

# 桑色素滴眼液治疗围绝经期雌性兔干眼的实验研究

江威<sup>1,2\*</sup>, 葛倩敏<sup>1\*</sup>, 黎彪<sup>1</sup>, 袁晴<sup>1</sup>, 梁荣斌<sup>1</sup>, 李秋玉<sup>1</sup>, 朱佩文<sup>1</sup>, 邓军萍<sup>2</sup>, 石文卿<sup>1</sup>, 邵毅<sup>1</sup>

引用:江威,葛倩敏,黎彪,等.桑色素滴眼液治疗围绝经期雌性兔干眼的实验研究.国际眼科杂志2020;20(3):432-437

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.3.07

基金项目:国家自然科学基金资助(No.81160118,81460092,81400372,81660158);江西省自然科学基金重大项目(No.20161ACB21017);江西省自然科学基金(No.20151BAB215016);江西省重点研发项目(No.20151BBG70223)

作者单位:<sup>1</sup>(330006)中国江西省南昌市,南昌大学第一附属医院眼科;<sup>2</sup>(330800)中国江西省高安市人民医院眼科

\*:江威和葛倩敏对本文贡献一致。

作者简介:江威,男,毕业于南昌大学医学院,医学学士,眼科副主任,主治医师,研究方向:角膜病与眼表疾病;葛倩敏,女,毕业于南昌大学,在读硕士研究生,研究方向:角膜病与眼表疾病。

通讯作者:邵毅,毕业于中山大学眼科中心,医学博士,眼科副主任,主任医师,研究方向:角膜病与眼表疾病。freebee99@163.com

收稿日期:2019-04-28 修回日期:2020-02-24

## 摘要

目的:探究桑色素滴眼液在围绝经期雌性兔干眼症中的治疗作用。

方法:选取雌性新西兰大白兔36只,采用双侧卵巢切除术,术后饲养60d,制作围绝经期雌兔干眼症模型(36眼,均为右眼),其中24只随机分成对照组、实验组两组(各12只):对照组应用磷酸盐缓冲液(PBS),实验组应用桑色素滴眼液,另12只不使用任何滴眼液。治疗前,治疗后2、4、6wk对实验兔采取角膜荧光素染色(FL)、Schirmer I试验(SIt)检查,同时测验溶菌酶含量、乳铁蛋白、淀粉酶活性和泪液总蛋白含量,并使用角膜共聚焦显微镜观察。

结果:治疗前两组的SIt、FL、溶菌酶含量、乳铁蛋白、淀粉酶活性和泪液总蛋白量均无差异( $P>0.05$ );治疗2、4、6wk后,对照组和实验组SIt和FL评分发生了不同的变化( $P<0.05$ )。实验组溶菌酶含量、乳铁蛋白、淀粉酶活性和泪液总蛋白量较治疗前没有显著变化(均 $P>0.05$ ),对照组溶菌酶含量、乳铁蛋白、淀粉酶活性和泪液总蛋白量都发生了程度不一的变化(均 $P<0.05$ )。治疗后2、4、6wk时两组SIt、FL评分、溶菌酶含量、乳铁蛋白、淀粉酶活性和泪液总蛋白量均有差异( $P<0.05$ )。治疗6wk,对照组炎症细胞密度为 $321\pm 91$ 个/ $\text{mm}^2$ ,上皮基底细胞密度为 $4436\pm 289$ 个/ $\text{mm}^2$ ,实验组炎症细胞密度为 $36\pm 11$ 个/ $\text{mm}^2$ ,上皮基底细胞密度为 $3219\pm 223$ 个/ $\text{mm}^2$ ,两组均有差异( $P<0.05$ )。治疗6wk后,对照组角膜上皮多支神经纤维发生弯曲,密度显著减少( $P<0.05$ ),实验组神经弯曲度明显减小,密度较治疗前增加。

结论:桑色素滴眼液对围绝经期雌性兔干眼症具有明确的治疗作用。

关键词:干眼;桑色素滴眼液;治疗;雄激素

## The application of Mulberry eye drops on xerophthalmia in perimenopausal female rabbit model

Wei Jiang<sup>1,2\*</sup>, Qian - Min Ge<sup>1\*</sup>, Biao Li<sup>1</sup>, Qing Yuan<sup>1</sup>, Rong - Bin Liang<sup>1</sup>, Qiu - Yu Li<sup>1</sup>, Pei - Wen Zhu<sup>1</sup>, Jun - Ping Deng<sup>2</sup>, Wen - Qin Shi<sup>1</sup>, Yi Shao<sup>1</sup>

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81160118, 81460092, 81400372, 81660158); Natural Science Key Project of Jiangxi Province (No. 20161ACB21017); Youth Science Foundation of Jiangxi Province (No. 20151BAB215016); Technology and Science Foundation of Jiangxi Province (No.20151BBG70223)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Gao'an People's Hospital, Gao'an 330800, Jiangxi Province, China

Co-first authors: Wei Jiang and Qian-Min Ge.

Correspondence to: Yi Shao. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. freebee99@163.com

Received:2019-04-28 Accepted:2020-02-24

## Abstract

• AIM: To investigate the therapeutic efficiency of Mulberry eye drops on dry eye in perimenopausal female rabbit model.

• METHODS: Totally 36 female New Zealand white rabbits were selected and operated with bilateral ovariectomy and fed for 60d postoperatively to make perimenopausal female rabbit dry eye model (36 eyes, all right eyes). And 24 of them were randomly divided into control group and experimental group (12 for each): the control group used PBS, the experimental group used Mulberry eye drops, the other 12 did not use any eye drops. The Schirmer I tests (SIt) and corneal fluorescein (FL) were made, and the tear total protein content, amylase activity, lactoferrin and lysozyme contents and confocal scanning microscopy were performed in two groups before treatment and 2, 4, 6wk after treatment.

• RESULTS: There was no significant difference in SIt, FL scores, total proteins, lysozyme, lactoferrin contents and amylase activity between two groups at pre-therapy (all  $P>0.05$ ). After 2, 4 and 6wk of treatment, there were significant changes in SIt and FL scores in the two

groups ( $P < 0.05$ ). There were no significant changes in lysozyme content, lactoferrin, amylase activity and total tear protein in the experimental group compared with those before treatment (all  $P > 0.05$ ), while there were significant changes in lysozyme content, lactoferrin, amylase activity and total tear protein in the control group (all  $P < 0.05$ ). At 2, 4 and 6wk after treatment, there were differences in the scores of S I t and FL, lysozyme content, lactoferrin, amylase activity and total protein content in tear between the two groups ( $P < 0.05$ ). At 6 wk after treatment, the mean number of corneal basal cells and inflammatory cells in control group were  $4436 \pm 289\text{mm}^2$  and  $321 \pm 91\text{mm}^2$ , respectively, which in experimental group were  $3219 \pm 223\text{mm}^2$  and  $36 \pm 11\text{mm}^2$ , respectively, there were statistical differences between two groups (all  $P < 0.05$ ). After 6wk treatment, there were no change of corneal nerve bending and less density in control group while the nerve fiber bending and density decreased significantly in experimental group, there were statistical differences between two groups (all  $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Mulberry eye drops has significantly therapy effects on the dry eye induced by decreased androgen and it has a definite clinical application value.

• **KEYWORDS:** dry eye; Mulberry eye drops; treatment; androgen

**Citation:** Jiang W, Ge QM, Li B, et al. The application of Mulberry eye drops on xerophthalmia in perimenopausal female rabbit model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(3):432-437

## 0 引言

干眼(dry eye disease, DED)是眼表面多因子疾病,其可致使泪液渗透压增高和泪膜不稳定,眼表炎症和损伤以及神经感觉异常为其主要特征<sup>[1]</sup>,中、重度的 DED 可使患者生活质量下降,甚至产生一定的心理问题。近年来的研究表明,按照不同的标准,DED 的总体发病率 8.7%~30.1%<sup>[2-5]</sup>。雄激素可作用于泪腺,因此泪腺是其靶器官之一,泪腺的结构和功能,包括其细胞结构、基因表达、免疫活性等在雄激素的作用下可发生相当大的改变<sup>[6]</sup>。而雄激素缺乏则可能导致泪腺功能障碍或泪液缺乏,从而引起干眼<sup>[7]</sup>。针对因雄激素水平改变而导致干眼的患者进行了激素治疗的临床研究,但为减少副作用,目前的治疗仍以局部对症治疗为主。因此,目前较好地解决方案是探寻此前未曾使用的激素替代药物。糖可与绝大多数黄酮类化合物结合形成苷,并保存在植物的根、叶和果实里,其余的黄酮类化合物则以游离形式存在,具有多种生物活性,如抗炎、抗氧化、抗免疫及抗癌等作用<sup>[8]</sup>。桑色素(morin)则是其中一种,可从桑科植物中提取,通过雄激素受体结合,一定程度上发挥弥补雄激素不足的作用。本实验应用围绝经期雌兔造模,探究桑色素滴眼剂对干眼的治疗效果,为日后临床雄激素替代治疗提供一定的依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 从南昌大学动物实验室中选取 6 周龄的新西兰雌性白兔 36 只,要求所选雌兔体质量均为 2.0~2.5kg。对所选取的雌兔的眼前节及眼底使用眼底镜、裂隙灯显微镜进行检查, S I t  $\geq 10\text{mm}/5\text{min}$ 。本实验经伦理委员会审批,符合动物实验的相关准则。

## 1.2 方法

**1.2.1 围绝经期雌兔干眼模型的构建** 参照文献<sup>[9]</sup>,随机选取 36 只雌兔,称重。腹腔注射足量的 3%氨基甲酸乙酯溶液(45mg/kg),然后将雌兔仰卧位放置,将头部及四肢固定并充分暴露其腹部,并使用电动剃刀对下腹部备皮。在使用碘伏对暴露的腹部进行消毒后,铺无菌巾单,无菌操作,并将手术刀经腹正中切口逐层剖入腹腔,行双侧卵巢切除术(orchietomized, ORX),然后依次关闭各层腹壁,连续缝合皮肤。术后连续 3d 行抗感染治疗,给予雌兔肌肉注射青霉素,并局部擦拭碘伏消毒。经过 2mo 观察后,被选取的雌兔角膜干燥且缺乏光泽,荧光素染色可见散布的点状溃疡, S I t  $< 10\text{mm}/5\text{min}$ ,泪膜破裂时间  $< 12\text{s}$ 。

**1.2.2 分组及处理** 将 ORX 术后 2mo 成功建模的 24 只雌兔随机分为对照组、实验组两组(每组为 12 只,且都选取右眼进行处理):(1)对照组:对照磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)组;(2)实验组:桑色素组。对对照组和实验组雌性兔右眼连续滴眼 6wk, 4 次/d。在治疗前、治疗后 2、4、6wk 时,分别对对照组和实验组雌性兔进行角膜泪液蛋白测定、角膜共聚焦显微镜检查、S I t 检查及荧光素染色检测。

**1.2.3 实验动物造模及筛选标准** 为控制变量,24 只雌兔全部由相同的操作者检查,以保证每次检查选取同一时间地点,且控制照明亮度不变,湿度和温度每次相同。经过 2mo 观察后,被选取的雌兔角膜干燥且缺乏光泽,荧光素染色可见散布的点状溃疡, S I t  $< 10\text{mm}/5\text{min}$ ,泪膜破裂时间  $< 12\text{s}$ 。

## 1.2.4 桑色素提取液的制备

**1.2.4.1 提取** 根据参考文献[10],将干燥桑科植物树叶碾碎,取碾碎后的粉末 20g,置于具塞三角烧瓶中,然后将 8 倍量(体积分数 70%)乙醇加入烧瓶中,摇匀后在室温下放置 10h 后,经过 20min 超声提取,过滤后再次将 6 倍量乙醇加入,再经 5min 超声提取后,过滤;准备一根离心管,将两次乙醇提取液一起加入其中,离心(2000r/min),最后提取上清液。分别用 1L 乙酸乙酯和氯仿萃取,得到萃取液,使用 HPLC-CL 法检测桑色素含量。

**1.2.4.2 分离纯化** 用 80~100 目聚酰胺柱色谱法层析分离萃取液,分离完成后用 70%乙醇洗脱。洗脱液以柱体积为单位进行浓度检测,重复上述纯化步骤直至得到较高纯度( $>95\%$ )的桑色素提取液<sup>[11]</sup>。

**1.2.5 桑色素滴眼剂的制备** 桑色素滴眼剂制备步骤:(1)溶解:提取物质量:水比为 0.1:1.0;(2)加入眼润滑剂羧甲基纤维素(1.5g/L);(3)缓冲:NaHCO<sub>3</sub>, KCl(0.1g/L 以下);(4)检测并调整理化特性:表面张力(40~50dyn/cm<sup>2</sup>)、屈光指数(1.336)、比重(约等于 1)、渗透压(311~350mOsm)、黏稠度(略高于水)和 pH 值(7.3~7.8);(5)加入保存剂:苯扎溴铵(0.05g/L)。

**1.2.6 PBS 滴眼剂的制备** PBS 滴眼剂制备步骤:(1)配制 PBS 缓冲液:磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>):0.27g,磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>):1.42g,氯化钠(NaCl):8g,氯化钾(KCl):0.2g,加去离子水大约 800mL 将其混匀并且使固体完全溶解,再缓慢加浓盐酸直至调节酸碱度为 7.4,最后定容到 1L;(2)加入眼润滑剂羧甲基纤维素(1.5g/L);(3)检测并调整理化特性:调至与桑色素滴眼剂相似;(4)加入保存剂:苯扎溴铵(0.05g/L)。

表1 两组治疗前后 S I t 及 FL 评分比较

分组	S I t (mm/5min)						FL (分)		
	治疗前	治疗后			治疗前	治疗后			
		2wk	4wk	6wk		2wk	4wk	6wk	
对照组	5.22±1.16	5.01±1.11 <sup>c</sup>	4.42±1.21 <sup>c</sup>	3.16±1.07 <sup>c</sup>	5.09±1.02	5.71±1.09 <sup>c</sup>	6.12±1.26 <sup>c</sup>	7.12±1.09 <sup>c</sup>	
实验组	5.27±1.17	5.97±1.01 <sup>a,c</sup>	6.34±1.51 <sup>a,c</sup>	7.71±2.52 <sup>a,c</sup>	5.93±1.09	3.22±0.67 <sup>a,c</sup>	2.51±0.52 <sup>a,c</sup>	2.17±0.54 <sup>a,c</sup>	
<i>t</i>	0.643	4.436	6.763	11.658	0.526	3.873	7.762	9.065	
<i>P</i>	0.932	0.045	0.024	0.013	0.836	0.034	0.017	0.009	

注:<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 对照组;<sup>c</sup>*P*<0.05 vs 治疗前。

**1.2.7 角膜荧光素染色及 S I t 检测** 角膜荧光素染色:使用 10g/L 荧光素钠点眼 1 滴后使雌兔立即瞬目,参照评分系统进行评分并分级<sup>[12]</sup>:0 级:无染色;1 级:很少的播散性污渍染色;2 级:中度污渍染色,程度在 1~3 级间;3 级:重度融合性污渍染色。

S I t 检查泪液基础分泌情况。取出刻度滤纸并将其一边折叠,置于待检查雌兔眼下结膜囊的中外 1/3 处 5min,并在取出试纸后测量其被浸润长度。参照文献<sup>[13]</sup>,S I t ≥ 10mm/5min 为正常。为控制变量,所有操作均由同一人完成。

**1.2.8 泪液蛋白测定** 从 9:00 到 11:00 取泪液样品,在泪河处取 20μL 无刺激性泪液,并储存在 -80℃ 的冰箱保存。使用小牛血清白蛋白作为标准,通过 Brandford 方法测量泪液的总蛋白质含量。淀粉酶活性测定参照文献<sup>[14]</sup>:操作采用自动分析仪分析 (LX20; Beckman, Fullerton, CA),4,6-亚乙基-对硝基苯-α-D-麦芽七糖苷 (ethylidene-4-nitrophenyl-α-d-maltoheptaoside, Leadman Group Co., Ltd., Beijing, China) 作为底物。

乳铁蛋白 (lactoferrin, LF) 测定参照文献<sup>[15]</sup>:从冰箱中取出 10μL 事先储存的泪液样品,稀释泪液样品,绘制出标准曲线并计算 LF 含量。通过比浊法测算溶菌酶含量,并参照说明书制作标准曲线、使用溶菌酶测试试剂盒,配制溶菌酶标准液和制备染色菌液;最后,把泪液样品和染色菌液混合摇匀,然后将混合液离心,获取上清液,泪液样品中溶菌酶含量可根据样品与测定管对照管光密度相差的数值,参照标准曲线计算出。

**1.2.9 共聚焦显微镜检查** 使用共聚焦显微镜对各组雌兔被测眼的角膜上皮的变化情况进行观察,由同一人实施检查。检查步骤:使雌兔头部固定,无法摇晃,让雌兔的眼睛直视前方,以 5g/L 的盐酸丙美卡因滴眼液点眼后,对中央角膜行全层检查,并保存清晰有效的图片,使用计算机软件测算炎症细胞和角膜上皮基底细胞的密度。神经密度 (mm/mm<sup>2</sup>):观察角膜下神经丛,采取 35~50μm 观察深度。应用 AUTOCAD 软件 (Auto Desk Co., Ltd, CA, US) 确定角膜下神经纤维的长度。按实际角膜面积 0.16mm<sup>2</sup> (400×400μm)/帧的标准获取每个图像,并描绘出观察到的单个图像中的神经纤维形状 (图 1,引自文献<sup>[16]</sup>),通过所描绘的折线特征得出折线的总长,然后将所得的折线总长比上面积的大小 (0.16mm<sup>2</sup>) 以计算出神经纤维密度 (mm/mm<sup>2</sup>)。神经纤维分支:为每个图像中看到的总分支数。曲率评分:图像中神经纤维曲率的程度可分为 4 个等级。分数越高,则神经纤维曲率越高<sup>[14]</sup>。

统计学分析:应用 GraphPad Prism 4.00 统计软件对数据施以统计学分析,并使用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示

计量资料,两组组间差异及各时间点测量值的时间差异性比较采用重复测量设计的方差分析,各时间点的组间差异比较用独立样本 *t* 检验,计数资料的组间比较采用  $\chi^2$  检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组治疗前后干眼相关指标比较** 治疗前,治疗后 2、4、6wk,两组 S I t 比较,差异有统计学意义 ( $F_{\text{组间}} = 9.92$ ,  $F_{\text{时间}} = 10.16$ ,  $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 13.54$ , 均 *P*<0.05)。治疗前两组 S I t 相比较,差异无统计学意义 (*t* = 0.643, *P*>0.05);与治疗前相比较,治疗 2、4、6wk 时实验组的 S I t 都产生了程度不一的改善,差异均有统计学意义 (*t* = 5.752, *t* = 6.714, *t* = 9.315, 均 *P*<0.05),而对照组 S I t 较治疗前明显恶化,差异均有统计学意义 (*t* = 4.842, *t* = 5.825, *t* = 5.648, 均 *P*<0.05);两组治疗 2、4、6wk 时 S I t 比较,差异均有统计学意义 (*t* = 4.436、6.763、11.658, 均 *P*<0.05)。治疗前,治疗后 2、4、6wk,两组 FL 比较,差异有统计学意义 ( $F_{\text{组间}} = 8.12$ ,  $F_{\text{时间}} = 9.28$ ,  $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 15.14$ , 均 *P*<0.05)。治疗前两组 FL 评分比较,差异无统计学意义 (*t* = 0.526, *P*>0.05);与治疗前相比,治疗 2、4、6wk 实验组 FL 评分均产生不同程度改善,差异均有统计学意义 (*t* = 5.763、5.653、3.542, 均 *P*<0.05),对照组与治疗前比较,FL 评分则明显恶化,差异均具有统计学意义 (*t* = 5.763、7.652、8.541, 均 *P*<0.05);两组治疗 2、4、6wk 时 FL 评分比较,差异均有统计学意义 (*t* = 3.873、7.762、9.065, 均 *P*<0.05),见表 1。

**2.2 两组治疗前后泪液蛋白比较** 治疗前,治疗后 2、4、6wk 两组溶菌酶含量比较,差异有统计学意义 ( $F_{\text{组间}} = 12.38$ ,  $F_{\text{时间}} = 10.72$ ,  $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 17.27$ , 均 *P*<0.05)。治疗前,治疗后 2、4、6wk 两组乳铁蛋白比较,差异有统计学意义 ( $F_{\text{组间}} = 10.93$ ,  $F_{\text{时间}} = 11.23$ ,  $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 20.83$ , 均 *P*<0.05)。治疗前,治疗后 2、4、6wk 两组淀粉酶活性比较,差异有统计学意义 ( $F_{\text{组间}} = 11.78$ ,  $F_{\text{时间}} = 14.95$ ,  $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 18.23$ , 均 *P*<0.05)。治疗前,治疗后 2、4、6wk 两组泪液总蛋白量比较,差异有统计学意义 ( $F_{\text{组间}} = 9.43$ ,  $F_{\text{时间}} = 10.43$ ,  $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 17.65$ , 均 *P*<0.05),见表 2。

治疗前两组溶菌酶含量、乳铁蛋白、淀粉酶活性和泪液总蛋白量无显著差别,差异均无统计学意义 (*t* = 8.425、9.532、9.672、5.267, 均 *P*>0.05);经过 6wk 的桑色素处理,实验组溶菌酶含量、乳铁蛋白、淀粉酶活性和泪液总蛋白量与治疗前相比没有显著变化,差异均无统计学意义 (*t* = 10.732、8.541、7.542、10.764, 均 *P*>0.05);而对照组在 6wk PBS 处理后与治疗前相比,溶菌酶含量、乳铁蛋白、淀粉酶活性和泪液总蛋白量都发生程度不一的降低,差异均有统计学意义 (*t* = 0.426、0.512、0.633、0.594, 均 *P*<0.05);治疗 2、4、6wk 后两组溶菌酶含量、乳铁蛋白、淀粉

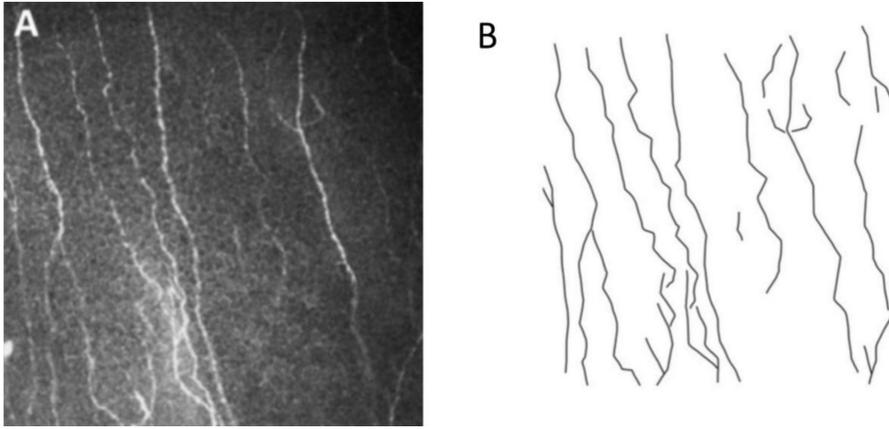


图1 共聚焦显微镜下神经纤维形态 A: AUTOCAD 截取的共聚焦显微图像内的神经纤维; B: 根据神经纤维描绘的折线。

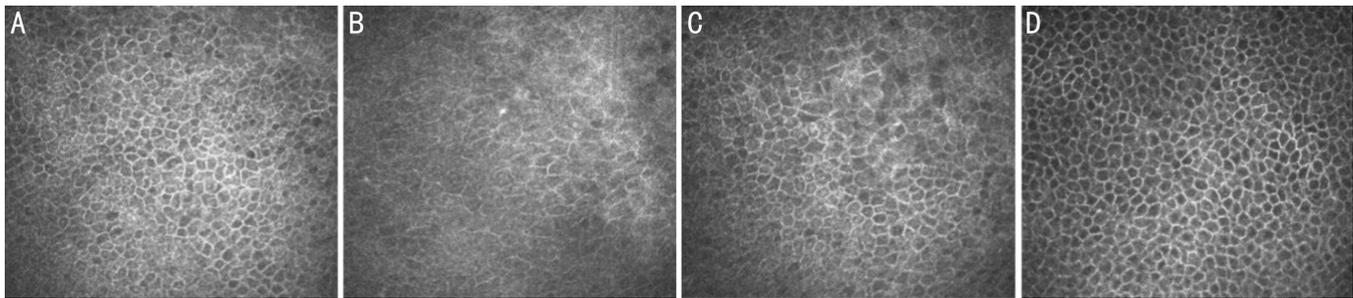


图2 两组雌性兔的角膜上皮基底细胞图片 A: 对照组治疗前; B: 对照组治疗 6wk 后; C: 实验组治疗前; D: 实验组治疗 6wk 后。

表2 治疗前后不同时间两组雌兔泪液蛋白比较

时间	对照组				实验组			
	总蛋白(g/L)	溶菌酶(g/L)	乳铁蛋白(g/L)	淀粉酶活性(IU)	总蛋白(g/L)	溶菌酶(g/L)	乳铁蛋白(g/L)	淀粉酶活性(IU)
治疗前	8.17±2.68	0.75±0.16	1.12±0.34	52.67±19.55	8.01±2.01	0.75±0.12	1.01±0.41	53.43±22.25
治疗后 2wk	7.54±2.32 <sup>c</sup>	0.62±0.17 <sup>c</sup>	0.92±0.35 <sup>c</sup>	47.43±16.74 <sup>c</sup>	8.09±2.17 <sup>a</sup>	0.89±0.14 <sup>a</sup>	1.11±0.33 <sup>a</sup>	54.54±19.14 <sup>a</sup>
治疗后 4wk	7.16±2.05 <sup>c</sup>	0.46±0.14 <sup>c</sup>	0.83±0.22 <sup>c</sup>	29.56±15.29 <sup>c</sup>	8.34±2.11 <sup>a</sup>	0.88±0.22 <sup>a</sup>	1.12±0.35 <sup>a</sup>	55.54±18.16 <sup>a</sup>
治疗后 6wk	5.71±1.91 <sup>c</sup>	0.42±0.11 <sup>c</sup>	0.62±0.16 <sup>c</sup>	24.55±17.48 <sup>c</sup>	8.19±2.01 <sup>a</sup>	0.86±0.11 <sup>a</sup>	1.17±0.32 <sup>a</sup>	56.17±17.32 <sup>a</sup>

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 治疗前。

酶活性和泪液总蛋白量相比, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

**2.3 两组治疗前后共聚焦显微镜观察图像分析** 治疗前可观察到角膜上皮基底细胞的边界较窄, 可见光亮炎性细胞(图 2A)。对照组治疗前, 治疗后 6wk, 可观察到上皮基底细胞的密度显著增大, 且上皮基底层观察到呈现为亮光样的炎性细胞(图 2A、B); 而实验组在治疗前可观察到呈现为亮光样的炎性细胞(图 2C), 但经 6wk 治疗后, 炎性细胞的数目显著减少, 而和正常雌性兔相比, 上皮基底细胞的密度则略有下降(图 2D)。经 6wk 治疗后, 对照组炎症细胞密度为  $321 \pm 91$  个/ $\text{mm}^2$ , 上皮基底细胞密度为  $4436 \pm 289$  个/ $\text{mm}^2$ , 而实验组炎症细胞密度为  $36 \pm 11$  个/ $\text{mm}^2$ , 上皮基底细胞密度为  $3219 \pm 223$  个/ $\text{mm}^2$ , 两组差异有统计学意义( $t = 5.477, 5.246$ , 均  $P < 0.05$ )。

对照组角膜的上皮下神经相对平直, 并且较多(图 3A), 6wk 后其密度较治疗前减小, 并可观察到多支神经纤维发生明显弯曲(图 3B)。实验组角膜上皮神经可见明显弯曲及分支(图 3C), 治疗 6wk 后, 其密度较治疗前增加, 弯曲度明显减小(图 3D)。

治疗前, 治疗后 2、4、6wk 两组神经纤维密度相比, 差异有统计学意义( $F_{\text{组间}} = 15.22, F_{\text{时间}} = 14.51, F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 18.73$ , 均  $P < 0.05$ )。治疗前, 治疗后 2、4、6wk 两组神经纤

维分支相比, 差异有统计学意义( $F_{\text{组间}} = 7.53, F_{\text{时间}} = 8.77, F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 10.24$ , 均  $P < 0.05$ )。治疗前, 治疗后 2、4、6wk 两组神经纤维曲率评分相比, 差异有统计学意义( $F_{\text{组间}} = 9.43, F_{\text{时间}} = 8.45, F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 12.84$ , 均  $P < 0.05$ )。

治疗前两组角膜上皮神经比较, 其密度大小、曲率评分、分支多少均未表现出明显差别, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。治疗 6wk 后, 对照组角膜上皮神经的曲率评分、分支多少和密度大小较治疗前明显改变, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与对照组和治疗前相比, 实验组神经纤维曲率评分降低, 分支数量显著减少, 神经纤维密度增加, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 3。

### 3 讨论

目前干眼症的发病人群正逐步朝着低龄化转变, 但缺乏雄激素可以导致 DED 的发生, 已有研究证明, 雄激素在调节眼表和附属器官的过程中发挥了很大的作用<sup>[17]</sup>。其效应具有分子生物学基础, 其调节涉及泪腺基因的表达<sup>[18]</sup>。受睾酮影响最大的基因包括与细胞生长, 增殖和代谢, 细胞通讯和运输, 核酸结合, 信号转导和受体活性相关的基因<sup>[18]</sup>。且雄激素的一些作用针对有丝分裂周期和 DNA 代谢的调节, 这些反应可能可以促进上皮细胞增殖<sup>[19]</sup>。

干眼造模完成后, 泪腺的解剖结构和生理功能遭受受明

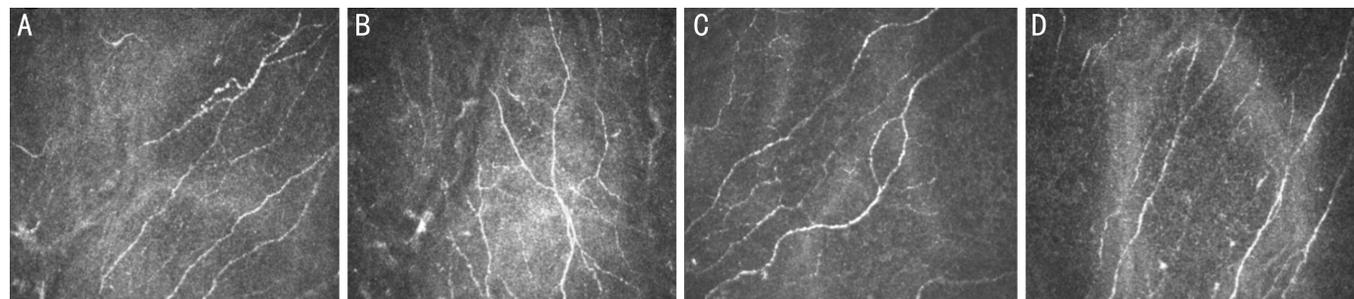


图3 两组雌性兔角膜上皮神经的图像 A:对照组治疗前;B:对照组治疗6wk后;C:实验组治疗前;D:实验组治疗6wk后。

表3 两组雌兔治疗后角膜上皮神经情况比较

分组	对照组			实验组		
	神经纤维密度 (mm/mm <sup>2</sup> )	神经纤维分支 (分支数/图)	曲率评分 (分)	神经纤维密度 (mm/mm <sup>2</sup> )	神经纤维分支 (分支数/图)	曲率评分 (分)
治疗前	16.02±2.13	7.34±1.11	3.34±0.36	15.23±2.02	7.34±1.18	3.32±0.43
治疗后2wk	14.21±2.02 <sup>°</sup>	8.69±1.42 <sup>°</sup>	3.41±0.35 <sup>°</sup>	16.37±2.11 <sup>a</sup>	7.12±0.92 <sup>a</sup>	3.21±0.46 <sup>a,c</sup>
治疗后4wk	13.21±2.01 <sup>°</sup>	9.23±1.51 <sup>°</sup>	3.61±0.42 <sup>°</sup>	17.53±2.16 <sup>a,c</sup>	7.15±1.17 <sup>a,c</sup>	2.95±0.34 <sup>a,c</sup>
治疗后6wk	12.61±2.14 <sup>°</sup>	10.67±1.79 <sup>°</sup>	3.67±0.33 <sup>°</sup>	18.36±2.84 <sup>a,c</sup>	7.06±0.89 <sup>a,c</sup>	2.75±0.41 <sup>a,c</sup>

注:<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组;<sup>°</sup>P<0.05 vs 治疗前。

显损害,其改变包括退行性改变,如生长和活动减少,腺体成分丢失,腺泡细胞大小减少,核体积和多态性减少,结缔组织增生,蛋白质水平中断,酶活性改变等<sup>[20]</sup>。同时,研究人员也报道,雄激素替代疗法可以逆转造模产生的影响,并可能引起组织结构,细胞活性和腺体分泌发生变化。这些改变可能包括腺泡上皮细胞活动活跃,出现丰富的糖蛋白分泌细胞,腺泡的增大,黏液和高度聚合的碳水化合物的生成,炎症的抑制以及泪液蛋白和液体分泌的变化<sup>[21-22]</sup>。因此,雄激素替代疗法在对因治疗上是较为有效的选择,但长期的激素应用有着严重的副作用,所以迫切需要寻找某种疗效佳且副作用相对较小的雄激素替代药物。

黄酮类物质可以发挥拟雄激素的作用,有望作为雄激素替代药物,在一定程度上减轻雄激素减少带来的副作用<sup>[23]</sup>。桑色素可以从一些中草药以及桑科植物中提取获得,利用它与雄激素化学构型的相似性,与细胞膜雄激素受体结合发挥拟雄激素作用,通过对角膜、细胞凋亡和泪腺局部炎症反应产生影响从而达到治疗干眼症的目的。本实验研究结果表明,实验组在经过桑色素滴眼液处理后,其S I t明显增加,FL评分明显下降,并且溶菌酶含量、乳铁蛋白、淀粉酶活性和泪液总蛋白含量则仍可与治疗前保持相似的水平,而对照组的上述各项指标相较未处理时则显著变差,这意味着造模后的雌兔在经过桑色素滴眼液的处理后,其干眼症状在很大程度上得到了缓解。我们推测,这一作用可能是由于作为黄酮类物质的桑色素增加了泪腺组织的TGF-β1的表达,减少了IL-1β和TNF-α的表达,从而缓解了泪腺局部炎症反应。同时,通过应用桑色素,泪腺组织中bcl-2 mRNA的表达得以提高,最终抑制泪腺组织的细胞凋亡。并且,桑色素可能发挥了和雄激素类似的作用,调节了泪腺一些蛋白质的分泌量,并在某种程度上减少了MHC II类抗原处理基因的泪腺表达,以及ASGPR1的表达<sup>[24]</sup>。

综上所述,桑色素滴眼液在一定程度上对消除围绝经期雌兔干眼的症状和维持泪液蛋白成分有一定作用,而且由于其给药方便,副反应较少,致使在未来临床应用中患者可能具有较高的依从性,因此具有广泛的临床应用价值。但是,对于桑色素滴眼液的临床应用,还需进一步的试验和验证。

#### 参考文献

- 1 邵毅. 国际干眼新共识(TFOS DEWS II)解读. 眼科新进展 2018;38(1):1-12
- 2 晏晓明. 解读国际泪膜与眼表协会2017年干眼专家共识中的干眼流行病学. 中华实验眼科杂志 2019;37(3):226-228
- 3 Titiyal JS, Falera RC, Kaur M, et al. Prevalence and risk factors of dry eye disease in North India: Ocular surface disease index-based cross-sectional hospital study. *Indian J Ophthalmol* 2018;66(2):207-211
- 4 Ferrero A, Alassane S, Binquet C, et al. Dry eye disease in the elderly in a French population-based study (the Montrachet study: Maculopathy, Optic Nerve, nuTRition, neuroAsCular and HEArT diseases): Prevalence and associated factors. *Ocul Surf* 2018;16(1):112-119
- 5 May M, Bakkar, Wisam A, et al. Epidemiology of symptoms of dry eye disease (DED) in Jordan: A cross-sectional non-clinical population-based study. *Cont Lens Anterior Eye* 2016;39(3):197-202
- 6 Sullivan DA, Rocha EM, Aragona P, et al. TFOS DEWS II sex, gender and hormones report. *Ocul Surf* 2017;15(3):284-333
- 7 Li L, Kang Q, Wang S, et al. Effects of androgen on ultrastructure of corneal epithelium and function of the tear film in BALB/c mice. *Cornea* 2015;34(3):334-341
- 8 Yu A, Wang J, Xue XS, et al. Theoretical study of the perietical disulfide bridge substituent effects on the antioxidant properties of naphthyridine diol derivatives. *J Phys Chem A* 2010;114(2):1008-1016
- 9 袁晴, 马明洋, 邹雪香, 等. 羊膜泪道支架预防围绝经期雌兔干眼症. 中国老年学杂志 2018;38(16):131-134
- 10 刘焱, 高智席, 黄成. HPLC-CL法测定桑叶中芦丁和桑色素. 安徽农业科学 2008;36(21):9128-9129
- 11 周倩. 新疆黑桑红色素提取工艺、化学总成分与初步应用的研究. 新疆医科大学 2015

- 12 Lemp MA. Report of the national eye institute /industry workshop on clinical trials in dry eyes. *GLAO J* 1995;21(4):221-232
- 13 马明洋, 袁晴, 刘启, 等. 羊膜泪道支架预防去势雄兔干眼症的实验研究. *眼科新进展* 2017;37(8):709-713
- 14 Chen ZY, Jie Y, Yu GY, *et al.* Treatment of severe keratoconjunctivitis sicca by parotid duct transposition after tympanic neurectomy in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52 ( 9 ): 6964-6970
- 15 何丽琴, 邹晶, 邵毅, 等. 春季角结膜炎活动期眼表和泪液蛋白的临床研究. *眼科新进展* 2015;35(12):1137-1140
- 16 Ma MY, Yuan Q, Ye L, *et al.* An experimental study of amniotic lacrimal duct stents in the treatment of perimenopausal female rabbits with dry eye. *Mol Med Rep* 2019;19:1056-1064
- 17 Elisabeth M. The Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Dry Eye Disease. *Dtsch Arztebl Int* 2015;112(5):71-81
- 18 Sullivan DA, Jensen RV, Suzuki T, *et al.* Do sex steroids exert sex-specific and/or opposite effects on gene expression in lacrimal and meibomian glands? *Mol Vis* 2009;15:1553-1572
- 19 Aakalu VK, Parameswaran S, Maienschein-Cline M, *et al.* Human Lacrimal Gland Gene Expression. *PLoS One* 2017;12(1):e0169346
- 20 Schaumberg DA, Dana R, Buring JE, *et al.* Prevalence of dry eye disease among US men: estimates from the Physicians' Health Studies. *Arch Ophthalmol* 2009;127(6):763-768
- 21 Richards SM, Liu M, Sullivan BD, *et al.* Gender-related differences in gene expression of the lacrimal gland. *Adv Exp Med Biol* 2002; 506: 121-127
- 22 Kao WWY, Wang IJ, Spaulding AG, *et al.* Overexpression of Biglycan Induces Ocular Surface Disorders in Ktenpr-Bgn Transgenic Mice (abstract). *Cornea* 2000;19(6):S98
- 23 Yao XL, Peng QH, Peng J, *et al.* Effects of extract of *Buddleja officinalis* on partial inflammation of lacrimal gland in castrated rabbits with dry eye. *Int J Ophthalmol* 2010;3(2):114-119
- 24 Siagris D, Pharmakakis N, Christofidou M, *et al.* Keratoconjunctivitis sicca and chronic HCV infection. *Infection* 2002;30(4):229-233