

· 实验研究 ·

α -黑素细胞刺激素联合羧甲基纤维素钠 对干眼大鼠眼表的保护作用

窦泽夏 茹玉莎 刘会娟 曾孝宇 孟珠 谷中秀 张琰 赵少贞

300384 天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼科研究所 天津医科大学眼视光学院

通信作者:张琰, Email: yanzhang04@tmu.edu.cn; 赵少贞, Email: zhaosz1997@sina.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.06.004

【摘要】 **背景** 研究表明, α -黑素细胞刺激素(α -MSH)具有抗炎作用,可缓解氢溴酸东莨菪碱诱导的大鼠干眼模型的眼表异常,而人工泪液羧甲基纤维素钠(CMC)能够润滑干眼眼表,但 α -MSH 能否在大鼠干眼模型中促进人工泪液 CMC 的治疗效果尚有待进一步研究。 **目的** 探讨 α -MSH 联合 CMC 对氢溴酸东莨菪碱诱导的大鼠干眼模型中眼表的保护作用。 **方法** 选取清洁级雌性 Wistar 大鼠 60 只,采用随机数字表法随机分为正常对照组、模型对照组、NaCl 点眼组、CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组,每组 10 只。除正常对照组外,其他各组大鼠分别于每日 9:00、12:00、15:00、18:00 接受 0.5 ml (6 mg/ml) 氢溴酸东莨菪碱皮下注射,共 28 d,以诱导干眼模型,NaCl 点眼组、CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组于注射后第 1 天分别用质量分数 0.9% NaCl 溶液、质量分数 0.5% CMC 滴眼液、 1×10^{-3} mg/ml α -MSH 溶液、 1×10^{-3} mg/ml α -MSH+0.5% CMC 混合液点右眼,每日 2 次(8:00 和 17:00)。各组大鼠分别于用药后 0、7、14、21 和 28 d 行 Shirmer 试验 I 检测(SIt)、泪膜破裂时间(BUT)检测、角膜上皮荧光素染色评分,并于用药后 28 d 完成检查后处死,取包含上下眼睑的整个大鼠眼球,取角膜组织行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察大鼠角膜的形态学变化,大鼠结膜组织行过碘酸希夫染色,光学显微镜下观察各组大鼠结膜杯状细胞的数量。 **结果** 随着造模后时间的延长,大鼠 SIt 值和 BUT 值逐渐下降,角膜荧光素染色评分逐渐增加,造模后各时间点模型对照组与正常对照组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。大鼠用药后 7、14 和 21 和 28 d, NaCl 点眼组 SIt 值、BUT 值和角膜荧光素染色评分与模型对照组比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。用药后 7、14 和 21 d, α -MSH+CMC 点眼组大鼠 SIt 值分别为(4.800±0.789)、(4.100±0.516)和(4.300±0.856)mm,明显高于相应时间点 NaCl 点眼组的(2.875±0.719)、(2.375±0.619)和(2.532±0.957)mm,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。用药后 7 d, α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组的 BUT 值分别为(4.938±1.843)s 和(5.000±1.491)s,明显高于 NaCl 点眼组的(3.250±1.000)s,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。用药后各时间点 CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组大鼠角膜荧光素染色评分均明显低于 NaCl 点眼组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),以 α -MSH+CMC 点眼组角膜荧光素染色评分最低。苏木精-伊红染色显示,模型对照组和 NaCl 点眼组大鼠出现角膜上皮层增厚、角膜水肿、角膜上皮粗糙和角膜基质层纤维排列紊乱, α -MSH+CMC 点眼组大鼠角膜水肿和上皮细胞的增生轻微,角膜形态接近正常对照组。大鼠结膜组织过碘酸希夫染色显示,CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组大鼠结膜杯状细胞数量明显多于模型对照组和 NaCl 点眼组(均 $P < 0.01$)。 **结论** 单独使用 α -MSH 和 CMC 可一定程度上改善干眼大鼠的角膜组织损伤、角膜形态学异常以及结膜杯状细胞数量的减少,但相对于单独用药, α -MSH 和 CMC 联合应用在造模后早期对改善干眼模型大鼠泪液分泌量和泪膜稳定性作用更明显。

【关键词】 干眼/药物治疗; 眼表; 保护作用; 羧甲基纤维素钠; α -促黑素细胞刺激素; 疾病模型; Wistar 大鼠

基金项目: 国家自然科学基金项目(81270975)

Combinatorial protective effects of α -melanocyte-stimulating hormone and carboxymethylcellulose on ocular surface in dry eye rat models Dou Zexia, Ru Yusha, Liu Huijuan, Zeng Xiaoyu, Meng Zhu, Gu Zhongxiu, Zhang Yan, Zhao Shaozhen

Tianjin Medical University Eye Hospital, School of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University Eye Institute, Tianjin 300384, China

Corresponding authors: Zhang Yan, Email: yanzhang04@tmu.edu.cn; Zhao Shaozhen, Email: zhaosz1997@sina.com

[Abstract] Background Researches showed that α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) inhibits

inflammation and ameliorates the ocular surface abnormalities in a scopolamine-induced dry eye rat model, and the managing effect of sodium carboxymethylcellulose (CMC) on dry eyes also has been determined. However, whether α -MSH can enhance the therapeutic effects of CMC remains to be investigated. **Objective** This study was to investigate the protective effects of α -MSH combined with CMC on ocular surface in a scopolamine-induced dry eye rat model. **Methods** Sixty clean female Wistar rats were randomly divided into normal control group, model control group, NaCl group, CMC group, α -MSH group and α -MSH+CMC group, and 10 rats for each group. The dry eye models were established by subcutaneous injection of scopolamine hydrobromide at 9:00, 12:00, 15:00 and 18:00 per day for 28 days. 0.9% NaCl solution, 1×10^{-3} mg/ml α -MSH solution, 0.5% CMC eye drop, and 1×10^{-3} mg/ml α -MSH+0.5% CMC solution were topically administered twice a day (8:00, 17:00) since the initial day of modeling according to grouping. Shirmer I test (S I t), breakup time of tear film (BUT) and corneal fluorescence staining were performed before and 7, 14, 21, 28 days after the application of drugs. At 28 days following the administration of drugs, the eyeballs of the rats were collected. Hemotoxylin and eosin staining was employed to examine the morphology of corneas, and periodic acid schiff (PAS) staining was used to count the conjunctival goblet cells. This study protocol was approved by Experimental Animal Ethic Committee of Tianjin Medical University (SYXK 2009-0001), and the use and care of the rats complied with ARVO Statement. **Results** The S I t and BUT values were significantly reduced, and the corneal fluorescence staining scores were significantly increased over time following modeling in the model control group (all at $P < 0.01$). No significant differences were found in the S I t, BUT and corneal fluorescence staining scores between model control group and NaCl group at various time points (all at $P > 0.05$). At 7, 14 and 21 days after intervention, the S I t values were (4.800 ± 0.789) , (4.100 ± 0.516) and (4.300 ± 0.856) mm in the α -MSH+CMC group, which were considerably higher than (2.875 ± 0.719) , (2.375 ± 0.619) and (2.532 ± 0.957) mm in the NaCl group (all at $P < 0.01$). At 7 days after intervention, the BUT values were (4.938 ± 1.843) seconds and (5.000 ± 1.491) seconds in the α -MSH group and α -MSH+CMC group, which were significantly higher than (3.250 ± 1.000) seconds in the NaCl group (both at $P < 0.01$). The corneal fluorescence staining scores in the CMC group, α -MSH group and α -MSH+CMC group were significantly lower than that in the NaCl group, with the lowest score in the α -MSH+CMC group (all at $P < 0.05$). The thickening of corneal epithelial layer, corneal edema and arrangement disorder of corneal stroma were found in the model control group and NaCl group; while slight corneal edema and epithelial cell proliferation were exhibited in the α -MSH+CMC group by hemotoxylin and eosin staining. PAS staining showed that the number of goblet cells was much more in the CMC group, α -MSH group and α -MSH+CMC group than that in the model control group and NaCl group (all at $P < 0.01$). **Conclusions** The sole application of α -MSH or CMC alleviates ocular surface damage and morphological abnormality to certain extent, and the combination of α -MSH and CMC generates more effective protection in comparison with sole administration of α -MSH or CMC. The early application of the drugs plays an improvement role in tear secretion and tear film stability in dry eyes.

[Key words] Dry eyes/drug therapeutic; Ocular surface; Protection; Sodium carboxymethylcellulose; α -Melanocyte-stimulating hormone; Disease models; Rats, Wistar

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81270975)

干眼是一种由多因素导致的泪膜与眼表异常的疾病,主要表现为泪膜渗透压升高和眼表炎症引起的眼部不适感、视力波动、泪膜不稳定等症状^[1]。研究表明,干眼患病率为 5% ~ 34%,女性及老年人群的发病率更高^[2],如治疗不当会引起眼表炎症、角膜损伤、视力下降,甚至致盲等。干眼的治疗方法包括人工泪液、免疫抑制剂、非甾体类药物的局部应用以促进泪液的分泌,抑制炎症反应等,从而缓解干眼症状^[3-5]。羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethylcellulose, CMC)作为人工泪液,已广泛用于干眼的临床治疗。CMC 富含阴离子及亲水基团,具有良好的黏附性,可以稀释炎症因子,稳定泪膜,湿润眼表;同时人工泪液中含有多种电

解质,可维持眼表组织的代谢平衡,缓解干眼症状。 α -促黑素细胞刺激素(α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)来源于阿片-促黑素细胞皮质素原,以往研究证实 α -MSH 可减轻大鼠的干眼症状,抑制炎症因子的产生^[6],但 α -MSH 能否促进 CMC 对大鼠干眼的治疗效果尚不清楚。本研究中拟采用 α -MSH 和 CMC 联合疗法治疗用氢溴酸东莨菪碱诱导的大鼠干眼,评估 α -MSH 和 CMC 联合应用对于干眼相关的临床指标及角膜、结膜组织形态学改变的改善作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6 周龄清洁级健康雌性 Wistar 大鼠 60 只(解放军军事医学科学院实验动物中心提供),体质量 160~180 g。大鼠均饲养于天津医科大学清洁级动物实验室,自由饮水与进食,室内温度为(25±1)℃,相对湿度为(40±5)%,12 h 明/12 h 暗周期性光照。本研究经天津医科大学实验动物护理和使用委员会批准(批准号:SYXK 2009-0001),实验动物的使用和喂养遵循 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂及仪器 东莨菪碱氢溴酸盐(美国 Sigma 公司); α -MSH(美国 Calbiochem 公司);CMC(爱尔兰艾尔建制药公司);泪液分泌酚红棉线(天津晶明新技术发展有限公司);荧光素钠注射液(美国 Alcon 公司);过碘酸希夫(periodic acid schiff, PAS)试剂盒(美国 Roche 公司)。裂隙灯显微镜(重庆康华科技有限公司);BX51 光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠干眼模型的建立 干眼模型的建立参照文献[6-7]描述的方法,于每天 9:00、12:00、15:00、18:00 用 0.5 ml 氢溴酸东莨菪碱(6 mg/ml,溶于质量分数 0.9% NaCl 溶液)行 Wistar 大鼠双侧后肢交替皮下注射,连续 28 d。

1.2.2 大鼠的分组与处理 采用随机数字表法将 60 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、NaCl 点眼组、CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组,每组 10 只。除正常对照组外,其余各组大鼠均建立干眼模型,从皮下注射氢溴酸东莨菪碱后第 1 天起,根据上述分组分别用生理盐水、质量分数 0.5% CMC 滴眼液、含 1×10^{-3} mg/ml α -MSH 的生理盐水以及含 1×10^{-3} mg/ml α -MSH 的 0.5% CMC 滴眼液点右眼,每天 2 次(8:00、17:00),每次 25 μ l,连续 28 d。正常对照组不接受任何处理。各组大鼠分别于干眼造模前和造模后第 7、14、21、28 天行泪液分泌试验 I (Schirmer I test, S I t)、泪膜破裂时间(breakup time of tear film, BUT)检测及角膜上皮荧光素染色。于造模后第 28 天完成上述检查后腹腔内注射质量分数 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g 体质量)行全身麻醉,颈椎脱臼法处死大鼠,取连带上眼睑、下眼睑及完整结膜的眼球,置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定。

1.2.3 干眼相关检查 分别于造模前和造模后第 7、14、21、28 天同一时间点对各组大鼠进行检查。

1.2.3.1 S I t 检测 参照文献[6-7]描述的方法行 S I t 检测。固定大鼠,在非麻醉状态下轻轻拉开下睑,用显微镊夹持酚红棉线置于右眼下结膜囊中外 1/3 处 30 s,取出后测量并记录酚红棉线湿润变红的长度,

读数精确到 0.01 cm。

1.2.3.2 BUT 检测 参照文献[6-7]描述的方法进行 BUT 检测,向大鼠下结膜囊内滴入 5 μ l 质量分数 1% 荧光素钠注射液,固定大鼠,并置于裂隙灯显微镜钴蓝光下观察,3 次瞬目后开始计时,至角膜出现第 1 个破裂斑的时间即为 BUT。

1.2.3.3 角膜荧光素染色评分 向大鼠下结膜囊内滴入 1% 荧光素钠注射液 1 μ l,瞬目 3 次后,置于裂隙灯显微镜钴蓝光下观察角膜表面荧光素着色情况。将角膜划分为 4 个象限,每个象限根据荧光素的着色程度和面积进行评分。0 分:无染色;1 分:散在点状着色(<30 个);2 分:点状着色(≥ 30 个),但不弥散;3 分:严重的弥散性着色,但尚未形成斑块状;4 分:斑块状着色。4 个象限评分之和代表角膜的荧光素染色评分。

1.2.4 角膜和结膜组织病理学检查 将固定的完整眼球经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,然后沿矢状面 5 μ m 厚切片,采用苏木精-伊红染色法,光学显微镜下观察角膜组织形态,采用过碘酸希夫染色,光学显微镜下观察结膜杯状细胞形态并计数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中各检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据经 Levene 检验方差齐。采用完全随机分组协方差研究设计,正常对照组与模型对照组间 S I t 值、BUT 值和角膜荧光素染色评分的差异比较采用独立样本 t 检验;正常对照组、模型对照组及各种药物点眼组干预后不同时间点大鼠右眼 S I t 值、BUT 值和角膜荧光素染色评分的总体差异比较采用两因素方差分析,多重比较采用 Tukey 检验;干预后 28 d 正常对照组、模型对照组及各种药物点眼组间大鼠结膜杯状细胞数目的差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠干眼模型造模情况

正常对照组大鼠右眼随着时间延长 S I t 值、BUT 值和角膜荧光素染色评分均轻度下降,模型对照组大鼠造模前 S I t 值稍低于正常对照组大鼠,但差异无统计学意义($P = 0.186$),造模后 7、14、21 和 28 d 大鼠 S I t 值均逐渐下降,各时间点 S I t 值均明显低于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P = 0.000$)。模型对照组大鼠造模前 BUT 值与正常对照组接近,造模后 7、14、21 和 28 d 大鼠 BUT 值均逐渐下降,各时间点 BUT

值均明显低于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P=0.000$)。正常对照组大鼠角膜荧光素染色评分在不同时间点缓慢增加,模型对照组大鼠造模前角膜荧光素染色评分与正常对照组接近,造模后随着时间延长明显增加,造模后各时间点角膜荧光素染色评分值均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P=0.000$)(图 1)。

2.2 干眼相关指标的变化

2.2.1 各组大鼠干预后不同时间点泪液分泌量比较

各组大鼠干预后不同时间点泪液分泌量总体比较差异均有统计学意义($F_{\text{分组}}=234.300, P=0.000; F_{\text{时间}}=65.620, P=0.000$)。模型对照组大鼠随造模后时间的延长,泪液分泌量逐渐下降。用药后 0 d 与 7 d 相比,除正常对照组外,各组大鼠泪液分泌量下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$),各组大鼠其余时间点前后比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。用药后 7、14、21、28 d,大鼠 S I t 值均明显低于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。模型对照组与 NaCl 组比较,用药后各时间点 S I t 值比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。各组大鼠用药前 CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组大鼠 S I t 值与 NaCl 点眼组比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);

用药后 7、14、21 d, α -MSH+CMC 点眼组 S I t 值明显高于 NaCl 点眼组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),NaCl 点眼组、CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组间 S I t 值的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);用药后 28 d,NaCl 点眼组与 CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组 S I t 值比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(表 1)。

2.2.2 各组大鼠用药后不同时间点 BUT 值比较

各组大鼠干预后不同时间点 BUT 值的总体比较,差异均有统计学意义($F_{\text{分组}}=540.000, P=0.000; F_{\text{时间}}=30.030, P=0.000$)。用药后 0 d 与 7 d 相比,除正常对照组外,各组大鼠 BUT 值下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),用药后 14 d,模型对照组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组 BUT 值均较用药后 7 d 下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),其余时间点前后各组大鼠比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。随着时间的延长,模型对照组 BUT 逐渐缩短,造模后各时间点大鼠 BUT 值明显低于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。模型对照组与 NaCl 组相比,各时间点大鼠 BUT 值差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。用药后 7、14、21 和 24 d,大鼠 BUT 值均明显低于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),CMC 点眼组与 NaCl 点眼组间 BUT 值比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。用药后 7 d, α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组大鼠 BUT 值均高于 NaCl 点眼组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。各时间点 CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组 BUT 值比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(表 2)。

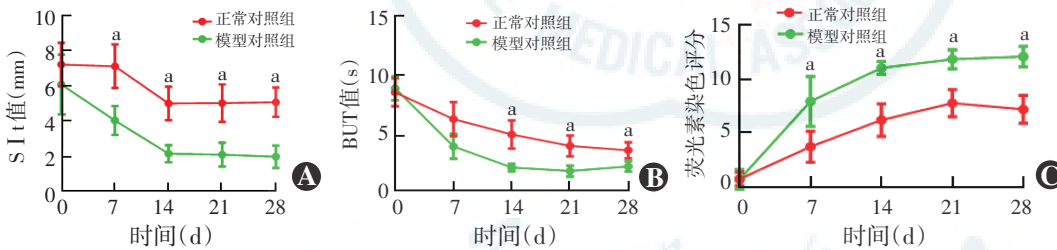


图 1 正常对照组与模型对照组干眼相关指标比较 A:造模后各时间点 2 个组间大鼠 S I t 值比较 与正常对照组比较,^a $P<0.01$ (独立样本 t 检验, $n=10$) B:造模后各时间点 2 个组间大鼠 BUT 值比较 与正常对照组比较,^a $P<0.01$ (独立样本 t 检验, $n=10$) C:造模后各时间点 2 个组间大鼠角膜荧光素染色评分比较 与正常对照组比较,^a $P<0.01$ (独立样本 t 检验, $n=10$)

表 1 各组大鼠用药后不同时间点 S I t 值比较($\bar{x}\pm s, \text{mm}$)

组别	样本量	不同时间点 S I t 值				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	10	7.250±1.244	7.156±1.247	5.031±1.958	5.047±1.073	5.100±0.835
模型对照组	10	6.111±1.711	4.050±0.826 ^{ac}	2.150±0.490 ^a	2.100±0.681 ^a	1.975±0.638 ^a
NaCl 点眼组	10	7.688±1.352	2.875±0.719 ^{ac}	2.375±0.619 ^a	2.532±0.957 ^a	3.321±1.067 ^a
CMC 点眼组	10	7.300±1.160	4.200±0.422 ^{ac}	3.450±0.780 ^a	3.500±0.882 ^a	2.800±0.587 ^a
α -MSH 点眼组	10	6.750±0.931	3.561±0.814 ^{ac}	3.562±0.479 ^a	3.500±1.049 ^a	4.214±0.935 ^a
α -MSH+CMC 点眼组	10	7.700±1.252	4.800±0.789 ^{abc}	4.100±0.516 ^{ab}	4.300±0.856 ^{ab}	3.450±0.832 ^a

注: $F_{\text{分组}}=234.300, P=0.000; F_{\text{时间}}=65.620, P=0.000$ 。与各自时间点正常对照组比较,^a $P<0.01$;与各自时间点 NaCl 点眼组比较,^b $P<0.01$;与组内 0 d 值比较,^c $P<0.01$ (两因素方差分析, Tukey 检验) S I t:泪液分泌试验 I; CMC:羧甲基纤维素钠;MSH:黑素细胞刺激素

组与 NaCl 点眼组间 BUT 值比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。用药后 7 d, α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组大鼠 BUT 值均高于 NaCl 点眼组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。各时间点 CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组 BUT 值比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(表 2)。

2.2.3 各组大鼠用药后不同时间点角膜荧光素染色评分比较

各组大鼠干预后不同时间点角膜荧光素染色评分

的总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 734.700, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 78.550, P = 0.000$)。模型对照组大鼠随时间延长,角膜荧光素染色评分逐渐增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),用药后 7、14、21、28 d,模型对照组角膜荧光素染色评分明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),模型对照组与 NaCl 点眼组大鼠角膜荧光素染色评分的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。用药后 7 d, α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组角膜荧光素染色评分均明显低于 NaCl 点眼组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。用药后 14 d, α -MSH+CMC 组角膜荧光素染色评分明显低于 NaCl 点眼组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而用药后 21 d 和 28 d, CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组角膜荧光素染色评分均较 NaCl 点眼组明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图 2, 表 3)。

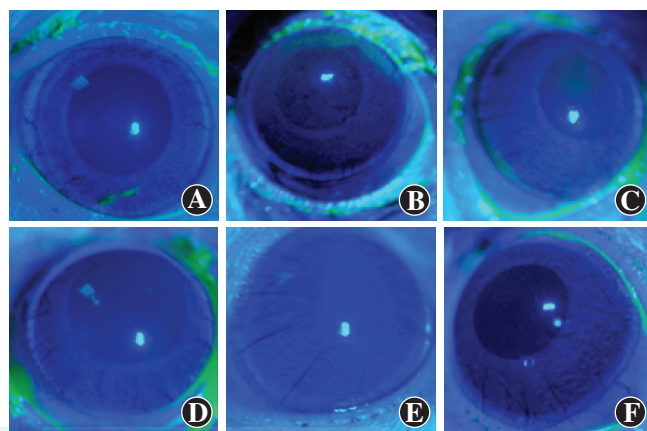


图 2 用药后 28 d 各组大鼠角膜荧光素染色情况 A: 正常对照组角膜表面光滑,未见明显着色 B、C: 模型对照组(B)和 NaCl 点眼组(C)角膜表面可见弥散性点状荧光素钠着色,但未连接成片 D、E、F: CMC 点眼组(D)、 α -MSH 点眼组(E)和 α -MSH+CMC 点眼组(F)角膜表面可见少量散在点状着色

表 2 各组大鼠用药后不同时间点 BUT 检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 BUT 值				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	10	8.406±1.188	6.125±1.454	4.813±1.203	3.844±0.884	3.467±0.681
模型对照组	10	8.750±1.020	3.800±1.056 ^{ac}	2.000±0.324 ^{ad}	1.700±0.470 ^a	2.100±0.447 ^a
NaCl 点眼组	10	8.813±1.424	3.250±1.000 ^{ac}	2.250±0.447 ^a	2.125±0.342 ^a	2.214±0.456 ^a
CMC 点眼组	10	8.300±1.767	4.000±0.816 ^{ac}	2.400±0.699 ^a	2.500±0.527 ^a	2.300±0.483 ^a
α -MSH 点眼组	10	8.625±1.088	4.938±1.843 ^{abc}	3.063±0.443 ^{ad}	3.250±0.577 ^a	3.143±0.663 ^a
α -MSH+CMC 点眼组	10	8.100±1.970	5.000±1.491 ^{abc}	3.100±0.738 ^{ad}	3.100±0.316 ^a	2.900±0.316 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 540.000, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 30.030, P = 0.000$ 。与各自时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与各自时间点 NaCl 点眼组比较, ^b $P < 0.01$; 与组内 0 d 值比较, ^c $P < 0.01$; 与组内 7 d 值比较, ^d $P < 0.01$ (两因素方差分析, Tukey 检验) BUT: 泪膜破裂时间; CMC: 羧甲基纤维素钠; MSH: 黑素细胞刺激素

表 3 各组大鼠不同时间点角膜荧光素染色评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点角膜荧光素染色评分				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	10	0.719±0.634	3.750±1.458	6.250±1.524	7.844±1.273	7.267±1.311
模型对照组	10	0.700±0.923	8.000±2.340 ^{ad}	11.150±0.587 ^{ac}	11.950±0.887 ^{af}	12.200±0.951 ^g
NaCl 点眼组	10	0.938±0.998	8.250±2.620 ^a	11.188±0.655 ^a	11.438±1.365 ^a	12.143±1.027
CMC 点眼组	10	0.800±0.632	6.400±2.011 ^a	10.500±0.707 ^a	9.300±0.823 ^{ab}	9.900±1.449 ^{ab}
α -MSH 点眼组	10	1.125±0.957	6.000±2.805 ^{ac}	9.563±0.964 ^a	9.625±1.088 ^{ab}	9.429±1.016 ^{ac}
α -MSH+CMC 点眼组	10	1.000±0.471	5.000±1.826 ^{ac}	9.100±1.197 ^{ab}	8.300±0.675 ^{ac}	8.900±0.994 ^{ac}

注: $F_{\text{分组}} = 734.700, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 78.550, P = 0.000$ 。与各自时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与各自时间点 NaCl 点眼组比较, ^b $P < 0.05, P < 0.01$; 与组内 0 d 值比较, ^d $P < 0.01$; 与组内 7 d 值比较, ^c $P < 0.01$; 与组内 14 d 值比较, ^f $P < 0.01$; 与组内 21 d 值比较, ^g $P < 0.01$ (两因素方差分析, Tukey 检验) CMC: 羧甲基纤维素钠; MSH: 黑素细胞刺激素

2.3 各组大鼠角膜病理组织学表现

2.3.1 大鼠角膜病理组织学结构变化 苏木精-伊红染色结果显示, α -MSH+CMC 点眼组大鼠角膜与正常对照组大鼠相似,表面光滑,上皮层由 4~6 层排列规则的细胞组成,基质层纤维细胞排列规则、致密;模

型对照组和 NaCl 点眼组大鼠角膜水肿增厚,表面粗糙,偶见上皮剥脱,角膜上皮层厚度增加,细胞层数增多,位于上皮层基底部的鳞状上皮细胞和基质层的纤维细胞排列紊乱、疏松; CMC 点眼组和 α -MSH 点眼组的角膜形态则介于模型对照组和正常对照组之间,呈轻度角膜水肿,角膜上皮较光滑,上皮各层细胞排列较规则,基质层纤维细胞排列稍疏松和紊乱(图 3)。

2.3.2 各组大鼠结膜杯状细胞数量比较 用药后 28 d, 正常对照组、模型对照组、NaCl 点眼组、CMC 点眼组、 α -MSH

点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组大鼠眼部每张切片中结膜杯状细胞数量分别为 (178.80 ± 45.39)、(82.50 ± 22.21)、(81.20 ± 24.35)、(135.20 ± 27.36)、(129.50 ± 15.43)、(131.50 ± 24.47) 个,组间总体比较差异有统

计学意义 ($F = 15.440, P = 0.000$), 模型对照组、NaCl 点眼组大鼠结膜杯状细胞数量较正常对照组明显减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 模型对照组与 NaCl 组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组结膜杯状细胞数量均明显多于 NaCl 点眼组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); CMC 点眼组、 α -MSH 点眼组和 α -MSH+CMC 点眼组大鼠结膜杯状细胞数量间两两比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 4)。

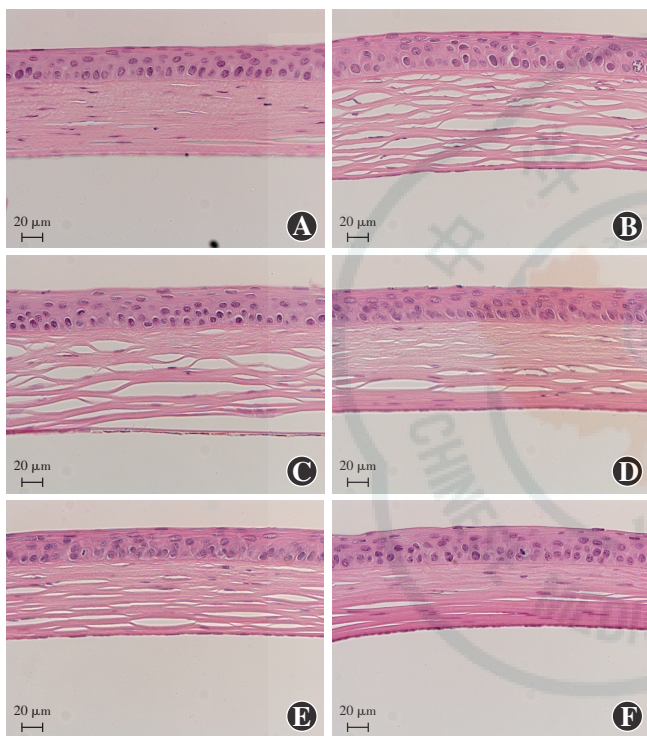


图 3 各组大鼠角膜组织病理学检查 (HE 标尺 = 20 μm) A: 正常对照组角膜表面光滑, 角膜上皮细胞排列规则 B: 模型对照组角膜表面粗糙, 角膜上皮细胞排列紊乱, 角膜基质层增厚, 基质纤维排列紊乱 C: NaCl 点眼组角膜上皮细胞排列紊乱, 角膜基质纤维排列紊乱、疏松 D: CMC 点眼组角膜表面较光滑, 上皮细胞排列较整齐, 基质层显微排列稍疏松 E: α -MSH 点眼组角膜上皮光滑, 上皮细胞排列较整齐, 角膜基质层增厚 F: α -MSH+CMC 点眼组角膜表面光滑, 上皮细胞排列整齐, 基质层纤维细胞排列致密, 接近正常对照组

3 讨论

泪膜成分由水样液层、黏蛋白层、脂质层组成, 每层组分的质和量及其内在联系对维持泪膜的平衡均发挥重要作用^[8]。干眼的发病机制复杂, 各种致病因素作用于眼表组织造成泪液渗透压的升高、角膜细胞的凋亡和结膜杯状细胞的萎缩, 影响腺体的分泌和神经传导^[9-12]。干眼分为泪液蒸发过强型及生成不足型, 由此产生多种干眼模型的诱导方法, 如破坏动物睑板腺, 控制环境因素, 应用肾上腺素、阿托品或糖皮质激素, 摘除泪腺, 破坏或干扰神经反射等^[13], 但这些方法

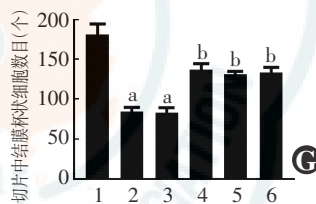
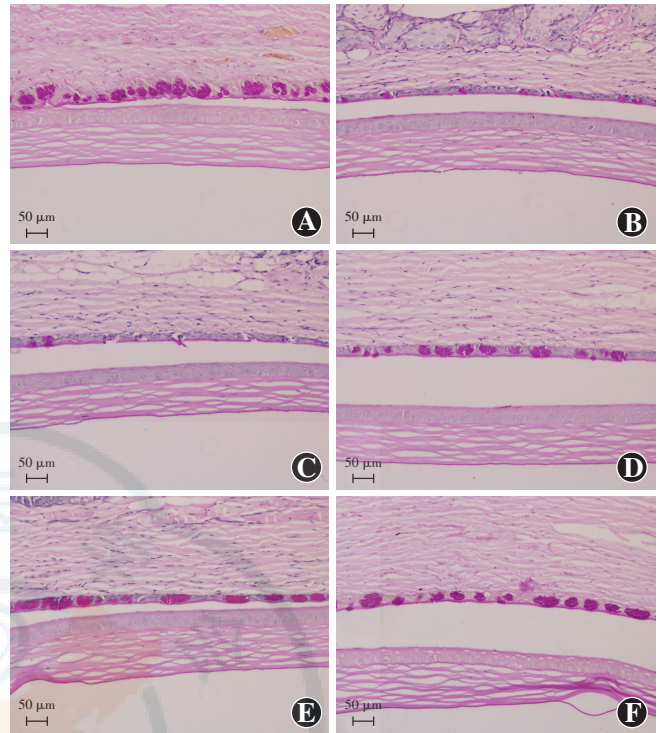


图 4 各组大鼠结膜杯状细胞数目的变化 (PAS 标尺 = 50 μm) A: 正常对照组大鼠结膜杯状细胞排列整齐, 呈紫红色着染, 数目较多 B: 模型对照组大鼠仅见散在结膜杯状细胞 C: NaCl 点眼组仅有极少量结膜杯状细胞

D: CMC 点眼组可见结膜杯状细胞, 但排列欠规则 E: α -MSH 点眼组大鼠结膜杯状细胞较多, 排列较为规则 F: α -MSH+CMC 点眼组结膜杯状细胞密度增加, 排列规则 G: 各组大鼠结膜杯状细胞数量量化比较 $F = 15.440, P = 0.000$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$; 与 NaCl 点眼组比较, $^b P < 0.01$ (单因素方差分析, Tukey 检验, $n = 10$) 1: 正常对照组 2: 模型对照组 3: NaCl 点眼组 4: CMC 点眼组 5: α -MSH 点眼组 6: α -MSH+CMC 点眼组

诱导的模型存在不稳定、并发症多等不足。本实验应用胆碱能 M 受体阻滞剂氢溴酸东莨菪碱对大鼠进行皮下注射, 模拟泪液生成减少型干眼模型, 具有作用持久、操作简单等特点, 可以用来研究干眼的新型干预措施及其作用机制。

本研究探讨 α -MSH 联合 CMC 在氢溴酸东莨菪碱诱导的大鼠干眼模型中的治疗效果, 造模后早期联合应用 α -MSH 和 CMC 可显著增加大鼠干眼模型的泪液分泌量, 缓解干眼大鼠模型中 BUT 的降低, 然而, CMC 对于大鼠干眼模型中的泪膜稳定性无明显作用。干眼组角膜荧光素染色评分随时间延长而增加, 干眼体征加重, CMC、 α -MSH 和 α -MSH 与 CMC 联合应用均可显著降低角膜荧光素染色评分, 且 α -MSH 与 CMC 联合应用对于干眼大鼠模型中角膜损伤的缓解作用更强, 提示 α -MSH 和 CMC 及两者联合应用对于干眼大鼠结

膜杯状细胞的数量和形态恢复均有效,并且效果相当。正常大鼠角膜表面光滑、完整,角膜上皮的各层细胞排列规则,基质层纤维细胞排列紧密;未接受药物治疗的大鼠角膜上皮粗糙,角膜上皮细胞层数增加,偶见剥脱,基质层细胞排列紊乱,泪膜稳定性及对眼表的保护作用降低,与既往的研究一致^[6-7];而单独应用 α -MSH 和 CMC 均可缓解干眼大鼠的眼表体征和细胞损伤。研究表明, α -MSH 与 CMC 联合应用可显著增强对干眼造成的眼表功能和细胞损伤的缓解作用,包括增加泪液分泌量、稳定泪膜、减轻角膜损伤、改善角膜水肿和角膜上皮的异常结构以及抑制结膜杯状细胞的丢失,但是研究发现联合应用 α -MSH 和 CMC 后,干眼模型鼠泪液分泌量在第 28 天的缓解作用没有明显增强,分析其可能的原因为后期腹腔内注射氢溴酸东莨菪碱对眼表的损伤进行性加重,超过药物的保护作用。总之,本实验结果表明 α -MSH 与 CMC 联合应用可对干眼的治疗起到协同效应。

目前,对干眼的治疗以人工泪液为主,其有效成分是 CMC^[14]。CMC 是一种带有羧基的阴离子纤维素水溶性聚合物,具有生物黏附性,其阴离子特性可增加其在眼表的停留时间^[15],促进其与眼表细胞的结合,起到促进上皮细胞再生^[16]、润滑眼表及稳定泪膜的作用^[17-18]。虽然人工泪液和润滑剂等药物可以缓解干眼的症状,但是无法从病因上治愈或控制干眼^[19],临床研究中已证实玻璃酸钠滴眼液治疗干眼具有一定疗效^[20]。研究提示,炎症是干眼发生和发展的重要致病因素^[21-22],而 α -MSH 具有强大的抗炎作用,并且可以修复角膜上皮损伤^[23]。在我们先前的研究中, α -MSH 可以缓解干眼大鼠泪液分泌量的减少,增加泪膜稳定性,抑制细胞凋亡,减轻角膜水肿,维护角膜完整性,并通过激活 PKA-CREB 和 MEK-ERK 通路抑制促炎因子在眼表的过度表达^[6],抑制链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠视网膜促炎因子细胞间黏附分子-1 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达,促进细胞间紧密连接成分 occludin 的表达,以减少视网膜血管渗漏,保护视网膜功能^[24]。本研究的结果也表明, α -MSH 与 CMC 联用可以使干眼的眼表体征得到进一步改善,从而发挥细胞保护和抑制角膜水肿的作用。Luger 等^[25]研究发现, α -MSH 可抑制促炎因子在角膜损伤、免疫性葡萄膜炎动物模型中角膜和葡萄膜中的表达及核因子- κ B 等炎症反应通路的活化,并可调节炎症细胞的增生、活力和迁移。此外,临床研究和动物实验证实,在干眼状态下,眼表炎性小体和白细胞介素-1 α 、TNF- α 等促炎因子表达上调^[26-28],提示 α -MSH

可能通过抑制炎症小体的表达与活化而增强 CMC 对干眼的治疗效果。

综上所述,本研究结果表明 α -MSH 联合 CMC 可以有效缓解皮下注射氢溴酸东莨菪碱诱导的干眼大鼠的眼表体征及角膜、结膜的病理改变,并表现出比单独应用 α -MSH 或 CMC 更为显著的效果,这为进一步开拓干眼的药物干预手段提供了新的思路,但其具体的作用机制仍有待进一步探讨。

志谢 非常感谢天津医科大学眼科医院与天津医科大学眼科研究所各位老师对本实验的帮助

参考文献

- [1] Hesse M, Akpek EK. Dry eye: an inflammatory ocular disease [J]. *J Ophthalmic Vis Res*, 2014, 9(2): 240-250.
- [2] Sutu C, Fukuoka H, Afshari NA. Mechanisms and management of dry eye in cataract surgery patients [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2016, 27(1): 24-30. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000227.
- [3] Perry HD, Solomon R, Donnenfeld ED, et al. Evaluation of topical cyclosporine for the treatment of dry eye disease [J]. *Arch Ophthalmol*, 2008, 126(8): 1046-1050. DOI: 10.1001/archophth.126.8.1046.
- [4] Yamaguchi M, Nishijima T, Shimazaki J, et al. Real-world assessment of diquafosol in dry eye patients with risk factors such as contact lens, meibomian gland dysfunction, and conjunctivochalasis: subgroup analysis from a prospective observational study [J]. *Clin Ophthalmol*, 2015, 9: 2251-2256. DOI: 10.2147/OPHT.S96540.
- [5] Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, et al. PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12034 [2016-06-20]. <http://www.nature.com/articles/ncomms12034>. DOI: 10.1038/ncomms12034.
- [6] Ru Y, Huang Y, Liu H, et al. α -Melanocyte-stimulating hormone ameliorates ocular surface dysfunctions and lesions in a scopolamine-induced dry eye model via PKA-CREB and MEK-Erk pathways [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18619 [2016-06-23]. <http://www.nature.com/articles/srep18619>. DOI: 10.1038/srep18619.
- [7] 刘会娟, 黄悦, 张琰, 等. 大鼠干眼模型的建立及其角膜神经的改变 [J]. *眼科新进展*, 2014, 34(5): 422-427. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2014.0116.
Liu HJ, Huang Y, Zhang Y, et al. Establishment of rat dry eye model and changes of corneal nerve [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2014, 34(5): 422-427. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2014.0116.
- [8] Arita R, Morishige N, Fujii T, et al. Tear interferometric patterns reflect clinical tear dynamics in dry eye patients [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(8): 3928-3934. DOI: 10.1167/iov.16-19788.
- [9] Dohlman TH, Ciralsky JB, Lai EC. Tear film assessments for the diagnosis of dry eye [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2016, 16(5): 487-491. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000307.
- [10] Marko CK, Menon BB, Chen G, et al. Spdef null mice lack conjunctival goblet cells and provide a model of dry eye [J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(1): 35-48. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.03.017.
- [11] Amico C, Tornetta T, Scifo C, et al. Antioxidant effect of 0.2% xanthan gum in ocular surface corneal epithelial cells [J]. *Curr Eye Res*, 2015, 40(1): 72-76. DOI: 10.3109/02713683.2014.914542.
- [12] Azizi S, Uçak T, Yaşar I, et al. Evaluation of the corneal layers in meibomian-gland-dysfunction-related dry eye by *in vivo* slit-scanning confocal microscopy [J]. *Semin Ophthalmol*, 2017, 32(3): 377-383. DOI: 10.3109/08820538.2015.1115084.
- [13] 肖启国, 刘祖国. 干眼模型的建立方法及评价 [J]. *眼科研究*, 2004, 22(4): 438-441.
Xiao QG, Liu ZG. The execution and evaluation to several dry eye models [J]. *Chin Ophthalm Res*, 2004, 22(4): 438-441.

- [14] She Y, Li J, Xiao B, et al. Evaluation of a novel artificial tear in the prevention and treatment of dry eye in an animal model [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2015, 31 (9) : 525–530. DOI: 10. 1089/jop. 2015. 0042.
- [15] Zheng X, Goto T, Ohashi Y. Comparison of *in vivo* efficacy of different ocular lubricants in dry eye animal models [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55 (6) : 3454–3460. DOI: 10. 1167/iovs. 13-13730.
- [16] Garrett Q, Simmons PA, Xu S, et al. Carboxymethylcellulose binds to human corneal epithelial cells and is a modulator of corneal epithelial wound healing [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48 (4) : 1559–1567. DOI: 10. 1167/iovs. 06-0848.
- [17] Napoli PE, Coronella F, Satta GM, et al. A novel OCT technique to measure *in vivo* the corneal adhesiveness for sodium carboxymethylcellulose in humans and its validity in the diagnosis of dry eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55 (5) : 3179–3185. DOI: 10. 1167/iovs. 13-13613.
- [18] Mencucci R, Boccalini C, Caputo R, et al. Effect of a hyaluronic acid and carboxymethylcellulose ophthalmic solution on ocular comfort and tear-film instability after cataract surgery [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2015, 41 (8) : 1699–1704. DOI: 10. 1016/j. jcrs. 2014. 12. 056.
- [19] 张明昌, 边芳. 重视干眼的炎症反应研究及防治 [J]. *中华眼科杂志*, 2013, 49 (1) : 6–7. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2013. 01. 003.
Zhang MC, Bian F. Emphasizing the prevention and anti-inflammation research of dry eye disease [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2013, 49 (1) : 6–7. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2013. 01. 003.
- [20] 魏红领, 李展宗, 李雅芳. 玻璃酸钠滴眼液治疗干眼临床随机对照试验的 Meta 分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31 (5) : 496–500. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 05. 020.
Wei HL, Li ZZ, Li YF. Meta-analysis of randomized controlled trials of sodium hyaluronate eye drops treating dry eye [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31 (5) : 496–500. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 05. 020.
- [21] The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007) [J]. *Ocul Surf*, 2007, 5 (2) : 75–92.
- [22] 刘祖国, 刘靖, 杨文照. 加强干眼抗炎治疗的临床研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31 (5) : 417–420. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 05. 001.
Liu ZG, Liu J, Yang WZ. Emphasizing clinical investigation on anti-inflammatory therapy of dry eye [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31 (5) : 417–420. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 05. 001.
- [23] Pavan J, Lukenda A, Stambuk N, et al. Effects of alpha-MSH on corneal epithelial lesions in rats [J]. *Coll Antropol*, 2012, 36 (4) : 1407–1411.
- [24] 韩倩, 张琰, 薄其玉, 等. α -黑素细胞刺激素对早期糖尿病大鼠视网膜血管渗漏的保护作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33 (4) : 316–322. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 04. 006.
Han Q, Zhang Y, Bo QY, et al. Alleviating effects of α -melanocyte-stimulating hormone on retinal vessel leakage in diabetic rats [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33 (4) : 316–322. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 04. 006.
- [25] Luger TA, Brzoska T. alpha-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs [J/OL]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66 Suppl 3 : iii52–55 [2016-05-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1793409/>. DOI: 10. 1136/ard. 2007. 079780.
- [26] Niu L, Zhang S, Wu J, et al. Upregulation of NLRP3 Inflammasome in the tears and ocular surface of dry eye patients [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10 (5) : e0126277 [2016-08-10]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0126277>. DOI: 10. 1371/journal.pone.0126277.
- [27] Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, et al. Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (10) : 7725–7730. DOI: 10. 1167/iovs. 11-7266.
- [28] Choi W, Noh H, Yeo A, et al. The effect of TNF- α blocker HL036337 and its best concentration to inhibit dry eye inflammation [J]. *Korean J Ophthalmol*, 2016, 30 (4) : 302–308. DOI: 10. 3341/kjo. 2016. 30. 4. 302.

(收稿日期: 2016-11-30)

(本文编辑: 刘艳)

读者 · 作者 · 编者

本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省立眼科医院 河南省眼科研究所承办的眼科专业学术期刊, 月刊, 每月 10 日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果, 主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等, 学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药理学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章, 欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~5 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组, 中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词, 其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用, 但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称, 各关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)