

# 青光安颗粒剂对自发性青光眼模型小鼠的降眼压作用及房水动力学的影响

龙达 周亚莎 李萍 刘家琪 彭俊 谭涵宇 彭清华

410007 长沙,湖南中医药大学第一附属医院中医眼科

通信作者:彭清华,Email:pqh410007@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.12.006

**【摘要】** 背景 研究表明青光眼的眼压增高与转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 促进小梁网细胞外基质的堆积以及黏附分子 CD44 导致房水排出阻力增加有关。传统中药青光安颗粒剂是中医临床上常用的降眼压药物,其是否通过小梁网通路发挥作用尚不清楚。目的 研究青光安颗粒剂对自发性青光眼模型 DBA/2J 小鼠房水动力学的影响及其作用机制。方法 选取 10 只眼压正常的 3 月龄雌性 DBA/2J 小鼠作为对照组,采用计算机随机数字分配法将 20 只 9 月龄自发性眼压升高的 DBA/2J 小鼠随机分为高眼压组和青光安组,青光安组小鼠采用 2.5 g/kg 复方青光安颗粒剂灌胃,每天 2 次,连续 15 d,对照组和高眼压组小鼠以相同剂量生理盐水灌胃。采用经前房注入/抽吸系统进行眼压测量,分别以 2.5、5.0  $\mu\text{l}/\text{min}$  的速率继续灌注,计算房水流畅系数(C)值和房水流出阻力(R)值。将 3 月龄 DBA/2J 小鼠 60 只按计算机随机数字分配法分为高剂量青光安组、中剂量青光安组、低剂量青光安组和空白对照组,每组各 15 只,分别用 25.00、12.50 和 6.25 g/kg 青光安颗粒剂灌胃,空白对照组用等容量生理盐水灌胃,给药后 7 d 麻醉条件下提取各组小鼠含青光安药物血清和空白对照动物血清,然后收集各组小鼠含小梁网巩膜组织进行培养,采用纤连蛋白(FN)、层黏连蛋白(LN)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫组织化学染色鉴定小梁网细胞。终质量浓度为 0、5、10、20、50 和 100 ng/ml 的 TGF- $\beta$  处理小梁网细胞 24 h,采用 MTT 比色法检测各组细胞活性;用不同质量浓度含药血清培养经 20 ng/ml TGF- $\beta$  处理的小梁细胞,分别于培养后 24、48 和 72 h 采用 ELISA 法检测细胞上清液中 TGF- $\beta_2$  受体质量浓度,采用 Western blot 法检测各组小梁网细胞中 CD44 蛋白的相对表达量。结果 对照组、高眼压组和青光安组小鼠在 2.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  和 5.0  $\mu\text{l}/\text{min}$  灌注速率下眼压明显不同,高眼压组小鼠眼压值明显高于青光安组和对照组,青光安组小鼠 C 值较高眼压组明显降低(1.08 $\pm$ 0.36 vs. 2.35 $\pm$ 1.34),R 值明显增加(1.05 $\pm$ 0.47 vs. 0.64 $\pm$ 0.55),差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。原代培养的细胞呈长梭形,FN、LN 和 NSE 均呈阳性表达。5、10 和 20 ng/ml TGF- $\beta$  处理组细胞活力值明显低于 0 ng/ml TGF- $\beta$  处理组细胞,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。与空白对照组比较,TGF- $\beta$  组小梁网细胞上清液中 TGF- $\beta_2$  受体质量浓度和细胞中 CD44 蛋白相对表达量均明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ );细胞培养后 24、48 和 72 h TGF- $\beta$ +高剂量含药血清组细胞上清液中 TGF- $\beta_2$  受体质量浓度和细胞中 CD44 相对表达量均明显低于 TGF- $\beta$  组和 TGF- $\beta$ +低剂量含药血清组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。结论 青光安颗粒剂通过影响房水动力学因素达到降低青光眼眼压的作用。青光安含药血清能明显降低体外培养的鼠小梁网细胞中 TGF- $\beta_2$  受体和 CD44 的表达。

**【关键词】** 青光眼/药物治疗; 中草药; 小梁网; 细胞培养; 转化生长因子- $\beta$ ; 黏附分子; DBA/2J 小鼠; 青光安

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81403437); 中国博士后基金面上项目(2015M570681); 湖南省自然科学基金项目(2015JJ3097); 湖南省教育厅科研基金优秀青年项目(14B137); 国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目; 湖南省中医五官科学重点学科建设项目

**Lowling-intraocular pressure and improving aqueous humor dynamic effects of qingguangan drug granules in spontaneous glaucoma mice** Long Da, Zhou Yasha, Li Ping, Liu Jiaqi, Peng Jun, Tan Hanyu, Peng Qinghua

First Affiliated Hospital of Hunan Traditional Chinese Medical University, Changsha 410007, China

Corresponding author: Peng Qinghua, Email: pqh410007@126.com

**[Abstract] Background** Researches showed that the increase of intraocular pressure (IOP) in glaucomatous eye is associated with the increasing resistance to aqueous humor outflow effects of transforming growth

factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and CD44. *Qingguangan* is a traditional Chinese medicine and used to treat glaucoma. However, its mechanism of lowering-IOP effect is not elucidated. **Objective** This study was to investigate the lowering-IOP effect and mechanism of *qingguangan* granule in DBA/2J mouse, a spontaneous glaucoma model mice. **Methods** Ten 3 month-old female DBA/2J mice with normal IOP were chosen as control group, and 20 spontaneous ocular hypertension mice aged 9 months were randomized into high IOP group and *qingguangan*-treated group, with 10 mice for each group. The *qingguangan* (2.5 g/kg) was administered by gavaging twice per day for consecutive 15 days in the *qingguangan*-treated group, and normal saline solution was used in the same way in the control group and high IOP group. IOP was measured by anterior chamber injection/suction system at a perfusion rate of 2.5 and 5.0  $\mu\text{l}/\text{min}$ , respectively, and the coefficient of aqueous outflow facility (C value) and outflow resistance (R value) were calculated. Another 60 3-month-old DBA/2J mice were randomized into blank control group gavaged with normal saline solution and high-, middle- and low-dose *qingguangan* groups gavaged with 25.00, 12.50 and 6.25 g/kg drugs, respectively, and the mouse serum containing drugs was extracted 7 days after treatment. The scleral tissue with trabecular meshwork were obtained for the culture of trabecular meshwork cells and the cells were identified by immunohistochemistry of fibronectin (FN), laminin (LN) and neuron-specific enolase (NSE). TGF- $\beta$  was added into the medium for 24 hours with the final concentration of 0, 5, 10, 20, 50 and 100 ng/ml, and MMT chromatometry was employed to detect the cell vitality. The cells pre-treated with 20 ng/ml TGF- $\beta$  were treated with different concentration of drug serum for 24, 48 and 72 hours, and the level of TGF- $\beta_2$  receptor in cell supernatant and the expression of CD44 protein in the cells were detected by ELISA and Western blot assay, respectively. **Results** The IOPs with perfusion both 2.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  and 5.0  $\mu\text{l}/\text{min}$  in the *qingguangan*-treated group and the control group were significantly lower than those in the high IOP group (all at  $P < 0.01$ ). Compared with the high IOP group, the C value was significantly reduced (2.35 $\pm$ 1.34 vs. 1.08 $\pm$ 0.36) and the R value was evidently elevated (0.64 $\pm$ 0.55 vs. 1.05 $\pm$ 0.47) in the *qingguangan*-treated group (all at  $P < 0.01$ ). Cultured cells were spindle-shaped with the positive response to FN, LN and NSE antibody. The cell vitality was lower in the 5, 10 and 20 ng/ml TGF- $\beta$  group than that in the 0 ng/ml TGF- $\beta$  group (all at  $P < 0.05$ ). Compared with the blank control group, the TGF- $\beta_2$  receptor content in the supernatant and the related expression level of CD44 protein in the cells were elevated in the TGF- $\beta$ -treated group (all at  $P < 0.01$ ), and TGF- $\beta_2$  receptor contents and CD44 expression levels in the TGF- $\beta$ +high dose drug serum group was significantly lower than those in the TGF- $\beta$  group and TGF- $\beta$ +low dose drug serum group 24, 48 and 72 hours after culture (all at  $P < 0.01$ ). **Conclusions** *Qingguangan* can lower IOP of spontaneous glaucoma mice by affecting aqueous humor dynamics. Serum containing *qingguangan* down-regulates the expressions of TGF- $\beta_2$  receptors and CD44 in trabecular meshwork cells *in vitro*.

**[Key words]** Glaucoma/drug therapy; Traditional Chinese medicine; Trabecular meshwork; Cell, cultured; Transforming growth factor- $\beta$ ; Adhesion molecule; Mice, DBA/2J; *Qingguangan*

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81403437); Chinese Postdoctoral Foundation (2015M570681); Hunan Provincial Natural Science Foundation (2015JJ3097); Fund for Outstanding Youth of Hunan Educational Department (14B137); National Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Key Foundation; Key Laboratory of Hunan Traditional Chinese Medicine

青光眼是全球范围内的主要致盲眼病之一,青光眼的视神经损害多源于房水引流障碍引起的病理性高眼压对眼部组织的机械性压迫。小梁网、Schlemm管和房水静脉共同构成房水引流系统,邻管组织和Schlemm管内壁是产生房水外流阻力的主要区域<sup>[1]</sup>,小梁网细胞外基质异常沉积引起的房水外流受阻是眼压升高的主要原因<sup>[2]</sup>。近年来研究发现,房水中多种生长因子影响小梁网细胞的生长和代谢,其中转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )可促进细胞外基质的堆积,增加房水流出阻力,导致眼压升高。黏附分子 CD44 为一种细胞膜表面糖蛋白,主要

以体液中的可溶性蛋白 (soluble CD44, sCD44) 和膜受体 2 种形式存在, sCD44 蛋白由膜 CD44 分子外功能区脱落而成<sup>[3]</sup>,也是导致房水排出受阻的主要分子,因此 sCD44 蛋白分子和 TGF- $\beta$  是参与房水动力学变化的主要因子,并对小梁网细胞形态、数量和功能产生影响。青光安颗粒剂用于青光眼的治疗已取得了较好疗效,我们的前期研究表明,青光安颗粒剂可改善眼部微循环,提高视网膜、视神经组织的耐缺氧和抗损伤能力<sup>[4]</sup>,但其相关的作用机制尚不明确。本研究拟探讨青光安颗粒剂对青光眼模型小鼠房水动力学的影响及作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 70 只 3 月龄和 20 只 9 月龄 SPF 级雌性 DBA/2J 小鼠由南京模式动物研究所提供, 动物实验设施和环境条件符合中国《实验动物环境及设施》国家标准(GB14925-2001)及对普通动物实验设施的有关标准, 动物饲养管理和动物实验操作符合《湖南省实验动物管理条例》的要求。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 胎牛血清(美国 Gibco 公司);青霉素、链霉素、胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司); TGF- $\beta$ (美国 Selleck Chemicals 公司); MTT 试剂(美国 Sigma 公司); DMSO(德国 Vetec 公司); 鼠抗纤连蛋白(fibronectin, FN)(66042-1-Ig)、鼠抗 CD44(10355-1-AP)(美国 Proteintech 公司); 鼠抗层黏连蛋白(laminin, LN)(ab133645)、鼠抗神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)(ab53025)(美国 Abcam 公司); 鼠 TGF- $\beta_2$  受体(TGF- $\beta_2$  receptor, TGFBR2)ELISA 试剂盒(美国 LifeSpan BioSciences 公司, LS-F8659-1)。MP150 压力传感器、DA100 放大器、UIM100 数字模拟转换器模块(美国 Biopacsystems 公司); CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 CELLSTAR 公司); 超净工作台、低速离心机(北京亚泰隆公司); 普通光学显微镜(日本 Nikon 公司); 倒置相差荧光显微镜(IX71, 日本 Olympus 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组及眼压相关指标的测定** 根据文献[5-6]报道, DBA/2J 小鼠  $\leq 3$  月龄时眼部情况正常, 少数小鼠于 5 月龄时眼压升高, 多数小鼠于 7 月龄时眼压升高, 9 月龄时小鼠眼压达到高峰, 11 月龄时眼压开始下降, 故本研究选取 10 只 3 月龄 DBA/2J 小鼠作为对照组, 采用计算机随机数字分配法将 20 只 9 月龄 DBA/2J 小鼠随机分为高眼压组和青光安组, 每组 10 只。青光安组小鼠根据体表面积计算出相当于成人复方青光安等效治疗量(2.5 g/kg)并以灌胃法给药, 每天 2 次, 连续 15 d。对照组和高眼压组小鼠每日以等容量生理盐水灌胃。采用经前房注入/抽吸法进行眼压测量。眼压测量系统包括压力传感器、放大器、数字模拟转换器模块、32G 针头及连接管道。使用时在传感器至三通管的管道内充满水, 确保管道内无任何气泡或杂质。将 32G 针头连接于三通管, 三通管的另外 2 个开口分别连接充满平衡盐溶液(balanced salt solution, BSS)的输液袋和压力传感器。各组小鼠用氯胺酮(100 mg/kg)和噻拉嗪(9 mg/kg)腹腔内注射进行

麻醉, 于解剖显微镜下固定四肢, 暴露眼球, 注意使颈部保持未受压状态。双眼先后测定, 待测眼用 50  $\mu$ l 生理盐水点眼以保持角膜湿润及前房穿刺野清晰。将 32G 针头尖端置于角膜表面水滴下, 针尖斜面朝上, 测量系统调定至零点, 将针尖端插入小鼠前房, 读取眼压数值。以 30 s 作为 1 个记录单位, 持续记录 2 min, 分别以 2.5  $\mu$ l/min 和 5.0  $\mu$ l/min 的速率继续进行灌注, 灌注速度的更换以每一速度下的描记曲线达到平台期为准。根据 Goldmann 公式计算房水流畅系数(C)值,  $C = \Delta I / \Delta IOP$ , 其中  $\Delta I$  为灌注速度变化值,  $\Delta IOP$  为眼压变化值; 房水流出阻力(R)值 =  $1/C$ 。

**1.2.2 小鼠含药血清的制备** 取 3 月龄 DBA/2J 小鼠 60 只, 常规饲养 1 周后按照计算机随机数字分配法分为高剂量青光安组、中剂量青光安组、低剂量青光安组和空白对照组, 每组各 15 只。高、中、低剂量青光安组小鼠分别用 25.00、12.50 和 6.25 g/kg 青光安颗粒溶液灌胃, 空白对照组用等容量生理盐水灌胃, 给药后 7 d 腹腔内注射麻醉小鼠后提取各组含青光安药物血清和空白对照血清。

**1.2.3 小梁细胞的原代培养及鉴定** 将 3 月龄的 DBA/2J 小鼠颈椎脱臼法处死, 取带小梁网的巩膜块组织, 将组织块剪碎后用胰蛋白酶消化, 小梁网组织侧贴附于 25 ml 的塑料培养瓶底部, 将培养瓶置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、96% 湿度、恒温培养箱中贴壁培养 20~40 min, 加入含体积分数 15% 胎牛血清、1 ml 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基至刚好浸没组织块, 放回 CO<sub>2</sub> 培养箱内进行培养, 平均 3 d 更换培养液 1 次, 每日在显微镜下观测细胞生长状况并记录, 约 2 周后当细胞达到 85% 融合时用胰蛋白酶消化并传代培养。采用免疫组织化学染色法进行细胞鉴定。取出培养的细胞爬片, PBS 清洗 2~3 次, 用质量分数 4% 多聚甲醛固定 30 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 加入体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 室温孵育 10 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h 或 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 50~100  $\mu$ l HRP 标记抗兔/鼠 IgG 二抗, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 DAB 工作液 50~100  $\mu$ l, 室温孵育 1~5 min, 光学显微镜下控制反应时间, 蒸馏水洗涤; 苏木素复染 5~10 min, 蒸馏水冲洗, PBS 返蓝; 梯度乙醇脱水各 5 min, 然后取出置于二甲苯中每次 10 min, 共 2 次, 中性树脂封片, 光学显微镜下观察计算机采集图像; 采用 Image-Pro-Plus 图像分析软件进行图像处理, 观察细胞中 FN、LN 和 NSE 的表达, 以细胞质中出现黄色或棕黄色染色为目标因子表达阳性。

**1.2.4 MMT 比色法检测不同质量浓度 TGF-β 处理组细胞活力** 将细胞接种至 96 孔板,细胞同步化后在饱和湿度环境中饥饿培养 24 h,培养液换成 TGF-β 终质量浓度为 0、5、10、20、50 和 100 ng/ml 的 DMEM/F12 培养基,每孔 100 μl,调零孔用不含细胞的等体积 DMEM/F12 培养液。细胞培养后 24 h,每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 10 μl,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养 4 h,取出 96 孔培养板,吸取旧的培养基及 MTT 溶液,每孔加入 150 μl DMSO 溶剂,室温下缓慢摇晃溶解 10 min,用酶标仪测定波长 490 nm 处吸光度(A)值,并计算细胞的活力值,细胞活力(%) =  $[A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}] / [A_{\text{未加药}} - A_{\text{空白}}] \times 100\%$ 。

**1.2.5 ELISA 法检测不同质量浓度含药血清和 TGF-β 共培养后小梁网细胞上清液中 TGF-β<sub>2</sub> 质量浓度** 将细胞接种至 96 孔板并分为空白对照组、TGF-β 组及 TGF-β+低、中、高剂量含药血清组。TGF-β 组细胞中添 20 ng/ml 并继续培养 24、48、72 h;TGF-β+低、中、高剂量含药血清组分别添加等剂量 TGF-β 和含 6.25、12.50 和 25.00 g/kg 青光安药物血清各 100 μl,继续培养 24、48 和 72 h,采用鼠 TGFBR2 ELISA 试剂盒测定细胞上清液中 TGF-β<sub>2</sub> 受体质量浓度,测定范围为 78 ~ 5 000 pg/ml。用酶标仪测定波长为 450 nm 的 A 值,计算样本质量浓度。

**1.2.6 Western blot 法检测不同质量浓度含药血清组小梁细胞中 CD44 蛋白的表达** 按照 1.2.5 的方法培养细胞 24、48 和 72 h,按说明书的步骤制备样品,检测蛋白浓度,蛋白上样量为 50 μg,经电泳、PVDF 转膜、封闭、一抗 4 ℃ 过夜孵育、二抗室温孵育 1 h、ECL 显色/曝光,将曝光后的底片扫描,并用 Quantity One 专业灰度分析软件进行灰度值分析,以 GAPDH 为参照,CD44 蛋白的相对表达量 = CD44 蛋白灰度值/GAPDH 蛋白灰度值。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 6 进行统计分析。本研究中定量检测指标的数据经证实呈正态分布,经 Levene 方差齐性检验证实方差齐。采用随机分组单因素干预多水平研究设计,对照组、高眼压组和青光安组小鼠不同灌注速度下眼压值总体差异比较采用重复测量两因素方差分析;3 个组间小鼠 C 值和 R 值总体差异比较,不同质量浓度 TGF-β 处理组小梁网细胞活力值的总体差异比较均采用单因素方差分析;空白对照组、TGF-β 组、TGF-β+低剂量含药血清组、TGF-β+中剂量含药血清组和 TGF-β+高剂量含药血清组药物作用细胞后不同时间点小鼠细胞上清液中 TGF-β<sub>2</sub>

受体质量浓度及小梁网细胞中 CD44 蛋白相对表达量的总体差异比较均采用两因素方差分析,多重比较均采用 Tukey 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组小鼠不同灌注速率下眼压值、C 值数以及 R 值比较** 对照组、高眼压组和青光安组小鼠在不同灌注速率下眼压值的总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 61.980, P < 0.000 1; F_{\text{灌注速率}} = 911.600, P < 0.000 1; F_{\text{交互作用}} = 20.279, P < 0.000 1$ ), 2.5 μl/min 和 5.0 μl/min 灌注速率下高眼压组小鼠眼压值明显高于青光安组和对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 1)。各组小鼠 C 值和 R 值总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 7.048, P = 0.002; F = 7.948, P = 0.016$ ),其中高眼压组小鼠 C 值明显低于青光安组,R 值明显高于青光安组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 2)。

**表 1 各组不同灌注速率下眼压值比较( $\bar{x} \pm s$ , mmHg)**

组别	眼数	不同灌注速率下眼压值	
		2.5 μl/min	5.0 μl/min
对照组	20	9.17±0.88 <sup>a</sup>	10.65±1.07 <sup>a</sup>
高眼压组	20	21.03±1.46	23.66±1.23
青光安组	20	13.35±1.11 <sup>a</sup>	14.95±1.93 <sup>a</sup>

注: $F_{\text{分组}} = 61.980, P < 0.000 1; F_{\text{灌注速率}} = 911.600, P < 0.000 1; F_{\text{交互作用}} = 20.279, P < 0.000 1$ 。与各自高眼压组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ (两因素方差分析, Tukey 检验) 1 mmHg=0.133 kPa

**表 2 各组 C 值和 R 值比较( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	眼数	C 值	R 值
对照组	20	2.77±2.16	0.51±0.27
高眼压组	20	1.08±0.36	1.05±0.47
青光安组	20	2.35±1.34 <sup>a</sup>	0.64±0.55 <sup>a</sup>
F 值		7.048	7.948
P 值		0.002	0.016

注:与高眼压组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ (单因素方差分析, Tukey 检验) C 值:房水流畅系数值;R 值:房水流出阻力值

**2.2 原代培养的小鼠小梁网细胞形态及标志物表达**

组织块接种后,细胞以组织块为放射状中心向外生长,在培养后 7 ~ 10 d 聚集成紧密连接的单层细胞层,细胞边缘紧密相连。细胞传至 3 ~ 5 代后,形态基本稳定,细胞形态呈宽大扁平,细胞质透亮,胞突较粗。小梁细胞 FN 染色阳性,细胞质呈砂砾状红色染色,部分相互连接呈网状(图 1A);LN 阳性,细胞质呈砂砾状棕红色染色(图 1B);NSE 阳性,细胞质呈砂砾状棕红色染色(图 1C);阴性对照片不着色(图 1D)。

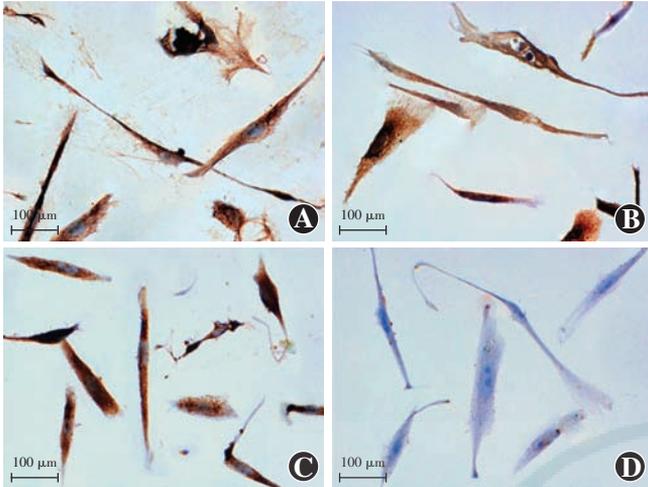


图 1 免疫组织化学染色法观察 FN、LN 及 NSE 的表达及定位 (DAB ×400, 标尺 = 100 μm) A: 培养的细胞中 FN 表达阳性, 为细胞质中棕黄色染色 B: 培养的细胞中 LN 表达阳性, 为细胞质中棕黄色染色 C: 培养的细胞中 NSE 表达阳性, 为细胞质中棕黄色染色 D: 阴性对照片

### 2.3 不同质量浓度 TGF-β 处理组细胞活力的变化

0、5、10、20、50 和 100 ng/ml TGF-β 处理后细胞活力值分别为  $1.111 \pm 0.052$ 、 $0.909 \pm 0.063$ 、 $0.924 \pm 0.075$ 、 $0.903 \pm 0.055$ 、 $0.947 \pm 0.071$  和  $0.953 \pm 0.069$ ，小梁网细胞活性随着 TGF-β 质量浓度的增加而上升，组间总体比较差异有统计学意义 ( $F = 4.318$ ,  $P = 0.018$ )，其中 5、10 和 20 ng/ml TGF-β 处理后细胞活力值明显低于 0 ng/ml TGF-β 处理后，差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 2)。

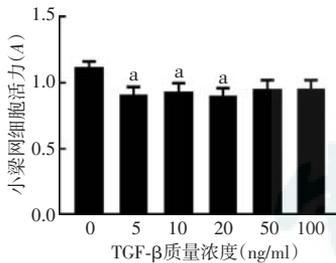


图 2 不同质量浓度 TGF-β 处理后小梁网细胞活性比较  $F = 4.318$ ,  $P = 0.018$ ，与 0 ng/ml TGF-β 作用组比较， $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, Tukey 检验,  $n = 3$ ) TGF: 转化生长因子

### 2.4 不同剂量含药血清组小鼠小梁网细胞中 TGF-β<sub>2</sub> 受体质量浓度改变

采用 ELISA 法检测出各组细胞 A 值, 根据标准曲线求出实验曲线  $Y = a + bx + cx^2 + dx^3$ 。空白对照组、TGF-β 组及 TGF-β+低剂量含药血清组、TGF-β+中剂量含药血清组和 TGF-β+高剂量含药血清组的细胞上清液中 TGF-β<sub>2</sub> 受体质量浓度随着青光安剂量的增大而下降, 且随着药物作用时间的延长而减小, 总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 75.59$ ,  $P < 0.01$ ;  $F_{\text{时间}} = 376.70$ ,  $P < 0.01$ )，其中 TGF-β 组、TGF-β+低剂量含药血清组、TGF-β+中剂量含药血清组和 TGF-β+高剂量

含药血清组药物作用后 24、48 和 72 h 细胞上清液中 TGF-β 质量浓度均低于空白对照组, TGF-β+高剂量含药血清组药物作用后 24、48 和 72 h 细胞上清液中 TGF-β 质量浓度均明显低于 TGF-β+低剂量含药血清组和 TGF-β+中剂量含药血清组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 3)。

表 3 各组药物作用后不同时间细胞上清液中 TGF-β<sub>2</sub> 受体质量浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/ml)

组别	样本量	药物作用后不同时间 TGF-β <sub>2</sub> 受体质量浓度		
		24 h	48 h	72 h
空白对照组	3	$0.586 \pm 0.005$	$0.607 \pm 0.006$	$0.589 \pm 0.004$
TGF-β 组	3	$1.091 \pm 0.019^a$	$1.137 \pm 0.013^a$	$1.024 \pm 0.016^a$
TGF-β+低剂量含药血清组	3	$1.003 \pm 0.006^a$	$0.978 \pm 0.003^a$	$0.927 \pm 0.003^a$
TGF-β+中剂量含药血清组	3	$0.926 \pm 0.003^a$	$0.803 \pm 0.007^a$	$0.771 \pm 0.002^a$
TGF-β+高剂量含药血清组	3	$0.861 \pm 0.002^{abc}$	$0.719 \pm 0.004^{bc}$	$0.649 \pm 0.008^{bc}$

注:  $F_{\text{分组}} = 75.59$ ,  $P < 0.01$ ;  $F_{\text{时间}} = 376.70$ ,  $P < 0.01$ 。与各自空白对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与各自 TGF-β 组比较,  $^b P < 0.05$ ; 与各自低剂量含药血清组比较,  $^c P < 0.05$  (两因素方差分析, Tukey 检验) TGF: 转化生长因子

### 2.5 不同剂量含药血清组小鼠小梁网细胞中 CD44 蛋白相对表达量变化

空白对照组、TGF-β 组、TGF-β+低剂量含药血清组、TGF-β+中剂量含药血清组和 TGF-β+高剂量含药血清组细胞中 CD44 表达条带随着药物剂量的增加和作用时间的延长而变化, 正常对照组细胞中 CD44 蛋白表达条带微弱, TGF-β 组细胞中 CD44 蛋白表达条带最强, 细胞中 CD44 蛋白表达条带逐渐减弱 (图 3)。各组药物作用后不同时间细胞中 CD44 蛋白相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 20.24$ ,  $P < 0.01$ ;  $F_{\text{时间}} = 28.86$ ,  $P < 0.01$ )，其中 TGF-β 组、TGF-β+低剂量含药血清组和 TGF-β+中剂量含药血清组细胞中 CD44 蛋白相对表达量均明显高于空白对照组, TGF-β+高剂量含药血清组细胞中 CD44 蛋白相对表

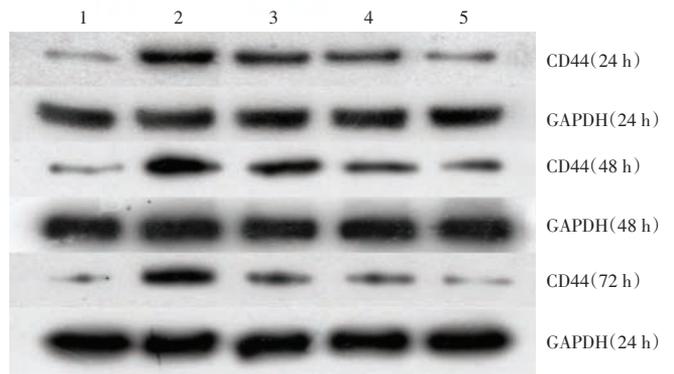


图 3 各组不同时间点 CD44 蛋白表达电泳图 1: 空白对照组; 2: TGF-β 组; 3: TGF-β+低剂量含药血清组; 4: TGF-β+中剂量含药血清组; 5: TGF-β<sub>2</sub>+高剂量含药血清组 TGF: 转化生长因子

定量均明显低于 TGF-β 组和 TGF-β+低剂量含药血清组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(表 4)。

**表 4 各组不同时间细胞中 CD44 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本量	不同时间点 CD44 的相对表达量		
		24 h	48 h	72 h
空白对照组	3	0.28±0.04	0.30±0.04	0.27±0.02
TGF-β 组	3	0.93±0.03 <sup>a</sup>	0.77±0.04 <sup>a</sup>	0.97±0.03 <sup>a</sup>
TGF-β+低剂量含药血清组	3	0.76±0.03 <sup>a</sup>	0.72±0.02 <sup>a</sup>	0.56±0.04 <sup>a</sup>
TGF-β+中剂量含药血清组	3	0.62±0.03 <sup>a</sup>	0.52±0.02 <sup>a</sup>	0.47±0.02 <sup>a</sup>
TGF-β+高剂量含药血清组	3	0.32±0.01 <sup>bc</sup>	0.33±0.01 <sup>bc</sup>	0.25±0.02 <sup>bc</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 20.24, P < 0.01$ ;  $F_{\text{时间}} = 28.86, P < 0.01$ 。与各自空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自 TGF-β 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各自 TGF-β+低剂量含药血清组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) TGF: 转化生长因子

### 3 讨论

DBA/2J 小鼠为一种遗传性青光眼动物模型,多于 7~9 月龄时出现眼压升高, DBA/2J 小鼠青光眼缓慢进展,与急性高血压模型相比能更好地模拟青光眼的发病特点<sup>[6]</sup>。本研究中对不同月龄的 DBA/2J 小鼠进行眼压测量,结果显示 6 月龄小鼠开始出现轻微的眼压升高,9 月龄时眼压显著升高,与杨帆等<sup>[7]</sup>和 Ojino 等<sup>[8]</sup>的实验结果相符。本研究使用前房微管技术及灌注装置评估青光安颗粒干预前后小鼠房水的动力学改变<sup>[9]</sup>,这是目前测量小鼠眼压最为准确的方法,但其操作过程较其他非侵入性的眼压测量方法复杂,整个测量系统的管道保持畅通是确保测量成功的保障。因此熟练的操作技巧是避免眼部并发症、提高测量成功率的关键。本课题组从传统医学角度出发,认为慢性高血压的发病机制为血脉淤滞、玄府闭塞和神水瘀积,并基于气虚血瘀水停的机制提出了益气活血利水的治疗方法<sup>[10]</sup>,青光安颗粒中黄芪补气利水,白术、茯苓、车前子益气利水明目,地龙、赤芍、红花活血化瘀,配伍后可发挥益气活血利水的作用。DBA/2J 小鼠眼压升高的病理机制与人类色素性青光眼的病理机制比较接近,即沉积于房角区域的色素细胞可导致小梁网房水流出受阻,眼压升高。本研究中以 9 月龄小鼠作为高血压模型,在不同的灌注压力下经前房穿刺直接测得眼压及房水流畅系数和房水流出阻力,发现高眼压小鼠服用青光安颗粒剂后眼压较高眼压组降低,房水流畅系数明显增大,房水流出阻力降低,提示青光安颗粒剂能影响房水动力学而达到降低眼压的作用。

CD44 和 TGF-β<sub>2</sub> 可对细胞黏附等生物学行为发挥调节作用并参与细胞多种信号转导途径,其表达的异

常可引起小梁网细胞的形态、数量和功能变化,增加房水流出通道的阻力<sup>[11]</sup>。本研究选用可影响小梁网细胞增生的最大质量浓度(20 ng/ml) TGF-β 刺激,结果表明随着青光安含药血清质量浓度的增加,小梁网细胞上清液中 TGF-β<sub>2</sub> 受体和细胞中 CD44 均呈现降低趋势,提示青光安改善房水流出效率和有效控制眼压的作用可能是通过小梁网途径实现的,关于青光安能减少 TGF-β 导致的细胞外基质在小梁网的堆积从而降低房水流出阻力的推测有待组织学研究进一步证实。

### 参考文献

- [1] 彭清华,曾志成,李波,等.青光安颗粒含药血清对加压后小梁网细胞活性的影响[J].国际眼科杂志,2009,9(5):839-842. DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2009.05.010. Peng QH, Zeng ZC, Li B, et al. Effect of serum containing qingguang an grains on pressurized human trabecular cells activity [J]. Int J Ophthalmol, 2009, 9(5): 839-842. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2009. 05. 010.
- [2] WuDunn D. Mechanobiology of trabecular meshwork cells [J]. Exp Eye Res, 2009, 88(4): 718-723. DOI: 10. 1016/j. exer. 2008. 11. 008.
- [3] Cichy J, Bals R, Potempa J, et al. Proteinase-mediated release of epithelial cell-associated CD44. Extracellular CD44 complexes with components of cellular matrices [J]. J Biol Chem, 2002, 277(46): 44440-44447.
- [4] 彭清华,李波.青光安颗粒剂对实验性高血压大鼠视网膜节细胞代谢作用的研究[J].湖南中医学院学报,1997,(2):53-56.
- [5] John SW, Smith RS, Savinova OV, et al. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(6): 951-962.
- [6] Libby RT, Anderson MC, Pang IH, et al. Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration [J]. Vis Neurosci, 2005, 22(5): 637-648. DOI: 10. 1017/S0952523805225130.
- [7] 杨帆,吴玲玲,郭秀娟,等.青光眼动物模型 DBA/2J 小鼠的眼部特征及组织学观察[J].眼科研究,2010,28(2):103-108. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-0808. 2010. 02. 002. Yang F, Wu LL, Guo XJ, et al. Ocular findings and histological change in glaucoma model of DBA/2J Mice [J]. Chin Ophthalm Res, 2010, 28(2): 103-108. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-0808. 2010. 02. 002.
- [8] Ojino K, Shimazawa M, Izawa H, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in optic nerve degeneration after chronic high intraocular pressure in DBA/2J mice [J]. J Neurosci Res, 2015, 93(11): 1675-1683. DOI: 10. 1002/jnr. 23630.
- [9] 郭秀娟,李颖,吴乐萌,等.前房插管技术测量小鼠眼压[J].眼科研究,2008,26(3):165-168. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2008. 03. 002. Guo XJ, Li Y, Wu LM, et al. Measurement of mouse intraocular pressure by microneedle method [J]. Chin Ophthalm Res, 2008, 26(3): 165-168. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2008. 03. 002.
- [10] 曾志成,彭俊,谭涵宇,等.活血利水法治疗眼科疾病的临床研究进展[J].湖南中医药大学学报,2010,30(7):74-78. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-070X. 2010. 07. 027. 074. 05.
- [11] Zeng ZC, Peng J, Tan HY, et al. Clinical research of activating blood and diuresis for ocular diseases in Chinese medicine [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2010, 30(7): 74-78. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-070X. 2010. 07. 027. 074. 05.
- [11] 陈书扬,吴瑜瑜,朱益华,等. TNF-α 对体外培养人眼小梁细胞 CD44s 表达的影响及意义 [J]. 临床眼科杂志, 2007, 15(5): 458-461. Chen SY, Wu YY, Zhu YH, et al. Effect of tumor necrosis factor-α on the expression of CD44s in cultured human trabecular meshwork cells [J]. J Clin Ophthalmol, 2007, 15(5): 458-461.

(收稿日期:2017-06-17 修回日期:2017-11-01)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)