

# 菊花总黄酮对去势导致干眼症雄兔泪腺细胞 Fas、FasL 表达的影响

姚小磊<sup>1</sup>, 彭清华<sup>2</sup>, 陈启雷<sup>1</sup>, 唐勇华<sup>1</sup>, 钟 茜<sup>1</sup>

**基金项目:**国家自然科学基金地区基金项目(No. 81260550); 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(No. 2012GXNSFBA053092); 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项基金资助项目(No. GZPT1221)

**作者单位:**<sup>1</sup>(530011)中国广西壮族自治区南宁市, 广西中医药大学附属瑞康医院眼科;<sup>2</sup>(410007)中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学第一附属医院中医眼科学重点学科

**作者简介:**姚小磊, 男, 毕业于湖南中医药大学, 医学博士, 讲师, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗眼表疾病、眼底病。

**通讯作者:**姚小磊. yxlshh@126.com

**收稿日期:**2014-05-27 **修回日期:**2014-08-22

## Effects of total flavonoid of chrysanthemum on Fas and FasL expression in lacrimal gland cells of male castrated rabbits with dry eye

Xiao-Lei Yao<sup>1</sup>, Qing-Hua Peng<sup>2</sup>, Qi-Lei Chen<sup>1</sup>, Yong-Hua Tang<sup>1</sup>, Qian Zhong<sup>1</sup>

**Foundation items:** Local Foundation of National Natural Science Foundation (No. 81260550); Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (No. 2012GXNSFBA053092); Health Department of Pharmaceutical Technology Special Foundation, Guangxi Zhuang Autonomous Region (No. GZPT1221)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Key Disciplines of Ophthalmology, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

**Correspondence to:** Xiao-Lei Yao. Department of Ophthalmology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yxlshh@126.com

Received: 2014-05-27 Accepted: 2014-08-22

### Abstract

• **AIM:** To evaluate the effects of total flavonoid of chrysanthemum on the expressions of Fas and FasL in male rabbits with dry eye, and to investigate the therapeutic effects of the total flavonoid of chrysanthemum on dry eye.

• **METHODS:** Totally 150 male Japanese white rabbits were divided into blank group (group A), sham-operated group (group B), model group (group C), androgen control treatment group (group D), and total flavonoid of chrysanthemum treatment group (group E).

The dry eye model was established with orchietomy on group C, D and E. Rabbits in group E were treated with total flavonoid of chrysanthemum. Rabbits in group D were treated with androgen intramuscular injection. Rabbits in the group A, group B, group C was treated with normal saline. All rabbits were detected with Schirmer's I test and tear break-up time (BUT). Fas, FasL were checked on immunohistochemistry.

• **RESULTS:** The Schirmer's I test values of group E was significantly higher than that of group C ( $P < 0.01$ ) and the BUT value of group E was significantly longer than that of group C ( $P < 0.01$ ). The quantity of positive expression of Fas in glandular tube cell and acinar epithelial cell and apoptosis cells of group E after treatment at 1, 3, 5mo were significantly lower than that of group C, cell population of the positive expression of FasL was obviously higher than that of group C ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** The main component of chrysanthemum is flavonoid, which could significantly inhibit happening of dry eye in rabbit after androgen level lowered and lacrimal gland apoptosis and keep basic tears secretory volume and tear film stability.

• **KEYWORDS:** castrate; dry eye; lacrimal gland; apoptosis; total flavonoid of chrysanthemum

**Citation:** Yao XL, Peng QH, Chen QL, *et al.* Effects of total flavonoid of chrysanthemum on Fas and FasL expression in lacrimal gland cells of male castrated rabbits with dry eye. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(10):1749-1754

### 摘要

**目的:** 观察菊花总黄酮对去势所致干眼症白兔泪腺凋亡相关基因蛋白 Fas、FasL 表达的影响, 探讨菊花总黄酮治疗干眼症的作用机制。

**方法:** 将 150 只雄性日本大耳白兔随机分为正常组(A组)、假手术组(B组)、模型组(C组)、雄激素对照治疗组(D组)和菊花总黄酮治疗组(E组)。C组、D组、E组行双侧去势术建立白兔干眼症模型。E组白兔用菊花总黄酮灌胃治疗, D组用雄激素肌肉注射, A组、B组、C组用生理盐水灌胃。分别于治疗后 1, 3, 5mo 每组处死 10 只, 取材用与相关指标检测。全部白兔行 Schirmer I 试验, 并检测泪膜破裂时间, 处死后取泪腺组织, 采用免疫组织化学法检测泪腺组织中凋亡相关基因蛋白 Fas、FasL 的表达, 并计数凋亡细胞数量。

**结果:** E组 Schirmer I 试验测量所得滤纸湿长明显高于 C组 ( $P < 0.01$ ), 泪膜破裂时间明显长于 C组 ( $P < 0.01$ )。E组治疗 1, 3, 5mo 后, 泪腺导管及腺泡上皮细胞中 Fas 阳

性表达的细胞数均明显低于C组,FasL阳性表达的细胞数均明显高于C组,细胞凋亡数量均明显低于C组( $P<0.01$ )。结论:菊花总黄酮中主要成分为黄酮类物质,可显著抑制雄激素水平降低后白兔干眼症的发生,抑制泪腺细胞凋亡,维持泪腺基础分泌量和泪膜的稳定性。

关键词:去势;干眼症;泪腺;细胞凋亡;菊花总黄酮  
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.10.03

引用:姚小磊,彭清华,陈启雷,等.菊花总黄酮对去势导致干眼症雄兔泪腺细胞 Fas、FasL 表达的影响.国际眼科杂志 2014;14(10):1749-1754

## 0 引言

干眼症已成为目前眼科研究的热点问题。雄激素水平下降是干眼症的重要发病原因,已渐成研究热点。菊花有效部位为黄酮类物质<sup>[1]</sup>。雄激素、黄酮均为杂环多酚类化合物,目前研究已证明某些黄酮类化合物具有拟雄激素作用<sup>[2]</sup>,可以用于治疗因雄激素水平下降所致的疾病<sup>[3]</sup>。利用放射性示踪标记的方法研究还表明,黄酮是细胞雄激素受体( androgen receptor, AR)的刺激物,可以与细胞 AR 结合发挥生物学效应<sup>[4]</sup>。我们因此提出假说:菊花中所含黄酮也应该可与 AR 结合,产生拟雄激素效应,治疗雄激素水平下降导致的干眼症。因此我们制备菊花总黄酮,并制作去势白兔干眼症模型进行研究,旨在探讨菊花总黄酮对抗雄激素水平下降所致干眼症的治疗效果如何以及是否能够抑制泪腺组织的细胞凋亡。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 取健康2月龄雄性日本大耳白兔150只(上海斯莱克实验动物有限公司提供,SPF级,许可证号:2012-0361,远交系)。裂隙灯显微镜、眼底镜检查眼前节及眼底无异常,5g/L的卡因眼液表面麻醉后Schirmer I试验(Schirmer I test, S I t)检测5min $\geq$ 10mm和泪膜破裂时间(break up time, BUT) $\geq$ 10s检查的白兔方可使用。

1.1.2 实验药物 菊花总黄酮,由浙江大学苏州工业技术研究院生产(批号:JH130804)。

1.1.3 主要试剂 芦丁对照品(芦丁 $\geq$ 98%;批号:MUST-12040302 成都曼斯特生物科技有限公司),5% BSA 封闭液,兔抗兔 Fas、FasL 多克隆抗体,生物素化山羊抗兔 IgG(FITC-IgG),过氧化物酶标记链酶白卵素(atrept avidin-biotin complex, SABC)免疫组织化学试剂盒,3,3'-二氨基联苯胺(3',3'-diaminobenzidine, DAB)显色剂(均购自武汉博士德生物工程有限公司)。

1.1.4 主要仪器设备 TU-1901 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);EYELA SB-1100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);DLSB-5/20 低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司);AL-204 电子天平(METTER TOLEDO 公司)LEICA DM LB2 型双目显微镜(德国 LEICA 公司生产);Shandon 325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司生产);DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司生产);Motic B<sub>3</sub> 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司生产)。

### 1.2 方法

1.2.1 菊花总黄酮的制备 菊花有效部位的提取方法:

首先对乙醇浓度、提取时间、提取温度和提取次数进行单因素考察,并通过正交优化设计,寻求了醇提最佳工艺条件;再通过静态吸附实验、动态吸附实验,优化出纯化杭白菊总黄酮的良好大孔树脂以及最佳吸附条件、洗脱条件。杭白菊干燥花蕾 15kg 粉碎后,醇提 2 次(第 1 次:原药材浸泡 10 倍量 80% 乙醇,加热至 80℃ 提取 2h,过滤;第 2 次:第 1 次提取的药渣浸泡 8 倍量的 80% 乙醇,加热 80℃ 提取 1h),浓缩后水沉,离心过滤,滤液上 AB-8 大孔树脂柱,用体积分数为 80% 乙醇进行洗脱,洗脱液浓缩,经真空带式干燥后粉碎得总黄酮干粉。

1.2.2 实验动物分组 对此 150 只雄兔,采用随机数字法分为 A1、B1、C1、D1、E1、A3、B3、C3、D3、E3、A5、B5、C5、D5、E5 共 15 组,每组 10 只。其中:A 代表正常组,B 代表假手术组;C 代表手术对照组,D 代表雄激素对照治疗组,E 代表菊花总黄酮治疗组;1 代表饲养 1mo,3 代表饲养 3mo,5 代表饲养 5mo,如表 1。

1.2.3 雄激素水平下降导致干眼症动物模型的制作 参照作者前期研究的方法<sup>[5]</sup>,行双侧睾丸切除术(ORX):将 C、D、E 三组实验兔切除双侧睾丸及附睾。B 组只切开阴囊,不切除睾丸,作为假手术对照。去势后饲养 1mo 表示建立轻度干眼症模型;去势后饲养 3mo 表示建立中度干眼症模型;去势后饲养 5mo 表示建立重度干眼症模型。

1.2.4 给药方法 首先计算好成人等效剂量,将菊花总黄酮溶解于生理盐水中。A、B、C 组每日以生理盐水 5mL 灌胃,每日一次;D 组每日以丙酸睾酮大腿肌肉注射,每日一次;E 组每日以菊花总黄酮灌胃,每日一次。1 组均灌胃 1mo;3 组均灌胃 3mo;5 组均灌胃 5mo。以常规饲料喂养。

### 1.2.5 标本取材及处理

1.2.5.1 取材前先完成基础分泌量及泪膜稳定性测定 分别于分组前、末次给药完成后对此 150 只雄兔分别进行 S I t 和 BUT 检查,检测标准参照 S I t 与 BUT 的诊断标准<sup>[6]</sup>。S I t 测定参照有关文献<sup>[7]</sup>。正常滤纸大小(5mm $\times$ 35mm)的 Whatman 41 号滤纸条,将一端折弯 5mm,置于下睑内侧 1/3 结膜囊内,其余部分悬垂于皮肤表面。人工使实验动物闭眼,5min 后测量滤纸湿润长度(不包括反折)。BUT 测定:用玻璃棒蘸 20g/L 荧光素钠溶液在下睑结膜囊内涂抹,使眼睑闭合荧光素均匀分布于角膜表面后,固定其上下睑使角膜充分暴露,于裂隙灯下用钴蓝光照射观察,从实验动物瞬目后睁眼开始计时,记录泪膜上出现第一个破裂点的时间。

1.2.5.2 取材 S I t 和 BUT 检查完后立即以断头法处死动物,即刻摘除泪腺。予以 40g/L 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,供免疫组织化学方法使用。

1.2.6 免疫组织化学法检测方法 每组石蜡块予以石蜡切片机连续切片,脱蜡至水,蒸馏水洗涤 2min $\times$ 2 次。免疫组织化学法检测严格按照说明书操作。显微镜下观察泪腺组织中泪腺导管细胞及腺泡上皮细胞的细胞凋亡以及免疫组化染色情况。Motic B<sub>3</sub> 显微摄像系统进行摄像。采用 MIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文分析系统中的免疫组织化学测量系统。以 2.105 $\mu$ m 为像素点长。在 1.271 $\times$ 10<sup>6</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup> 窗口面积下测量凋亡相关基因 Fas、FasL 蛋白的平均光密度值,行半定量分析。并随机统计各组 5~7 个高倍视野( $\times$ 400 倍)中的凋亡细胞总数,计算每高倍视野下的平均细胞数。

表1 实验动物分组情况

编码	A	B	C	D	E
1	A1组:1mo 正常组	B1组:1mo 假手术组	C1组:1mo 对照组	D1组:雄激素对照治疗1mo组	E1组:菊花总黄酮治疗1mo组
3	A3组:3mo 正常组	B3组:3mo 假手术组	C3组:3mo 对照组	D3组:雄激素对照治疗3mo组	E3组:菊花总黄酮治疗3mo组
5	A5组:5mo 正常组	B5组:5mo 假手术组	C5组:5mo 对照组	D5组:雄激素对照治疗5mo组	E5组:菊花总黄酮治疗5mo组

表2 白兔各组治疗前后 S I t 测量值

( $\bar{x} \pm s$ , mm/5min)

组别	n	造模后 1mo	造模后 3mo	造模后 5mo
正常组(A)				
给药前	10	15.33±5.71	14.77±5.21	15.30±4.17
给药后	10	15.47±5.86	15.33±4.99	16.07±5.86
假手术组(B)				
给药前	10	15.03±5.70	14.78±5.26	15.32±4.76
给药后	10	15.41±5.98	15.11±4.98	15.08±4.86
对照组(C)				
给药前	10	13.41±2.29	15.50±4.32	14.51±3.12
给药后	10	6.66±2.33 <sup>b</sup>	4.68±1.00 <sup>b,c</sup>	2.67±1.98 <sup>b,d</sup>
雄激素对照治疗组(D)				
给药前	10	13.22±2.33	15.01±4.33	15.55±3.43
给药后	10	12.97±2.29	15.66±4.61	14.92±4.23
菊花总黄酮治疗组(E)				
给药前	10	13.44±3.29	14.66±3.72	14.51±3.02
给药后	10	14.66±5.27 <sup>f</sup>	13.33±5.66 <sup>f</sup>	12.66±5.22 <sup>f</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 给药前; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 造模后 1mo; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 同一时间给药后的对照组。

统计学分析:用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,双侧检验,资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。先进行正态分布及方差齐性检验,若呈正态分布,方差齐,多组比较采用方差分析,治疗后多组比较,以治疗前数值为协变量,进行协方差分析,治疗前后比较用配对  $t$  检验,方差不齐者采用 Satterthwaite 方法进行校正  $t$  检验,非正态分布采用 Wilcoxon 秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 菊花总黄酮提取质控结果** 菊花药材 15kg 提取,得到成品 300g。紫外标准曲线法测定提取物中总黄酮的含量:用已经制备的芦丁标准品对照液作为对照,建立紫外标准曲线,并进行精密性、稳定性、重复性、加样回收率实验,紫外法测定成品中总黄酮含量。成品中总黄酮含量达 73.5%,收率为 4.9%,总黄酮的提取率为 42.1%。

**2.2 基础泪液分泌量** S I t 检测基础泪液分泌量,经自身前后配对  $t$  检验显示,C1、C3、C5 组白兔去势后基础泪液分泌量明显减少,与去势前比较,差异有统计学差异( $P < 0.01$ )。方差分析显示,与 C1 组比较,C3 和 C5 组白兔的泪腺分泌量下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。雄兔去势后经菊花总黄酮治疗后,经方差分析,E 组不同治疗时间后 S I t 值比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。自身前后配对  $t$  检验显示,与治疗前比较,差异亦无统计学意义( $P > 0.05$ )。E 组 S I t 值与相同时间点的 C 组比较,以治疗前的 S I t 值为协变量,经协方差分析,E 组基础泪液分泌量增加,滤纸湿长明显增长( $P < 0.01$ ),见表 2。

**2.3 泪膜稳定性** BUT 检测模型组泪膜稳定性,经自身前后配对  $t$  检验显示,C1、C3、C5 组 BUT 明显缩短,与去势前比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );方差分析显示,与 C1 组比较,C3 和 C5 组白兔的 BUT 更短( $P < 0.05$ )。雄兔去势后经菊花总黄酮治疗后,经方差分析,以及经自身前后

配对  $t$  检验,E 组在不同治疗时间后,E5 组的泪膜稳定性较 E1 组降低( $P < 0.05$ ),其他各时间点之间 BUT 值比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。以治疗前的泪膜破裂时间为协变量,经协方差分析,治疗组泪膜稳定性增加,BUT 与相应时间点模型组比较明显延长( $P < 0.01$ ),见表 3。

**2.4 泪腺细胞凋亡** C1、C2、C3 组去势后细胞凋亡明显增强,泪腺腺泡和导管上皮中均可见散在的阳性凋亡细胞,与相应的 A 组比较,差异有统计意义( $P < 0.01$ );与 C1 组比较,C5 组的泪腺细胞凋亡数量增加( $P < 0.05$ )。光学显微镜下可见凋亡细胞核呈棕黄色,有的细胞核中染色物质集中于核膜下呈不规则环形或半月形,或可见分裂的细胞核。E1、2、3 组的细胞凋亡数量下降,与相应时间点 C 组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 4。A 组、B 组 Fas 及 FasL 蛋白表达不明显。C 组泪腺导管和腺泡中可见大量 Fas 及 FasL 蛋白表达于细胞膜和细胞浆中,呈棕黄色颗粒,见表 4 和图 1,2。

## 3 讨论

**3.1 中医对于菊花及相关方剂治疗干眼症的佐证论述** 干眼症根据其症状,轻症可归属于“白涩症”,重症可归属于“神水将枯”。《秘传眼科龙木论》论述:“目涩者何也?答曰:此乃熏脏腑也……液道枯干,脏腑邪热传于卫,真气不荣于目,故目涩也。依用羊肝丸。”(所载“羊肝丸”第一味药即菊花)可见“神水将枯”病机为内因在脏腑之邪热伤阴液,邪热传于卫表则为风热。而《素问·宣明五气篇》说:“五脏化液,肝为泪”,《银海精微》说:“泪乃肝之液”,可见“神水将枯”所病脏腑在肝,所以治疗原则应在内清肝热、养肝阴,在外清肺卫风热。菊花入肝经,既能清肝,又能养肝,还可入肺经,清肺卫风热<sup>[8]</sup>,为治疗干眼症理想药物。《银海精微》、《原机启微》、《眼科龙目论》、《目经大成》等所收录的许多治疗干眼症症状的代表方剂,

表3 白兔各组治疗前后 BUT 测量值 ( $\bar{x} \pm s, s$ )

组别	n	造模后 1mo	造模后 3mo	造模后 5mo
正常组(A)				
给药前	10	14.26±3.23	15.31±0.33	14.833±5.71
给药后	10	14.51±2.60	14.07±6.01	15.333±4.44
假手术组(B)				
给药前	10	14.27±3.25	15.11±3.32	14.83±5.76
给药后	10	14.57±2.62	14.01±6.05	15.33±4.40
对照组(C)				
给药前	10	13.65±1.77	14.50±4.12	13.50±4.12
给药后	10	7.44±1.13 <sup>b</sup>	6.66±2.33 <sup>b</sup>	4.66±2.10 <sup>b,c</sup>
雄激素对照治疗组(D)				
给药前	10	13.23±1.03	14.70±4.22	13.09±4.23
给药后	10	12.23±1.07	13.77±2.77	13.67±2.38
菊花总黄酮治疗组(E)				
给药前	10	14.59±2.78	14.59±2.21	13.78±1.69
给药后	10	14.94±4.41 <sup>f</sup>	12.81±2.67 <sup>f</sup>	11.75±4.41 <sup>f,g</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs 给药前; <sup>c</sup>P<0.05 vs 造模后 1mo; <sup>f</sup>P<0.01 vs 同一时间给药后的对照组; <sup>g</sup>P<0.05 vs 造模后 1mo。

表4 各组治疗后泪腺组织中 Fas、FasL 表达及细胞凋亡情况 ( $\bar{x} \pm s, s$ )

组别	n	Fas	FasL	凋亡细胞数量
正常组(A)				
造模后 1mo	10	0.111±0.023 <sup>f</sup>	0.114±0.027 <sup>f</sup>	12.34±4.67
造模后 3mo	10	0.113±0.025 <sup>f</sup>	0.124±0.014 <sup>f</sup>	13.01±5.55
造模后 5mo	10	0.117±0.029 <sup>f</sup>	0.163±0.024 <sup>f</sup>	12.87±3.22
假手术组(B)				
造模后 1mo	10	0.129±0.021 <sup>f</sup>	0.115±0.014 <sup>f</sup>	15.31±4.07
造模后 3mo	10	0.135±0.029 <sup>f</sup>	0.125±0.024 <sup>f</sup>	15.04±5.50
造模后 5mo	10	0.115±0.030 <sup>f</sup>	0.095±0.065 <sup>f</sup>	13.87±4.02
对照组(C)				
造模后 1mo	10	0.481±0.111	0.454±0.121	46.45±9.27 <sup>d</sup>
造模后 3mo	10	0.568±0.142	0.545±0.095	59.23±10.32 <sup>d</sup>
造模后 5mo	10	0.598±0.127	0.572±0.121	71.41±11.68 <sup>d</sup>
雄激素对照治疗组(D)				
造模后 1mo	10	0.142±0.051 <sup>f</sup>	0.125±0.044 <sup>f</sup>	11.78±3.91 <sup>f</sup>
造模后 3mo	10	0.168±0.058 <sup>f</sup>	0.115±0.034 <sup>f</sup>	20.27±4.89 <sup>f</sup>
造模后 5mo	10	0.127±0.033 <sup>f,g</sup>	0.095±0.035 <sup>f,g</sup>	30.89±5.67 <sup>f</sup>
菊花总黄酮治疗组(E)				
造模后 1mo	10	0.158±0.031 <sup>f</sup>	0.111±0.034 <sup>f</sup>	12.27±3.21 <sup>f</sup>
造模后 3mo	10	0.186±0.046 <sup>f</sup>	0.114±0.034 <sup>f</sup>	21.28±4.09 <sup>f</sup>
造模后 5mo	10	0.189±0.043 <sup>a,f</sup>	0.134±0.036 <sup>b,f</sup>	31.88±5.60 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 造模后 1mo; <sup>d</sup>P<0.01 vs 同一时间的正常组; <sup>f</sup>P<0.01 vs 同一时间的对照组; <sup>g</sup>P<0.05 vs E5 组。

如秘方菊花散方、菊花散、蝉花散、菊睛丸、五秀重明丸、白菊清金散等,以及《审视瑶函》中治疗“白涩症”的桑白皮汤,方中皆有菊花,且大都为君药;特别是《眼科龙目论》说“菊花散,理肝气风毒、眼目赤肿、昏暗羞明、隐涩难开”,《银海精微》说“蝉花散,治肝经蕴积、热毒伤肝、上攻于目”,《原机启微》说“五秀重明丸,治翳膜遮睛、癍涩昏花”,都体现了菊花治疗干眼症的重要性。可见菊花在内可清肝之积热,滋肝之阴液,在外清卫表风热,为治疗干眼症的理想药物,具有良好的中医理论依据。

**3.2 雄激素水平下降将引起泪腺局部细胞凋亡** 正常泪腺极少发生细胞凋亡现象,而在于眼症患者和动物模型中发现结膜上皮细胞和泪腺腺泡细胞的凋亡增加<sup>[9,10]</sup>; Gao 等<sup>[10]</sup>采用 TUNEL 技术和免疫组化分析,发现正常泪腺和结膜上皮细胞存在轻度细胞凋亡,而 KCS 狗眼的泪腺腺泡细胞、结膜上皮细胞凋亡程度显著高于正常, KCS 狗 p53、Fas、FasL 等呈现高表达。细胞凋亡主要通过两条途径影响干眼病的病理过程:一是对泪腺的影响,二是对炎症细胞的影响,而腺泡细胞的萎缩和淋巴细胞凋亡进一步

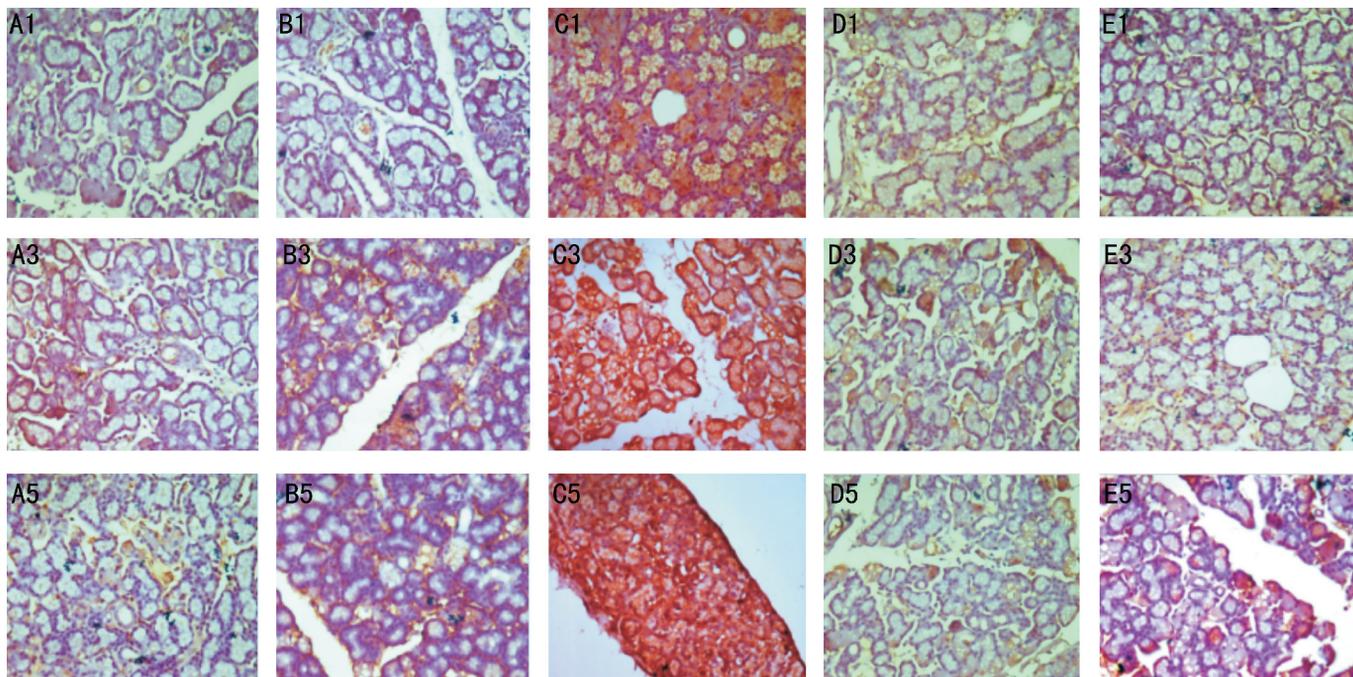


图1 免疫组织化学法各组白兔泪腺组织中 Fas 蛋白表达(光学显微镜 $\times 400$ ) A1: 正常组给药 1mo 后; A3: 正常组给药 3mo 后; A5: 正常组给药 5mo 后; B1: 假手术组给药 1mo 后; B3: 假手术组给药 3mo 后; B5: 假手术组给药 5mo 后; C1: 对照组给药 1mo 后; C3: 对照组给药 3mo 后; C5: 对照组给药 5mo 后; D1: 雄激素对照治疗组给药 1mo 后; D3: 雄激素对照治疗组给药 3mo 后; D5: 雄激素对照治疗组给药 5mo 后; E1: 菊花总黄酮治疗组给药 1mo 后; E3: 菊花总黄酮治疗组给药 3mo 后; E5: 菊花总黄酮治疗组给药 5mo 后。

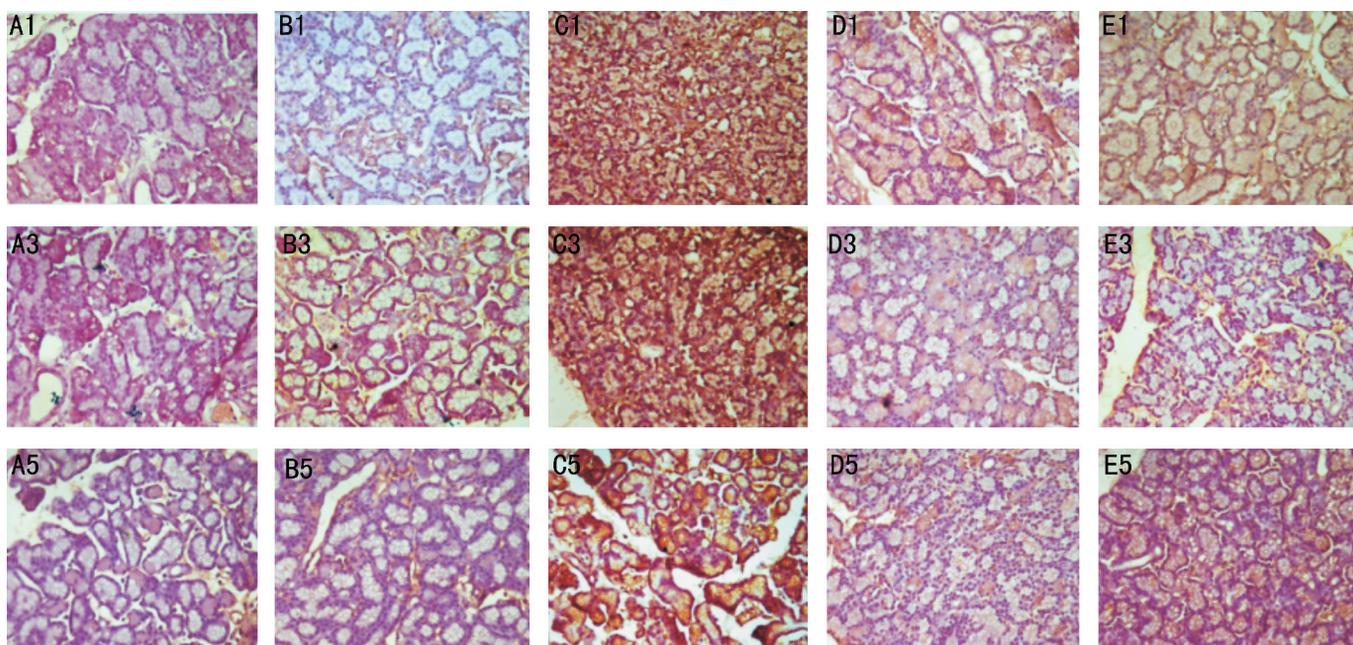


图2 免疫组织化学法各组白兔泪腺组织中 FasL 蛋白表达(光学显微镜 $\times 400$ ) A1: 正常组给药 1mo 后; A3: 正常组给药 3mo 后; A5: 正常组给药 5mo 后; B1: 假手术组给药 1mo 后; B3: 假手术组给药 3mo 后; B5: 假手术组给药 5mo 后; C1: 对照组给药 1mo 后; C3: 对照组给药 3mo 后; C5: 对照组给药 5mo 后; D1: 雄激素对照治疗组给药 1mo 后; D3: 雄激素对照治疗组给药 3mo 后; D5: 雄激素对照治疗组给药 5mo 后; E1: 菊花总黄酮治疗组给药 1mo 后; E3: 菊花总黄酮治疗组给药 3mo 后; E5: 菊花总黄酮治疗组给药 5mo 后。

加重炎症过程,形成恶性循环<sup>[10]</sup>。Fas 与其配体 FasL 或 Fas 抗体结合可诱导 Fas 表达细胞发生凋亡<sup>[11]</sup>,Fas/FasL 诱导的细胞凋亡是细胞毒性 T 淋巴细胞发挥生物学效应的主要途径。不管表达于细胞表面的 FasL 还是纯化的 FasL,只要与细胞表面的 Fas 分子结合后,后者发生交联,向细胞内传递信号,Fas 的死亡结构域募集 FADD 分子,FADD 中的死亡效应域募集 caspase8,caspase8 自我激活,

进而激活 caspase3,细胞随即发生凋亡。Azzarolo 等<sup>[12]</sup>研究还发现雄激素有防止泪腺细胞凋亡,坏死和淋巴细胞浸润的作用。这说明雄激素水平高低与干眼症的泪腺细胞凋亡和炎症之间有密切的关系。

**3.3 菊花提取物对泪腺局部细胞凋亡的影响** 雄激素水平下降是干眼症发生的一个重要原因,雄激素替代治疗是有明确疗效的,但是长期使用雄激素将会导致一系列相应

副作用的发生。目前研究已证明某些黄酮类化合物具有拟雄激素作用<sup>[2]</sup>,有望成为雄激素替代药物,以规避雄激素的副作用<sup>[3]</sup>。在作者参与的同类研究中,就发现密蒙花总黄酮灌胃,对于雄激素水平下降的动物模型有较好的实验疗效<sup>[13]</sup>,并且可以抑制泪腺组织的细胞凋亡<sup>[14]</sup>,为本研究提供了很好的借鉴作用。在本研究中我们发现,D1组、D3组、D5组以及E1组、E3组、E5组泪腺组织中的Fas、FasL平均光密度值较C1组、C3组、C5组降低,差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$ ),说明促凋亡因子Fas、FasL在泪腺局部受到雄激素和菊花总黄酮的抑制,菊花总黄酮的效应与雄激素类似,与同类研究结果有一致性<sup>[12]</sup>;但随着时间的推移,菊花总黄酮对凋亡因子的影响开始逊于雄激素,D5组与E5组之间的差异开始有统计学差异( $P<0.05$ ),可能实验动物对菊花总黄酮的拟激素效应逐渐适应有关,可考虑进一步研究。本实验研究表明,通过菊花总黄酮的干预,抑制了细胞凋亡,表现为治疗组泪腺组织中Fas、FasL表达显著降低,因此泪腺局部的细胞凋亡数量减少,正常泪腺细胞得到保护,使处于凋亡阶段的细胞退出凋亡程序。对于雄性去势白兔来说,这可能与菊花总黄酮发挥了雄激素替代作用相关,与Azzarolo等的实验中雄激素能够抑制泪腺局部Fas、FasL表达的结果相符合。正常泪腺细胞得到保护之后,泪液分泌得到保障,表现为泪液基础分泌量试验以及泪膜破裂时间测量值的好转,使E组SIt、BUT接近A组。

根据本研究结果,我们认为菊花总黄酮可以抑制泪腺腺泡和腺管细胞的细胞凋亡,提高泪液基础分泌量,维持泪膜稳定性,改善眼表干燥状态,其机制可能与菊花总黄酮的拟雄激素效应有关,有待进一步研究。

#### 参考文献

1 张健,钱大玮,李友宾,等.菊花的化学成分研究.天然产物研究与开发 2006;18(1):71-73,91

- 2 黄秀兰,周亚伟,王伟.淫羊藿黄酮类化合物药理研究进展.中成药 2005;27(6):719-721
- 3 Moyad MA. Complementary therapies for reducing the risk of osteoporosis in patients receiving luteinizing hormone-releasing hormone treatment/orchiectomy for prostate cancer: a review and assessment of the need for more research. *Urology* 2002;59(4 Suppl 1):34-40
- 4 Nifli AP, Bosson-Kouamé A, Papadopoulou N, et al. Monomeric and oligomeric flavanols are agonists of membrane androgen receptors. *Exp Cell Res* 2005;309(2):329-339
- 5 姚小磊,彭清华,吴权龙,等.围绝经期性激素水平下降导致干眼症兔模型的建立.湖南中医药大学学报 2009;29(3):9-12
- 6 张梅,陈家祺,刘祖国.干眼症检查的进展.眼科研究 2001;19(2):184-187
- 7 林静.去势雌干眼症动物模型制作及发病机制的研究(硕士学位论文文).青岛大学 2005
- 8 李传课,曹建辉.中医眼科学.北京:人民卫生出版社 2001:261
- 9 Toda I, Sullivan BD, Wickham LA, et al. Gender- and androgen-related influence on the expression of proto-oncogene and apoptotic factor mRNAs in lacrimal glands of autoimmune and non-autoimmune mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;71(1-2):49-61
- 10 Gao J, Schwal TA, Addeo JV, et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine kerabbitoconjunctivitis sicca: the effect of topical cyclosporin A therapy. *Cornea* 1998;17(6):654-663
- 11 Dayan CM, Elsegood KA, Made R. Fast expression on epithelial cells: the Bottazzo-Feldman hypothesis revisited. *Immunol Tady* 1997;18(5):203-205
- 12 Azzarolo AM, Wood RL, Mircheff AK, et al. Androgen influence on lacrimal gland apoptosis, necrosis, and lymphocytic infiltrabition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(3):592-602
- 13 姚小磊,彭清华,吴权龙.密蒙花提取物治疗兔去势所致干眼症.眼视光学杂志 2008;10(1):21-26
- 14 姚小磊,彭清华,吴权龙,等.密蒙花提取物对去势导致干眼症白兔泪腺细胞凋亡的影响.中国中医眼科杂志 2007;17(3):139-144