

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.23.004

文章编号: 1005-8982(2016)23-0016-05

论著

玻璃酸钠和 Omega-3 必需脂肪酸混合滴眼液 对去势雄兔干眼症模型的疗效观察

刘荣, 刘长明, 崔乐乐, 周正, 韦晓丹
(河北省唐山工人医院 眼科, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 探讨玻璃酸钠和 Omega-3 必需脂肪酸(Omega-3 EFAs)混合滴眼液对去势雄兔干眼症治疗的有效性。**方法** 将 15 只新西兰成年雄兔随机分为正常对照组(A)、非治疗组(B)、玻璃酸钠治疗组(C)、Omega-3 EFAs 治疗组(D)、玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 联合治疗组(E), 每组 3 只。对 B、C、D、E 组行去势术复制动物模型, 造模成功后 C、D、E 组雄兔双眼分别以玻璃酸钠滴眼液、Omega-3 EFAs 滴眼液、玻璃酸钠及 Omega-3 EFAs 混合滴眼液治疗, 每日 10 次, 连续 1 个月。全部实验兔行 Schirmer 1 试验, 测定泪膜破裂时间, 行角膜荧光素染色评分, Western blot 检测兔泪腺组织中的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达。**结果** 各组指标经 LSD- t 检验显示, 药物干预后玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合滴眼液组泪液分泌量、泪膜稳定性高于其他实验组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 泪腺组织内 TNF- α 的表达低于其他实验组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 局部应用玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合滴眼液治疗去势雄兔干眼症可明显改善雄兔眼表特征, 降低泪腺组织 TNF- α 的表达。

关键词: 干眼症; 玻璃酸钠; Omega-3 必需脂肪酸; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R777.2

文献标识码: A

Effects of mixed eye drops of omega-3 essential fatty acids and sodium hyaluronate on ocular surface of dry eye model of castrated male rabbits

Rong Liu, Chang-ming Liu, Le-le Cui, Zheng Zhou, Xiao-dan Wei
(Department of Ophthalmology, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the efficacy of the topical application of omega-3 essential fatty acids (EFAs) and sodium hyaluronate mixture in a rabbit model of experimental dry eye (EDE). **Methods** Fifteen healthy New Zealand rabbits were randomly divided into 5 groups with 3 rabbits in each group, i.e. normal group (A), non-treatment group (B), sodium hyaluronate therapy group (C), omega-3 EFAs therapy group (D), and mixed sodium hyaluronate and omega-3 EFAs therapy group (E). The rabbits in the groups B, C, D and E had bilateral testis and epididym resected. After successful building of xerophthalmia model, the groups C, D and E were treated with sodium hyaluronate, omega 3 EFAs and combined sodium hyaluronate and omega 3 EFAs in two eyes, 10 times a day for a month. All the experimental rabbits received Schirmer I test, the breakup time of tear film and corneal fluorescein staining scores were determined. Tumor necrosis factor α (TNF- α) in lacrimal tissue was detected by Western blot. **Results** LSD- t test showed the rabbits in the group E showed a significant improvement in lacrimal secretion and tear film stability compared with other groups, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). A significant decrease in the TNF- α level was observed in the group E, the differences were statistically significant from other groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Topical application of mixed eye drops containing sodium hyaluronate and omega 3 EFAs could improve the ocular

收稿日期: 2016-03-17

surface signs and decrease the expression of TNF- α in lacrimal gland of xerophthalmia model of castrated male rabbits.

Keywords: dry eye; sodium hyaluronate; omega-3 essential fatty acids; TNF- α

干眼症(dry eye, DE)是一种常见的具有潜在危害的眼表疾病,包括多种眼表症状如眼表干燥、发红、烧灼感、视力波动,以及眼表病理学改变如角膜上皮的缺损和泪腺细胞的鳞状化生。研究显示^[1-2],造成 DE 的重要机制是泪膜功能障碍导致的炎症^[3]。Omega-3 必需脂肪酸(Omega-3 essential fatty acids, Omega-3 EFAs)是具有多种生物学功能的必需脂肪酸,研究证实它具有调节抗氧化酶的活性,阻断炎症因子的基因编码的作用^[4-5],包括白介素-1 α 、白介素-6、干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)等^[6]。玻璃酸钠滴眼液是临床治疗干眼症的常用药物,但是单独使用并不能完全解决干眼症症状。本实验用去势雄兔复制干眼症模型,探讨玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合滴眼液治疗干眼症的疗效及对眼表炎症因子表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物和药物

健康 1 月龄新西兰雄兔 15 只,体重(0.5 \pm 0.2)kg,由天津医科大学动物中心提供。玻璃酸钠滴眼液(德国 URSAPHARTM Arzne),Omega-3 EFAs(美国 Sigma Aldrich 公司),泪液分泌测定滤纸、荧光素钠染色剂(天津晶明新技术开发有限公司),山羊抗兔 TNF- α 抗体、 β -actin、人抗山羊 IgG(Santa Cruz),PIPA 蛋白裂解液、Trizol 试剂(碧云天生物技术研究所),抗体稀释液、蛋白封闭液(北京博奥森公司),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(北京普利来基因技术有限公司),PVDF 膜(北京索莱宝科技有限公司),蛋白质 Marker(Fermentas 公司),甲醇、浓盐酸等其他化学试剂均为国产。

1.2 动物模型复制

将实验兔固定于兔架上,氯胺酮(0.05 ml)50 mg/kg 肌内注射全身麻醉,阴囊局部加用盐酸利多卡因局部麻醉,将一侧睾丸由腹腔挤入阴囊,用刀片作一阴囊切口,用力挤出睾丸,结扎精索静脉及输精管后,切除睾丸及附睾,另一侧睾丸及附睾同法切除,术后预防感染。检查均由同一人完成,每次检查时间、地点、照明亮度、湿度及温度相同,于实验前和实验后 2、3、4 周,2、3 个月行 Schirmer I 试验、BUT 检测及角膜荧光素染色。

1.3 实验分组及给药方法

0.2% Omega-3 EFAs 溶液配制:0.2% Omega-3 EFAs 溶于三蒸水中;玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合液配制:0.2% Omega-3 EFAs 溶于玻璃酸钠滴眼液中。将 15 只新西兰成年雄兔随机分为正常对照组(A)、非治疗组(B)、玻璃酸钠治疗组(C)、0.2% Omega-3 EFAs 治疗组(D)、玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合治疗组(E),每组 3 只。对 B、C、D、E 组行去势术复制动物模型,术后 3 个月动物模型成功复制后,C、D、E 组雄兔双眼分别以玻璃酸钠滴眼液、0.2% Omega-3 EFAs 滴眼液、玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合滴眼液治疗(混合后滴眼),每日自 9~18 点每小时滴双眼 1 次,每次 30 μ l,每日 10 次,连续 1 个月。

1.4 检查方法

①Schirmer I 试验:用 5 mm \times 35 mm 泪液检测滤纸条,一端弯折 5 mm,置于下睑外侧 1/3 泪腺囊内,余部分悬垂于皮肤表面。5 min 后测量滤纸湿润长度。②泪膜破裂时间(BUT):荧光素钠滤纸生理盐水浸润后涂抹于模型兔下睑泪腺囊内,眼睑闭合数次使荧光素均匀分布于角膜表面,于钴蓝光下观察,从最后一次瞬目开始计时,记录泪膜上出现第一个破裂点的时间。③角膜荧光素染色评分(FL):荧光素染色后钴蓝光下观察,采用 0~12 分制方法记录染色结果,将角膜分为 4 个象限,0 分:无染色(-);1 分:1~30 个点状着色;2 分:>30 个点状着色但染色未融合;3 分:角膜点状着色融合、丝状物及溃疡等。

1.5 Western blot 检测 TNF- α 的表达

1.5.1 组织总蛋白提取 每组雄兔以空气栓塞法处死后立即取适量泪腺组织(1~2 ml),反复用单去污剂裂解液(PMSF)400 μ l 裂解制成组织匀浆(于冰上),将组织匀浆移至 1.5 ml 离心管中离心(12 000 r/min \times 5 min,4 $^{\circ}$ C),取上清液置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。

1.5.2 Western blot 步骤 配制分离胶及浓缩胶,灌胶上样,调整各组蛋白的含量约 50 μ g,加入 200 μ l EP 管中,每管 7 μ l 的蛋白上样缓冲液,调整体积为 45 μ l,电泳(先恒压 80 V,待溴酚蓝跑至分离胶后改为横流 35 mA,距离底部 0.5 cm 时,停止电泳),转膜:PVDF 膜浸泡于甲醇中 60 min 激活,转膜条件横

流 200 mA, 60 min。取出 PVDF 膜放入 TBST 中漂洗 (3 × 10 min), 将膜浸入封闭液中, 置于摇床上室温封闭 60 min。一抗孵育 4℃ 过夜约 12 h, 室温下继续孵育 2 h。TBST 清洗 3 × 7 min。二抗孵育: 将膜放入稀释好的二抗 (1 : 1 000) 中置于摇床上室温孵育 3 h。TBST 清洗 3 × 7 min。按比例 (1 : 1) 配好显色液, 将膜平铺于玻璃板上, 吸取适量显色液滴加于膜上, 反应约 1 min 后, 放入凝胶成像分析仪器中, 曝光照相保存。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模成功

去势模型兔术后 3 周, 泪液分泌开始减少, 泪膜稳定性下降, 3 个月后, 模型雄兔体重较对照组无明显变化, 角膜干燥, 角膜表面染色, 泪液分泌及泪膜稳定性降低, 并呈时间依赖性, 与对照组相比差异有统计学意义。去势后 3 个月雄兔作为去势干眼症模型用于实验。

2.2 实验检测

2.2.1 Schirmer I 治疗后, 玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合治疗组 (E) 与玻璃酸钠治疗组 (C)、0.2% Omega-3 EFAs 治疗组 (D) 以及非治疗组 (B) 比较, 经 LSD-*t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 14.225, 10.060$ 和 $14.361, P = 0.000$); 玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合治疗组 (E) 与正常对照组 (A) 比较, 差异无统计学意义 ($t = 0.624, P = 0.567$)。见

附表。

2.2.2 BUT 经 LSD-*t* 检验, 玻璃酸钠治疗组 (C)、0.2% Omega-3 EFAs 治疗组 (D)、玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合治疗组 (E) 经药物治疗后泪膜稳定性均有提高, 差异有统计学意义 ($t = 19.579, 16.232$ 和 $22.182, P = 0.000$); 玻璃酸钠治疗组 (C)、0.2% Omega-3 EFAs 治疗组 (D)、玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合治疗组 (E) 与非治疗组 (B) 比较泪膜稳定性差异有统计学意义 ($t = 6.182, 5.173$ 和 $10.750, P = 0.004, 0.013$ 和 0.000), 玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合治疗组 (E) 与正常对照组 (A)、玻璃酸钠治疗组 (C) 比较泪膜稳定性差异无统计学意义 ($t = 1.249$ 和 $0.981, P = 0.280$ 和 0.382)。见附表。

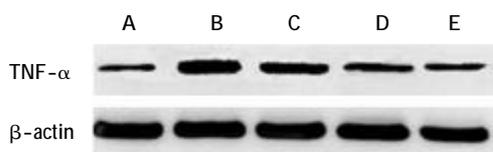
2.2.3 FL 经 LSD-*t* 检验, 玻璃酸钠治疗组 (C)、0.2% Omega-3 EFAs 治疗组 (D)、玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合治疗组 (E) 药物治疗后角膜染色较治疗前减少 ($t = 4.949, 2.828$ 和 $7.002, P = 0.008, 0.047$ 和 0.002)。见附表。

2.2.4 TNF- α 表达 相应药物治疗后, 玻璃酸钠治疗组 (C)、0.2% Omega-3 EFAs 治疗组 (D)、玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合治疗组 (E) 与非治疗组 (B) TNF- α 表达经 LSD-*t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 5.014, 10.557$ 和 $12.277, P = 0.007, 0.000$ 和 0.000), 0.2% Omega-3 EFAs 治疗组 (D) 及玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合治疗组 (E) 治疗后 TNF- α 表达与正常对照组 (A) 相当 ($t = 1.633$ 和 $0.229, P = 0.178$ 和 0.830), 玻璃酸钠和 0.2% Omega-3 EFAs 混合治疗组 (E) 与玻璃酸钠治疗组 (C) TNF- α 表达比较, 差异有统计学意义 ($t = 12.379, P = 0.000$)。见附表和附图。

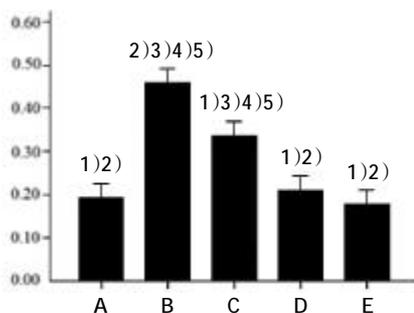
附表 各组治疗前后眼表实验检测结果及泪腺组织内 TNF- α 表达比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	Schirmer I		BUT		FL		TNF- α
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗后
A 组	18.067 ± 0.513	17.467 ± 1.150 ¹⁾²⁾³⁾	15.000 ± 1.000	15.000 ± 1.732 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0	0 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾	0.195 ± 0.010 ¹⁾²⁾
B 组	3.700 ± 0.781	3.334 ± 1.305 ²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾	5.000 ± 1.000	2.000 ± 1.000 ²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾	7.333 ± 1.528	9.000 ± 1.000 ²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾	0.461 ± 0.038 ²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾
C 组	4.800 ± 0.656	15.367 ± 0.666 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾	4.333 ± 0.577	11.667 ± 2.517 ¹⁾⁴⁾⁶⁾	6.334 ± 1.528	1.667 ± 0.577 ¹⁾³⁾⁴⁾⁶⁾	0.338 ± 0.019 ¹⁾³⁾⁵⁾⁶⁾
D 组	4.633 ± 0.551	13.300 ± 1.114 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾	4.333 ± 0.882	10.000 ± 1.000 ¹⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾	6.667 ± 0.577	3.667 ± 0.577 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾	0.212 ± 0.015 ¹⁾²⁾
E 组	4.300 ± 0.800	18.067 ± 1.206 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	4.667 ± 0.577	13.334 ± 1.528 ¹⁾³⁾⁴⁾	6.000 ± 1.000	1.333 ± 0.577 ¹⁾³⁾⁴⁾	0.180 ± 0.0113 ¹⁾²⁾
F 值	252.08	87.27	94.8	41.94	-	-	3.64
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-	0.0442

注: 1) 与非治疗组 (B) 比较, $P < 0.05$; 2) 与玻璃酸钠治疗组 (C) 比较, $P < 0.05$; 3) 与 Omega-3 EFAs 治疗组 (D) 比较, $P < 0.05$; 4) 与同组治疗前比较, $P < 0.05$; 5) 与玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合治疗组 (E) 比较, $P < 0.05$; 6) 与正常对照组 (A) 比较, $P < 0.05$



A Western blot 条带图



B 各实验组 TNF-α 的表达

1)与非治疗组(B)比较, $P<0.05$;2)与玻璃酸钠治疗组(C)比较, $P<0.05$;3)与正常对照组(A)比较, $P<0.05$;4)与 Omega-3 EFAs 治疗组(D)比较, $P<0.05$;5)与玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合治疗组(E)比较, $P<0.05$

附图 检测泪腺组织中 TNF-α 的表达

3 讨论

炎症是干眼症发生、发展的重要因素,炎症因子的产生不仅可刺激淋巴细胞增生对泪腺造成免疫攻击,自身也会干扰泪腺的正常分泌。泪腺的腺泡细胞可以表现为一种抗原表达细胞,刺激淋巴细胞的增生,因此泪腺可能是最先具有免疫应答的组织,并产生异常调节^[7]。研究显示在干眼症患者泪腺组织中 TNF-α 的表达增高,而给予外生性 TNF-α,会抑制神经递质的释放,减弱泪腺的分泌,因此减少炎症因子的表达是干眼症治疗的重点^[8]。

Omega-3 EFAs 是一种天然的调节剂,除了可以调节抗氧化酶,如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及抑制促氧化酶的产生外,还可以通过向类花生四烯酸的转化代谢过程中调节炎症性和免疫应答^[7,9]。Omega-3 EFAs 的代谢产物包括 α 亚麻酸及它的去饱和产物二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid,EPA)和二十六碳六烯酸(docosahexaenoic acid,DHA)^[6]。EPA 是抗炎因子的前体,可抑制 IL-α、β 和 TNF-α 的生成。DHA 是具有神经保护作用的 D1 的前体,可以保护泪腺组织和眼表细胞免于由 TNF-α 介导的凋亡^[10]。实验证实^[6,9]单独使用 Omega-3 EFAs 可在细胞和分子水平减少炎症因子如 CD11b⁺、IL-1α 和 TNF-α 的表达。本实验结果证实单独使用 Omega-3 EFAs 组及玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合组均减少泪腺

组织内 TNF-α 的蛋白表达,两组间 TNF-α 的表达差异无统计学意义,说明 Omega-3 EFAs 可能有抑制眼表炎症的作用。

玻璃酸钠滴眼液广泛应用于干眼症的临床治疗中,玻璃酸钠具有非牛顿液体的特性和极好的生物相容性,其溶液具有高度的黏弹性,分子链越长,黏弹性越好,黏度随切变的增大而明显减小,即使药液的黏度很高,眼睑仍然可眨眼自如没有黏糊感。同时玻璃酸钠除润滑眼表面,改善眼表刺激症状外还可改善干眼症患者角膜表面规律从而改善其视功能并减轻畏光现象^[11-12],但单独使用玻璃酸钠滴眼液并不能完全解决干眼症患者的所有症状。本实验证实,单独使用玻璃酸钠治疗可有效地改善泪膜质量,减少角膜染色并可局部控制炎症,玻璃酸钠治疗组及玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合组在 BUT 和 FL 检测中差异无统计学意义。应用玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合滴眼液后有效改善干眼症雄兔临床症状并减少炎症因子的表达,角膜荧光素染色评分、泪腺组织内 TNF-α 均明显低于其他实验组,通过 Western blot 检测证实玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合制剂可明显降低炎症因子 TNF-α 的表达。

综上所述,玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合滴眼液可改善干眼症雄兔的角膜失代偿,减少炎症因子的产生。综合玻璃酸钠对角膜的保护作用和 Omega-3 EFAs 的抗炎作用,玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合滴眼液以协同的方式改善干眼症的症状和体征。实验证实,使用玻璃酸钠和 Omega-3 EFAs 混合滴眼液的临床治疗效果更好。

参 考 文 献:

- [1] STERN M E, PFLUGFELDER S C. Inflammation in dry eye[J]. Ocul Surf, 2004, 2(2): 124-130.
- [2] YOON K C, PARK C S, YOU I C, et al. Expression of CXCL9, -10, -11, and CXCR3 in the tear film and ocular surface of patients with dry eye syndrome[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(2): 643-650.
- [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.
- [4] DE ASSIS A M, RECH A, LONGONI A, et al. Omega3-Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed die t[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 361(1/2): 151-160.
- [5] TAKAHASHI M, TSUBOYAMA-KASAOKA N, NAKATANI T,

- et al. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPARalpha activation and ROS production[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282(2): G338-348.
- [6] RASHID S, JIN Y, ECOIFFIER T, et al. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye[J]. *Arch Ophthalmol*, 2008, 126(2): 219-225.
- [7] ROSENBERG E S, ASBELL P A. Essential fatty acids in the treatment of dry eye[J]. *Ocul Surf*, 2010, 8(1): 18-28.
- [8] OH H J, LI Z, PARK S H, et al. Effect of hypotonic 0.18% sodium hyaluronate eyedrops on inflammation of the ocular surface in experimental dry eye[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2014, 32(11): 4424-4428.
- [9] PINAZO-DURAN M D, GALBIS-ESTRADA C, PONS-VAZQUEZ S, et al. Effects of a nutraceutical formulation based on the combination of antioxidants and omega-3 essential fatty acids in the expression of inflammation and immune response mediators in tears from patients with dry eye disorders[J]. *Clin Interv Aging*, 2013, 8: 139-148.
- [10] ARAGONA P, BUCOLO C, SPINELLA R, et al. Systemic omega-6 essential fatty acid treatment and pge1 tear content in Sjogren's syndrome patients[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(12): 4474-4479.
- [11] LEKHANONT K, CHUCKPAIWONG V, VONGTHONGSRI A, et al. Effects of sodium hyaluronate on wavefront aberrations in dry eye patients[J]. *Optom Vis Sci*, 2014, 91(1): 39-46.
- [12] HASEGAWA T, AMAKO H, YAMAMOTO T, et al. Corneal-protective effects of an artificial tear containing sodium hyaluronate and castor oil on a porcine short-term dry eye model[J]. *J Vet Med Sci*, 2014, 76(3): 49-56.

(申海菊 编辑)