

# 环孢素 A 滴眼液对损伤角膜上皮水通道蛋白 3 表达的影响

刘 妍<sup>1</sup>, 贡雅洁<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(116033) 中国辽宁省大连市第三人民医院眼科;  
<sup>2</sup>(116027) 中国辽宁省大连市, 大连医科大学附属二院眼科  
作者简介:刘妍, 医师, 硕士, 研究方向:屈光手术。  
通讯作者:贡雅洁, 主任医师, 教授, 硕士, 研究方向:屈光手术。  
gyj123456@yahoo.com.cn  
收稿日期:2009-12-03 修回日期:2010-02-21

## Influence of cyclosporin A eye drops on aquaporin protein 3 expression in corneal epithelial injury

Yan Liu<sup>1</sup>, Ya-Jie Gong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Third People's Hospital of Dalian, Dalian 116033, Liaoning Province, China; <sup>2</sup> Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Ya-Jie Gong. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China. gyj123456@yahoo.com.cn  
Received:2009-12-03 Accepted:2010-02-21

### Abstract

- **AIM:** To learn the up-regulation of aquaporin protein 3 (AQP3) expression in the corneal epithelial healing process of mice by cyclosporin A (CsA) eye drops.
- **METHODS:** Models were established in the mechanical curettage method of corneal epithelium in mice to observe the repair of corneal epithelium. Corneas were treated with AQP3 immunohistochemical staining to observe the expression of AQP3.
- **RESULTS:** AQP3 expression could be seen in the basal cell layer of the cornea. After applications of 125, 250, 500, 1000mg/L CsA eye drops, the AQP3 expression was increased progressively. When corneal epithelium injury was treated with 500mg/L CsA eye drops, there was no statistical difference in healing size between the experimental group and control group 6 hours after injury, while 12, 18, 24 hours after injury there was a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ).
- **CONCLUSION:** 500mg/L CsA eye drops can accelerate mice corneal epithelial damage repair by increasing the expression of AQP3.
- **KEYWORDS:** cyclosporin A; corneal epithelial; wound healing; aquaporin protein 3

Liu Y, Gong YJ. Influence of cyclosporin A eye drops on aquaporin protein 3 expression in corneal epithelial injury. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(3):430-431

### 摘要

**目的:** 环孢素 A (Cyclosporin A, CsA) 滴眼液在小鼠角膜上

皮愈合过程中上调水通道蛋白 3 (aquaporin protein 3, AQP3) 表达的作用机制。

**方法:** 采用机械法刮除小鼠角膜上皮的方法建立模型, 观察角膜上皮修复情况。取角膜行 AQP3 免疫组化染色, 观察 AQP3 表达。

**结果:** 角膜上皮基底细胞层可见 AQP3 的表达。应用 125, 250, 500, 1000mg/L CsA 滴眼液点眼后 AQP3 的表达呈递增趋势。角膜上皮损伤后用 500mg/L CsA 滴眼液点眼, 损伤后 6h 实验组与对照组愈合面积比较无统计学差异, 而损伤后 12, 18, 24h 比较均有显著统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** 应用 500mg/L CsA 滴眼液点眼, 可通过增加 AQP3 表达而加快小鼠角膜上皮损伤的修复。

**关键词:** 环孢素 A; 角膜上皮; 创伤修复; AQP3

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.03.008

刘妍, 贡雅洁. 环孢素 A 滴眼液对损伤角膜上皮水通道蛋白 3 表达的影响. 国际眼科杂志 2010;10(3):430-431

### 0 引言

角膜上皮创伤是临床上极为常见的眼外伤。角膜屈光手术均可不同程度地造成角膜上皮损伤。完善的角膜创伤修复对于维持正常的视功能和屈光手术的矫正效果具有重要影响。我们采用机械法去除小鼠角膜上皮, 观察采用 500mg/L 环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 滴眼液治疗后角膜上皮愈合过程中 AQP3 的表达, 同时观察角膜上皮损伤的愈合过程, 阐明低浓度 CsA 滴眼液加速角膜上皮损伤修复的作用机制提供实验依据, 并为研究角膜创伤修复有效的治疗药物提供新的思路。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康雄性昆明种小鼠 95 只, 体质量 22 ~ 26g, 眼部检查无异常。小鼠 200g/L 乌拉坦溶液 1g/kg 腹腔注射全身麻醉, 用 2mm 直径的环钻在角膜中央标记创伤区, 机械法刮除标记区内的角膜上皮。

**1.2 方法** 将 35 只小鼠随机分为 7 组, 分别于角膜上皮损伤后接受 PBS 及 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000mg/L CsA 滴眼液点眼, 1 滴/次, 每 3h 1 次, 共 12h。60 只小鼠随机分为两组, 去角膜上皮后, 20g/L 荧光素钠染色, 即刻照相 1 次。对照组滴 PBS, 实验组滴 500mg/L CsA 后分别于 6, 12, 18, 24, 30h, 20g/L 荧光素钠染色后照相, 观察角膜上皮修复情况, 脱颈椎处死, 取角膜, 进行 AQP3 免疫组化染色, 光镜下观察 AQP3 表达情况, 并应用图像分析软件进行量化。用不规则面积软件分析, 测得修复速率。以 0h 创伤面积为 100%, 后续各时间点以其未修复区面积与 0h 创伤面积相比所得百分数来衡量其修复情况。

统计学分析: 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用两样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著意义。

## 2 结果

角膜上皮基底细胞层可见 AQP3 的表达,呈棕黄色颗粒状,上皮表层及基质无表达。小鼠角膜上皮损伤 12h 后,应用 125,250,500,1000mg/L CsA 滴眼液点眼,角膜上皮免疫组化 AQP3 的表达单位面积 IOD 值分别为  $0.0634 \pm 0.0265$ ,  $0.0761 \pm 0.0349$ ,  $0.0868 \pm 0.0204$  和  $0.1002 \pm 0.0245$  较 PBS  $0.0577 \pm 0.0152$  呈递增的趋势,而应用 2000,4000mg/L CsA 滴眼液时, AQP3 的表达则较 1000mg/L CsA 滴眼液无明显差异。对照组小鼠及应用 500mg/L CsA 滴眼液点眼的实验组小鼠角膜上皮均在创伤后 24~30h 内完成修复过程,损伤后 6h 实验组与对照组愈合面积比较无统计学差异,而损伤后 12,18,24h 实验组与对照组愈合面积比较均有显著统计学差异 ( $P < 0.05$ ,表 1)。小鼠损伤角膜上皮在 500mg/L CsA 滴眼液点眼后各时间点 AQP3 的表达均较对照组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,表 1)。

## 3 讨论

角膜上皮细胞层来源于外胚叶,厚约 50 $\mu$ m,由 5~6 层细胞所组成。上皮细胞层为复层上皮,细胞分为 3 种:基底细胞、翼状细胞、表层细胞。基底细胞层为一单层细胞,位置最深,细胞的底部紧接前弹力层,细胞的顶部与翼状细胞连接。免疫组化表明,AQP3 表达于正常小鼠及各组角膜上皮基底细胞层,呈棕黄色颗粒状。角膜上皮损伤后,面积较小的上皮缺损,可以在 24h 内修复;面积较大时,所需时间较长。随着分子生物学和细胞化学的进展,人们对角膜创伤修复过程的了解也越来越深入。业已证明其损伤修复过程是极其复杂的,是由多种细胞和众多细胞因子在时间和空间高度协调而完成的。水通道蛋白是存在于动植物及微生物细胞膜上转运水的特异孔道,它介导着不同类型细胞膜的跨膜水转运。目前已从哺乳动物的组织中鉴定出 11 种水通道蛋白,统称“aquaporins, AQP3”。AQP3 分布于多个组织器官,在眼结膜的上皮细胞、杯状细胞和腺样层,角膜上皮及内皮层含有丰富的 AQP3。AQP3 的上调可以增加水和甘油的转运,保证了角膜上皮愈合过程中的能量代谢需要。Levin 等<sup>[1]</sup>证明 AQP3 在角膜上皮甘油和水的转运起很大作用,且 AQP3 基因敲除小鼠的角膜上皮愈合时间延长。因此角膜上皮损伤的愈合过程中水通道蛋白的作用不可忽视。King 等<sup>[2]</sup>证明,水分子通道不存在开放或关闭的状态,其转运水和甘油的能力受水通道蛋白表达水平的显著影响。

CsA 是 1983 年在全球上市的一种作用很强、选择性很高的免疫抑制剂。它是从真菌发酵产物中提取的一种化合物,是含有 11 个氨基酸的环状多肽。近年来,CsA 广泛应用于免疫性疾病(如移植排斥反应,白塞氏病)和肿瘤(如白血病)。CsA 在不同疾病中的使用浓度是不同的,用于角膜移植术后的浓度是 10g/L 以上。刘常明等<sup>[3]</sup>证实低浓度 CsA 滴眼液对结膜干燥综合征有明显的治疗作用,治疗的机制包括抑制淋巴细胞,增加结膜杯状细胞的数量,上调结膜上皮细胞和杯状细胞及腺样层 AQP3 的表达量。Cho 等<sup>[4]</sup>研究证实,CsA 减轻眼表炎症,减少炎

表 1 小鼠角膜上皮损伤和 AQP3 表达  $\bar{x} \pm s$

t/h	缺损面积(%)		单位面积 IOD 值	
	对照组	实验组	对照组	实验组
0	-	-	$0.0624 \pm 0.0341$	$0.0652 \pm 0.0385$
6	$88.4 \pm 2.9$	$87.6 \pm 2.4$	$0.0597 \pm 0.0178$	$0.0749 \pm 0.0372^a$
12	$76.9 \pm 2.1$	$65.2 \pm 1.9^a$	$0.0645 \pm 0.0312$	$0.0872 \pm 0.0243^a$
18	$55.3 \pm 1.7$	$38.0 \pm 2.0^a$	$0.0635 \pm 0.0264$	$0.0892 \pm 0.0328^a$
24	$18.4 \pm 1.9$	$5.7 \pm 2.3^a$	$0.0586 \pm 0.0338$	$0.0884 \pm 0.0177^a$
30	-	-	$0.0619 \pm 0.0315$	$0.0887 \pm 0.0257^a$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

症反应对水通道蛋白的破坏,可以使水通道蛋白的表达上调。为了选取最合适的 CsA 滴眼液浓度,我们制造角膜上皮损伤的动物模型后,再应用不同浓度 CsA 滴眼液予以治疗,Cho 等<sup>[4]</sup>证明用 CsA 滴眼液点眼后 12h,结膜上皮 AQP3 表达量达到峰值,所以我们采用角膜上皮损伤后 12h 处死小鼠来观察不同浓度 CsA 滴眼液对 AQP3 表达的影响,发现应用 125,250,500,1000mg/L CsA 滴眼液点眼后,角膜上皮免疫组化 AQP3 的表达较 PBS 组呈递增的趋势,而应用 2000,4000mg/L CsA 滴眼液时, AQP3 的表达则较 1000mg/L CsA 滴眼液无明显差异。这些表明,在 1000mg/L 以下的低浓度 CsA 滴眼液,可增加 AQP3 的表达,且呈较好的量效关系。应用 500mg/L CsA 滴眼液点眼治疗后,小鼠损伤角膜上皮在点眼后各时间点 AQP3 的表达均较对照组有显著性差异,且角膜上皮修复时间缩短,各时间点的修复面积较对照组也均有显著性差异。说明应用 500mg/L CsA 滴眼液点眼后,可通过增加小鼠角膜上皮 AQP3 的表达含量而加速角膜上皮的愈合,与 Levin 等<sup>[1]</sup>的实验结果相符。为了减少人为的误差,我们选取积分光密度( IOD)/图片总面积( sum area) 指标进行统计学分析,即先将图片上目标区各点的光密度值累加起来,得到 IOD,再除以有效目标分布区域的面积,得到的值反映了目标物质的单位面积浓度。我们不仅观测了低浓度 CsA 滴眼液的治疗效果,更进一步探讨了其治疗机制是通过上调角膜上皮基底细胞 AQP3 的表达量来实现的,从而为进一步探讨角膜上皮损伤的治疗,为屈光手术能有更好的矫正效果提供了一个新的思路。而低浓度 CsA 滴眼液促进角膜上皮修复还有哪些其它的作用机制,是需要继续研究的问题。

### 参考文献

- 1 Levin MH, Verkman AS. Aquaporin-3-Dependent Cell Migration and Proliferation during Corneal Re-epithelialization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(10):4365-4372
- 2 King LS, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Physiol* 1996;58:619-648
- 3 刘常明,孙京华,张翌昭,等. 环孢素 A 滴眼液治疗结膜干燥综合征的机理探讨. *临床眼科杂志* 2005;13(5):431-434
- 4 Cho ML, Kim WU, Min SY, et al. Cyclosporine differentially regulates interleukin-10, interleukin-15, and tumor necrosis factor a production by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2002;46(1):42-51