

大黄素对烟曲霉菌性角膜炎模型大鼠的抗炎作用机制研究

勾晓梅,李雪丽,隋源,周丽霞

引用:勾晓梅,李雪丽,隋源,等. 大黄素对烟曲霉菌性角膜炎模型大鼠的抗炎作用机制研究. 国际眼科杂志 2019;19(9):1466-1469

作者单位:(150066)中国黑龙江省哈尔滨市,中航工业哈尔滨二四二医院眼科

作者简介:勾晓梅,女,毕业于哈尔滨医科大学,学士,副主任医师,研究方向:角膜病、眼底病。

通讯作者:勾晓梅.gouxiaomei77@163.com

收稿日期:2018-12-20 修回日期:2019-08-13

摘要

目的:研究大黄素对烟曲霉菌性角膜炎模型大鼠的抗炎作用机制。

方法:建立烟曲霉菌性角膜炎模型,分为模型组和大黄素组,各8只,正常组10只。大黄素组采取大黄治疗,模型组和正常组采取等体积生理盐水治疗。观察大鼠角膜炎症指数、病理学特征,检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)、MAPK、NF- κ B蛋白。

结果:大黄素组大鼠角膜炎症指数、角膜炎细胞计数、TNF- α 、IL-6、ICAM-1水平、MAPK、NF- κ B蛋白低于模型组,PPAR蛋白表达高于模型组($P<0.05$)。

结论:大黄素通过调控PPAR、MAPK、NF- κ B蛋白,改善TNF- α 、IL-6、ICAM-1炎症因子水平,对烟曲霉菌性角膜炎大鼠起到抗炎作用。

关键词:大黄素;烟曲霉菌;角膜炎

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.9.04

Anti-inflammatory mechanism of emodin in rats with *Aspergillus fumigatus* keratitis

Xiao-Mei Gou, Xue-Li Li, Yuan Sui, Li-Xia Zhou

Department of Ophthalmology, AVIC Harbin 242 Hospital, Harbin 150066, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Xiao-Mei Gou. Department of Ophthalmology, AVIC Harbin 242 Hospital, Harbin 150066, Heilongjiang Province, China. gouxiaomei77@163.com

Received:2018-12-20 Accepted:2019-08-13

Abstract

• **AIM:** To study the anti-inflammatory mechanism of emodin in rats with *Aspergillus fumigatus* keratitis.

• **METHODS:** The model of *Aspergillus fumigatus* keratitis was established and divided into model group and emodin group, 8 in each group and 10 in the normal group. The emodin group was treated with rhubarb, and the model group and the normal group were treated with saline of equal volume. Corneal inflammation index and pathological characteristics were observed. Tumor necrosis factor - α (TNF - α), interleukin - 6 (IL - 6), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), MAPK and NF- κ B protein were detected.

• **RESULTS:** The corneal inflammation index, corneal inflammatory cell count, TNF- α , IL-6, ICAM-1, MAPK and NF- κ B protein in emodin group were lower than those in model group, and the expression of PPAR protein was higher than that in model group ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** Emodin can improve the levels of TNF- α , IL-6 and ICAM-1 inflammatory factors by regulating PPAR, MAPK and NF- κ B proteins, and play an anti-inflammatory role in rats with *Aspergillus fumigatus* keratitis.

• **KEYWORDS:** emodin; *Aspergillus fumigatus*; keratitis

Citation: Gou XM, Li XL, Sui Y, et al. Anti-inflammatory mechanism of emodin in rats with *Aspergillus fumigatus* keratitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(9):1466-1469

0 引言

烟曲霉菌是一种致病性较强的病原菌,数据显示,因烟曲霉菌感染导致角膜炎发生的研究增多^[1]。近年来我国患烟曲霉菌性角膜炎的人数也在逐年增加,严重制约人们的生活水平,影响人们的身心健康^[2]。大黄素主要从大黄中提取出来,是大黄的主要有效成分^[3]。大黄素药性广泛,具有抑菌消炎、保肝利尿的功效,同时还可以调节免疫系统^[4]。本实验通过大黄素对烟曲霉菌性角膜炎模型大鼠进行治疗,研究其抗炎作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 选取30只雄性健康清洁级SD大鼠,体质量215~255(平均225.5 \pm 10.2)g,鼠龄9~12(平均10.5 \pm 0.3)mo,均符合动物保护条例。由广西医科大学实验动物中心提供,大鼠饲养严格按照动物饲养标准规程操作,环境温度保持于22 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C,湿度45%~55%,每小时通风6~10次,每天按时给水及添加饲料,每2d更换垫料1次。烟曲霉菌菌种由中国科学院微生物研究所菌种保存中心提供。本研究经过我院伦理委员会批准。主要试剂

表1 三组大鼠角膜炎症指数和角膜炎症细胞计数比较 $\bar{x} \pm s$

组别	数量(只)	角膜炎症指数 (分)	角膜炎症细胞计数 (个/视野)
正常组	10	3.15±0.55	40.25±10.16
模型组	8	6.25±1.55 ^a	90.12±17.25 ^a
大黄素组	8	4.31±0.35 ^{a,c}	59.45±13.36 ^{a,c}
<i>F</i>		8.871	11.494
<i>P</i>		<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.05 vs 正常组;^c*P*<0.05 vs 模型组。

和仪器:大黄素(广东中山康之源生物有限公司提供);流式细胞仪、Western blot 试剂盒(天津九鼎公司);PPAR、MAPK、NF-κB 一抗和二抗(英国 Abcam 公司提供)。

1.2 方法

1.2.1 烟曲霉菌性角膜炎模型建立 将菌种在 Sabouroud 培养基中接种,在 25℃ 环境下培养 1wk,采用灭菌水配置真菌孢子悬浊液,将孢子浓度调整为 1×10^8 CFU/mL。选取 20 只大鼠制备烟曲霉菌性角膜炎模型。参考任毅等^[5]模型建立并适当进行改正,在制备前使用 5g/L 左氧氟沙星滴眼液滴注双眼,4 次/d,连续滴注 3d。之后采用 3.5mL/kg 10%水合氯醛进行腹腔麻醉,采用 1%盐酸丁卡因滴注大鼠双眼,常规消毒后,采用 4mm 环钻在角膜中间进行定位,将角膜上皮清除后,覆盖直径 6mm 的软性角膜接触镜,将浓度为 1×10^8 CFU/mL 的悬浊液注入镜片与角膜层之间,在结膜囊位置涂抹氧氟沙星眼膏,之后采用 5-0 丝线将上下眼睑缝合。手术 9h 后拆线,将软性角膜接触镜移除。建模 48h 后,发现大鼠角膜白润病症深度加深,范围扩大,覆盖整个眼球,说明建模成功。

1.2.2 分组和给药 20 只大鼠建模死亡 4 只,成功 16 只,随机分为模型组和大黄素组,各 8 只。建模成功后 1h,大黄素组大鼠给予大黄素进行治疗,在大鼠眼结膜下注射大黄素(大黄素,纯度 ≥ 98%),其剂量参考陈国玲等^[6]文献,为 0.05mL,1 次/d,连续治疗 5d。模型组和正常组大鼠给予等体积的生理盐水进行治疗,1 次/d,连续治疗 5d。观察所有大鼠治疗期间饮食和活动情况,采用裂隙灯显微镜观察大鼠鼠眼畏光、流泪和角膜混浊情况。

1.2.3 角膜炎症指数统计 角膜炎症指数评分以病灶大小、病变深度为标准。病灶大小:病灶占角膜总面积的 1%~25%,记为 1 分;病灶占角膜总面积的 >25%~50%,记为 2 分;病灶占角膜总面积 >50%~75%,记为 3 分;病灶占角膜总面积的 >75%~100%,记为 4 分。病变深度:角膜显示轻度混浊,但瞳孔和虹膜清晰,记为 1 分;角膜浅层显示灰白色混浊,瞳孔和虹膜通过病灶可以观察到,记为 2 分;角膜全层不透明,显示不均匀的混浊,记为 3 分;角膜显示均匀致密混浊,记为 4 分。

1.2.4 病理学观察 提取大鼠角膜组织,在 10%甲醛缓冲液中保持 48h,之后脱水、浸蜡、包埋、切片、脱蜡处理后,采用 HE 进行染色,在显微镜下观察大鼠角膜病理学特征,并对角膜炎症细胞进行计数。

1.2.5 酶联免疫吸附测定法 TNF-α、IL-6、ICAM-1 指标检测 采用 50mmol/L 碳酸盐包被缓冲液将抗原进行溶解,浓度为 10~20μg/mL,在 96 孔酶标板中加入

100μL/孔,4℃ 过夜保存。第 2d 舍弃包被液,采用 PBST 洗涤 3 次,每孔中加入 150μL 1% BSA,在 37℃ 环境中封闭 1h。之后采用 PBST 洗涤 3 次,在每孔中加入 100μL 不同倍比稀释度的血清,加入对样品,37℃ 孵育 2h。采用 PBST 洗涤 5 次,加入 100μL 稀释后的 HRP 标记二抗,37℃ 孵育 1h。PBST 洗涤 5 次,之后使用显色剂显色 20min 后,在酶标仪上读取 A405 吸收值。

1.2.6 Western blot 检测 PPAR、MAPK、NF-κB 蛋白表达 将采集到的标本使用 PBS 缓冲液清洗 3 遍以上,分离缓冲液,加入 IP 细胞裂解液,进行裂解 35min,提取总蛋白,BCA 测定蛋白浓度。取 20μg/孔蛋白质,通过 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳,加入适量浓缩的 SDS-PAGE 蛋白缓冲液 15min;100V 电泳 10min,结束之后,将电转膜浸泡在 10%牛奶中,在 37℃ 环境下的摇床上封闭 1.5h;与一抗(稀释浓度 1:10000)结合,加入 TBST 稀释按 1:1000 稀释一抗 Tubulin(内参照),在 4℃ 环境下孵育过夜保存;第 2d 用 TBST 缓冲液清洗,与二抗(稀释浓度 1:10000)结合在室温下孵育 1h,再次用 TBST 缓冲液反复清洗。最后加入显影剂将其仅在底物溶液中进行显色,分析其灰度值,目的蛋白条带灰度值/内参条带灰度值=目的蛋白相对表达量,分析 PPAR、MAPK、NF-κB 蛋白表达量。

统计学分析:采用 SPSS20.0 统计软件进行分析,其中计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述,对于每个指标首先采用单因素方差分析进行 3 组间的比较,若存在差异,再采用 LSD-*t* 检验进行组间的两两比较。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠角膜炎症指数和角膜炎症细胞计数比较 如表 1 所示,三组大鼠角膜炎症指数和角膜炎症细胞计数比较,差异有统计学意义(*P*<0.01)。模型组大鼠角膜炎症指数和角膜炎症细胞计数高于正常组,差异有统计学意义(*P*<0.05);大黄素组大鼠角膜炎症指数和角膜炎症细胞计数低于模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05);大黄素组大鼠角膜炎症指数和角膜炎症细胞计数高于正常组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。

2.2 三组大鼠角膜组织病理学观察 正常组大鼠角膜组织上皮表现完整,未见炎性细胞浸润。模型组大鼠角膜组织胶原纤维发生肿胀,排列紊乱,有大量炎性细胞浸润,坏死组织脱落,形成溃疡。大黄素组大鼠角膜组织炎性细胞减少,胶原纤维排列整齐(图 1)。

2.3 三组大鼠 TNF-α、IL-6、ICAM-1 水平比较 三组大鼠 TNF-α、IL-6、ICAM-1 水平比较,差异有统计学意义(*P*<0.05)。模型组大鼠 TNF-α、IL-6、ICAM-1 水平高于正常组,差异有统计学意义(*P*<0.05);大黄素组 TNF-α、IL-6、ICAM-1 水平低于模型组,差异有统计学意义(*P*<0.05);大黄素组 TNF-α、IL-6、ICAM-1 水平高于正常组,差异有统计学意义(*P*<0.05,表 2)。

2.4 三组大鼠 PPAR、MAPK、NF-κB 的蛋白表达比较 三组大鼠 PPAR、MAPK、NF-κB 的蛋白表达比较,差异有统计学意义(*P*<0.05)。模型组大鼠 PPAR 蛋白表达低于正常组,MAPK、NF-κB 蛋白高于正常组,差异有统计学意义

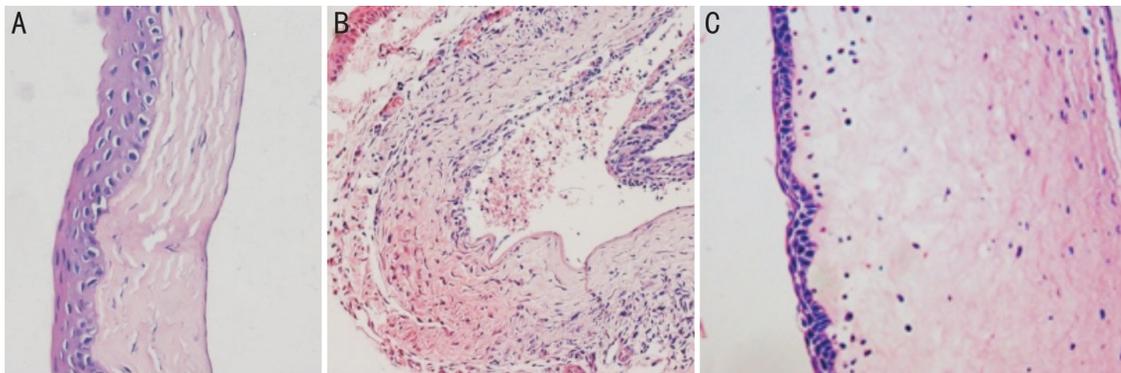


图1 三组大鼠角膜组织病理学观察(HE) A:正常组($\times 200$);B:模型组($\times 400$);C:大黄素组($\times 200$)。

表2 三组大鼠 TNF- α 、IL-6、ICAM-1 水平比较

组别	数量(只)	TNF- α	IL-6	ICAM-1
正常组	10	353.15 \pm 20.55	140.25 \pm 11.16	38.66 \pm 5.45
模型组	8	468.25 \pm 50.55 ^a	290.12 \pm 20.25 ^a	68.42 \pm 10.33 ^a
大黄素组	8	382.11 \pm 10.85 ^{a,c}	189.45 \pm 15.36 ^{a,c}	45.36 \pm 8.62 ^{a,c}
F		9.886	30.007	11.820
P		<0.01	<0.01	<0.01

($\bar{x} \pm s$, ng/L)

注:^a $P < 0.05$ vs 正常组;^c $P < 0.05$ vs 模型组。

表3 三组大鼠 PPAR、MAPK、NF- κ B 的蛋白表达比较

组别	数量(只)	PPAR	MAPK	NF- κ B
正常组	10	1.15 \pm 0.06	0.32 \pm 0.05	0.42 \pm 0.03
模型组	8	0.25 \pm 0.05 ^a	1.25 \pm 0.08 ^a	1.36 \pm 0.05 ^a
大黄素组	8	0.88 \pm 0.04 ^{a,c}	0.95 \pm 0.03 ^{a,c}	1.06 \pm 0.02 ^{a,c}
F		50.963	42.926	79.157
P		<0.01	<0.01	<0.01

$\bar{x} \pm s$

注:^a $P < 0.05$ vs 正常组;^c $P < 0.05$ vs 模型组。

义($P < 0.05$);大黄素组 PPAR 蛋白表达高于模型组, MAPK、NF- κ B 低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);大黄素组 PPAR 蛋白表达低于正常组, MAPK、NF- κ B 表达高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$, 表3,图2)。

3 讨论

真菌性角膜炎致病菌是真菌,是一种感染性角膜病。真菌性角膜炎与长时间配戴角膜接触镜和使用抗生素有关^[7]。我国主要的致病真菌主要有镰刀菌属、曲霉菌属和念珠菌等^[8]。烟曲霉菌属于曲霉菌属,烟曲霉菌角膜炎使用一般的抗菌药物治疗,很难完全杀死,增大了治疗难度,严重时会导致角膜溃疡、角膜穿孔甚至失明^[9]。本研究中,建立烟曲霉菌性角膜炎大鼠模型,选择将悬浊液注入角膜接触镜镜片与角膜层之间,其操作简单,时间短,建模成功率较高。

研究表明,多种细胞因子参与了真菌性角膜炎的发生和发展,细胞因子表达水平与炎症的发生和发展以及角膜损伤的严重具有相关性^[10]。有研究指出,大黄素能够提高角膜屏障蛋白表达量,保护角膜屏障完整,降低中性粒细胞的浸润程度,减少角膜损伤^[11]。本研究结果显示,大黄素组大鼠角膜炎症指数和角膜炎症细胞计数降低,说明大黄素可以降低大鼠角膜炎症指数,减少角膜炎症细胞数

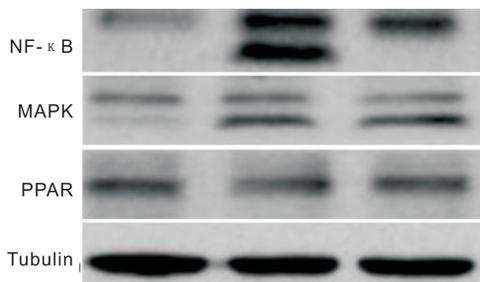


图2 三组大鼠 PPAR、MAPK、NF- κ B 蛋白表达 Western blot 图。

量。高红刚等^[12]指出,大黄素能够抑制眼部碱烧伤炎症。本研究也说明大黄素的抑制炎症作用明显。IL-6 是炎症发热反应的重要因子,某些肿瘤细胞会自身诱导形成 IL-6,促进肿瘤细胞的增殖生长,IL-6 在人体内参与多种炎症反应和疾病,属于促炎因子^[13-14]。TNF- α 能够刺激免疫活性细胞产生白细胞介素等炎症因子,但是 TNF- α 在机体中过多表达,会促使 T 细胞产生各种炎症因子,从而造成机体细胞的损坏^[15]。ICAM-1 是一种重要的黏附分子,主要介导细胞间的黏附反应,参与细胞间的信号转导和活化过程,促进细胞生长和分化,在炎症反应过程中发挥着重要作用^[16]。本研究结果显示,大黄素组 TNF- α 、

IL-6、ICAM-1 水平降低,说明大黄素可以改善大鼠的 TNF- α 、IL-6、ICAM-1 水平,起到抑制炎症的作用。Chen 等^[17]指出,大黄素能够缓解角膜水肿和炎性细胞浸润程度,降低角膜组织中 TNF- α 、ICAM-1 水平,与本研究结果保持一致。

本研究显示,大黄素组 PPAR 蛋白表达升高,MAPK、NF- κ B 表达降低,说明大黄素对 MAPK、NF- κ B 有抑制作用,促进 PPAR 蛋白表达,大黄素通过抑制 NF- κ B 活化,能够减少炎性细胞因子的释放,从而对组织起到一定的保护作用。陈国玲等^[6]研究也指出,大黄素能改善其 NF- κ B 蛋白表达,本研究与其保持一致。NF- κ B 可以与多种基因启动因子进行特异性结合,促进基因转录,NF- κ B 通过对下游基因进行转录,起到对炎症因子网络调节作用^[18-19]。PPAR、MAPK 是 NF- κ B 重要的调节蛋白^[20]。通过本研究说明,大黄素其可能的作用机制是激活 NF- κ B 相关通路,控制 PPAR、MAPK 表达,通过抑制 NF- κ B 调控 TNF- α 、IL-6、ICAM-1 水平,抑制炎性释放,降低炎性反应。

综上所述,大黄素治疗烟曲霉菌性角膜炎模型大鼠效果显著,通过调控 PPAR、MAPK、NF- κ B 蛋白,改善 TNF- α 、IL-6、ICAM-1 炎症因子水平,起到抗炎作用。

参考文献

- 1 钟菁,袁进,蒋刚彪,等.伏立康唑纳米银复合膜对烟曲霉菌性角膜炎的疗效及安全性.中华实验眼科杂志 2015;33(5):412-418
- 2 李冰,陈一强,孔晋亮,等.黄芩素联合两性霉素 B 对烟曲霉菌生物被膜的体外作用.山东医药 2016;56(4):5-7
- 3 刘瑞霞,齐文杰.大黄素治疗重症急性胰腺炎的作用与机制研究进展.临床和实验医学杂志 2016;15(2):193-195
- 4 林玩福,汪晨,凌昌全.大黄素抗肿瘤作用研究进展.中国中药杂志 2015;40(20):3937-3940
- 5 任毅,甘胜伟,李平华,等.Dectin-1 和 TLR4 在烟曲霉菌性角膜炎大鼠角膜组织中的表达及其在角膜炎发病中的作用.吉林大学学报(医学版) 2015;41(6):1176-1180
- 6 陈国玲,任然,张英辉,等.大黄素对角膜炎大鼠角膜组织 NF- κ B 活化表达的影响及意义.山东大学学报(医学版) 2014;52(9):44-47

- 7 任晓晓,吴欣怡.TSLPR/STAT5 信号通路在角膜基质细胞抗烟曲霉菌感染免疫调控的体外研究.中华眼科杂志 2016;52(3):206-211
- 8 邹丽红,陈一强,孔晋亮,等.绿原酸联合两性霉素 B 对烟曲霉菌生物膜干预作用的体外研究.中华医院感染学杂志 2015;25(6):1201-1203
- 9 陈先华,牛军,郝飞,等.烟曲霉菌对唑类抗真菌药的耐药机制研究进展.中华临床医师杂志(电子版) 2016;10(3):418-423
- 10 刘婷婷,邹文进,程璞,等.多西环素对大鼠烟曲霉菌性角膜炎中炎症细胞及 MCP-1 的抑制作用.广西医科大学学报 2018;35(4):441-445
- 11 Chen G, Zhang J, Zhang H, et al. Anti-inflammatory effect of emodin on lipopolysaccharide-induced keratitis in Wistar rats. *Int J Clin Exp Med* 2015;15;8(8):12382-12389
- 12 高红刚,周菊华.大黄素抗炎作用及相关机制研究进展.济宁医学院学报 2016;39(5):348-352
- 13 刘超,高慧婕,朱玉贞,等.大黄素对小鼠的免疫调节作用及对脾细胞 TNF- α 和 IL-10 表达的影响.基础医学与临床 2018;38(9):1298-1302
- 14 董亚慧,陈鹏,张真真,等.白细胞介素-6 对糖尿病小鼠角膜缘干细胞活化的促进作用和角膜上皮愈合的加速作用.中华实验眼科杂志 2017;35(5):423-431
- 15 彭玲,蔡伟浩,陆晓和,等.氟他胺诱导干眼模型大鼠角膜和泪腺组织病理变化及 TNF- α 、IL-1 α 的表达.眼科新进展 2016;36(6):506-511
- 16 袁建树,王鹏赟,王骥,等.夏枯草颗粒治疗更年期妇女干眼症的疗效及对结膜白介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 、胞间黏附分子-1 表达的影响.中国妇幼保健 2017;32(12):2675-2678
- 17 Chen D, Liu J, Lu L, et al. Emodin attenuates TNF- α -induced apoptosis and autophagy in mouse C2C12 myoblasts through the phosphorylation of Akt. *Int Immunopharmacol* 2016;34:107-113
- 18 刘小波,桑文涛,石博宇,等.荆防药对正丁醇提取部位抗炎作用的 NF- κ B 信号通路机制研究.北京中医药大学学报 2018;41(11):959-968
- 19 杨晓晓,黄虹婷,刘满华,等.NF- κ B 参与调控细胞凋亡.上海交通大学学报(医学版) 2017;37(10):1446-1452
- 20 任凯旋,涂岳圣,朱涛,等.大黄素通过 PPAR γ /NF- κ B 信号通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应.西部医学 2018;30(1):12-15,20