

· 实验研究 ·

重组胸腺素 $\beta 4$ 在干眼模型中对炎症反应的调节作用及对眼表修复的影响

张慧芹 李颖 冯丽娜 许永根

100191 北京大学第三医院眼科

通信作者:许永根, Email: edman1029@aliyun.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.005

【摘要】 背景 研究证实炎症与干眼的发生和发展相关,其中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 γ 干扰素 (IFN- γ) 是重要的炎症因子。胸腺素 $\beta 4$ (T $\beta 4$) 具有促进上皮细胞迁移和抑制炎症反应的作用,但其对于眼表修复的影响及其机制尚未阐明。目的 观察重组 T $\beta 4$ 对于干眼模型鼠眼中 TNF- α 和 IFN- γ 表达的调控作用及其对眼表修复的影响。方法 选用清洁级雄性成年 SD 大鼠 50 只,用质量分数 0.3% 苯扎氯铵溶液连续点左眼 7 d 以诱导干眼模型,以泪膜破裂时间 (BUT)、角膜荧光素染色评分、Schirmer 试验 I (S I t) 结果评估造模情况。将造模成功的 36 只眼按随机数字表法分为模型对照组、重组人表皮生长因子 (rhEGF) 点眼组、T $\beta 4$ 点眼组及 PBS 点眼组,按照分组分别用 5 μ l T $\beta 4$ 溶液 (9 μ g/ml)、rhEGF 滴眼液、无菌 PBS 点眼,每日 3 次,连续 7 d,大鼠右眼不进行任何干预作为正常对照组。各组大鼠均于点眼后 7 d 行 BUT、角膜上皮荧光素染色和 S I t 检查。点眼后 7 d 以过量麻醉法处死动物,制备大鼠眼表组织切片,采用苏木精-伊红染色法观察各组大鼠角膜和结膜组织形态学变化;采用过碘酸希夫染色法计数结膜组织中杯状细胞的数目;透射电子显微镜下观察大鼠角膜和结膜细胞超微结构改变;分别采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测大鼠结膜组织中 TNF- α mRNA 和 IFN- γ mRNA 及其蛋白的表达。结果 正常对照组、模型对照组、rhEGF 点眼组、T $\beta 4$ 点眼组和 PBS 点眼组大鼠 BUT 分别为 (10.42 \pm 0.66)、(7.46 \pm 0.49)、(8.71 \pm 0.50)、(9.59 \pm 0.35) 和 (8.63 \pm 0.68) s, 总体比较差异有统计学意义 ($F=5.65, P=0.00$), 其中模型对照组大鼠 BUT 明显短于正常对照组, rhEGF 点眼组和 T $\beta 4$ 点眼组大鼠 BUT 明显较模型对照组大鼠延长, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。各鼠间大鼠 S I t 和角膜荧光素染色评分的总体比较差异均无统计学意义 ($F=0.42, P=0.79; F=136.77, P=0.00$)。苏木精-伊红染色显示,模型对照组大鼠角膜、结膜上皮缺损,角膜基质层水肿; rhEGF 点眼组和 T $\beta 4$ 点眼组大鼠角膜、结膜上皮细胞形态不规则,呈过度增生状。各组大鼠结膜组织中杯状细胞数量的总体比较差异有统计学意义 ($F=3.16, P=0.04$), 其中模型对照组和 rhEGF 点眼组大鼠结膜组织中杯状细胞数量均明显低于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 而 T $\beta 4$ 点眼组大鼠结膜杯状细胞数量与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。透射电子显微镜下观察可见,模型对照组大鼠角膜、结膜上皮细胞的微绒毛和微皱襞肿胀、融合、卷曲、断裂和脱落, T $\beta 4$ 点眼组角膜、结膜上皮细胞微绒毛呈增生修复状态。各组大鼠结膜组织中 TNF- α mRNA 和 IFN- γ mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F=43.08, 371.69$, 均 $P=0.00$), 各组大鼠结膜组织中 TNF- α 和 IFN- γ 蛋白表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F=34.27, 43.52$, 均 $P=0.00$), 其中模型对照组大鼠结膜组织中 TNF- α mRNA 和 IFN- γ mRNA 及其蛋白的表达量均明显高于正常对照组, 而 T $\beta 4$ 点眼组上述因子的表达量均明显低于模型对照组和 rhEGF 点眼组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。结论 T $\beta 4$ 局部点眼可通过下调干眼大鼠结膜组织中 TNF- α 和 IFN- γ 的表达而增加泪膜的稳定性, 促进眼表损伤的修复。

【关键词】 干眼/化学诱导; 胸腺素 $\beta 4$ /治疗作用; 眼表; 修复; 炎症因子; 疾病模型; SD 大鼠

Promoting ocular surface restoration effects and anti-inflammatory mechanism of thymosin beta 4 in rat dry eye Zhang Huiqin, Li Ying, Feng Lina, Xu Yonggen

Department of Ophthalmology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Corresponding author: Xu Yonggen, Email: edman1029@aliyun.com

【Abstract】 **Background** Studies showed that inflammation is associated with the pathogenesis and development of dry eyes, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) are key inflammatory factors. Thymosin $\beta 4$ (T $\beta 4$) plays a promoting effect on the migration of epithelial cells and anti-inflammatory action.

However, the influences of T β 4 on the repair of ocular surface in dry eyes are unelucidated. **Objective** This study was to investigate the regulation of T β 4 to the expressions of TNF- α and IFN- γ and its effect on the recovery of ocular surface in rat dry eye models. **Methods** The dry eye models were induced by topically administered benzalkonium chloride (BAC) for consecutive 7 days in the left eyes of 50 SPF male SD rats, and 36 successful models were used in the experiment. T β 4 solution (9 μ g/ml), recombinant human epithelial growth factor (rhEGF) and sterile PBS at 5 μ l was topically administered three times for consecutive 7 days in the T β 4 group, rhEGF group and PBS group, and no drug was used in the model control group. The normal right eyes of rats served as the normal control group. The break-up time of tear film (BUT), corneal fluorescein staining score and Schirmer I test (S I t) were examined and evaluated in the rats on the seventh day after administration of drugs. Then the rats were sacrificed by excessive anesthesia and the sections of the ocular surface were prepared. The morphology of the specimens was examined by hematoxylin and eosin staining, and the number of conjunctival goblet cells was counted by periodic acid-schiff staining. The ultrastructure of the corneal and conjunctival cells was examined under the transmission electron microscope. The expressions of TNF- α mRNA and IFN- γ mRNA and their proteins in conjunctiva tissue were quantified by quantitative real-time PCR and Western blot, respectively. The use and care of the animals followed by Regulation for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** The BUT was (10.42 \pm 0.66), (7.46 \pm 0.49), (8.71 \pm 0.50), (9.59 \pm 0.35) and (8.63 \pm 0.68) seconds in the normal control group, model control group, rhEGF group, T β 4 group and BUT group, showing a significant difference among the groups ($F=5.65, P=0.00$), and the BUT was evidently shortened in the model control group compared with the normal control group, while the BUT was significantly extended in the rhEGF group and T β 4 group in comparison with the model control group (all at $P<0.05$). No significant differences were found in the corneal fluorescence score and S I t among the groups ($F=0.42, P=0.79; F=136.77, P=0.00$). The corneal and conjunctival epithelium defect and corneal stromal edema were seen in the model control group, and the proliferation of the epithelial cells were found in the rhEGF group and T β 4 group, with the irregular arrangement of the cells. A considerable difference was seen in the number of conjunctival goblet cells among the groups ($F=3.16, P=0.04$), and the number of conjunctival goblet cells in the rhEGF group and model control group was significantly less than that in the normal control group (all at $P<0.05$), and no statistically significant difference was seen between T β 4 group and normal control group ($P>0.05$). The swelling, mergence, crispation, rupture and decrease of the microvilli and micro fold were found in the model control group, and the repair of the cell microvilli was seen in the T β 4 group. The expressions of the TNF- α mRNA, IFN- γ mRNA and their proteins in the conjunctiva were significantly different among the groups ($F=43.08, 371.69, 34.27, 43.52$, all at $P=0.00$), the expressions of the inflammatory factors were significantly higher in the model control group compared with the normal control group, and these expressions were evidently lower in the T β 4 group in comparison with the model control group and rhEGF group (all at $P<0.05$). **Conclusions** The topical administration of T β 4 solution can promote the repair of ocular surface by down-regulating the expression of TNF- α and IFN- γ in conjunctiva and stabilize the tear film in rat dry eyes.

[**Key words**] Dry eyes/chemically induced; Thymosin beta 4/therapeutic effects; Ocular surface; Repair; Inflammatory factors; Disease models; Rats, SD

干眼是由多因素造成的眼表及泪液异常的疾病,可导致眼部不适和视力下降,破坏泪膜稳定性,进而造成眼表的损害,并伴有泪液渗透压升高和眼表炎症反应,严重时还可致眼表上皮鳞状化生、结膜杯状细胞异常及上皮细胞凋亡^[1]。研究发现,炎症反应是干眼发病过程中的关键因素之一,多种免疫细胞和炎症因子参与干眼的发生和发展^[2-3]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 是眼表炎症反应中活跃的炎症因子,具有免疫调节作用,可诱导炎症介质的产生,调控 T 淋巴细胞的黏附、趋化和迁移等生物学行为,介导细胞程序性死

亡^[4-5]。目前临床上常用糖皮质激素或免疫抑制剂对干眼伴发的眼表炎症进行治疗,但长期应用这些药物会引起眼表菌群失调及免疫力下降,甚至有引起眼压升高及并发白内障的风险。近年来研究发现,胸腺素 β 4 (thymosin β 4, T β 4) 具有促进上皮细胞迁移、调控炎症反应、抑制细胞凋亡等多重生物学效应,其用于眼表组织修复的相关研究尚处于探索阶段^[6-8]。本研究拟观察 T β 4 在干眼模型中对 TNF- α 和 IFN- γ 的调节作用及对眼表修复的影响,探讨 T β 4 对干眼眼表修复的治疗效果和可能的机制,为临床开发干眼的治疗药物提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级雄性成年 SD 大鼠 50 只, 体质量(220±5)g, 由北京维通利华实验动物有限责任公司提供。大鼠饲养于北京大学医学部实验动物饲养室, 室温为(25±2)℃, 湿度为(60±5)%, 自然昼夜节律。实验动物的使用遵循国家科学技术部颁布的《实验动物管理条例》(2011 修订版)。

1.1.2 主要试剂及仪器 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司); 泪液检测试纸条、荧光素钠眼科检测试纸(天津晶明新技术开发有限公司); 苯扎氯铵(美国 Sigma 公司); 重组表皮生长因子(recombinational epidermal growth factor, rhEGF)滴眼液(桂林华诺威基因药业有限公司); 重组 Tβ4(北京诺思兰德生物技术股份有限公司); RNA 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Thermo 公司); 兔抗大鼠 GAPDH 抗体(bs-2188R)、兔抗大鼠 IFN-γ 抗体(bs-0480R)(北京博奥森生物技术公司); 兔抗大鼠 TNF-α 抗体(ab6671, 美国 Abcam 公司); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG(ZB-2301, 北京中杉金桥生物技术有限公司); ECL 显色液、显影液(北京普利莱基因技术有限公司)。PS-75E 裂隙灯显微镜、Leica 光学显微镜、裂隙灯显微镜、眼前节照相系统(日本 Topcon 公司); 透射电子显微镜(JEM-1400, 日本 JEOL 公司); NanoDrop2000(美国 Thermo 公司); ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 苯扎氯铵诱导的大鼠干眼模型的建立 大鼠左眼用质量分数 0.3% 苯扎氯铵溶液点眼, 每次 5 μl, 每日 3 次, 连续点眼 7 d^[9], 右眼不做任何处理。

1.2.2 实验动物分组 对 50 只大鼠进行干眼评估, 将泪液分泌量、泪膜破裂时间(break-up time of tear film, BUT)、角膜荧光素染色各指标数值进行统计分析, 将各项临床指标均值±标准差范围内最接近指标均值的 36 只大鼠纳入后续的治疗实验, 将造模成功的 36 只大鼠按照随机数字表法分为模型对照组、rhEGF 点眼组、Tβ4 点眼组和 PBS 点眼组, 每组 9 只, 各组大鼠右眼作为正常对照组。将 10 mg/ml 的 Tβ4 稀释至 20 μg/ml 储存液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20℃ 储存, 使用前 4℃ 条件下溶化并稀释至 9 μg/ml。按照分组各组大鼠分别用 5 μl Tβ4 溶液、rhEGF 滴眼液、PBS 点眼, 每日 3 次, 连续 7 d。正常对照组不进行任何干预。

1.2.3 各组大鼠干眼相关指标的检测 各组大鼠分

别于造模前及治疗后腹腔内注射盐酸氯胺酮(50 mg/kg)和盐酸赛拉嗪混合液(5 mg/kg)行全身麻醉, 并进行以下检查: (1) BUT 用 3 μl 质量分数 1% 的荧光素钠点眼, 将大鼠眼睑闭合后打开(瞬目)3 次, 用裂隙灯显微镜钴蓝光进行观察, 以末次瞬目至角膜出现第 1 个黑斑的时间记为 BUT, 重复观察 3 次, 取平均值。(2) 泪液分泌试验 I (Schirmer I test, S I t) 按照文献[10]描述的方法, 将 1 mm×35 mm 的滤纸一端于 2.5 mm 处折叠, 置于受检眼下睑结膜囊内侧 1/3 处, 其余部分悬垂于皮肤表面, 将大鼠眼闭合 5 min, 测量滤纸被浸湿的长度(不包括反折处)。(3) 角膜荧光素染色评分 结膜囊内荧光素钠点眼 2 min 后, 在裂隙灯显微镜钴蓝光下观察大鼠角膜上皮荧光素染色情况, 按照文献[11]描述的方法对角膜荧光素染色进行分级。将角膜分成上、下、鼻、颞侧 4 个象限并分别评分, 无荧光素染色者为 0 分, 点状染色少于 30 个者为 1 分, 点状染色多于 30 个但不弥散者为 2 分, 弥散状染色但无斑块状者为 3 分, 斑块状染色者为 4 分, 各象限评分之和即为角膜上皮荧光素染色总评分。

1.2.4 各组大鼠眼表组织病理学检查 过量麻醉法分别处死各组大鼠 2 只, 立即摘除双侧眼球, 将整个眼球置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋。制备 5 μm 厚全眼球切片, 行苏木精-伊红染色或过碘酸希夫染色, 封片, 光学显微镜下观察并拍照。每组取 6 张不同位置的切片, 200 倍显微镜下分别计数过碘酸希夫染色阳性杯状细胞, 取平均值。

1.2.5 各组大鼠角膜细胞超微结构观察 过量麻醉法分别处死各组大鼠 1 只, 立即摘除眼球, 将整个眼球置于体积分数 2.5% 戊二醛中固定 2 h, 然后用质量分数 1% 锇酸固定, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 制备角膜及结膜组织超薄切片, 透射电子显微镜下观察并拍照。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测各组结膜组织中 TNF-α 和 IFN-γ mRNA 表达 各组分别过量麻醉法处死 3 只大鼠后立即摘除眼球, 分离角膜、结膜, 置于无 RNA 酶 Eppendor 管内, -80℃ 低温冰箱保存备用。取出结膜组织, 放入 0.5 ml Trizol 中, 采用 Trizol 一步法提取组织总 RNA, 以 NanoDrop2000 测定 RNA 纯度, 按照 RNA 逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA。GAPDH 上游引物: 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3', 下游引物: 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'; IFN-γ 上游引物: 5'-GACCTGCCTCATACTCATAACC-3', 下游引物: 5'-GCCATCCACCTTCTCCAAAG-3'; TNF-α 上游引物:

5'-CTTCTCATTCCCTGCTCGTGG-3', 下游引物: 5'-TGATCTGAGTGTGAGGGTCTG-3'。采用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 进行扩增, 扩增反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 65 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。反应结束后检测扩增产物的融解曲线, 根据仪器自带软件自动设置阈值, 生成 Ct 值。每个样品设置 3 个复孔, 独立实验至少重复 3 次。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因的相对表达量。

1.2.7 Western blot 法检测结膜中 TNF- α 和 IFN- γ 蛋白的表达 各组分别过量麻醉法处死 3 只大鼠后立即摘除眼球, 分离角膜、结膜, 置于无 RNA 酶 Eppendorf 管内, -80 °C 低温冰箱保存备用。取低温保存的结膜组织, 加入组织裂解液匀浆收集总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳并转印至醋酸纤维素膜, 质量分数 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; 分别加入 TNF- α (1:500)、IFN- γ (1:500) 一抗, 4 °C 过夜, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:3000), TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 化学发光法曝光显影。以 GAPDH 为内参, 用 Image J 软件处理系统分别检测内参和目的蛋白条带的灰度值, 以样品目的蛋白与内参的比值为目的蛋白的相对含量。

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。本研究检测指标的数据资料经 Shapiro-Walk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用完全随机分组多水平研究设计, 正常对照组、模型对照组、rhEGF 点眼组、T β 4 点眼组和 PBS 点眼组间大鼠 BUT、角膜荧光素染色评分、S I t、TNF- α mRNA 和 IFN- γ mRNA 及其蛋白在结膜中相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠干眼相关检测指标的变化

正常对照组、模型对照组、rhEGF 点眼组、T β 4 点眼组和 PBS 点眼组大鼠 BUT 的总体比较差异有统计学意义 ($F = 5.65, P = 0.00$); 其中模型对照组大鼠 BUT 较正常对照组大鼠明显缩短, 差异有统计学意义 ($P = 0.00$); rhEGF 点眼组、T β 4 点眼组和 PBS 点眼组较模型组 BUT 延长, 差异均有统计学意义 (均 $P = 0.00$); T β 4 点眼组均较 rhEGF 点眼组及 PBS 点眼组 BUT 延长, 差异均有统计学意义 (均 $P = 0.00$); rhEGF 点眼组与 PBS 点眼组 BUT 比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.76$)。各组大鼠 S I t 比较差异无统计学意义

($F = 0.42, P = 0.79$); 正常对照组、模型对照组、rhEGF 点眼组、T β 4 点眼组和 PBS 点眼组大鼠角膜荧光素染色评分的总体比较差异有统计学意义 ($F = 136.77, P = 0.00$); rhEGF 点眼组、T β 4 点眼组和 PBS 点眼组与模型组比较, 角膜荧光素染色评分降低, 差异均有统计学意义 (均 $P = 0.00$); T β 4 点眼组与 rhEGF 点眼组及 PBS 点眼组比较, 角膜荧光素染色评分降低, 差异均有统计学意义 (均 $P = 0.00$); rhEGF 点眼组与 PBS 点眼组角膜荧光素评分比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.80$) (表 1)。

表 1 各组大鼠 BUT、S I t 及角膜荧光素染色评分的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	BUT (s)	S I t (mm/5 min)	角膜荧光素染色评分
正常对照组	24	10.42 \pm 0.66	4.97 \pm 0.83	1.03 \pm 1.18
模型对照组	6	7.46 \pm 0.49 ^a	3.66 \pm 0.83 ^a	12.77 \pm 1.24 ^a
rhEGF 点眼组	6	8.71 \pm 0.50 ^{ab}	4.46 \pm 0.78	10.29 \pm 1.70 ^a
T β 4 点眼组	6	9.59 \pm 0.35 ^{abcd}	4.21 \pm 1.36	9.00 \pm 1.63 ^{abcd}
PBS 点眼组	6	8.63 \pm 0.68 ^{ab}	3.90 \pm 1.74 ^a	10.43 \pm 1.13 ^{ab}
F 值		5.65	0.42	136.77
P 值		0.00	0.79	0.00

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.01$; 与 rhEGF 组比较, ^c $P < 0.01$; 与 PBS 点眼组比较, ^d $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) BUT: 泪膜破裂时间; S I t: 泪液分泌试验 I; rhEGF: 重组人表皮生长因子; T β 4: 胸腺素 β 4

裂隙灯显微镜下可见正常对照组大鼠角膜和结膜表面光滑, 角膜无水肿, 结膜无充血, 角膜表面未见荧光素染色。模型对照组大鼠可见角膜水肿, 结膜充血, 角膜荧光素染色弥散着染。rhEGF 点眼组和 T β 4 点眼组角膜上皮水肿和结膜充血较模型对照组明显减轻, 角膜荧光素染色阳性程度减轻; PBS 点眼组大鼠角膜上皮水肿, 弥漫性荧光素染色, 结膜明显充血, 与模型对照组无明显差异 (图 1)。

2.2 各组大鼠角膜、结膜组织病理学表现

2.2.1 角膜和结膜组织的常规组织形态学变化 苏木精-伊红染色显示, 正常对照组角膜由 2~3 层鳞状上皮细胞构成, 细胞排列整齐均匀; 结膜由 2~7 层非角化鳞状上皮细胞组成, 细胞形态规则、完整, 结膜表面平滑, 可见散在分布的杯状细胞。模型对照组大鼠角膜、结膜上皮出现缺损, 可见炎性细胞浸润, 角膜上皮细胞形态异常, 角膜基质层水肿, 结膜上皮杯状细胞明显减少。rhEGF 点眼组角膜和结膜上皮细胞基本完整, 角膜和结膜上皮表面较平整, 形态不规则, 呈过度增生状, 细胞层数异常增多, 可见炎性细胞浸润。T β 4 点眼组大鼠角膜、结膜上皮损伤恢复, 细胞层数及细胞形态接近正常, 部分组织仍可见上皮表面不连续, 偶见

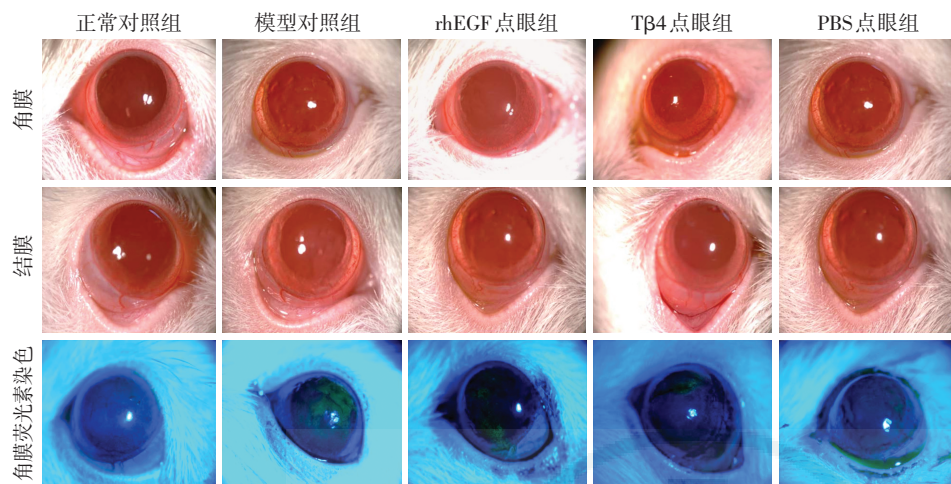


图 1 各组大鼠眼球裂隙灯显微镜下观察 正常对照组大鼠结膜和角膜表面光滑,角膜未见荧光素染色;模型对照组大鼠角膜上皮水肿,弥漫性荧光素染色,结膜明显充血;rhEGF 点眼组和 Tβ4 点眼组角膜上皮水肿和结膜充血较模型对照明显减轻,角膜荧光素染色阳性程度减轻;PBS 点眼组大鼠角膜上皮水肿,弥漫性荧光素染色,结膜明显充血,与模型对照组无明显差异 rhEGF:重组人表皮生长因子;Tβ4:胸腺素 β4

色染色;模型对照组大鼠结膜组织中过碘酸希夫染色阳性细胞较少;rhEGF 点眼组和 Tβ4 点眼组过碘酸希夫染色阳性细胞有所增加(图 3)。正常对照组、模型对照组、rhEGF 点眼组、Tβ4 点眼组和 PBS 点眼组大鼠结膜组织中杯状细胞数量为(84.00 ± 10.57)、(48.00 ± 16.92)、(59.00 ± 23.95)、(64.00 ± 9.61)和(52.00 ± 7.38)个/视野,组间大鼠结膜杯状细胞数量的总体比较差异有统计学意义($F = 3.16, P = 0.04$),与正常对照组比较, rhEGF 点眼组和 PBS 点眼组大鼠

炎性细胞浸润(图 2)。

2.2.2 结膜杯状细胞改变 过碘酸希夫染色显示,正常对照组大鼠结膜组织中可见较多杯状细胞,呈绛红

鼠结膜杯状细胞数量均明显减少(均 $P < 0.05$),而 Tβ4 点眼组结膜杯状细胞数量与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 4)。

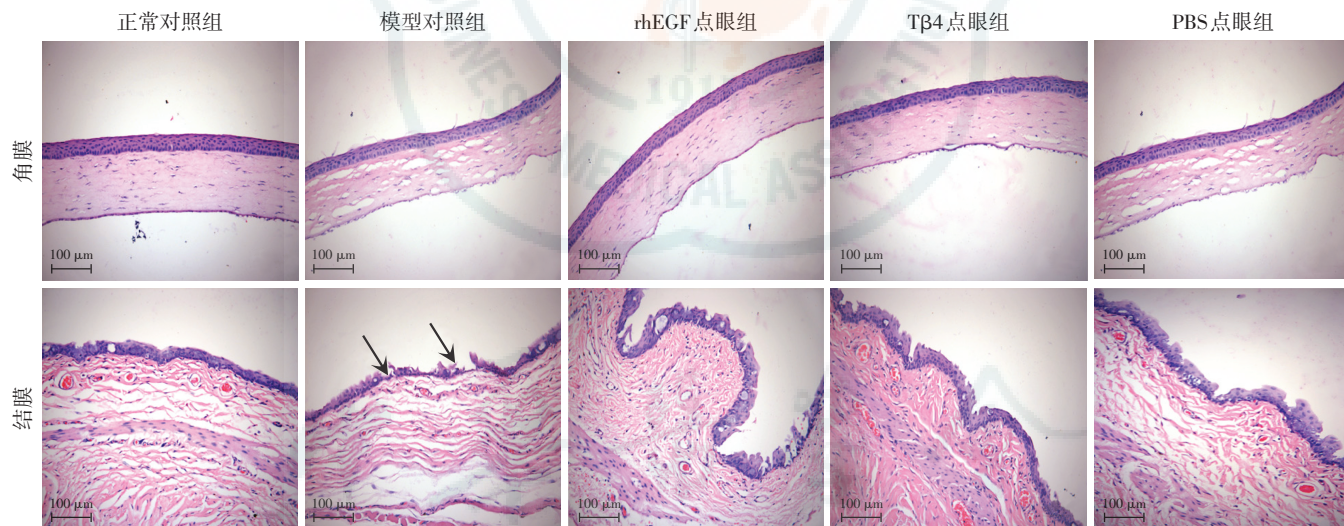


图 2 各组大鼠角膜、结膜组织形态学表现 (HE × 200, 标尺 = 100 μm) 正常对照组大鼠角膜、结膜上皮完整;模型对照组大鼠结膜上皮缺损(箭头),角膜上皮不光滑;EGF 点眼组角膜上皮层基本完整,结膜上皮细胞呈过度增生状;Tβ4 点眼组角膜上皮层基本完整,结膜上皮细胞呈增生状;PBS 点眼组角膜上皮表现与模型对照组接近,结膜上皮呈增生状 rhEGF:重组人表皮生长因子;Tβ4:胸腺素 β4

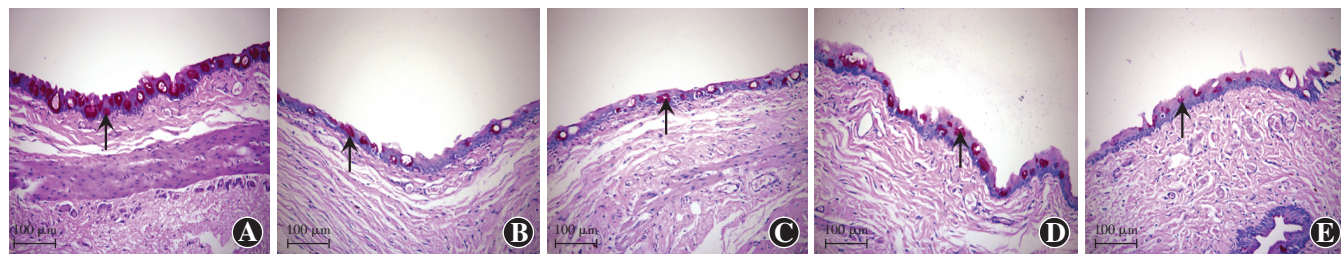


图 3 各组大鼠结膜组织中杯状细胞形态变化 (PAS × 200, 标尺 = 100 μm) A:正常对照组结膜杯状细胞(箭头)呈散在分布,呈绛红色染色(箭头) B:模型对照组大鼠结膜杯状细胞(箭头)较正常对照组明显减少 C:rhEGF 点眼组结膜杯状细胞(箭头)较模型对照组增加 D:Tβ4 点眼组结膜杯状细胞(箭头)较模型对照组增多 E:PBS 点眼组结膜杯状细胞(箭头)较正常对照组明显减少,与模型对照组无明显差异

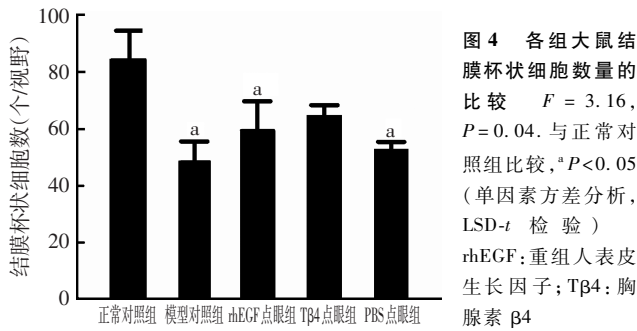


图4 各组大鼠结膜杯状细胞数量的比较 $F = 3.16$, $P = 0.04$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) rhEGF: 重组人表皮生长因子; T β 4: 胸腺素 β 4

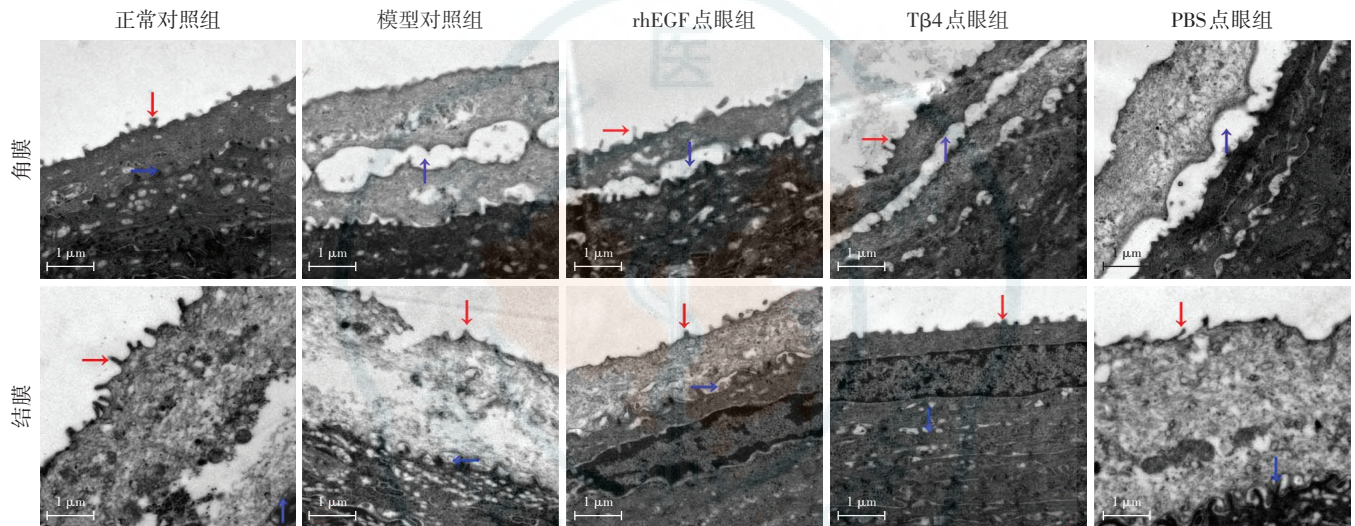


图5 各组大鼠角膜、结膜上皮细胞超微结构改变($\times 2000$, 标尺 = $1 \mu\text{m}$) 正常对照组角膜和结膜上皮细胞表面有丰富的微绒毛结构(红箭头), 细胞连接紧密(蓝箭头);模型对照组角膜和结膜上皮细胞微绒毛消失(红箭头),细胞连接断裂(蓝箭头);rhEGF点眼组角膜和结膜上皮细胞数量增加,细胞间连接断裂仍存在(蓝箭头);T β 4点眼组角膜上皮细胞微绒毛明显增多(红箭头),细胞间连接出现恢复(蓝箭头);PBS点眼组角膜和结膜上皮细胞微绒毛消失(红箭头),细胞间连接断裂明显(蓝箭头) rhEGF: 重组人表皮生长因子; T β 4: 胸腺素 β 4

2.4 各组大鼠结膜组织中 TNF- α mRNA 和 IFN- γ mRNA 相对表达量比较

各组大鼠结膜组织中 TNF- α mRNA 和 IFN- γ mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 43.08, 371.69$, 均 $P = 0.00$), 其中模型对照组 TNF- α mRNA 和 IFN- γ mRNA 相对表达量均明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); T β 4 点眼组 TNF- α mRNA 和 IFN- γ mRNA 的相对表达量均明显低于模型对照组、rhEGF 点眼组和 PBS 点眼组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$) (表 2)。

2.5 各组大鼠结膜组织中 TNF- α 和 IFN- γ 蛋白表达量比较

各组大鼠结膜组织中 TNF- α 和 IFN- γ 蛋白表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 34.27, 43.52$, 均 $P = 0.00$), 其中模型对照组大鼠结膜组织中 TNF- α 和 IFN- γ 蛋白表达量明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); T β 4 点眼组大鼠结膜组织中

2.3 各组大鼠角膜和结膜上皮细胞超微结构变化

正常对照组大鼠角膜和结膜上皮表层细胞微绒毛丰富;模型对照组大鼠角膜和结膜上皮细胞的微绒毛和微皱襞肿胀、融合、卷曲、断裂和脱落;rhEGF 点眼组角膜和结膜上皮细胞数量及细胞表面微绒毛明显增加,但仍可见细胞间连接的断裂;T β 4 点眼组大鼠角膜和结膜上皮细胞微绒毛呈现修复和增生,细胞间连接出现恢复,与模型对照组比较微绒毛肿胀较轻,密度增加,细胞肿胀较轻;PBS 点眼组角膜和结膜上皮细胞微绒毛消失,可见大量细胞间连接断裂(图 5)。

表 2 各组大鼠结膜组织中 TNF- α 和 IFN- γ mRNA 相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	TNF- α mRNA	IFN- γ mRNA
正常对照组	3	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
模型对照组	3	3.36 \pm 0.25 ^a	7.94 \pm 0.15 ^a
rhEGF 点眼组	3	3.03 \pm 0.14	9.34 \pm 0.66
T β 4 点眼组	3	2.32 \pm 0.41 ^{bed}	5.19 \pm 0.33 ^{bed}
PBS 点眼组	3	4.31 \pm 0.53	14.25 \pm 0.64
F 值		43.08	371.69
P 值		0.00	0.00

注:与正常对照组比较, $^a P < 0.05$;与模型对照组比较, $^b P < 0.01$;与 rhEGF 点眼组比较, $^c P < 0.01$;与 PBS 点眼组比较, $^d P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) TNF: 肿瘤坏死因子; IFN: 干扰素; rhEGF: 重组人表皮生长因子; T β 4: 胸腺素 β 4

TNF- α 蛋白表达量明显低于模型对照组、rhEGF 点眼组和 PBS 点眼组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); T β 4 组大鼠结膜组织中 IFN- γ 蛋白相对表达量明显低于模型对照组和 PBS 点眼组, 差异均有统计学意义

(均 $P < 0.01$), 但 rhEGF 组与 Tβ4 组比较差异无统计学意义 ($P = 0.15$) (图 6, 表 3)。

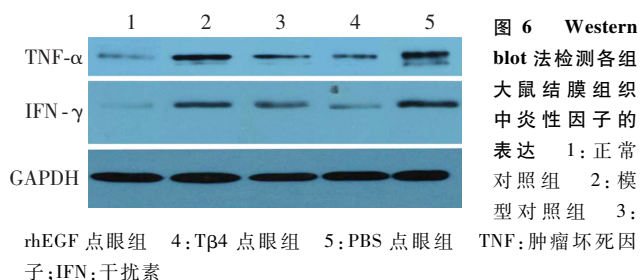


图 6 Western blot 法检测各组大鼠结膜组织中炎症因子的表达 1: 正常对照组 2: 模型对照组 3: rhEGF 点眼组 4: Tβ4 点眼组 5: PBS 点眼组 TNF: 肿瘤坏死因子; IFN: 干扰素

表 3 各组大鼠结膜组织中 TNF-α 和 IFN-γ 蛋白表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	TNF-α 蛋白	IFN-γ 蛋白
正常对照组	3	0.08 ± 0.25	0.13 ± 0.03
模型对照组	3	0.45 ± 0.72 ^a	0.62 ± 0.05 ^a
rhEGF 点眼组	3	0.32 ± 0.31	0.37 ± 0.09
Tβ4 点眼组	3	0.29 ± 0.25 ^{bed}	0.29 ± 0.04 ^{bd}
PBS 点眼组	3	0.40 ± 0.41	0.57 ± 0.04
F 值		34.27	43.52
P 值		0.00	0.00

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.01$; 与 rhEGF 点眼组比较, ^c $P < 0.01$; 与 PBS 点眼组比较, ^d $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) TNF: 肿瘤坏死因子; IFN: 干扰素; rhEGF: 重组人表皮生长因子; Tβ4: 胸腺素 β4

3 讨论

苯扎氯铵是滴眼液中常用的防腐剂, 其可破坏泪膜, 损伤角膜、结膜上皮细胞间连接蛋白, 抑制杯状细胞分泌功能, 诱发眼表炎症等^[9,12]。苯扎氯铵滴眼液常用于诱导大鼠干眼模型, 这种干眼模型稳定且病理表现与人干眼类似^[13]。本研究中采用苯扎氯铵滴眼液诱导大鼠干眼模型来探讨 Tβ4 对 TNF-α 和 IFN-γ 的调节作用及其对眼表损伤修复的影响以及可能的作用机制。

泪膜中的黏蛋白主要来自结膜杯状细胞, 黏蛋白是维护眼表正常微环境的重要泪膜组成成分。当角膜、结膜上皮细胞及杯状细胞受损时, 泪膜中的黏蛋白会出现质或量的异常。角膜、结膜上皮细胞的微绒毛结构是泪膜得以涂布于眼表的必需亚细胞结构, 当微绒毛结构异常时, 黏蛋白将不能涂布在上皮细胞表面。以上现象均可导致泪膜异常, BUT 缩短, 进而发生干眼, 导致炎症发生, 眼表损伤加剧, 形成恶性循环。通过抑制炎症因子的表达可抑制炎症信号通路及抗原递呈细胞的激活, 并可抑制细胞凋亡, 减少对杯状细胞及泪腺腺管细胞的损害, 增加泪膜中的黏蛋白、表皮生长因子等的表达, 有利于泪膜功能恢复^[13]。

TNF-α 和 IFN-γ 同属炎症因子网络中的核心成员^[14-15]。TNF-α 是细胞增生、分化、凋亡和代谢的核心调控因子, 趋化炎性细胞浸润, 激活抗原递呈细胞, 诱导淋巴细胞释放更多的炎症因子, 参与干眼的病理生理过程^[16]; 而 IFN-γ 可以阻断杯状细胞的黏蛋白分泌, 抑制细胞增生^[5], 诱导细胞发生程序性凋亡^[17]。眼表炎症损坏眼表, 影响泪液分泌, 改变泪膜成分, 致使泪液分泌量减少, 泪膜稳定性下降, BUT 缩短, 最终导致角膜、结膜上皮鳞状化生, 杯状细胞丢失伴有分泌功能下降。炎症是干眼发病的核心环节, 抑制眼表炎症是干眼治疗的关键。近年来, 临床中常用糖皮质激素和免疫抑制剂治疗干眼伴发眼表炎症, 但长期应用这些药物不仅使眼表菌群失调、免疫力下降, 还会引起青光眼、白内障等严重并发症。研究发现 Tβ4 为具有抗炎、促进损伤愈合等多种生物活性的多肽^[18-19]。局部应用 Tβ4 可促进细胞的分化、迁移和再上皮化, 进而促进皮肤创伤愈合^[20]。Tβ4 也可促进角膜上皮细胞增生, 调控炎症反应, 降低多种细胞因子和趋化因子的表达, 减轻角膜瘢痕形成^[21]。体外研究还发现, Tβ4 可抑制苯扎氯铵导致的角膜、结膜上皮细胞凋亡^[22]。基于上述特点, Tβ4 用于眼表修复的研究是一个热点。本研究中结果显示 Tβ4 点眼组较模型对照组各干眼指标均明显改善, 角膜上皮面更加光滑, 结膜充血减轻; 角膜、结膜上皮表面平整, 上皮细胞层数和形态接近正常状态, 结膜杯状细胞的数量增加、形态开始修复, 透射电子显微镜下观察可见角膜、结膜上皮细胞微绒毛有较大修复, 细胞内亚细胞器形态饱满, 而 TNF-α 和 IFN-γ 表达有明显的下调趋势, 提示 Tβ4 可促进干眼模型的眼表修复, 抑制炎症因子 TNF-α 和 IFN-γ 的表达。EGF 点眼组各评估指标也有所改善, 角膜、结膜上皮细胞和杯状细胞均明显修复, 与 Tβ4 治疗组差异无统计学意义, 但 TNF-α 和 IFN-γ 蛋白和 mRNA 表达量较 Tβ4 治疗组明显升高, 说明 EGF 在促角膜、结膜上皮增生、分化方面有明显的效果, 但抗炎作用明显弱于 Tβ4。

综上所述, 局部应用 Tβ4 治疗苯扎氯铵诱导的干眼可以使结膜组织内 TNF-α 和 IFN-γ 炎症因子表达明显降低; 同时角膜、结膜上皮以及结膜杯状细胞的功能和形态得到有效修复, BUT 延长, S I t 增加, 角膜荧光素染色评分降低。提示 Tβ4 能有效抑制 TNF-α 和 IFN-γ 的表达, 有助于眼表组织的修复和微环境的改善, 最终为泪膜稳定、眼表健康提供有力条件。Tβ4 治疗干眼的具体作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Barabino S, Chen Y, Chauhan S, et al. Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31(3): 271-285. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2012.02.003.
- [3] Calonge M, Enriquez-de-Salamanca A, Diebold Y, et al. Dry eye disease as an inflammatory disorder [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2010, 18(4): 244-253. DOI: 10.3109/09273941003721926.
- [4] 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. DOI: 10.1016/j.ajo.2008.08.032.
- [5] de Paiva CS, Villarreal AL, Corrales RM, et al. Dry eye-induced conjunctival epithelial squamous metaplasia is modulated by interferon-gamma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(6): 2553-2560. DOI: 10.1167/iovs.07-0069.
- [6] Sosne G, Qiu P, Ousler GW, et al. Thymosin β_4 : a potential novel dry eye therapy [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1270: 45-50. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06682.x.
- [7] Goldstein AL, Hannappel E, Sosne G, et al. Thymosin β_4 : a multi-functional regenerative peptide. Basic properties and clinical applications [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(1): 37-51. DOI: 10.1517/14712598.2012.634793.
- [8] 姜志昕, 郝朋, 汤欣, 等. 胸腺素 β_4 对乙醇诱导的体外兔角膜上皮细胞损伤的保护作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(2): 108-114. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.003. Jiang ZX, Hao P, Tang X, et al. Protective effects of thymosin β_4 on ethanol-induced rabbit corneal epithelial cell damage *in vitro* [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(2): 108-114. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.003.
- [9] Lin Z, Liu X, Zhou T, et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 257-264.
- [10] Fujihara T, Murakami T, Fujita H, et al. Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(1): 96-100.
- [11] Pauly A, Brignole-Baudouin F, Labbé A, et al. New tools for the evaluation of toxic ocular surface changes in the rat [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(12): 5473-5483. DOI: 10.1167/iovs.06-0728.
- [12] 李骏, 晏晓明. 苯扎氯胺对体外培养的人角膜上皮细胞毒性作用的研究 [J]. *眼科研究*, 2008, 26(11): 814-817. Li J, Yan XM. Toxicity of benzalkonium chloride on human corneal epithelial cells *in vitro* [J]. *Chin Ophthal Res*, 2008, 26(11): 814-817.
- [13] 何欢, 刘祖国, 林志荣, 等. 普拉洛芬治疗苯扎氯胺诱导小鼠干眼的研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2012, 48(1): 33-40. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.01.009. He H, Liu ZG, Lin ZR, et al. Therapeutic effects of Pranoprofen on the mouse dry eye induced by topical medication of Benzalkonium Chloride [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2012, 48(1): 33-40. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.01.009.
- [14] Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, et al. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients [J]. *Cornea*, 2009, 28(9): 1023-1027. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181a16578.
- [15] Cousins SW, Espinosa-Heidmann DG, Csaky KG. Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration; a biomarker of risk for choroidal neovascularization? [J]. *Arch Ophthalmol*, 2004, 122(7): 1013-1018. DOI: 10.1001/archophth.122.7.1013.
- [16] Postal M, Appenzeller S. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. *Cytokine*, 2011, 56(3): 537-543. DOI: 10.1016/j.cyt.2011.08.026.
- [17] de Saint Jean M, Brignole F, Feldmann G, et al. Interferon-gamma induces apoptosis and expression of inflammation-related proteins in Chang conjunctival cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(10): 2199-2212.
- [18] Sosne G, Chan CC, Thai K, et al. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators *in vivo* [J]. *Exp Eye Res*, 2001, 72(5): 605-608. DOI: 10.1006/exer.2000.0985.
- [19] Goldstein AL, Hannappel E, Kleinman HK. Thymosin beta4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues [J]. *Trends Mol Med*, 2005, 11(9): 421-429. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.07.004.
- [20] Xu TJ, Wang Q, Ma XW, et al. A novel dimeric thymosin beta 4 with enhanced activities accelerates the rate of wound healing [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2013, 7: 1075-1088. DOI: 10.2147/DDDT.S50183.
- [21] Sosne G, Qiu P, Christopherson PL, et al. Thymosin beta 4 suppression of corneal NFkappaB: a potential anti-inflammatory pathway [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84(4): 663-669. DOI: 10.1016/j.exer.2006.12.004.
- [22] Sosne G, Albeiruti AR, Hollis B, et al. Thymosin beta4 inhibits benzalkonium chloride-mediated apoptosis in corneal and conjunctival epithelial cells *in vitro* [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(3): 502-507. DOI: 10.1016/j.exer.2006.02.001.

(收稿日期: 2016-09-20)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)

广告目次

拓普康 OCT(全能真彩扫频源 OCT) 北京拓普康医疗器械有限公司……封二

同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页

普诺明(高次非球面人工晶状体) 爱博诺德(北京)医疗科技有限公司……前插页

普南扑灵(0.1% 普拉洛芬滴眼液) 深圳市瑞霖医药有限公司……前插页

博士伦博视康叶黄素片 山东博士伦福瑞达制药有限公司……前插页

递法明片(花青素药用制剂) 惠州市百吉瑞医药有限公司……前插页

灵光(复方樟柳碱注射液) 华润紫竹药业有限公司……前插页

见康(拉坦前列素滴眼液) 华润紫竹药业有限公司……前插页

施图伦(七叶洋地黄双苷滴眼液) 深圳市康哲药业有限公司……前插页

泰普罗斯(全新结构前列腺素滴眼液) 参天制药(中国)有限公司……封三

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底