

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.11.006
文章编号: 1005-8982 (2024) 11-0034-09

实验研究·论著

枸杞糖肽对角膜碱烧伤小鼠角膜炎症反应及愈合的作用及其机制研究*

闫雅蓉¹, 刘菁华², 颜鑫霖², 井雅朋², 李轩³

[1. 天津医科大学 眼科临床学院, 天津 300070; 2. 南开大学医学院, 天津 300071;
3. 天津市眼科医院研究所(天津市眼科学与视觉科学重点实验室), 天津 300020]

摘要: **目的** 探讨枸杞糖肽(LbGp)在角膜碱烧伤损伤愈合中的作用及其机制。**方法** 根据治疗方式不同将45只健康、SPF级、6~8周、雄性C57BL/6J小鼠随机分为正常对照组(N组)、损伤对照组(PBS组)、LbGp治疗组(LbGp组),每组15只。PBS组和LbGp组小鼠右眼复制碱烧伤模型,采用点眼联合结膜下注射的方式分别给予PBS溶液或LbGp溶液(10 mg/mL)治疗。治疗后第3天采用裂隙灯显微镜及HE染色观察各组小鼠角膜上皮修复情况和角膜组织结构;实时荧光定量聚合酶链反应、Western blotting及免疫组织化学染色技术检测各组小鼠角膜组织NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、髓过氧化物酶(MPO)的表达及核转录因子 κ B(NF- κ B)的磷酸化水平。治疗后的第14天采用裂隙灯显微镜对角膜混浊程度进行评分,HE染色观察角膜组织结构。**结果** 治疗后第3天LbGp组小鼠角膜上皮愈合速度快于PBS组($P < 0.05$)。N组、PBS组及LbGp组的NF- κ B-p65、NLRP3、IL-1 β 及IL-6基因和蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),PBS组均高于N组($P < 0.05$),LbGp组均低于PBS组($P < 0.05$)。LbGp组角膜基质中MPO染色阳性的中性粒细胞的浸润较PBS组减轻。治疗后第14天LbGp组小鼠角膜混浊评分低于PBS组($P < 0.05$)。**结论** LbGp治疗可以抑制小鼠角膜碱烧伤后NF- κ B的激活及NLRP3、IL-1 β 的表达,从而减轻过度的炎症反应,促进小鼠角膜上皮再生及角膜结构恢复,有助于恢复角膜的透明性和完整性。

关键词: 角膜; 碱烧伤; 炎症反应; 枸杞糖肽; 核转录因子 κ B; NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3; 白细胞介素-1 β

中图分类号: R779.13

文献标识码: A

Effects and mechanisms of lycium barbarum glycopeptide on corneal inflammation and healing in alkali-burned mice*

Yan Ya-rong¹, Liu Jing-hua², Yan Xin-lin², Jing Ya-peng², Li Xuan³

[1. Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Medical College, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Tianjin Eye Hospital Institute (Tianjin Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science), Tianjin 300020, China]

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of lycium barbarum polysaccharide (LbGp) in corneal alkali burn healing. **Methods** Forty-five healthy SPF-grade male C57BL/6J mice aged 6-8 weeks were randomly divided into normal control group (N), injury control group (PBS) and LbGp treatment group (LbGp), with

收稿日期: 2023-11-25

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 82171024); 天津市科技计划项目(No: 20JCYBJC01450); 天津市医学重点学科(专科)建设项目(No: TJYXZDXK-016A)

[通信作者] 李轩, E-mail: xuanli08@yahoo.com; Tel: 15222764625

15 mice in each group. In the PBS and LbGp groups, mice were subjected to alkali burn injury in the right eye, and then treated with PBS solution or LbGp solution (10 mg/mL) via eye drops and subconjunctival injection, respectively. Three days after treatment, the corneal epithelial repair and corneal tissue structure were observed by slit lamp microscope and HE staining. The expression levels of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), myeloperoxidase (MPO) and the phosphorylation levels of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in corneal tissues of each group were detected using qRT-PCR, Western blotting, and immunohistochemistry. At 14 days after treatment, the degree of corneal opacity was scored with a slit lamp microscope; the corneal tissue structure was observed by HE staining. **Results** On the third day after treatment, the corneal epithelial healing rate of LbGp group was significantly faster than that of PBS group. The comparison of genes and proteins relative expression levels of NF- κ B-p65, NLRP3, IL-1 β , and IL-6 among the N group, PBS group, and LbGp group revealed statistically significant differences ($P < 0.05$). The expression levels were higher in the PBS group than in the N group ($P < 0.05$), while they were lower in the LbGp group compared to the PBS group ($P < 0.05$). Furthermore, the infiltration of MPO-positive neutrophils in the corneal stroma of the LbGp group was lower than that of the PBS group. On day 14 after treatment, the corneal opacity score in the LbGp group was significantly lower than that in the PBS group ($P < 0.05$). **Conclusion** LbGp treatment can inhibit the activation of NF- κ B and expression of NLRP3 and IL-1 β after corneal alkali burn in mice, inhibit excessive inflammatory response, and promote the regeneration of corneal epithelium and the recovery of corneal structure, which is conducive to the restoration of corneal transparency and integrity.

Keywords: corneal; alkali burn; inflammation; lycium barbarum glycopeptide; nuclear factor-kappa B; NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; interleukin-1 β

角膜是眼球前 1/6 的透明外层,是眼部屈光系统的重要组成部分,其直接暴露于外部环境,容易受到损伤和感染^[1]。碱烧伤是一种常见的化学损伤,与酸烧伤不同,碱烧伤能够迅速渗透到深层角膜基质中,导致深层角膜基质液化性坏死,并引起严重的炎症反应。此外,碱烧伤还会释放大量蛋白水解酶,破坏蛋白多糖和胶原蛋白^[2-3],可能导致角膜混浊、新生血管等并发症,进而严重影响患者视力^[4]。角膜损伤后,角膜上皮的修复至关重要,其可以显著降低感染、混浊或穿孔的风险^[1],在此过程中,会启动炎症反应来清除死细胞和细菌,并促进伤口修复。而核转录因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)/白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 是一个重要的炎症信号传导通路,该信号通路涉及到 NF- κ B、NLRP3 及 IL-1 β 的调节,而这个信号通路的异常激活可能导致过度的炎症反应,对组织和细胞产生不良影响^[5]。因此,在角膜损伤后的治疗过程中,通过抑制 NF- κ B/NLRP3/IL-1 β 信号通路中细胞因子的表达,减轻过度的炎症反应,对于促进角膜损伤的修复和恢复角膜组织的正常结构具有重要意义。

枸杞作为传统草药和食品补充品,已在中国和其他亚洲国家使用了近 20 世纪。最近研究发现,枸杞多

糖是其主要生物活性成分,具有多种药理作用,如抗炎、抗纤维化、抗氧化、抗癌、抗辐射等^[6-8]。其中,枸杞糖肽(LbGp)是从枸杞多糖中提取的活性成分,是由 5 个高分子多糖蛋白结合物(LbGp1-5)的混合物组成,主要由阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和 18 种氨基酸组成。在高效液相色谱(HPLC)差折射率图上,LbGp 分子量 1 000~10 000 Da 的组分占 50%~85%^[9]。此外,LbGp 的总成分中,蛋白质、中性多糖和糖醛酸分别占 20%~35%、20%~35% 和 5%~20%^[10]。有研究表明,LbGp 在结肠组织中具有抗炎作用^[11],同时对肾或睾丸组织损伤有保护作用^[12]。然而,在眼部疾病方面,LbGp 的研究相对较少,因此,本研究旨在通过复制小鼠角膜碱烧伤模型,探讨 LbGp 在角膜炎症反应及纤维化、促进角膜愈合中的作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及处理

选用 45 只健康、SPF 级、6~8 周龄、20~22 g 雄性 C57BL/6J 小鼠[斯贝福(北京)生物技术有限公司]。饲养条件:22~24 $^{\circ}$ C,相对湿度 45%~50%,12 h 明/暗交替循环,提供充足的食物和水。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010;实验动物使用许可证号:SYXK(津)2020-0008;动物实验获天津市南

开医院实验动物伦理委员会批准,伦理编号: NKYY-DWLL-2023-053。入组前使用裂隙灯显微镜仔细检查小鼠角膜及前房,确保角膜光滑透明,前房无任何病变。根据治疗方式不同,将 45 只小鼠随机分成正常对照组(N 组):未经任何处理的健康小鼠;损伤对照组(PBS 组):右眼复制碱烧伤模型后给予 PBS 溶液和妥布霉素眼膏治疗;LbGp 治疗组(LbGp 组):右眼复制碱烧伤模型后给予 LbGp 溶液和妥布霉素眼膏治疗。给药方式:结膜下注射结合滴眼(隔日交换),即在损伤当日进行结膜下注射 PBS 溶液或 LbGp 溶液(10 mg/mL)(5 μ L/眼,1 次/d)结合妥布霉素眼膏(1 次/d),次日用 PBS 溶液或 LbGp 溶液滴眼治疗(5 μ L/眼,3 次/d)结合妥布霉素眼膏(1 次/d)。随后依此类推交替进行治疗。观察时间点为治疗后的第 3 天和第 14 天。实验遵循《实验动物管理条例》。

1.2 实验试剂和仪器

LbGp(宁夏天仁枸杞生物科技股份有限公司院士工作站),滤纸片(杭州富阳北木浆纸有限公司),妥布霉素滴眼液和眼膏、盐酸丙美卡因滴眼液(比利时 Alcon 公司),PBS 溶液(北京索莱宝科技有限公司),磷酸化 NF- κ B(p-NF- κ B-p65)抗体(3033S,英国 Cell Signaling Technology 公司),NF- κ B-p65(8242S,英国 Cell Signaling Technology 公司),髓过氧化物酶(MPO)抗体(T62224S,艾比玛特医药科技上海有限公司),IL-1 β (ab9722,英国 Abcam 公司),NLRP3(ab270449,英国 Abcam 公司),GAPDH(ab181602,英国 Abcam 公司)。数码裂隙灯显微镜(苏州微清医疗有限公司),体式显微镜(德国 Zeiss 公司),组织固定液(江苏世泰实验器材有限公司),RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司),荧光素钠眼科检查试纸(天津晶明新技术开发有限公司)。

1.3 角膜碱烧伤模型的复制

实验开始前,小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(70 mg/kg)麻醉,同时用盐酸丙美卡因滴眼液滴于右眼进行局部麻醉。然后,将直径 2 mm 的滤纸片浸透于 1 mol/L 的氢氧化钠 NaOH 溶液中,将滤纸片上多余液体吸干后,将其放置于小鼠右眼角膜中央,保持 10 s。随后立即撤去滤纸片,并用 20 mL 生理盐水冲洗眼表及结膜囊,实验结束后涂妥布霉素滴眼膏预防感染。

1.4 免疫组织化学染色

在治疗后的第 3 天和第 14 天对小鼠注射过量麻醉药物,并用颈椎脱臼法处死。迅速摘取小鼠眼球立即放入含有 1 mL 组织固定液的 EP 管中(室温固定 24~48 h)。将固定好的小鼠眼球进行酒精浓度梯度及二甲苯梯度脱水处理,然后石蜡包埋,制成 4 μ m 病理切片。通过 HE 染色,观察角膜各层细胞的结构和形态。同时,采用免疫组织化学染色法对治疗后第 3 天的组织切片进行 MPO(1:1 000 稀释)及 IL-1 β (1:500 稀释)染色,观察 3 组小鼠角膜中 MPO 和 IL-1 β 蛋白表达。

1.5 Western blotting 检测角膜组织 p-NF- κ B-p65、NF- κ B-p65、NLRP3 蛋白表达

治疗后第 3 天,小鼠注射过量麻醉药物,并用颈椎脱臼法处死,取下完整角膜(每组 3 个样本),放入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液中裂解(4 $^{\circ}$ C、15 min)。超声处理后,对悬液进行低温高速离心(10 min),吸取富含蛋白的上清液,并使用蛋白标准(5 mg/mL BSA)试剂盒测定所得蛋白溶液的浓度。将收集的蛋白溶液与 5X SDS-PAGE 上样缓冲液混合,100 $^{\circ}$ C 煮 10 min,制得蛋白样本。取蛋白样品,上样至电泳仪加样孔内,分离 p-NF- κ B-p65、NLRP3、IL- β 及内参 GAPDH 蛋白条带,将各蛋白条带转至 PVDF 膜上。4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜,一抗包括 p-NF- κ B-p65(1:1 000 稀释)、NF- κ B-p65(1:1 000 稀释)、NLRP3(1:1 000 稀释)、IL-1 β (1:1 000 稀释)、GAPDH(1:1 000 稀释)。次日,在室温下孵育二抗(1:10 000 稀释)2 h。最后,用奥德赛萨双色红外激光成像系统(LI-COR,美国)进行曝光。使用 ImageJ 软件对图像进行分析。

1.6 实时荧光定量聚合酶链反应检测角膜组织 NF- κ B、NLRP3、IL-6、IL-1 β 基因表达

治疗后第 3 天,小鼠注射过量麻醉药物,并用颈椎脱臼法处死。取下完整角膜(每组 3 个样本),采用硅基质柱法提取 3 组小鼠角膜组织总 RNA,试剂盒购自天根生化科技有限公司。使用 M-MLV 逆转录酶试剂盒(Promega Corporation, Madison, 美国)合成 cDNA。反应体系:Oligo dT 2 μ L, RNA 提取液 25 μ L,逆转录反应(5 \times M-MLV Buffer 8 μ L、10 nM dNTP 4 μ L、M-MLV 逆转录酶 1 μ L)。反应条件:70 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,随后进行逆转录反应 42 $^{\circ}$ C、60 min,94 $^{\circ}$ C、10 min,4 $^{\circ}$ C 保持。实时荧光定量聚合

酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 采用 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa 生物科技股份有限公司, 大连) 和 LightCycler®480 II PCR 系统(德国 Roche 公司)进行。反应体系: SYBR Premix 10 μL, 正向引物 0.5 μL, 反向引物 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH₂O 8 μL。qRT-PCR 反应条件: 95 °C 预变性 15 s, 95 °C 变性 15 s, 59 °C 退火 30 s, 74 °C 延伸 30 s, 共 45 个循环。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

| 基因 | 引物序列 | 长度/bp |
|---------|----------------------------------|-------|
| β-actin | 正向: 5'-GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC-3' | 22 |
| | 反向: 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3' | 22 |
| NF-κB | 正向: 5'-ACACCTCTGCATATAGCGGC-3' | 20 |
| | 反向: 5'-CAGCCTTCTCCCAAGAGTCG-3' | 20 |
| NLRP3 | 正向: 5'-CTGGCATCTGGGAAACCT-3' | 19 |
| | 反向: 5'-CATCTGCAGCTGTTTTTCAGGG-3' | 21 |
| IL-6 | 正向: 5'-CCCCAATTTCGAATGCTCTCC-3' | 21 |
| | 反向: 5'-CGCACTAGGTTTGGCCGAGTA-3' | 20 |
| IL-1β | 正向: 5'-TGCCACCTTTTGACAGTGATG-3' | 21 |
| | 反向: 5'-TGATGTGCTGCTGCGAGATT-3' | 20 |

1.7 角膜混浊评分

治疗后第 14 天,使用数码裂隙灯显微镜观察小鼠角膜(每组 6 个样本),并采用 0~4 分制进行角膜混浊评分。评分标准:0 分为角膜完全透明,虹膜及瞳孔清晰可见;1 分为角膜轻微不透明,可见虹膜和瞳孔细节;2 分为角膜轻度混浊,隐约可见虹膜和瞳孔;3 分为角膜不透明,几乎不可见虹膜和瞳孔;4 分为角膜完全不透明,不可见虹膜和瞳孔。评分由 2 位研究人员独立进行,结果取平均值。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较用 *t* 检验或 Wilcoxon 检验; 多组比较用方差分析, 进一步两两比较用 SNK-*q* 或 Bonferroni 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠角膜修复的临床表现

治疗后第 3 天,数码裂隙灯显微镜观察结果显

示, LbGp 组小鼠角膜上皮缺损面积占比 (28.27%) 小于 PBS 组 (69.69%), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*t* = 8.256, *P* = 0.001)。HE 染色结果表明, PBS 组小鼠角膜上皮存在缺损, 上皮层细胞排列不规则且层数仅为 2~3 层。角膜基质水肿且有大量炎症细胞浸润。而 LbGp 组治疗后第 3 天角膜基质中的炎症细胞较 PBS 组少, 角膜基质水肿减轻。见图 1。

2.2 各组小鼠角膜组织内 MPO 的表达

免疫组织化学染色结果显示, 与 N 组角膜比较, PBS 组的角膜间质有大量 MPO 染色阳性的中性粒细胞浸润, 而 LbGp 组中性粒细胞浸润的程度明显降低。见图 2。

2.3 各组小鼠角膜组织 NF-κB、NLRP3、IL-1β 及 IL-6 mRNA 基因相对表达量比较

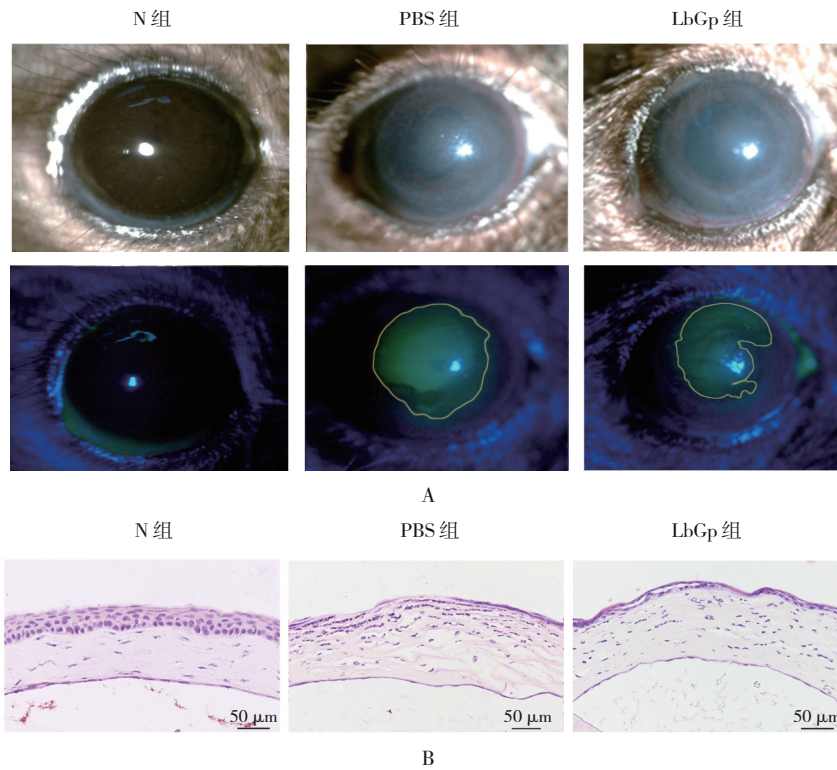
qRT-PCR 的结果显示, N 组、PBS 组及 LbGp 组的 NF-κB-p65、NLRP3、IL-1β 和 IL-6 mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05); 进一步两两比较, 经 SNK-*q* 或 Bonferroni 检验, PBS 组 NF-κB-p65、NLRP3、IL-1β 和 IL-6 mRNA 相对表达量较 N 组升高 (*P* < 0.05), 而 LbGp 组 NF-κB-p65、NLRP3、IL-1β 和 IL-6 mRNA 相对表达量较 PBS 组降低 (*P* < 0.05)。见表 2。

2.4 各组小鼠角膜组织 NF-κB、NLRP3、IL-1β 及 IL-6 蛋白相对表达量比较

Western blotting 检测结果显示, N 组、PBS 组及 LbGp 组的 p-NF-κB-p65/NF-κB-p65、NLRP3 和 IL-1β 蛋白相对表达量的比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05); 进一步两两比较, 经 SNK-*q* 或 Bonferroni 检验, PBS 组 p-NF-κB-p65/NF-κB-p65、NLRP3 和 IL-1β 蛋白相对表达量较 N 组升高 (*P* < 0.05), 而 LbGp 组 p-NF-κB-p65/NF-κB-p65、NLRP3 和 IL-1β 蛋白相对表达量较 PBS 组降低 (*P* < 0.05)。免疫组织化学染色结果显示, 与 N 组角膜比较, PBS 组的角膜间质有大量的 IL-1β 的表达。见表 3 和图 3、4。

2.5 各组小鼠角膜混浊程度评分及 HE 染色

治疗后第 14 天,裂隙灯显微镜观察结果显示, N 组小鼠角膜完全透明,瞳孔和虹膜纹理清晰可见; PBS 组小鼠角膜中度混浊,几乎不可见瞳孔和虹膜纹理;而 LbGp 组小鼠角膜呈轻度混浊,隐约可见瞳孔和虹膜纹理(见图 5A)。角膜混浊评分显



A: 治疗 3 d 后使用数码裂隙灯显微镜观察及荧光素钠染色的结果; B: 治疗 3 d 后小鼠角膜组织 HE 染色结果。

图 1 治疗 3 d 后小鼠角膜组织修复情况及 HE 染色结果

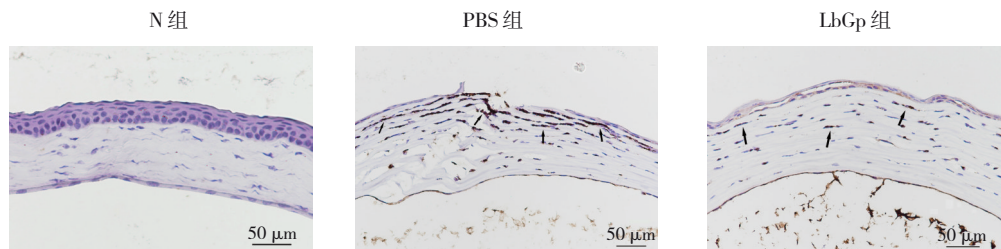


图 2 治疗 3 d 后各组小鼠角膜组织中 MPO 的表达 (免疫组织化学染色)

表 2 各组小鼠角膜组织 NF-κB-p65、NLRP3、IL-1β 及 IL-6 mRNA 相对表达量的比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | NF-κB mRNA | NLRP3 mRNA | IL-1β mRNA | IL-6 mRNA |
|--------|-------------|-------------|-----------------|-------------|
| N 组 | 1.00 ± 0.03 | 1.02 ± 0.23 | 1.01 ± 0.18 | 1.02 ± 0.23 |
| PBS 组 | 1.98 ± 0.28 | 4.97 ± 2.80 | 547.85 ± 436.23 | 5.22 ± 2.30 |
| LbGp 组 | 1.40 ± 0.42 | 1.40 ± 1.20 | 102.82 ± 136.18 | 2.01 ± 1.44 |
| F 值 | 22.404 | 12.266 | 12.149 | 15.537 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

表 3 各组小鼠角膜组织 p-NF-κB-p65、NLRP3 及 IL-1β 蛋白相对表达量的比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | p-NF-κB-p65/NF-κB-p65 蛋白 | NLRP3 蛋白 | IL-1β 蛋白 |
|--------|--------------------------|-------------|-------------|
| N 组 | 1.06 ± 0.16 | 0.46 ± 0.06 | 0.52 ± 0.61 |
| PBS 组 | 1.48 ± 0.14 | 1.14 ± 0.12 | 1.17 ± 0.07 |
| LbGp 组 | 1.08 ± 0.15 | 0.35 ± 0.11 | 0.77 ± 0.17 |
| F 值 | 7.228 | 54.331 | 25.463 |
| P 值 | 0.025 | 0.000 | 0.001 |

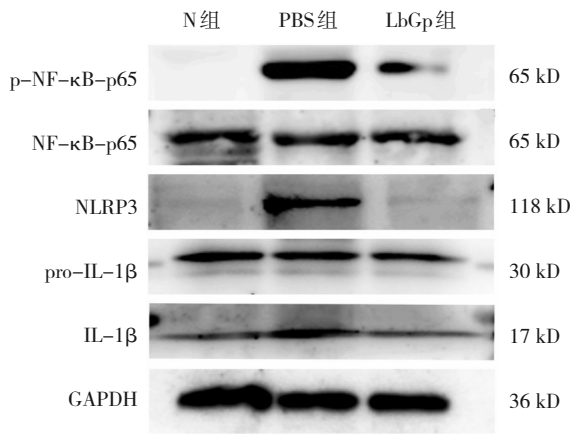


图3 各组小鼠角膜组织蛋白相对表达量的比较

示, PBS组角膜混浊评分(3.33 ± 0.62)分高于 LbGp组(1.63 ± 0.57)分, 经 Wilcoxon 检验分析, 差异有统计学意义($Z = -4.190, P = 0.000$)。HE 染色结果显示, N组小鼠角膜上皮细胞约 3 至 4 层, 基质胶原排列规则; PBS组和 LbGp组小鼠角膜上皮细胞仅 2 至 3 层, 细胞排列不规则, 其中, PBS组角膜基质中有大量肌成纤维细胞分布, LbGp组肌成纤维细胞减少, 细胞排列更加规则, 角膜结构保持更好(见图 5B)。

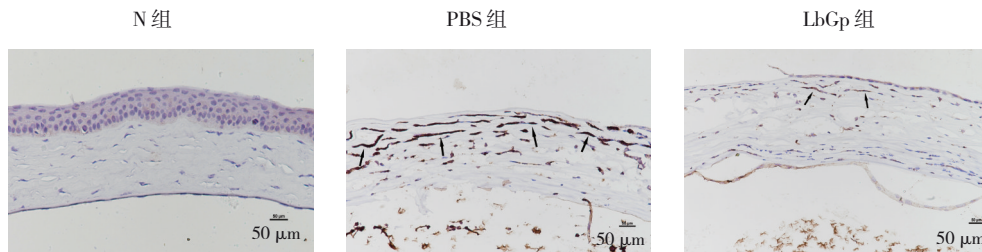
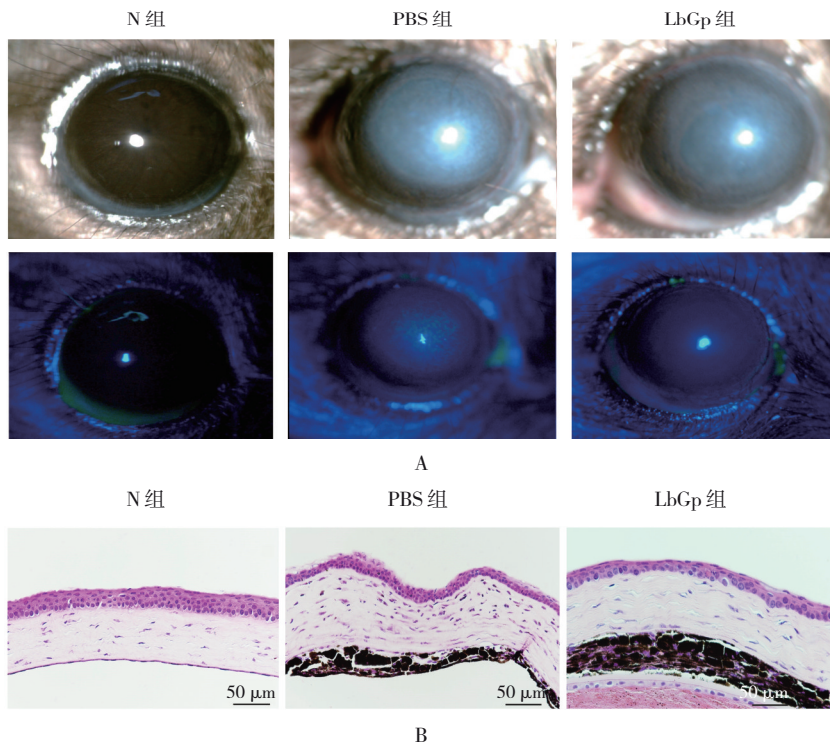


图4 治疗 3 d 后各组小鼠角膜组织中 IL-1β 的表达 (免疫组织化学染色)



A: 治疗 14 d 后使用数码裂隙灯显微镜观察及荧光素钠染色的结果; B: 治疗 14 d 后小鼠角膜组织 HE 染色结果。

图5 治疗 14 d 后小鼠角膜混浊情况和 HE 染色结果

3 讨论

碱烧伤是常见的眼外伤之一,在急诊科患者中约占53.6%^[13]。角膜碱烧伤后,修复过程中细胞因子过度表达会引起严重的炎症反应^[2],导致角膜混浊、新生血管等并发症^[14],严重影响视力。已有研究表明,通过抑制促炎因子和NF- κ B核移位,可以有效抑制角膜碱烧伤后的炎症反应^[15]。SAIKA等^[16]研究也表明,抑制NF- κ B激活可以治疗小鼠角膜碱烧伤。有研究报道,NLRP3炎症小体在角膜碱烧伤后的炎症反应中起重要作用,激活的NLRP3小体可引发Caspase-1活化,导致IL-1 β 的成熟和释放,阻断NLRP3通路可以减少炎症,从而提高角膜清晰度^[17]。因此,抑制NF- κ B激活及NLRP3、IL-1 β 表达来抑制炎症反应,可能是促进角膜碱烧伤后愈合的潜在策略。NF- κ B是一种转录因子,可调控炎症、细胞凋亡、应激反应、伤口愈合及血管生成等重要生物过程^[18]。在未活化状态下,NF- κ B与其抑制因子 κ B(I κ B)结合,处于细胞质中且无活性。当组织发生损伤时,I κ B被磷酸化后降解,释放NF- κ B-p65,随后经过进一步的磷酸化作用,NF- κ B-p65被激活并转运至细胞核内,结合特定的DNA序列,激活炎症和免疫相关基因的表达^[19]。NLRP3是一种NOD样受体蛋白,存在于细胞质中并能被激活^[20]。在细胞受到损伤、感染或其他激活信号时,NLRP3被激活并与适配蛋白ASC结合形成复合体。激活的NLRP3炎症小体可以激活Caspase-1,促使细胞内的pro-IL-1 β 和pro-IL-18转化为活性的IL-1 β 和IL-18并释放到细胞外发挥作用^[21]。这些活性的细胞因子进一步调节和放大炎症反应,参与免疫调节。NF- κ B通过调控IL-1 β 等分子间接影响NLRP3炎症小体的功能。激活NF- κ B后,会诱导IL-1 β 的合成,而IL-1 β 是NLRP3激活的组成部分^[22]。此外,NLRP3炎症小体的活化也可以影响NF- κ B通路。有研究表明,NLRP3激活可以诱导NF- κ B的活化,增强炎症反应。这是通过NLRP3小体释放促炎细胞因子(如IL-1 β 、IL-18)来实现的,这些细胞因子可以激活NF- κ B通路^[23]。NF- κ B和NLRP3之间存在复杂的相互调控关系,二者在免疫和炎症反应中密切合作,共同调控炎症因子的产生和细胞免疫反应。

有研究表明,枸杞多糖通过多个信号转导通路,如NF- κ B、PI3K-Akt-mTOR、p38-MAPK、Wnt- β -catenin、MLCK-MLC、PI3K-Akt-GSK-3 β 及MyD88等发挥抗炎和免疫调节、抗氧化、抗衰老、降血脂、抗辐射、抗肿瘤和神经保护的重要作用^[24-28]。在非酒精性脂肪性肝炎治疗过程中,枸杞多糖通过抑制NLRP3/6炎症小体通路和NF- κ B活化,减轻肝损伤^[29]。枸杞多糖中提取的活性成分LbGp具有抗炎作用,并且其较小的分子量有利于人体吸收。将药物直接注射到结膜下,可以使药物快速渗透到眼部组织中。然而,反复注射可能会增加炎症反应的风险,为了确保治疗的安全和有效,需要注意注射的频率和剂量。因此,本研究采用结膜下注射结合滴眼的方式给药,隔日交换,增加药物在眼部的局部浓度,提高治疗效果。在角膜碱烧伤修复过程中,减轻过度的炎症反应,对于恢复角膜的透明度至关重要。在碱烧伤后的早期阶段,角膜基质会出现炎症细胞^[30],其中中性粒细胞是首先出现的白细胞类型。中性粒细胞具有双重功能,既可以清除死亡细胞释放的细胞废物,又可能加剧失控或慢性炎症程度^[31]。因此,本研究探索了LbGp对中性粒细胞浸润的影响,通过检测治疗3d后各组小鼠角膜中一种特定的中性粒细胞蛋白(MPO)来评估角膜基质内中性粒细胞的数量。已有研究表明,角膜碱烧伤后,过度表达的IL-1 β 和大量的炎症细胞可能导致异常炎症和“继发性损伤”^[32],从而延迟角膜上皮创面的闭合。这可能导致肌成纤维细胞活性上调^[33]。这些细胞分泌细胞外基质成分^[34],导致角膜间质纤维化,最终造成角膜混浊^[35]。本研究复制角膜碱烧伤模型,并观察LbGp在角膜碱烧伤后愈合过程中的作用。为探讨LbGp在调控炎症反应中的作用机制,本研究检测治疗3d后各组小鼠角膜样本中p-NF- κ B-p65和NLRP3的表达。发现LbGp能够降低角膜碱烧伤后过度激活的p-NF- κ B-p65及NLRP3炎症小体水平,降低IL-1 β 表达水平,减少中性粒细胞浸润。这些结果表明碱烧伤3d后PBS组的小鼠角膜炎症反应明显,而LbGp有效地抑制了角膜碱烧伤后过度的炎症反应,有助于促进角膜上皮的修复,并恢复角膜组织的正常结构,从而减少角膜纤维化和混浊的发生。

本研究发现,在角膜碱烧伤后 3 d,小鼠角膜中 IL-6 表达升高,而 LbGp 治疗后抑制了 IL-6 的表达。过度表达的 IL-6 与肝纤维化相关,其可以导致肝纤维化相关分子基质金属蛋白酶和组织抑制剂 1 (TIMP) 失衡,促进细胞外基质沉积^[36-37]。LbGp 治疗 14 d 后,小鼠角膜混浊较 PBS 组减轻,因此笔者推测 LbGp 也可以通过抑制 IL-6 表达来抑制碱烧伤引起的角膜混浊。本研究对于理解 LbGp 在角膜碱烧伤治疗中的作用机制,以及角膜混浊的发生与抑制机制具有重要的临床意义。

综上所述,小鼠角膜碱烧伤后,NF- κ B、NLRP3、IL-1 β 、IL-6 等细胞因子被激活,引起过度的炎症反应,进而导致角膜纤维化。而 LbGp 的干预会抑制这些细胞因子和炎症细胞的活性,减轻继发的免疫反应和炎症反应,有利于恢复角膜的透明性和完整性。这表明 LbGp 可能是角膜损伤愈合和预防角膜混浊的一种新的潜在疗法。本研究结果为进一步探索 LbGp 在治疗角膜碱烧伤和其他炎症疾病方面的应用提供了有益的参考。

参 考 文 献 :

- [1] ZIAEI M, GREENE C, GREEN C R. Wound healing in the eye: therapeutic prospects[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 126: 162-176.
- [2] DUA H S, TING D S J, AL SAADI A, et al. Chemical eye injury: pathophysiology, assessment and management[J]. *Eye (Lond)*, 2020, 34(11): 2001-2019.
- [3] SPROGYTE L, PARK M, DI GIROLAMO N. Pathogenesis of alkali injury-induced limbal stem cell deficiency: a literature survey of animal models[J]. *Cells*, 2023, 12(9): 1294.
- [4] SHAHRIARY A P, SABZEVARI M M, JADIDI K M, et al. The role of inflammatory cytokines in neovascularization of chemical ocular injury[J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2022, 30(5): 1149-1161.
- [5] FABIANI C, SOTA J, TOSI G M, et al. The emerging role of interleukin (IL) -1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory and degenerative eye diseases[J]. *Clin Rheumatol*, 2017, 36(10): 2307-2318.
- [6] AMAGASE H, SUN B, BOREK C. Lycium barbarum (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum of healthy adults[J]. *Nutr Res*, 2009, 29(1): 19-25.
- [7] CHEN Z S, LU J H, SRINIVASAN N, et al. Polysaccharide-protein complex from Lycium barbarum L. is a novel stimulus of dendritic cell immunogenicity[J]. *J Immunol*, 2009, 182(6): 3503-3509.
- [8] JIN M L, HUANG Q S, ZHAO K, et al. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from Lycium barbarum L[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 54: 16-23.
- [9] LI R W, QU S, QIN M, et al. Immunomodulatory and antiviral effects of Lycium barbarum glycopeptide on influenza a virus infection[J]. *Microb Pathog*, 2023, 176: 106030.
- [10] DAI Y L, GUO J X, ZHANG B R, et al. Lycium barbarum (Wolfberry) glycopeptide prevents stress-induced anxiety disorders by regulating oxidative stress and ferroptosis in the medial prefrontal cortex[J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154864.
- [11] HUANG Y C, ZHENG Y H, YANG F M, et al. Lycium barbarum glycopeptide prevents the development and progression of acute colitis by regulating the composition and diversity of the gut microbiota in mice[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 921075.
- [12] ZHOU X L, ZHANG Z G, SHI H, et al. Effects of Lycium barbarum glycopeptide on renal and testicular injury induced by di(2-ethylhexyl) phthalate[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2022, 27(3): 257-271.
- [13] NAKANO Y, UCHIYAMA M, ARIMA T, et al. PPAR α agonist suppresses inflammation after corneal alkali burn by suppressing proinflammatory cytokines, MCP-1, and nuclear translocation of NF- κ B[J]. *Molecules*, 2018, 24(1): 114.
- [14] SAIKA S, MIYAMOTO T, YAMANAKA O, et al. Therapeutic effect of topical administration of SN50, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, in treatment of corneal alkali burns in mice[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(5): 1393-1403.
- [15] BIAN F, XIAO Y Y, ZAHEER M, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome pathway by butyrate improves corneal wound healing in corneal alkali burn[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 562.
- [16] SRIVASTAVA S K, RAMANA K V. Focus on molecules: nuclear factor-kappaB[J]. *Exp Eye Res*, 2009, 88(1): 2-3.
- [17] YU H, LIN L B, ZHANG Z Q, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 209.
- [18] ZHANG J, WU X Y, YU F S X. Inflammatory responses of corneal epithelial cells to Pseudomonas aeruginosa infection[J]. *Curr Eye Res*, 2005, 30(7): 527-534.
- [19] SHIMIZU H, SAKIMOTO T, YAMAGAMI S. Pro-inflammatory role of NLRP3 inflammasome in experimental sterile corneal inflammation[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9596.
- [20] ZHANG X, NING W, GAO G, et al. Bazedoxifene attenuates intestinal injury in sepsis by suppressing the NF- κ B/NLRP3 signaling pathways[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 947: 175681.
- [21] PENG L, WEN L, SHI Q F, et al. Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF- κ B/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 978.
- [22] CHENG J, ZHOU Z W, SHENG H P, et al. An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of Lycium barbarum polysaccharides[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 33-78.
- [23] JIANG S J, XIAO X, LI J, et al. Lycium barbarum polysaccharide-glycoprotein ameliorates ionizing radiation-

- induced epithelial injury by regulating oxidative stress and ferroptosis via the Nrf2 pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 204: 84-94.
- [24] WANG Y, SUN M Y, JIN H Y, et al. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on immunity and the gut microbiota in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 701566.
- [25] XIAO Z Y, DENG Q, ZHOU W X, et al. Immune activities of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. What do we know so far?[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 229: 107921.
- [26] QI Y C, DUAN G Z, FAN G H, et al. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on cell signal transduction pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 147: 112620.
- [27] XIAO J, WANG F, LIONG E C, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides improve hepatic injury through NF κ -B and NLRP3/6 pathways in a methionine choline deficient diet steatohepatitis mouse model[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt B): 1480-1489.
- [28] WILSON S E, MOHAN R R, MOHAN R R, et al. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2001, 20(5): 625-637.
- [29] KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(3): 159-175.
- [30] HARING R S, SHEFFIELD I D, CHANNA R, et al. Epidemiologic trends of chemical ocular burns in the United States[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2016, 134(10): 1119-1124.
- [31] GIRARD M T, MATSUBARA M, FINI M E. Transforming growth factor-beta and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991, 32(9): 2441-2454.
- [32] OTTO G. IL-1 β switches on kidney fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(8): 475.
- [33] PELLICORO A, RAMACHANDRAN P, IREDALE J P, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 181-194.
- [34] WYNN T A, VANNELLA K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis[J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 450-462.
- [35] MACK M. Inflammation and fibrosis[J]. *Matrix Biol*, 2018, 68-69: 106-121.
- [36] IANNITTI R G, NAPOLIONI V, OIKONOMOU V, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10791.
- [37] RODERFELD M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis[J]. *Matrix Biol*, 2018, 68-69: 452-462.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 闫雅蓉, 刘菁华, 颜鑫霖, 等. 枸杞糖肽对角膜碱烧伤小鼠角膜炎症反应及愈合的作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(11): 34-42.

Cite this article as: YAN Y R, LIU J H, YAN X L, et al. Effects and mechanisms of *lycium barbarum* glycopeptide on corneal inflammation and healing in alkali-burned mice[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(11): 34-42.