

# 血必净注射液影响肿瘤坏死因子- $\alpha$ 在内毒素诱导的葡萄膜炎大鼠中的表达

杜仲霞<sup>1</sup>, 王杰<sup>2</sup>, 李瑞东<sup>2</sup>, 杨媛<sup>2</sup>

引用: 杜仲霞, 王杰, 李瑞东, 等. 血必净注射液影响肿瘤坏死因子- $\alpha$ 在内毒素诱导的葡萄膜炎大鼠中的表达. 国际眼科杂志, 2025, 25(10): 1560-1565.

关键词: 内毒素; 葡萄膜炎; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 血必净注射液

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2025.10.03

基金项目: 山东省中医药科技项目 (No.2021M085)

作者单位: <sup>1</sup>(276000) 中国山东省临沂市, 山东省鲁南眼科医院; <sup>2</sup>(261000) 中国山东省潍坊市, 山东第二医科大学附属中医医院 潍坊市中医院

作者简介: 杜仲霞, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼表疾病和白内障治疗。

通讯作者: 杨媛, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼底病. 82yangyuan@163.com

收稿日期: 2025-04-07 修回日期: 2025-08-25

## Effect of Xuebijing injection on tumor necrosis factor- $\alpha$ expression in rats with endotoxin-induced uveitis

Du Zhongxia<sup>1</sup>, Wang Jie<sup>2</sup>, Li Ruidong<sup>2</sup>, Yang Yuan<sup>2</sup>

Foundation item: Shandong Provincial Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project (No.2021M085)

<sup>1</sup>Shandong Lunan Eye Hospital, Linyi 276000, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Affiliated Hospital of Shandong Second Medical University; Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Weifang 261000, Shandong Province, China

Correspondence to: Yang Yuan. Affiliated Hospital of Shandong Second Medical University; Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Weifang 261000, Shandong Province, China. 82yangyuan@163.com

Received: 2025-04-07 Accepted: 2025-08-25

### 摘要

目的: 观察肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 在内毒素诱导的葡萄膜炎 (EIU) 模型大鼠虹膜、睫状体组织中的表达, 以及血必净注射液对 EIU 大鼠 TNF- $\alpha$  表达的影响。

方法: 将清洁级 Wistar 大鼠 65 只随机分为 3 组, 生理盐水注射组 5 只 (A 组)、生理盐水+内毒素注射组 30 只 (B 组)、血必净注射液+内毒素注射组 30 只 (C 组)。B 组和 C 组大鼠采用双后足底注射大肠杆菌内毒素诱导葡萄膜炎动物模型, 并在注射内毒素 30 min 前分别腹腔注射生理盐水 (15 mL/kg) 或血必净注射液 (15 mL/kg)。将 B 组和 C 组大鼠在注射内毒素后分为 6、12、18、24、48、72 h 六个亚组, 每个亚组各 5 只, 于上述不同时间点观察大鼠眼内炎症反应, 吸取房水计数炎症细胞数目, 并采用 HE 染色观察大鼠虹膜、睫状体组织内的病理改变, 免疫组织化学方法检测术后不同时间点 TNF- $\alpha$  在虹膜、睫状体组织中的表达并分析。

结果: 临床观察显示, A 组大鼠未出现葡萄膜炎体征, B 组大鼠可见炎症反应, C 组与 B 组相比炎症反应显著减轻 ( $P<0.01$ ); 房水细胞计数显示 A 组房水中未见炎性细胞, C 组房水细胞数量较 B 组显著减少 ( $P<0.01$ ); HE 染色显示 A 组无细胞浸润, B 组在内毒素注射后 6 h 即可观察到眼部出现细胞浸润, 随着时间推移浸润细胞数逐渐增加, 24 h 达到峰值后逐渐减少; C 组在内毒素注射后 6 h 炎性细胞浸润不明显, 24 h 可见少量炎性细胞浸润, 48 h 炎性细胞浸润几乎消失。免疫组化染色显示 B 组大鼠虹膜、睫状体组织中 TNF- $\alpha$  表达高于 A 组 ( $P<0.01$ ), 且 TNF- $\alpha$  在 C 组的表达相较 B 组减弱 ( $P<0.01$ )。

结论: TNF- $\alpha$  在 EIU 模型大鼠中表达增高, 其平均光密度比值与炎症程度呈正相关, 且血必净注射液可通过降低 TNF- $\alpha$  的水平减轻内毒素诱导的葡萄膜炎的炎症反应。

### Abstract

• AIM: To evaluate the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the iris and ciliary body of Wistar rats in the endotoxin-induced uveitis (EIU), and the effect of Xuebijing injection on its expression.

• METHODS: A total of 65 Wistar rats were randomly divided into three groups: Group A (normal saline,  $n=5$ ), Group B (normal saline+endotoxin-injected,  $n=30$ ), and Group C (Xuebijing+endotoxin-injected,  $n=30$ ). The EIU model was induced in Wistar rats of the groups B and C by injecting LPS into the plantar surfaces of the hind feet, and normal saline (15 mL/kg) or Xuebijing (15 mL/kg) were intraperitoneally administered 30 min before LPS administration. The rats of the groups B and C were further divided into 6 subgroups after LPS injection, including 6, 12, 18, 24, 48, and 72 h subgroups, with 5 rats in each group. Furthermore, the intraocular inflammation of the rats was observed at each time above, the number of infiltrating cells in the aqueous humor was counted, and the pathological changes were observed in the iris and ciliary body of rats using hematoxylin and eosin (HE) staining. TNF- $\alpha$  expression

in iris and ciliary tissue at different postoperative time points was evaluated using immunohistochemistry.

• **RESULTS:** Clinical observations indicated no signs of uveitis in the group A, signs of uveitis were observed in the group B. Both iris symptoms and damage were significantly reduced in the group C compared to the group B ( $P < 0.01$ ). Cell counts in the aqueous humor revealed no inflammatory cells in the group A, while the number of aqueous humor cells in the group C was significantly reduced compared to Group B ( $P < 0.01$ ). HE staining revealed no cellular infiltration in the group A. In the group B, some cellular infiltration was observed in the eyes at 6 h post-LPS exposure. The number of infiltrating cells increased over time, peaked at 24 h, and gradually declined thereafter. In the group C, cell infiltration was not obvious at 6 h, few at 24 h, and nearly disappeared by 48 h. Immunohistochemical staining showed higher TNF- $\alpha$  expression in the ciliary body and iris in the group B than in the group A ( $P < 0.01$ ). Compared to the group C, TNF- $\alpha$  expression in the group B was significantly upregulated following LPS injection ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** TNF- $\alpha$  expression was elevated in EIU rats, and there was a positive correlation between its mean optical density ratio and inflammation degree. Moreover, Xuebijing injection could alleviate inflammation response through the reduction of TNF- $\alpha$  levels.

• **KEYWORDS:** endotoxin; endotoxin - induced uveitis; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Xuebijing injection

**Citation:** Du ZX, Wang J, Li RD, et al. Effect of Xuebijing injection on tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in rats with endotoxin-induced uveitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2025, 25(10): 1560-1565.

## 0 引言

葡萄膜炎(endotoxin-induced uveitis, EIU)泛指累及虹膜、睫状体、玻璃体、视网膜及脉络膜等眼内组织的炎症性疾病,是全球重要的致盲性眼病之一。其发生、发展与炎症反应密切相关,病因复杂,常与细菌、病毒感染及自身免疫性疾病相关<sup>[1]</sup>。目前临床治疗以糖皮质激素和免疫抑制剂为主,但存在副作用显著、易复发且治疗成本高昂等问题,使得葡萄膜炎的治疗仍面临挑战。在葡萄膜炎中, Th1 细胞(T helper 1 cell)是关键的促炎细胞亚群。其主要促炎介质为肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )。炎症反应中,活化的固有免疫细胞释放 TNF- $\alpha$ ,后者进一步促进 Th1 细胞活化,构成炎症损伤的核心环节<sup>[2]</sup>。多种主要类型的葡萄膜炎具有相似的免疫病理机制,特征为 Th1 和 Th17 细胞(T helper 17 cell)的激活,以及线粒体氧化应激介导的视网膜色素上皮损伤<sup>[3]</sup>。氧化应激与 TNF- $\alpha$  密切相关:TNF- $\alpha$  可诱导氧自由基生成,进而激活中性粒细胞产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),导致组织损伤;同时,ROS 亦可上调 TNF- $\alpha$  水平。两者在葡萄膜炎的发展中形成

恶性循环,发挥重要作用<sup>[4]</sup>。

孙梦杰等<sup>[4]</sup>的实验研究显示,血必净注射液能够明显降低脓毒症模型大鼠血清中的炎症因子 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)和白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)的含量,从而抑制炎症因子过度释放。血必净注射液是一种化瘀解毒的中成药,临床常用于器官功能衰竭及全身炎症反应综合征等疾病的治疗<sup>[5]</sup>,然而,其在葡萄膜炎治疗领域的研究报道尚属少见。本研究采用内毒素诱导 Wistar 大鼠构建葡萄膜炎模型,评估其临床表现并计数房水炎性细胞。通过 HE 染色观察虹膜组织病理学变化,并运用免疫组化技术检测炎症关键因子 TNF- $\alpha$  在疾病进程中的表达水平。同时进一步与血必净注射液预处理组比较,旨在探讨 TNF- $\alpha$  在葡萄膜炎发病机制中的作用,观察血必净注射液对 TNF- $\alpha$  表达的调控效应及其对葡萄膜炎的治疗作用,为探索葡萄膜炎新的治疗策略提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 **实验动物** 健康无眼疾的清洁级 Wistar 大鼠 65 只由山东朋悦实验动物科技有限公司提供,6-8 周龄,体质量 180-220 g,大鼠室温下自由饮食和饮水。研究符合伦理学标准,且通过伦理学委员会审查(审批号:2024SDL872)。

1.1.2 **主要试剂和仪器** 血必净注射液(天津红日药业);内毒素脂多糖(美国 Sigma);兔抗大鼠 TNF- $\alpha$  多克隆抗体(北京中杉金桥);PV-9001 免疫组化试剂盒, PV-9002 免疫组化试剂盒,棕黄色 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥);BH-2 型光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);YZ-20T 眼科手术显微镜,眼科显微手术器械包(苏州医疗器械厂);CMIAS 多功能真彩图像分析仪(购自北京航空航天大学)。

### 1.2 方法

1.2.1 **实验分组与处理** 根据杨培增等<sup>[6]</sup>的方法,将内毒素脂多糖溶解于灭菌的生理盐水至终浓度 2 mg/mL。大鼠经腹腔注射 10%水合氯醛溶液(3 mL/kg)全身麻醉后,用 75%酒精消毒大鼠双后足垫。将清洁级 Wistar 大鼠 65 只随机分为 3 组, A 组为对照组 5 只, 每只大鼠双后足底部注射 0.9%的生理盐水 1 mg/kg; B 组为生理盐水+内毒素注射组 30 只, 提前腹腔注射生理盐水 15 mL/kg, 30 min 后双后足底皮下注射内毒素溶解液 1 mg/kg, 得到内毒素脂多糖诱导的葡萄膜炎动物模型; C 组为血必净注射液+内毒素注射组 30 只, 大鼠提前给予腹腔注射血必净注射液 15 mL/kg<sup>[7]</sup>, 30 min 后双后足底皮下注射内毒素 1 mg/kg。B 组与 C 组根据注射内毒素后处死大鼠的时间点分为 6、12、18、24、48、72 h 六个亚组, 每个亚组 5 只大鼠。

1.2.2 **EIU 临床观察及评分** 在相应时间点处用裂隙灯观察各组大鼠眼部炎症表现并给予评分。炎症分级参考 Hoekzema 评分标准<sup>[8]</sup>:虹膜充血 0-2 分,前房内渗出 1-2 分,前房积脓 0-2 分,瞳孔缩小 0-2 分,总分 8 分。

1.2.3 **房水中白细胞计数检测** 内毒素注射后在各时间点用微量移液器从大鼠角膜缘抽出少量房水滴于细胞计数板上,显微镜下观察计数 4 个角的大方格中的白细胞总

数,压线细胞只计左侧和上方,以所得细胞数 $\times 10 \times 1/4$  即得每单位  $\mu\text{L}$  房水中的白细胞数目,每个亚组取平均值进行分析。

**1.2.4 标本及切片的制作** 采集完房水后,过量戊巴比妥钠(150 mg/kg)处死大鼠并迅速摘除左眼眼球,流水冲洗后,将所取完整眼球置于5%中性甲醛溶液中固定24 h。取出后流水冲洗30 min,去除晶状体,沿视轴方向作矢状切面。将标本进行梯度酒精脱水,制作石蜡标本薄片,厚度4  $\mu\text{m}$ ,用于HE染色及免疫组化。

**1.2.5 判断标准及方法** 光学显微镜下观察,TNF- $\alpha$  染色阳性的细胞表现为胞浆出现棕黄色程度不等的、基本均匀的粗大颗粒反应。A组及B、C各亚组中各取5张切片,每张切片均在虹膜部位,在40倍物镜下,将切片上显示的免疫组织化学染色阳性细胞信号投射到图像分析的荧光屏上,经灰度调节后测定阳性细胞的平均光密度值(optical density, OD),并进行统计学分析。

统计学分析:应用SPSS17.0统计软件进行分析,数据首先进行方差齐性和正态性检验,所有数据均符合正态分布,采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组数据进行独立样本 *t* 检验,三组数据行方差分析,均数两两比较采用SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 临床观察及评分** A组未见炎症反应,各项葡萄膜炎临床评分均为0;注射内毒素后6 h, B组大鼠出现虹膜轻度充血,瞳孔缩小,12 h开始出现房水闪辉,虹膜充血变厚,瞳孔区有纤维素渗出,18 h炎症反应较前加重,24 h炎症反应达到高峰,虹膜充血严重,瞳孔进一步缩小,瞳孔区纤维素渗出显著增多,大量炎性细胞浸润。48 h炎症明显减轻。C组大鼠在注射内毒素后6、12、18、24、48、72 h各时间点炎症反应表现明显弱于B组,差异有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),检验结果数据见表1。

**2.2 房水细胞计数** A组房水中未检出细胞,房水细胞计数为0,注射内毒素后6、12、18、24、48、72 h各时间点C组大鼠房水细胞计数比B组均明显减少,差异有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),数据及检验结果见表2。

**2.3 HE染色检查大鼠虹膜组织病理学** A组光学显微镜下虹膜上皮细胞大小一致且排列整齐,细胞质呈均匀染

色,细胞核圆形,组织层次清晰,无炎症细胞浸润(图1A)。B组内毒素注射后6 h虹膜血管扩张,虹膜组织内有少量炎症细胞浸润;24 h虹膜组织水肿明显,色素上皮细胞排列紊乱,血管充血、明显扩张,大量炎症细胞浸润,中性粒细胞为主,还有少量淋巴细胞和单核细胞(图1B);48 h虹膜组织水肿减轻,炎症细胞浸润减少(图1C);72 h浸润炎症细胞极少(图1D)。C组内毒素注射后6 h虹膜组织轻度水肿,血管轻度扩张,少量炎症细胞浸润;24 h虹膜轻度充血,少量炎症细胞浸润(图1E);48 h虹膜充血明显减轻,炎症细胞浸润明显减少(图1F);72 h虹膜组织基本正常(图1G)。C组大鼠虹膜炎症反应较B组明显减轻。

**2.4 各组大鼠虹膜及睫状体组织TNF- $\alpha$ 免疫组织化学染色结果** A组正常虹膜组织TNF- $\alpha$ 弱阳性表达,B组、C组TNF- $\alpha$ 阳性表达,主要见于虹膜睫状体上皮细胞及渗出炎症细胞胞浆中,呈棕黄色着染(图2)。

**2.5 各组大鼠虹膜及睫状体组织TNF- $\alpha$ 阳性细胞光密度值** 方差分析结果显示,各时间点三组之间的差异均具有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),进一步两两比较结果表明,各时间点C组TNF- $\alpha$ 阳性表达明显少于B组,差异有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。注射内毒素后12、18、24、48 h, A、B、C三组两两比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。第6、72 h, B组分别与C、A组比较差异有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),C组与A组比较差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),见表3,图3。

## 3 讨论

葡萄膜炎是一种常见且可致盲的眼病,好发于青壮年人群。其反复发作、迁延难愈的特性严重影响患者生活质量。目前,该病尚缺乏特效疗法和有效的预防措施。葡萄膜炎的发病与发展是一个复杂的动态过程,在人体内,对眼内微环境的相关研究存在诸多限制,而建立动物模型可在细胞和分子层面深入探讨葡萄膜炎的发病机制及进展过程,是葡萄膜炎相关研究的重要途径。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为内毒素的活性成分,是革兰阴性菌( $G^-$ 细菌)细胞壁的关键组分及主要致病因子。其致病机制主要通过激活单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞等免疫细胞,诱导产生多种炎性介质如IL-1、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、前列腺

表1 两组大鼠注射内毒素后不同时间点葡萄膜炎临床评分比较

( $n = 5, \bar{x} \pm s$ , 分)

分组	注射 6 h	注射 12 h	注射 18 h	注射 24 h	注射 48 h	注射 72 h
B组	1.24 $\pm$ 0.45	2.14 $\pm$ 0.47	4.52 $\pm$ 0.76	6.16 $\pm$ 0.78	3.69 $\pm$ 0.63	1.14 $\pm$ 0.48
C组	0	0.45 $\pm$ 0.27	1.33 $\pm$ 0.34	2.05 $\pm$ 1.07	0.63 $\pm$ 0.54	0
<i>t</i>	6.177	6.972	8.567	6.941	8.246	5.322
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:B组为生理盐水+内毒素注射组;C组为血必净注射液+内毒素注射组。

表2 两组大鼠注射内毒素后不同时间点房水细胞计数比较

( $n = 5, \bar{x} \pm s$ , cells/ $\mu\text{L}$ )

分组	注射 6 h	注射 12 h	注射 18 h	注射 24 h	注射 48 h	注射 72 h
B组	28.56 $\pm$ 4.35	86.98 $\pm$ 7.99	148.01 $\pm$ 10.98	207.21 $\pm$ 12.56	128.89 $\pm$ 9.58	27.87 $\pm$ 5.20
C组	5.98 $\pm$ 1.34	25.18 $\pm$ 3.68	44.21 $\pm$ 6.29	70.34 $\pm$ 9.21	29.45 $\pm$ 5.19	6.11 $\pm$ 2.02
<i>t</i>	11.093	15.709	18.342	19.650	20.408	8.722
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:B组为生理盐水+内毒素注射组;C组为血必净注射液+内毒素注射组。



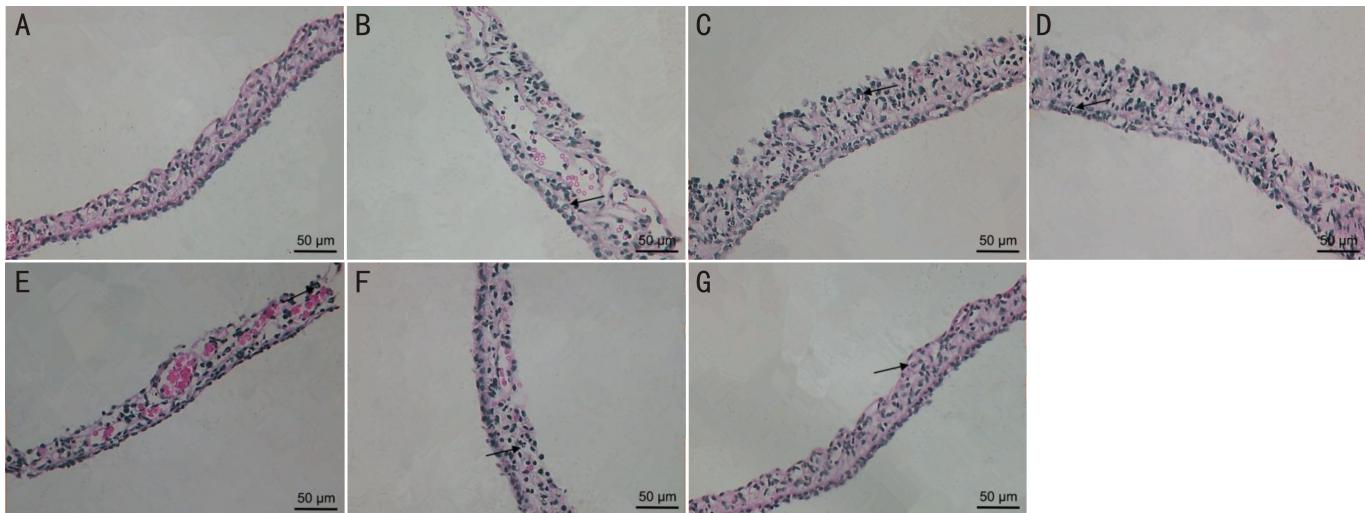


图1 大鼠虹膜组织病理学 HE 染色结果 A: A 组正常大鼠虹膜;B: B 组大鼠内毒素注射后 24 h 虹膜基质层明显变厚,血管扩张充血,有大量炎性细胞浸润(箭头所指);C: B 组 48 h 虹膜组织基质层厚度较 24 h 变薄,轻度血管扩张充血,少量炎症细胞浸润(箭头所指);D: B 组 72h 虹膜组织基质层厚度较 48 h 变薄,极少量炎症细胞浸润(箭头所指);E: C 组内毒素注射后 24 h,虹膜基质层变厚不明显,血管轻度扩张充血,有少量炎性细胞浸润(箭头所指);F: C 组 48 h,虹膜基质层变厚较轻,血管轻度扩张充血,有少量炎性细胞浸润(箭头所指);G: C 组 72 h,虹膜基质层基本恢复正常,几乎无炎性细胞浸润(箭头所指)。

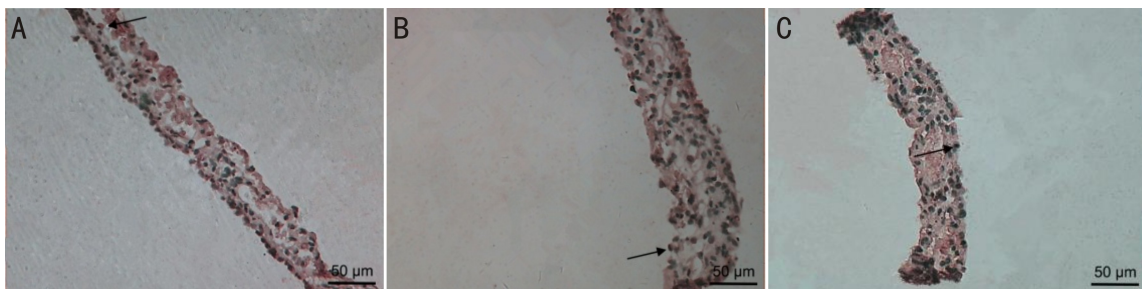


图2 大鼠虹膜睫状体组织 TNF- $\alpha$  免疫组织化学染色结果 A: A 组正常虹膜组织 TNF- $\alpha$  弱阳性表达(箭头所指);B: B 组 24 h 虹膜组织 TNF- $\alpha$  强阳性表达(箭头所指);C: C 组 24 h 虹膜组织 TNF- $\alpha$  表达增多,但较 B 组 24 h 阳性表达弱(箭头所指)。

表3 各组大鼠不同时间点虹膜及睫状体组织 TNF- $\alpha$  阳性细胞光密度值

( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

分组	注射 6 h	注射 12 h	注射 18 h	注射 24 h	注射 48 h	注射 72 h
A 组	0.072 $\pm$ 0.018	0.072 $\pm$ 0.018	0.072 $\pm$ 0.018	0.072 $\pm$ 0.018	0.072 $\pm$ 0.018	0.072 $\pm$ 0.018
B 组	0.205 $\pm$ 0.012 <sup>b</sup>	0.287 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	0.419 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.507 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup>	0.317 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup>	0.302 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
C 组	0.080 $\pm$ 0.021 <sup>d</sup>	0.149 $\pm$ 0.002 <sup>b,d</sup>	0.210 $\pm$ 0.006 <sup>b,d</sup>	0.301 $\pm$ 0.008 <sup>b,d</sup>	0.169 $\pm$ 0.002 <sup>b,d</sup>	0.080 $\pm$ 0.002 <sup>d</sup>
F	91.80	489.00	657.79	835.40	558.30	597.24
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: A 组为生理盐水注射组; B 组为生理盐水+内毒素注射组; C 组为血必净注射液+内毒素注射组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs A 组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs B 组。

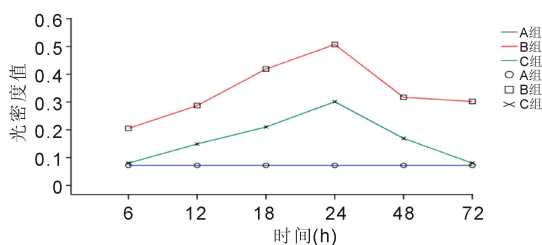


图3 不同时间点各组大鼠虹膜及睫状体组织 TNF- $\alpha$  阳性细胞光密度值。

素、白三烯 B4、TNF- $\alpha$ 、干扰素(interferon, IFN)、白细胞致热源(leukocytic pyrogen, LP)等引发机体内毒素性发热、微循环障碍和急性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)等表现。杨培增等<sup>[6]</sup>在对眼部组织平片

和切片进行免疫组织化学研究时发现,内毒素诱导的眼内炎不仅累及眼前节,还可引发视网膜和脉络膜的原发性炎性细胞浸润,由此提出了 EIU 动物模型可作为人类全葡萄膜炎动物模型的观点。目前用于葡萄膜炎研究的动物模型主要有两种: EIU 和实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveoretinitis, EAU)。与 EAU 相比, EIU 模型因炎症发生迅速、病程短、虹膜、睫状体炎性浸润显著、建模简便且可重复性好等优势,被公认为较成熟的人类葡萄膜炎动物模型<sup>[9]</sup>。人类前葡萄膜炎如 Reiter's 综合征、BLA-B27 阳性的急性前葡萄膜炎、幼年型风湿性关节炎、Behcet's 病、伏格特-小柳-原田综合征(vogt-koyanagi-syndrome)的临床表现和病理改变与 EIU 模型的改变大致相似<sup>[10]</sup>。许颖知等<sup>[11]</sup>研究发现 EIU 模型小鼠房水中 TNF- $\alpha$  在 LPS 注射后 4 h 即达峰值,作为

早期核心炎症因子调控全程炎症反应。而 IL-1、IL-6 于 16 h 达峰后逐渐下降,其峰值滞后于 TNF- $\alpha$ 。这一发现与临床葡萄膜炎患者房水中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 高表达的现象一致。据 Guex-Grosier 等<sup>[12]</sup>实验研究得出。内毒素注射后动物模型眼部病理改变为 2-4 h 前房出现蛋白渗出,6-10 h 炎性细胞浸润(主要有多形核中性粒细胞与单核细胞浸润),伴随蛋白渗出,24 h 炎症反应达高峰,48 h 炎症反应明显减轻。本次实验大鼠注射内毒素后临床表现及病理改变与以往报道基本相符,亦证实成功复制出内毒素诱导的葡萄膜炎模型。

参与葡萄膜炎发病过程的 T 细胞亚群包括:Th1、Th2、Th17 和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Tregs)<sup>[13]</sup>,活化的 T 细胞亚群可以释放出许多炎症因子,从而损伤血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)和光感受器细胞,导致眼免疫细胞的浸润和活化,进而发展为葡萄膜炎<sup>[14]</sup>。Th1 细胞具有促炎作用,主要源于其可分泌 IL-2、TNF- $\alpha$ 、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )等细胞因子<sup>[2]</sup>,TNF- $\alpha$  是一种参与并刺激全身急性炎症反应的细胞因子,有研究发现 TNF 受体在虹膜、睫状体、视网膜色素上皮细胞都可以找到,TNF- $\alpha$  与其受体相结合后,可增加血-视网膜屏障的通透性,使黏附分子增加,从而使炎症细胞因子向眼部浸润,TNF- $\alpha$  又能促进基质金属蛋白酶 3(matrix metalloproteinase 3, MMP-3)的表达,进一步破坏 BRB<sup>[15]</sup>。TNF- $\alpha$  由 Th 细胞、巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞和内皮细胞分泌,它可以激活其他细胞因子,上调黏附分子,诱导一氧化氮合酶,提高细胞介导的免疫和肉芽肿形成<sup>[16]</sup>。TNF- $\alpha$  作为早期核心促炎因子,可启动细胞因子级联反应,诱导 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 及次级介质[如血小板活化因子、前列腺素、一氧化氮(nitric oxide, NO)和白细胞三烯]的合成,最终引发炎症失衡<sup>[17]</sup>。有研究发现使用 LPS 诱导的葡萄膜炎模型中 TNF- $\alpha$  升高,与 LPS 给药后 3 h 相比,给药后 24 h 的 TNF- $\alpha$  水平更高<sup>[18]</sup>。Pérez-Guijo<sup>[19]</sup>和 Santos Lacomba<sup>[20]</sup>等发现葡萄膜炎患者的血清和房水中 TNF- $\alpha$  水平明显高于正常组。既往研究亦发现,LPS 诱导的急性葡萄膜炎小鼠房水中 NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6 浓度升高<sup>[21]</sup>。本实验证实正常大鼠虹膜上皮细胞、睫状体上皮细胞可见 TNF- $\alpha$  弱阳性表达,在内毒素注射 6 h 后,TNF- $\alpha$  的表达即明显上升,并在 24 h 内逐渐升高,24 h 达高峰后逐渐下降。TNF- $\alpha$  平均光密度比值与炎症程度呈正相关。由此可推测 TNF- $\alpha$  是葡萄膜炎炎症过程的重要介质,促进炎症细胞移行、渗出及炎症介质的释放,加重炎症反应,造成眼组织损伤,这与国外报道基本一致。

血必净注射液是以清代医家王清任之血府逐瘀汤为底方,由红花、川芎、赤芍、当归、丹参等中药组合而成,主要活性成分包括川芎嗪、红花黄色素 A、丹参素及阿魏酸等<sup>[22]</sup>。血必净注射液可拮抗内毒素及多种炎症介质,抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 等炎症因子释放并促进免疫稳态恢复<sup>[23]</sup>。血必净注射液在临床上已用于脓毒症和胰腺炎<sup>[24]</sup>,其主要成分之一红花黄色素可强效抑制炎症因子<sup>[25]</sup>;当体内的炎症因子出现异常性激活时,丹参中的丹参酮 II A 可起到有效的阻碍作用,进而实现抗感染的效果<sup>[26]</sup>;赤芍中的赤芍总苷能够抑制炎症因子的表达<sup>[27]</sup>;川芎中的川芎嗪能够在一定程度上缓解患者体内的炎症浸润程度<sup>[28]</sup>。中国食品药品监督管理局批准血必净注射液用于治疗感染诱导的全身炎症反应综合征和多器官

功能障碍综合征。然而,其在葡萄膜炎治疗中的作用尚未见报道。

Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)/核转录因子(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号通路在大鼠急性内毒素性葡萄膜炎中起关键介导作用,内毒素 LPS 会引起该信号上调,升高血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平,导致眼部炎症反应<sup>[29]</sup>。TLR4 是 LPS 的受体<sup>[30]</sup>,主要被 LPS 所激活,LPS 在激活 TLR4 后,通过 MyD88 依赖途径活化 NF- $\kappa$ B 促进 NO、TNF- $\alpha$  等细胞因子的释放,最终启动机体的免疫损伤<sup>[31]</sup>,TNF- $\alpha$  是激活 NF- $\kappa$ B 通路的重要细胞因子,它可介导炎症介质的表达和转录,从而诱发炎症损伤<sup>[32]</sup>。寻找能干预 TLR4 信号转导的物质,如抑制 NF- $\kappa$ B 或 TNF- $\alpha$  的药物,可能是应用于葡萄膜炎疾病的防治与治疗中并控制机体炎症损伤加重的新途径。刘雪峰等<sup>[33]</sup>证实其可降低严重脓毒症患者血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平并改善器官功能。秦娜等<sup>[34]</sup>报道,血必净注射液可快速纠正 T 淋巴细胞紊乱,抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 释放,降低严重创伤患者血清中炎症因子水平。有研究发现,在急性百草枯中毒大鼠肺损伤模型中,血必净注射液能够通过抑制 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 和 IL-13 的表达改善百草枯中毒导致的肺损伤<sup>[35]</sup>。

本研究首次将血必净作为 TNF- $\alpha$  抑制剂应用于大鼠葡萄膜炎模型。结果显示造模前 30 min 给予血必净预处理,可显著降低大鼠虹膜/睫状体组织内 TNF- $\alpha$  表达,减少炎性细胞浸润并缓解炎症反应。这表明血必净可能通过抑制 TNF- $\alpha$  发挥防治葡萄膜炎的作用。研究局限:(1)结论基于动物模型,缺乏临床验证;(2)TNF- $\alpha$  检测仅采用免疫组化,需补充蛋白/基因水平分子生物学验证;(3)未设置阳性药物对照及剂量效应研究;(4)深层机制有待进一步探索。

综上,血必净注射液可有效抑制葡萄膜炎模型大鼠 TNF- $\alpha$  表达及炎症进展,为人类葡萄膜炎的防治提供新思路,血必净注射液作为中药复方制剂在治疗葡萄膜炎中具有潜在应用价值。

**利益冲突声明:**本文不存在利益冲突。

**作者贡献声明:**杜仲霞论文选题与修改,初稿撰写,文献检索,数据分析;李瑞东数据收集,论文修改及审阅;王杰课题研究监督,经费支持;杨媛选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

#### 参考文献

- [1] Tsiroki T, Dastiridou A, Symeonidis C, et al. A focus on the epidemiology of uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*, 2018,26(1):2-16.
- [2] 杨明,何笑英,韩伟.自身免疫性葡萄膜炎中免疫细胞的功能及变化的研究进展. *细胞与分子免疫学杂志*, 2023,39(1):81-87.
- [3] Lai TT, Yang CM, Yang CH. Astaxanthin protects retinal photoreceptor cells against high glucose-induced oxidative stress by induction of antioxidant enzymes via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Antioxidants (Basel)*, 2020,9(8):729.
- [4] 孙梦杰,屠亚茹,欧阳慧子,等.血必净注射液及其药代标示物对脓毒症大鼠炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8 和 IL-10 表达的影响. *天津中医药大学学报*, 2018,37(1):13-15.
- [5] 赵哲,胡仕祥,管俊芳,等.血必净注射液治疗全身炎症反应综合征的系统评价及序贯分析. *中国中药杂志*, 2021,46(15):3980-3989.



- [6] 杨培增, Alex F. de Vos, Lidy Broersma, 等. 内毒素诱导大鼠葡萄膜炎的组织平片和切片研究. 中华眼底病杂志, 1996,12(1):33-36,83.
- [7] 罗鹏, 周振兴. 血必净对大鼠急性肺损伤的保护作用. 中国应用生理学杂志, 2017,33(2):132-135.
- [8] Hoekzema R, Murray PI, van Haren MA, et al. Analysis of interleukin-6 in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991,32(1):88-95.
- [9] Miyazaki A, Kitaichi N, Ohgami K, et al. Anti-inflammatory effect of angiotensin type 1 receptor antagonist on endotoxin-induced uveitis in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008,246(5):747-757.
- [10] Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, et al. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature*, 1980,286(5773):611-613.
- [11] 许颖知, 卢弘, 陈巍, 等. 细胞因子在内毒素诱导的前葡萄膜炎小鼠房水和血清中的表达. 眼科新进展, 2010,30(4):308-312.
- [12] Guex-Crosier Y, Wittwer AJ, Roberge FG. Intraocular production of a cytokine (CINC) responsible for neutrophil infiltration in endotoxin induced uveitis. *Br J Ophthalmol*, 1996,80(7):649-653.
- [13] Guo KL, Zhang XM. Cytokines that modulate the differentiation of Th17 cells in autoimmune uveitis. *J Immunol Res*, 2021,2021(1):6693542.
- [14] Liu XY, Meng JY, Liao XY, et al. A de novo missense mutation in MPP2 confers an increased risk of Vogt-Koyanagi-Harada disease as shown by trio-based whole-exome sequencing. *Cell Mol Immunol*, 2023,20(11):1379-1392.
- [15] Whitmore HAB, Amarnani D, O'Hare M, et al. TNF- $\alpha$  signaling regulates RUNX1 function in endothelial cells. *FASEB J*, 2021,35(2):e21155.
- [16] O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 2002,2(1):37-45.
- [17] 周慧君, 程尉新, 林洪远解放军第三〇四医院 SICU, 等. 弥散性血管内凝血临床治疗进展. 中国危重病急救医学, 2000,10:635-636.
- [18] Keles S, Halici Z, Atmaca HT, et al. The ocular endothelin system; a novel target for the treatment of endotoxin-induced uveitis with bosentan. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014,55(6):3517-3524.
- [19] Pérez-Guijo V, Santos-Lacomba M, Sánchez-Hernández M, et al. Tumour necrosis factor- $\alpha$  levels in aqueous humour and serum from patients with uveitis; the involvement of HLA-B27. *Curr Med Res Opin*, 2004,20(2):155-157.
- [20] Santos Lacomba M, Marcos Martín C, Gallardo Galera JM, et al. Aqueous humor and serum tumor necrosis factor- $\alpha$  in clinical uveitis. *Ophthalmic Res*, 2001,33(5):251-255.
- [21] 刘敏, 姜明红, 高静, 等. miR-23a 对 LPS 诱导小鼠巨噬细胞促炎性细胞因子表达的影响. 基础医学与临床, 2013,33(6):666-670.
- [22] 吴江莹, 刘晓新. 血必净注射液的抗炎作用机制研究进展. 检验医学与临床, 2013,10(15):2030-2032.
- [23] 马俊清, 宋祖军. 血必净注射液治疗脓毒症、多器官功能障碍综合征的研究进展. 中华老年多器官疾病杂志, 2009,8(1):84-87.
- [24] 卢海儒, 樊凌沁. 血必净注射液的循证应用、不良反应及使用注意事项. 中国新药杂志, 2013,22(20):2449-2452.
- [25] 刘兆润, 董丽, 吴国刚. 俯卧位通气在中重度急性呼吸窘迫综合征的临床应用进展. 中国呼吸与危重监护杂志, 2016,15(5):517-519.
- [26] 赖军华, 漆奋强, 陈德伦, 等. 俯卧位通气联合小肠造瘘喂养在食管癌术后合并重度急性呼吸窘迫综合征患者中的应用. 广西医学, 2019,41(13):1654-1657,1665.
- [27] 李亮, 孙兆瑞, 任艺, 等. 俯卧位通气治疗急性百草枯中毒致中重度急性呼吸窘迫综合征的临床研究. 医学研究生学报, 2019,32(1):69-72.
- [28] 蒋文芳, 王晓源, 侯金珍, 等. 俯卧位通气对急性呼吸窘迫综合征患者腹腔压力影响的研究. 中国急救医学, 2018,38(9):799-802.
- [29] Kim W, Quesada R, Scherthaner MB, et al. Effects of percutaneous transluminal angioplasty on diastolic function in patients with chronic occlusion of lower-extremity artery. *J Invasive Cardiol*, 2016,28(12):498-504.
- [30] Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med*, 2002,30:S1-S11.
- [31] Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- $\kappa$ B involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*, 2003,198(7):1043-1055.
- [32] 白杨静, 钟舒阳. 巨噬细胞在葡萄膜炎免疫调节治疗机制中的研究进展. 国际眼科杂志, 2024,24(7):1068-1072.
- [33] 刘雪峰, 李文放, 赵良, 等. 血必净注射液对重症监护病房严重脓毒症患者器官功能保护作用的临床研究. 中国中西医结合急救杂志, 2010,17(1):20-23.
- [34] 秦娜, 李无阴, 魏立伟. 血必净注射液对严重创伤患者 T 淋巴细胞亚群及炎性细胞因子的影响. 中成药, 2013,35(9):1879-1881.
- [35] 卢文静, 李伟哲, 王鑫, 等. 百草枯中毒大鼠肺组织中 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、IL-13 的表达及血必净注射液干预的作用. 现代中西医结合杂志, 2019,28(32):3567-3571.