

# 基于 JNK1/AQP5 通路研究杞参方颗粒对高渗透诱导的角膜上皮细胞的效应机制

赵磊<sup>1,2</sup>, 杨笑薇<sup>1</sup>, 周慧敏<sup>1</sup>, 左韬<sup>2</sup>

引用: 赵磊, 杨笑薇, 周慧敏, 等. 基于 JNK1/AQP5 通路研究杞参方颗粒对高渗透诱导的角膜上皮细胞的效应机制. 国际眼科杂志 2022;22(1):28-33

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.82104714); 国家中医药管理局“中医药循证能力建设项目”(No.2019XZZX-YK008); 辽宁省自然科学基金项目(No.20170540557)

作者单位:<sup>1</sup>(110032) 中国辽宁省沈阳市, 辽宁中医药大学;  
<sup>2</sup>(110034) 中国辽宁省沈阳市, 辽宁中医药大学附属第二医院眼科

作者简介: 赵磊, 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗眼科疾病。

通讯作者: 左韬, 女, 毕业于辽宁中医药大学, 博士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 中西医结合治疗眼科疾病. ykzt208@163.com

收稿日期: 2021-06-20 修回日期: 2021-12-08

## 摘要

**目的:** 基于 JNK1/AQP5 通路观察杞参方颗粒对高渗透诱导的角膜上皮细胞(HCECs)保护作用, 阐明其治疗干眼的作用机制。

**方法:** 通过 500mOsm/L 浓度渗透压作用于 HCECs 制造干眼细胞模型。空白组: 正常条件培养的角膜上皮细胞; 模型组: 模型细胞加入 10% 空白血清; 西药组: 模型细胞加入 0.3% 玻璃酸钠滴眼液; 杞参方高剂量组: 模型细胞加入 15% 杞参方高剂量含药血清; 杞参方中剂量组: 模型细胞加入 15% 杞参方中剂量含药血清; 杞参方低剂量组: 模型细胞加入 15% 杞参方低剂量含药血清。CCK-8 法检测不同药物干预对 HCECs 存活率的影响; ELISA 法检测各组细胞外液炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达; 免疫细胞化学法检测各组 HCECs 凋亡因子 caspase-1 与 AQP5 的蛋白表达变化; Western blotting 法检测各组 HCECs 的 JNK1、p-JNK1、AQP5 表达情况。

**结果:** 与空白组相比, 各组 HCECs 存活率均显著减少(均  $P < 0.01$ ), 各组细胞外液炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 HCECs 中 caspase-1、p-JNK1、AQP5 蛋白表达水平均显著增高(均  $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 各用药组 HCECs 存活率均显著增加(均  $P < 0.01$ ), 各用药组的细胞外液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 HCECs 中 AQP5、p-JNK1 蛋白表达水平及西药组及杞参方高中剂量组 caspase-1、AQP5 蛋白表达均减少(均  $P < 0.05$ ); 与西药组相比, 杞参方高剂量组 HCECs 存活率显著增加( $P < 0.01$ ), 杞参方各剂量组的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达水平均减少(均  $P < 0.05$ ), 杞参方高剂量组 caspase-1 及杞参方高、中剂量组的 AQP5 蛋白表达水平减少(均  $P < 0.05$ )。Western blotting 法检测 HCECs 的 JNK1 蛋白表达各组比较无差异( $P > 0.05$ )。

**结论:** 杞参方颗粒可降低高渗透诱导 HCECs 的 JNK1 的磷酸化和 AQP5 的蛋白表达, 降低细胞外液炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 HCECs 凋亡因子 caspase-1 的表达, 最终有效抑制炎症反应和细胞凋亡。

**关键词:** 干眼; 杞参方; 角膜上皮细胞; JNK1; AQP5

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.1.05

## Study on the protective mechanism of Qishen recipe on corneal epithelial cells induced by hypertonic based on JNK1/AQP5 pathway

Lei Zhao<sup>1,2</sup>, Xiao-Wei Yang<sup>1</sup>, Hui-Min Zhou<sup>1</sup>, Tao Zuo<sup>2</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 82104714); Evidence-based Capacity Building Project of Traditional Chinese Medicine of China's Ministry of Finance (No. 2019XZZX-YK008); Liaoning Natural Science Foundation Project (No.20170540557)

<sup>1</sup>Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110034, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Tao Zuo. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110034, Liaoning Province, China. ykzt208@163.com

Received: 2021-06-20 Accepted: 2021-12-08

## Abstract

• **AIM:** To observe the protective effect of Qishen recipe on corneal epithelial cells induced by hypertonic fluid, and elucidated its mechanism of action in the treatment of dry eye base on JNK1 / AQP5 pathway.

• **METHODS:** Human corneal epithelial cells (HCECs) model was created by osmotic pressure at a concentration of 500mOsm/L for 24h. Serum of rats containing drugs in the blank group, model group, Western medicine group, and Qishen recipe low-dose, medium-dose and high-dose groups were treated on the modeled DE HCECs, and the effects of different drug stimulation on the survival rate of HCECs were tested by CCK-8 method. The expressions of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-6 in extracellular fluid were explored by ELISA. The expression of apoptosis factors caspase 1 and AQP5 were detected by immunocytochemistry (ICC). The expressions of AQP5,

JNK1, p-JNK1 of HCECs after intervention with different drug concentrations were found by Western blotting.

• **RESULTS:** Compared with the blank group, the survival rate of HCECs in each group was significantly reduced ( $P < 0.01$ ). The extracellular fluid inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-6 and caspase-1, p-JNK1, AQP5 protein expression levels increased significantly in each group (all  $P < 0.01$ ); In comparison to the model group, the survival rate of HCECs in each medication group increased significantly (all  $P < 0.01$ ). The expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 in the extracellular fluid of each drug group, AQP 5 and p-JNK1 protein expression in HCECs, and the expression of caspase-1 and AQP5 protein in the western medicine group and the Qishen recipe high and medium dose group were all reduced (all  $P < 0.05$ ). Compared with the western medicine group, the survival rate of HCECs in the Qishen prescription high-dose group was significantly increased ( $P < 0.01$ ). The expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in each dose group of Qishen recipe were reduced (all  $P < 0.05$ ), while the expression levels of caspase-1 in the high-dose Qishen recipe group and the AQP5 protein expression levels of the high and medium-dose Qishen recipe group saw a decrease (all  $P < 0.05$ ). However, there was no statistically significant difference in the JNK1 protein expression of HCECs of all the groups detected by Western blotting method ( $P > 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Qishen recipe can not only reduce the JNK1 phosphorylation and AQP5 protein expression of HCECs induced by hypertonicity, but also reduce the expression of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-6 and the apoptotic factor caspase-1 of HCECs in the extracellular fluid, thus effectively inhibit inflammation and apoptosis.

• **KEYWORDS:** dry eye; Qishen recipe; corneal epithelial cells; JNK1; AQP5

**Citation:** Zhao L, Yang XW, Zhou HM, *et al.* Study on the protective mechanism of Qishen recipe on corneal epithelial cells induced by hypertonic based on JNK1/AQP5 pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(1):28-33

## 0 引言

干眼是由泪液的质、量及动力学异常导致的泪膜不稳定或眼表微环境失衡的慢性眼表疾病,可伴眼表炎症反应、组织及神经异常,造成眼部不适症状和(或)视功能障碍<sup>[1]</sup>。其中,泪膜不稳定与眼表上皮细胞损伤互为因果,可形成恶性循环加重干眼病情<sup>[2]</sup>。干眼的相关研究一直是眼科专业领域的焦点,中医药在干眼治疗方面具有独特优势,充分发挥中医药治疗干眼的优势是我国干眼研究中需要重点加强的内容<sup>[3]</sup>。杞参方是左韬教授基于临床经验用于治疗干眼的中药方剂,前期研究显示,杞参方能够有效改善干眼患者的眼部症状、泪液分泌量和泪膜破裂时间,值得进一步对其进行深入研究<sup>[4]</sup>。

渗透压一度被认为是干眼病诊断的金标准,正常人的泪膜渗透压约在 300~310(平均 302)mOsm/L<sup>[5]</sup>。而与之相比,干眼患者的泪液渗透压分布在 306~441(平均 343)mOsm/L,可以高达 360mOsm/L<sup>[6]</sup>;500mOsm/L 高渗透压体外培养的角膜或结膜上皮细胞已经成为了用于

模拟干眼疾病状态的经典模型,并且被广泛地用于干眼发病机制等方面的基础实验研究<sup>[7-8]</sup>。TFOSDEWS II 得出结论,干眼的核心机制是蒸发诱导的泪液高渗,泪液高渗直接损害眼表,引起炎症反应,其中以丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)与核因子  $\kappa$ B 介导的最为常见<sup>[9]</sup>。MAPK 作为主要信号传递者,担负着从细胞表面到核内部的信号传递工作,调控着许多常见的生理活动,如炎症、细胞凋亡、肿瘤细胞的侵袭等<sup>[10]</sup>。JNK 为 MAPK 的亚族。研究证实,细胞炎性因子在干眼发病过程中表达明显增强,而炎性因子的表达释放与 JNK 通路的激活密切相关<sup>[11-12]</sup>。水通道蛋白 5(Aquaporin 5, AQP5)c-Jun 氨基末端激酶 1(c-Jun N-terminal Kinase 1, JNK 1)AQP5 在角膜上皮层中丰富存在,为水分子通过角膜上皮屏障提供主要途径,并且发挥着调节炎症、角膜损伤、细胞凋亡等作用<sup>[13]</sup>。Ren 等<sup>[8]</sup>研究证实 JNK/AQP5 信号通路是 500mOsm/L 渗透压诱导的人角膜上皮细胞(human corneal epithelial cells, HCECs)干眼模型的重要调控通路,故而本研究引入了 JNK1/AQP5 信号通路进行杞参方治疗干眼的作用初探,从而在细胞实验方面证实杞参方颗粒治疗干眼的效应机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验药品:杞参方颗粒组成:熟地黄 20g、山药 9g、山茱萸 9g、牡丹皮 9g、泽泻 6g、茯苓 6g、枸杞子 6g、菊花 6g、人参 3g、麦冬 9g、五味子 6g、通草 6g、黄精 9g、葛根 9g,由北京康仁堂药业有限公司提供。实验试剂及仪器:人 12-SV40 角膜上皮细胞株(CRL-11135);NaCl 粉剂,美国 Sigama 公司;细胞活力检测试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8),北京 Solarbio 公司;白介素-6(Interleukin 6, IL-6)检测试剂盒(SEA079Mu)与肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )检测试剂盒(SEA133Mu),武汉优尔生商贸有限公司;Anti-Caspase-1 抗体、Anti-JNK1 抗体[EPR17557](ab199380)、Anti-JNK1(phospho T183 + Y185)抗体[EPR20763](ab215208),abcam 公司;AQP5 抗体(D-7):sc-514022, Santa Cruz Biotechnology 公司。MK3 型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;371 型细胞培养箱,美国热电公司;DM IL 型倒置显微镜,德国徕卡公司;EP300 型电泳仪与 Tanon-4200SF 凝胶成像分析系统,上海天能科技有限公司。本研究通过伦理委员会审核并认真执行(No. 210000420200010)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和保存** HCECs 用包含 10%胎牛血清、100U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 细胞孵育箱中培养,每 1~2d 换液。当细胞生长至 80%~90%融合时,用 0.25%胰蛋白酶消化,消化时间约为 37℃,5min,按 1:3 传代培养。细胞冻存:取生长状态良好的细胞,0.25%胰蛋白酶,37℃,5min 消化后调整细胞数至  $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ /mL,离心去上清液,加等量细胞冻存液(10% DMSO+90%胎牛血清)重悬,加入冻存管,放入冻存盒,-80℃ 冰箱过夜后放入液氮长期保存。

**1.2.2 制作高渗透压干眼模型** HCECs 造模在含 10%胎牛血清、100U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基中加入无菌 500mOsm/L 渗透压的饱和氯化钠溶液,培养基 pH 值均为  $7.2 \pm 0.2$ 。

### 1.2.3 血清制备

**1.2.3.1 空白血清的制备** 成年雄性 Wistar 大鼠 10 只, SPF 级, 体质量 220~240g, 于实验动物中心屏障级动物房内, 自由摄食饮水, 适应性喂养 2d, 禁食 12h 后, 给予蒸馏水灌胃。每日 2 次, 连续 3d。末次灌胃 1h 后开始采血。采用腹主动脉采血法, 血液入 15mL 离心管, 室温静置 1h, 待有血清析出后, 3000r/m 离心 15min。分离血清, 56℃ 水浴灭活 40min, 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌。-20℃ 保存备用。

**1.2.3.2 杞参方含药血清的制备** 成年雄性 Wistar 大鼠 30 只, SPF 级, 体质量 220~240g, 于实验动物中心屏障级动物房内, 自由摄食饮水, 适应性喂养 2d, 禁食 12h 后, 给予杞参方颗粒蒸馏水冲服灌胃, 每日 2 次, 连续 3d。参考《药理实验方法学》与人折算, 大鼠剂量即按照成人日剂量的 6.36 倍分冲备用; 人每日用量为 1.88g/(kg·d), 折算后大鼠最终等效剂量为 11.98g/(kg·d), 则杞参方高、中、低剂量分别为 23.96、11.98、5.99g/(kg·d)。每日 2 次灌胃。末次灌胃 1h 后开始采血。血液室温静置 1h, 待有血清析出后, 3000r/min 离心 15min。分离血清, 56℃ 水浴灭活 40min, 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌。-20℃ 保存备用。

**1.2.4 实验分组** 空白组: 正常条件培养的角膜上皮细胞; 模型组: 模型细胞加入 10% 空白血清; 西药组: 模型细胞加入 0.3% 玻璃酸钠滴眼液; 杞参方高剂量组: 模型细胞加入 15% 杞参方高剂量含药血清; 杞参方中剂量组: 模型细胞加入 15% 杞参方中剂量含药血清; 杞参方低剂量组: 模型细胞加入 15% 杞参方低剂量含药血清。

### 1.2.5 实验指标

**1.2.5.1 CCK-8 法检测不同药物干预对 HCECs 存活率的影响** 细胞以  $1 \times 10^4$ /mL 的密度接种于 96 孔板中, 每孔接种 100 $\mu$ L, 将培养板置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中预培养 24h; 吸去 96 孔板中旧培养基后, 分别加入 100 $\mu$ L 培养基渗透压为 500mOsm/L 的含空白血清、0.3% 玻璃酸钠滴眼液、不同浓度杞参方颗粒含药血清的培养基到 96 孔板中, 每组设 3 个复孔, 继续培养 24h; 吸去 96 孔板中旧培养基, 将 CCK-8 试剂和完全培养基 1:9 稀释配制成 10% 的工作浓度, 加入 96 孔板中, 设 3 个只含 CCK-8 工作液的复孔为空白孔, 置于培养箱内孵育 2h; 用酶标仪检测在 450nm 处的吸光度值 (A), 计算细胞存活率。计算公式: 存活率 = [(A 实验孔 - A 空白孔)/(A 对照孔 - A 空白孔)]  $\times$  100%。

**1.2.5.2 ELISA 法检测各组细胞外液炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达情况** 将试剂盒中的标准品冻干粉用 1mL 标准品稀释剂稀释后, 每孔浓度为 X、X/2、X/4、X/8、X/16、X/32pg/mL。制作标准品稀释液 (0pg/mL) 以便后期空白孔加样。将标准品、稀释后标准品、待测血清依次加入酶标板中。最后使用标准品稀释液 (0pg/mL) 加入空白孔。置于 37℃ 水浴锅中, 孵育 2h。在酶标板中, 每孔加入 100 $\mu$ L 工作液 A, 将封板膜黏贴于酶标板上, 水浴锅孵育 1h。弃去酶标板内的反应液, 将酶标板倒扣于滤纸上拍击, 使孔内残留的液体流干。用洗板液重复进行 5 次洗板。滴加工作液 B 在酶标板中, 重复以上步骤。通过酶标仪进行检测, 于 450nm 波长测定各孔的 OD 值, 通过测量所得标准曲线计算出目的蛋白的浓度。

**1.2.5.3 免疫细胞化学法检测各组 HCECs 的凋亡因子 caspase-1 和 AQP5 的蛋白表达情况** 制作细胞片后进

行染色: (1)  $1 \times$  PBS 缓冲液洗涤切片 3 次, 各 5min; (2) 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 滴加在切片上, 室温静置 10min; (3) PBS 洗 3 次, 各 5min; (4) 使用正常山羊血清进行封闭, 室温 10~15min, 甩去多余液体。(5) 滴加一抗 (1:400) 50 $\mu$ L, 置于湿盒内, 4℃ 抗体孵育过夜。(6)  $1 \times$  PBS 洗 3 次, 各 5min; (7) 滴加试剂 A (生物素标记的抗鼠/兔 IgG) 50 $\mu$ L, 室温静置 20min; (8)  $1 \times$  PBS 洗 3 次, 各 5min; (9) 滴加试剂 B (HRP 标记的链霉亲和素) 50 $\mu$ L, 室温静置 20min; (10)  $1 \times$  PBS 洗 3 次, 各 5min; DAB 显色; 苏木精复染, 镜下观察并采集照片, 测定 5 个随机视野的平均光密度值, 以其平均值作为该样本中目的蛋白表达水平。

**1.2.5.4 Western-blotting 法检测各组 HCECs 的 AQP5 和 JNK1 及 p-JNK1 蛋白表达情况** 将 HCECs 以  $3 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 12 孔细胞培养板, 培养 18~24h 至细胞铺满瓶底 85% 左右, 弃去旧培养基, 分别给予正常等渗培养基和培养基渗透压为 500mOsm/L 的含空白血清、0.3% 玻璃酸钠滴眼液、不同浓度杞参方颗粒含药血清的培养基, 继续培养 4h 后, 收集细胞备用。相同实验重复 3 次。提取各组细胞总蛋白质, BCA 法测定蛋白质的浓度, 然后根据每个样品孔的吸光度, 计算样品的蛋白质浓度。调整蛋白浓度, 变性后经 SDS-PAGE 电泳分离; 300mA 恒流模式电流转膜 1h。室温封闭 2h。将膜分别泡入一抗 (1:500) 稀释液抗体中, 4℃ 孵育过夜。次日, 回收一抗, 将 PVDF 膜泡入 TBST 缓冲液中, 洗膜 5min  $\times$  6 次。将 PVDF 膜泡入山羊抗兔 HRP 标记的二抗 (用 TBST 1:5000 稀释) 中, 于摇床缓慢摇动, 室温孵育 2h。回收二抗, 将 PVDF 膜泡入 TBST 缓冲液中, 洗膜 5min  $\times$  6 次。将 ECL 发光试剂 A 和试剂 B 按照 1:1 比例混合, 滴在 PVDF 膜的蛋白面上, 然后通过伯乐 Imaging System 化学发光成像分析仪成像。通过 Quantity-one 分析软件对蛋白条带进行 OD 定量分析。以目的蛋白条带和内参条带的 OD 比值来表示目的蛋白的相对表达水平。

统计学分析: 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 多组间比较使用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验; 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 CCK-8 法检测各组 HCECs 存活率比较** 各组 HCECs 的存活率比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与空白组相比, 各组 HCECs 存活率均显著减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 各用药组 HCECs 存活率均显著增加, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与西药组相比, 杞参方高剂量组 HCECs 存活率显著增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 其余各组两两比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

**2.2 ELISA 法检测各组细胞外液炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 情况** 各组细胞外液炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与空白组相比, 各组细胞外液炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达水平均显著增高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 各用药组的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达水平均减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与西药组相比, 杞参方各剂量组的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达水平均减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其余各组两两比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组细胞存活率和细胞外液 TNF- $\alpha$  及 IL-6 含量比较

组别	存活率(%)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-6(ng/L)	$\bar{x} \pm s$
空白组	1.08 $\pm$ 0.07	63.56 $\pm$ 7.69	17.69 $\pm$ 2.02	
模型组	0.38 $\pm$ 0.04	212.41 $\pm$ 36.42	55.64 $\pm$ 8.55	
西药组	0.60 $\pm$ 0.05	174.52 $\pm$ 20.55	43.14 $\pm$ 7.32	
杞参方高剂量组	0.97 $\pm$ 0.13	108.44 $\pm$ 18.02	29.38 $\pm$ 4.02	
杞参方中剂量组	0.68 $\pm$ 0.10	133.91 $\pm$ 21.37	34.52 $\pm$ 5.73	
杞参方低剂量组	0.64 $\pm$ 0.08	169.81 $\pm$ 36.78	49.17 $\pm$ 6.48	
<i>F</i>	91.22	42.96	52.03	
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	

表 2 各组细胞蛋白表达情况比较

组别	caspase-1	AQP5 (免疫细胞化学法)	JNK1	p-JNK1	AQP5 (Western blotting 法)	$\bar{x} \pm s$
空白组	0.106 $\pm$ 0.0153	0.103 $\pm$ 0.0150	0.571 $\pm$ 0.0737	0.234 $\pm$ 0.0255	0.215 $\pm$ 0.0268	
模型组	0.247 $\pm$ 0.0196	0.260 $\pm$ 0.0237	0.558 $\pm$ 0.105	0.593 $\pm$ 0.106	0.553 $\pm$ 0.0438	
西药组	0.222 $\pm$ 0.0167	0.231 $\pm$ 0.0220	0.575 $\pm$ 0.0681	0.467 $\pm$ 0.0502	0.544 $\pm$ 0.0541	
杞参方高剂量组	0.180 $\pm$ 0.0269	0.154 $\pm$ 0.0170	0.586 $\pm$ 0.0679	0.394 $\pm$ 0.100	0.421 $\pm$ 0.0856	
杞参方中剂量组	0.198 $\pm$ 0.0252	0.177 $\pm$ 0.0164	0.600 $\pm$ 0.0459	0.449 $\pm$ 0.0269	0.448 $\pm$ 0.0807	
杞参方低剂量组	0.243 $\pm$ 0.0235	0.219 $\pm$ 0.0242	0.553 $\pm$ 0.0685	0.499 $\pm$ 0.0737	0.502 $\pm$ 0.0539	
<i>F</i>	35.25	49.15	0.334	16.98	25.27	
<i>P</i>	<0.01	<0.01	0.888	<0.01	<0.01	

2.3 免疫细胞化学法检测各组 HCECs 凋亡因子 caspase-1 及 AQP5 的蛋白表达情况比较 各组 HCECs 凋亡因子 caspase-1 及 AQP5 的蛋白表达情况比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与空白组相比, 各组 HCECs 中 caspase-1、AQP5 蛋白表达水平均显著增高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 各用药组的 AQP5 表达水平均减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 西药组、杞参方高、中剂量组 caspase-1 表达水平较模型组均减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与西药组相比, 杞参方高剂量组 caspase-1、AQP5 及杞参方中剂量组的 AQP5 蛋白表达水平显著减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 其余各组两两比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2, 图 1、2。

2.4 Western blotting 法检测各组 JNK1 和 p-JNK1 及 AQP5 的蛋白表达情况比较 Western blotting 法检测各组 JNK1 蛋白表达情况比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但 p-JNK1 和 AQP5 的蛋白表达情况比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与空白组相比, 各组 p-JNK1 和 AQP5 蛋白表达均显著增高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 各组 p-JNK1 及杞参方高、中剂量组的 AQP5 蛋白表达均减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与西药组相比, 杞参方高、中剂量组 AQP5 蛋白表达水平减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其余各组两两比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2, 图 3。

### 3 讨论

杞参方由杞菊地黄丸和生脉饮再加通草、黄精、葛根组合而成。杞菊地黄丸为滋阴明目之名方。相关 Meta 分析<sup>[14-15]</sup>显示, 杞菊地黄丸联合西药治疗干眼的疗效要优

于西药组。杞菊地黄丸不仅改善干眼的症状和无表面麻醉泪液分泌试验 (Schirmer I test, S I t), 还可降低泪液中 IL-1 $\beta$ 、IL-8 的表达水平<sup>[16]</sup>。生脉饮具有益气养阴生津之效, 亦有抑制细胞凋亡和抗氧化作用<sup>[17]</sup>。加葛根以补津液、通经络、升阳气; 加黄精补气养阴, 润肺, 健脾, 益肾; 加通草以行肺胃经气, 清势利水, 通利三焦; 诸药同用, 共奏益气养阴生津之效。

与空白组相比, 各组 HCECs 中 p-JNK1 蛋白表达水平均显著增高; 与模型组相比, 杞参方用药组 HCECs 中 p-JNK1 蛋白表达水平减少。Western blotting 法检测 HCECs 中 JNK1 蛋白表达, 统计学比较差异均无统计学意义。在未受刺激的细胞内, MAPK 处于静止状态, 处于细胞浆内。当细胞受到相关因素刺激后, MAPK 被激活而发生逐级磷酸化, 磷酸化后的 MAPK 蛋白则会进入细胞核内, 故而出现如上结果。郭宣妮等<sup>[18]</sup>发现干眼组患者泪液中 p-JNK1 蛋白表达水平与泪膜破裂时间 (break up time, BUT) 和 S I t 均呈显著负相关, 与角膜荧光素染色 (fluorescent, FL) 评分呈显著正相关, 与本研究的模型组 p-JNK1 蛋白表达水平均显著增高的结果一致。通过干预以 JNK 为核心的信号转导通路可抑制干眼状态下的炎症信号向细胞凋亡进行转导<sup>[19-20]</sup>。杞参方可减少 HCECs 的 JNK1 的磷酸化的蛋白表达, 可为杞参方对干眼起到抗炎及抗细胞凋亡的作用。本研究发现杞参方用药组的 HCECs 细胞存活率显著增加, 且 AQP5 蛋白表达显著减少。Ren 等<sup>[8]</sup>发现高渗环境刺激下的 HCECs 干眼模型的 JNK 的磷酸化和 AQP5 的表达均明显升高, 同时炎症因子 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  和凋亡因子 caspase-1 也升高, 促进细胞的炎症反应和凋亡, 并且证实了 JNK/AQP5 通路

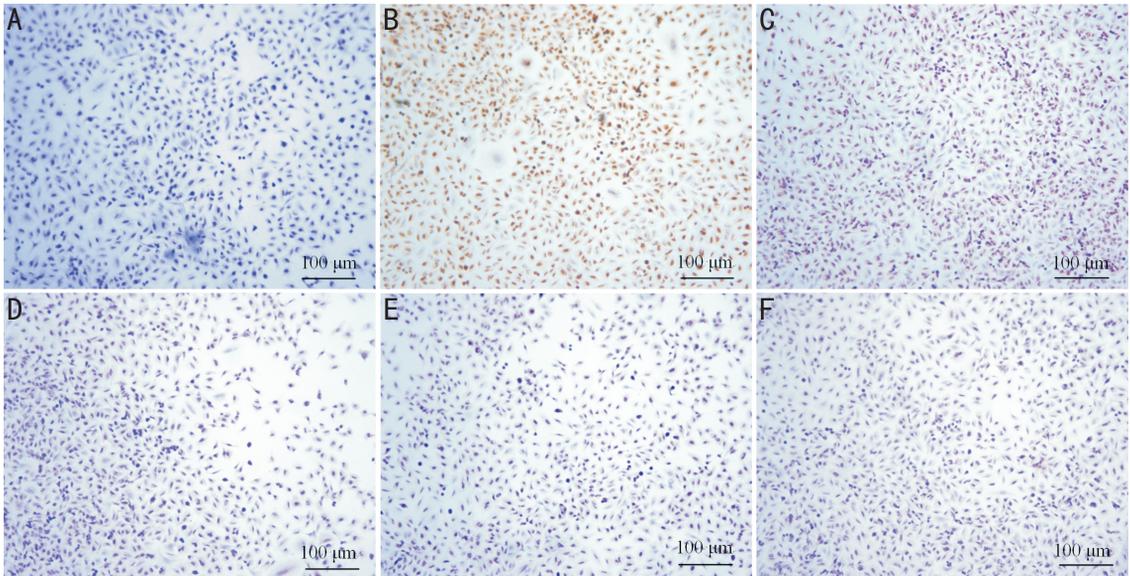


图1 免疫细胞化学法检测各组 caspase-1 蛋白表达情况 A:空白组;B:模型组;C:西药组;D:杞参方高剂量组;E:杞参方中剂量组;F:杞参方低剂量组。

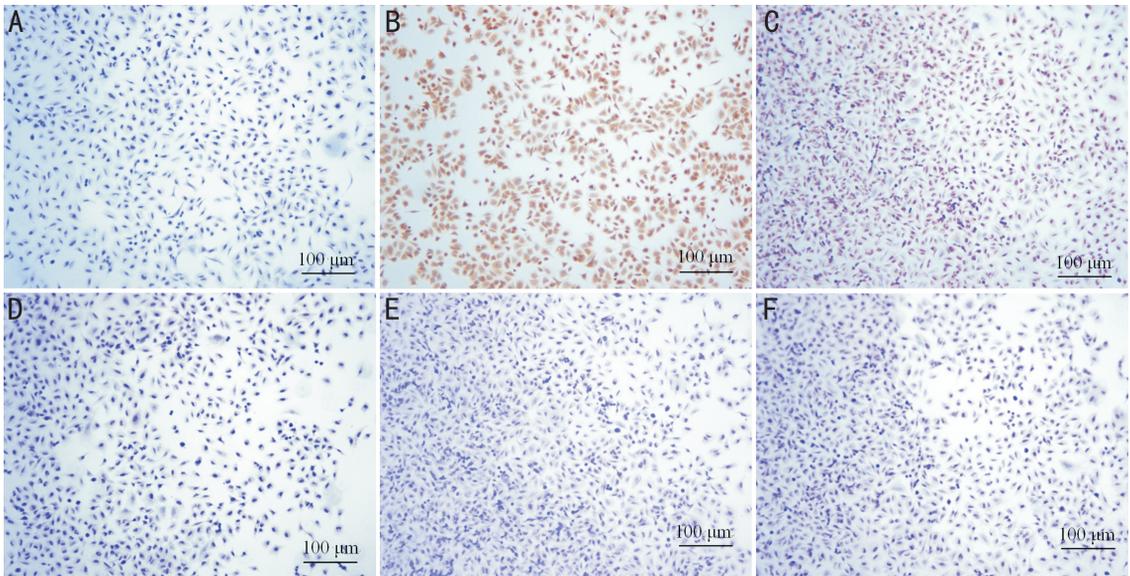


图2 免疫细胞化学法检测各组 AQP5 蛋白表达情况 A:空白组;B:模型组;C:西药组;D:杞参方高剂量组;E:杞参方中剂量组;F:杞参方低剂量组。

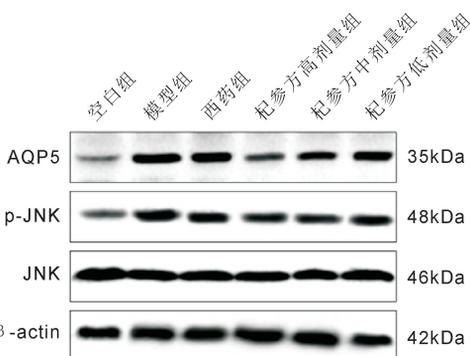


图3 Western blotting 法检测各组 JNK1 和 p-JNK1 及 AQP5 的蛋白表达情况比较。

在干眼模型中发挥了重要作用。Shankardas 等<sup>[21]</sup> 也证实 AQP5 的下调增加了 HCECs 的增殖和迁移。但是 Kumari 等<sup>[22]</sup> 研究表明,上调 AQP5 在角膜上皮划伤环境下通过促进细胞迁移和增殖,发挥促进角膜创伤愈合的独特功

能。出现以上截然不同的结果,考虑为在机械性角膜划伤环境下,AQP5 高表达可以促进角膜细胞向伤口位置迁移和增殖,从而修复角膜损伤,而一旦受伤区域被修复,则会对细胞迁移和增殖产生接触抑制反应;而在高渗环境下,通过下调 AQP5 可以抑制炎症反应与细胞凋亡,从而对 HCECs 进行保护作用。AQP5 调控机制与角膜细胞所处环境而不同,因此设计针对 AQP5 的研究策略要有差异性。

本研究发现杞参方治疗组的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 明显低于模型组,且 HCECs 存活率均显著增加,证实杞参方可减少细胞外液炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达水平治疗干眼。相关研究也证实,高渗透压可通过 JNK 通路促进小鼠角膜上皮 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子的释放,并促进细胞凋亡<sup>[23-24]</sup>。并且,干眼患者的泪液炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  与眼部症状、BUT、S I t、FL 及干眼程度密切相关,可作为反映疾病程度的灵敏、可靠的标志物<sup>[25-26]</sup>。本研

究通过 ELISA 法检测细胞外液炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达作为炎症指标,具有一定的科学性与研究意义。

综上,杞参方可通过降低高渗透诱导 HCECs 的 JNK1 的磷酸化和 AQP5 的蛋白表达,降低细胞外液炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 HCECs 的凋亡因子 caspase-1 的表达,最终有效抑制炎症反应和细胞凋亡。

#### 参考文献

- 1 亚洲干眼协会中国分会,海峡两岸医药卫生交流协会眼科学专业委员会眼表与泪液病学组,中国医师协会眼科医师分会眼表与干眼学组.中国干眼专家共识:定义和分类(2020年).中华眼科杂志 2020;56(6):418-422
- 2 王杨,黄钰清,杨燕宁.地夸磷索钠滴眼液对中重度干眼患者眼表状况和视觉质量的影响.中华眼视光学与视觉科学杂志 2021;23(5):329-335
- 3 孙旭光.解读国际泪膜与眼表协会 2017 年干眼专家共识中的性别及性激素与干眼.中华眼科杂志 2018;54(2):90-91
- 4 左韬,赵磊,张祝强,等.杞参膏治疗气阴两虚型干眼症临床观察.辽宁中医杂志 2016;43(3):548-551
- 5 Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, et al. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J Ophthalmol* 2011; 151(5):792-798
- 6 Gilbard JP, Rossi SR, Gray KL, et al. Tear film osmolarity and ocular surface disease in two rabbit models for keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29(3):374-378
- 7 Zheng Q, Ren Y, Reinach PS, et al. Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes initiate inflammation in hyperosmolarity stressed human corneal epithelial cells and environment-induced dry eye patients. *Exp Eye Res* 2015;134:133-140
- 8 Ren Y, Lu H, Reinach PS, et al. Hyperosmolarity-induced AQP5 upregulation promotes inflammation and cell death via JNK1/2 Activation in human corneal epithelial cells. *Sci Rep* 2017;7(1):4727
- 9 Craig JP, Nelson JD, Azar DT, et al. TFOS DEWS II report executive summary. *Ocul Surf* 2017;15(4):802-812
- 10 多玥荷,孙莉娜,应森林,等.西黄丸通过 ERK/MAPK 信号通路对人结肠癌裸鼠移植瘤的影响.中华中医药杂志 2013;28(10):3055-3058
- 11 Chen YH, Zhang XY, Yang L, et al. Decreased PPAR- $\gamma$  expression in the conjunctiva and increased expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the

conjunctiva and tear fluid of dry eye mice. *Mol Med Rep* 2014;9(5):2015-2023

12 The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5(2):75-92

13 Kumari SS, Varadaraj M, Menon AG, et al. Aquaporin 5 promotes corneal wound healing. *Exp Eye Res* 2018;172:152-158

14 赵敏,田霞,肖西立,等.杞菊地黄汤联合玻璃酸钠滴眼液治疗白内障术后干眼的疗效.国际眼科杂志 2021;21(7):1231-1235

15 肖西立,李涓.杞菊地黄丸治疗干眼症有效性及安全性的 Meta 分析.国际眼科杂志 2020;20(1):96-102

16 陈爱菊,杨涛,徐静.杞菊地黄丸对干眼症基础泪液分泌的影响.中华中医药学刊 2021;39(2):222-224

17 Lin MS, Chen ZJ, Luo L, et al. Research on the present situation of Shengmai Yin and the development of Shengmai preparations. *Pharm Clin Chin Mat Med* 2017;8:69-73

18 郭宣妮,姜春辉,朱安泰,等.青光眼术后干眼患者泪液中 MAPK、Sirt1 水平与泪膜功能的相关性分析.眼科新进展 2020;40(7):663-666

19 干眼动物模型制备规范(草案).中国实验方剂学杂志 2018;24(19):6-9

20 Dong ZH, Wang DC, Liu TT, et al. The roles of MAPKs in rabbit nucleus pulposus cell apoptosis induced by high osmolality. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014;18(19):2835-2845

21 Shankardas J, Patil RV, Vishwanatha JK. Effect of down-regulation of aquaporins in human corneal endothelial and epithelial cell lines. *Mol Vis* 2010;16:1538-1548

22 Kumari SS, Varadaraj M, Menon AG, et al. Aquaporin 5 promotes corneal wound healing. *Exp Eye Res* 2018;172:152-158

23 Li FH, Xue SQ, Xiu HJ, et al. The role of JNK/SAPK and p38 signal pathways in apoptosis of rabbit nucleus pulposus cells induced by high osmolality. *Fudan Univ J Med Sci* 2012;39(2):128-134

24 李彦霖,郁叶,郭婷莉,等.氧化应激和炎症反应中 Nrf2/HO-1 与 MAPK 的相关性.医学综述 2021;27(1):8-13

25 曹娟,马波,李海燕.鼠神经生长因子对兔眼 LASIK 术后角膜知觉恢复和泪液动力学指标及细胞因子的影响.川北医学院学报 2020;35(4):559-562,602

26 李玲,朱梦晨,李点,等.兔干眼细胞模型的建立与生物学特征评价.国际眼科杂志 2021;21(2):217-221