, 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。结果提示, ZMED 能显著抑制高渗盐溶液诱导的 HCEC 凋亡。

3.3 AO/EB 双荧光染色和 Hoechst 荧光染色观察细胞形态

用 AO/EB 染色法, 在共聚焦显微镜下观察细胞凋亡情况。吖啶橙 (AO) 能透过细胞膜使所有的细胞都着色, 使细胞发出绿色荧光, 且凋亡细胞由于细胞膜通透性增加更易着色, 凋亡细胞的荧光会更强。溴化丙锭 (EB) 只能透过深度凋亡受损的细胞膜, 并使凋亡细胞着色发出红色荧光, 在两者染色的合并图像能清楚识别受损细胞与正常细胞。结果显示 (图 5), 相比对照组, 模型组细胞绿色荧光增强, 红色荧光斑点增多, AO/EB 的 Merged

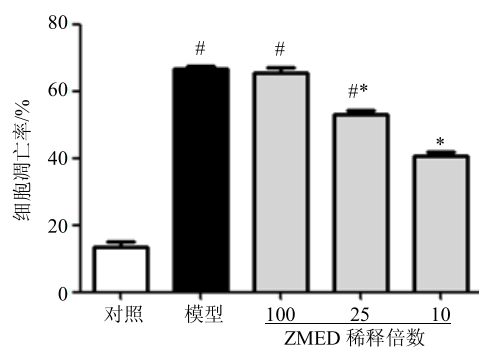
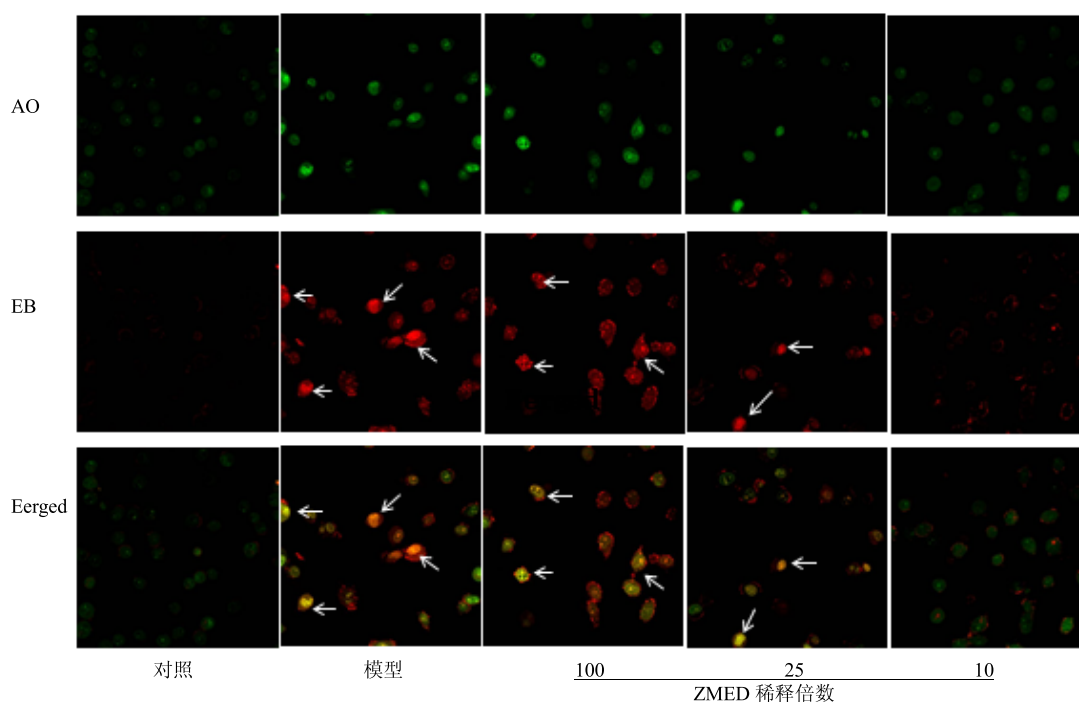
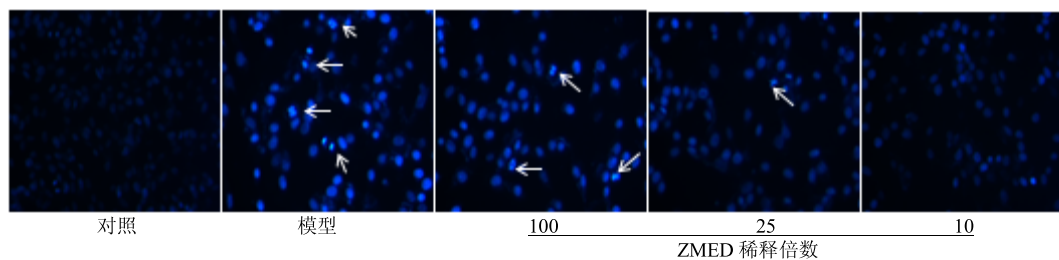
图 4 各组 HCEC 凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Fig. 4 Comparison on apoptosis rate of HCEC in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

图 4 显示出了较多的橘红色固缩状细胞。说明高渗盐溶液使细胞膜通透性增加，凋亡细胞增多。随着 ZMED 浓度增加，图中的绿色荧光减弱，红色荧光斑点减少，Merged 图层中的橘红色斑块，固缩状细胞减少。说明 ZMED 能剂量依赖性地减少高渗盐溶液引起的细胞凋亡。此外，采用 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡情况。Hoechst33258 是一种能检测细胞凋亡的核酸染料，对于凋亡细胞的细胞核，由于染色质固缩，Hoechst33258 能使其发出比正常细胞的细胞核更强烈的蓝色荧光，因而能检测细胞的凋亡程度。Hoechst33258 染色结果显示 (图 6)，HCEC 经过高渗盐诱导后，模型组细胞亮蓝色荧光显著增

图 5 ZMED 对 $110 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 损伤的 HCEC 形态的影响 (AO/EB 双染法)Fig. 5 Effects of ZMED on morphology of HCEC injured by $110 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl (AO/EB double staining)

箭头指向凋亡细胞
arrow directed apoptosis cells

图 6 ZMED 对 $110 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 损伤的 HCEC 形态的影响 (Hoechst 染色法)Fig. 6 Effects of ZMED on morphology of HCEC injured by $110 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl (Hoechst staining)

强。随着 ZMED 给药浓度逐渐升高,凋亡细胞减少,固缩的细胞核减少,细胞的蓝色荧光也减弱。说明 ZMED 能抑制高渗盐溶液诱导的 HCEC 凋亡。

3.4 对高渗诱导损伤 HCEC 细胞凋亡相关通路蛋白表达的影响

鉴于以上结果,对 ZMED 对高渗盐损伤引起的 Caspase 凋亡通路上的关键蛋白表达水平的变化进行了研究。Western blotting 结果显示(图 7),高渗盐刺激能使剪切态(激活状态)Caspase-3、Caspase-9 和 PARP 的表达增加,而 Caspase-3、Caspase-9 和 PARP 剪切态表达的增加意味着细胞的 Caspase 凋亡信号通路被激活,细胞正发生凋亡,因此以上结果说明高渗盐溶液的刺激促进了 HCEC 的凋亡。而经不同浓度 ZMED 处理后,由于高渗盐溶液刺激而引起的蛋白水平的变化均受到了抑制:ZMED 浓度依赖性降低了被高渗盐刺激而升高的剪切态 Caspase-3、Caspase-9 和 PARP 的表达水平。该结果表明,ZMED 能通过抑制线粒体介导的 Caspase-9/Caspase-3 细胞凋亡通路来抵抗高渗盐诱导的 HCEC 凋亡。

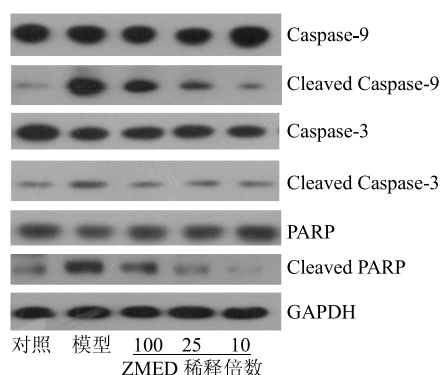


图 7 ZMED 对 $110 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 损伤的 HCEC Caspase-9/Caspase-3 通路的影响

Fig. 7 Effect of ZMED on Caspase-9/Caspase-3 pathway of HCEC injured by $110 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl

4 讨论

高渗是干眼症初发阶段最典型的病程和病因。本实验在高渗盐诱导 HCEC 损伤情况下,研究 ZMED 对角膜上皮细胞的保护作用。采用 MTT 和 LDH 试验来检测 HCEC 在经过高渗盐处理和 ZMED 处理后的细胞活力,结果显示,ZMED 对 MTT 和 LDH 释放都有显著的改善作用,提示其对高渗盐诱导的 HCEC 损伤的保护作用,可能在于增强细胞膜的完整性。

目前,细胞的凋亡过程确切机制尚不完全清楚,但凋亡过程的紊乱可能与许多疾病的发生有直接或间接的关系。细胞凋亡涉及的 Caspase 家族蛋白与细胞凋亡形态学特征变化(如细胞膜空泡形成、核膜破裂、染色质聚集和边聚及 DNA 断裂等)关系密切^[14]。Caspase-8、Caspase-9 等凋亡启动因子在上游发生自我活化并识别和激活下游的凋亡执行因子 Caspase-3 和 Caspase-7 等,作用于其特异性底物并导致细胞凋亡^[15]。本研究中,通过流式细胞术检测发现 ZMED 可以降低高渗诱导凋亡的 HCEC 的 Annexin V-FITC/PI 双阳性细胞数量,且有显著的浓度依赖性。在 AO/EB 双荧光染色和 Hoechst 荧光染色中发现, 110 mmol/L 的氯化钠高渗溶液作用于 HCEC 24 h 可见明显的凋亡细胞,而给药 24 h 后,随着给药浓度的增加,凋亡形态的细胞数量逐渐较少。在对凋亡相关蛋白的检测中发现,在 HCEC 中 Cleaved Caspase-9、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 呈浓度依赖性下调。因此可以推测,ZMED 可能通过调控 Caspase-9/Caspase-3 信号通路发挥抑制 HCEC 凋亡的作用。

综上所述,本研究利用体外培养的 HCEC 建立细胞损伤模型,通过高渗盐溶液模拟干眼症初发阶段的病因,并采用细胞存活率、LDH、细胞形态和染色、流式细胞仪等多个方法和指标,考察了 ZMED 对该损伤模型的保护作用。研究过程中发现,稀释 25 倍以下的 ZMED 对高渗盐造成的细胞损伤具有明显的抑制作用,提示其可能具有治疗初发干眼的良好药效。这为该药物用于治疗干眼的进一步药效评价以及作用机制的阐明提供有益探索。

参考文献

- [1] Messmer E M. The Pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2015, 112(71): 71-82.
- [2] Alja crnej M D, Ahmad kheirkhah M D, Ai ren B S, *et al*. Patients' perspectives on their dry eye disease [J]. *Ocular Surface*, 2016, 14(4): 440-446.
- [3] Nelson J D, Helms H, Fiscella R, *et al*. A New look at dry eye disease and its treatment [J]. *Adv Therapy*, 2000, 17(2): 84-93.
- [4] 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 2013 干眼临床诊疗专家共识 [J]. *中华眼科杂志*, 2013, 49(1): 73-75.
- [5] Moon J H, Kim K W, Moon N J. Smartphone use is a risk factor for pediatric dry eye disease according to region and age: a case control study [J]. *BMC Ophthalmol*, 2016,

- 16(4): 188.
- [6] Barber L D, Pflugfelder S C, Tauber J, *et al.* Phase III safety evaluation of cyclosporine 0.1% ophthalmic emulsion administered twice daily to dry eye disease patients for up to 3 years [J]. *Ophthalmology*, 2005, 112(10): 1790-1794.
- [7] Semba C P, Gadek T R. Development of liftegrast: a novel T-cell inhibitor for the treatment of dry eye disease [J]. *Clin Ophthalmol*, 2016, 10(31): 1083-1094.
- [8] Redfern R L, Barabino S, Baxter J, *et al.* Dry eye modulates the expression of toll-like receptors on the ocular surface [J]. *Exp Eye Res*, 2015, 3(18): 1-10.
- [9] Lia D Q, Luo L H, Chena Z, *et al.* JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1 β , TNF- α and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(4): 588-596.
- [10] Li D Q, Chen Z, Song X J. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 2004, 45(12): 4302-4311.
- [11] 丁晓萍, 费毅琴, 肖凌, 等. 珍珠明目滴眼液及珍珠液中蛋白多肽类成分的分析 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 911-916.
- [12] 程敏, 叶小弟, 缪云萍, 等. 珍珠明目滴眼液改善兔眼球结膜微循环的实验研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(8): 856-859.
- [13] 马琳丽, 张洪燕. 珍珠明目滴眼液离子导入治疗干眼症疗效观察 [J]. 实用中医药杂志, 2014, 30(6): 552-553.
- [14] 岳原亦, 张扬, 张一奇. Caspase家族与细胞凋亡 [J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(6): 25-26.
- [15] Hacker G, Paschen S A. Therapeutic targets in the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2007(11): 515-526.