

# 不同构型吉法酯对干眼症大鼠角膜的保护作用\*

糜玲<sup>1,2\*\*</sup>, 周波<sup>1,2</sup>, 李永<sup>1,2</sup>, 彭金刚<sup>1,2</sup>, 汤磊<sup>1,2</sup>, 黄家宇<sup>1\*\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 药学院 药物分析教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨不同构型吉法酯对东莨菪碱氢溴酸盐所致干眼症大鼠角膜的保护作用。方法: 40 只雌性 Wistar 大鼠, 均分为正常组、生理盐水对照组、4Z 吉法酯治疗组(4Z 组)、4E 吉法酯治疗组(4E 组)和混合吉法酯治疗组(混合组), 后 4 组大鼠采用皮下注射东莨菪碱氢溴酸盐联合风扇制备干眼症大鼠模型, 正常组和生理盐水组大鼠用生理盐水滴眼、其余各治疗组分别使用 10 g/L 的各构型吉法酯滴眼液连续治疗 14 d; 于造模前、治疗第 7 及 14 天采用 Shirmer I 试验测量泪液分泌体积、角膜荧光素钠染色评价角膜损伤; 治疗第 14 天麻醉状态下处死大鼠采集角膜标本, 使用 HE 染色观察角膜形态学改变, PAS 染色计数结膜杯状细胞。结果: 泪液体积结果显示, 治疗前, 各治疗组大鼠与生理盐水组之间泪液体积的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ), 治疗第 7 天时, 4E 组和混合组大鼠泪液体积大于生理盐水组和 4Z 组大鼠( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 治疗第 14 天各治疗组大鼠的泪液体积明显大于生理盐水组大鼠( $P < 0.01$ ); 角膜荧光素钠染色评分结果显示, 治疗前各治疗组大鼠与生理盐水组染色评分比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ), 治疗第 7 天时 4E 组大鼠评分低于与生理盐水组( $P < 0.05$ ), 治疗第 14 天各治疗组大鼠评分明显低于生理盐水组( $P < 0.01$ ); HE 染色结果显示, 与生理盐水组大鼠相比, 各治疗组大鼠角膜的病理变化减轻; PAS 染色结果显示, 各治疗组大鼠结膜杯状细胞数量高于生理盐水组大鼠( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 4E 组和混合组则分别均高于 4Z 组( $P < 0.05$ )。结论: 4Z、4E 及混合式吉法酯对干眼症大鼠的角膜有保护作用, 4E 构型吉法酯的效果更好, 其保护机制可能与吉法酯增加泪液分泌和减少角膜杯状细胞数有关。

**[关键词]** 大鼠, Wistar; 吉法酯; 角膜; 干眼症; 构型; 结膜杯状细胞

**[中图分类号]** R744 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)01-0045-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.01.009

## Effects of Different Configurations of Gefarnate on Cornea in Dry Eye Rats

MI Ling<sup>1,2</sup>, ZHOU Bo<sup>1,2</sup>, LI Yong<sup>1,2</sup>, PENG Jingang<sup>1,2</sup>, TANG Lei<sup>1,2</sup>, HUANG Jiayu<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Guizhou Chemical Synthetic Drug Research and Development Engineering Technology Research Center, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the protective effect of different configurations of gemcitabine on scopolamine hydrobromide-induced dry eyes in rats. **Methods:** Wistar female rats were randomly divided into the normal group, 1% gemcitabine treatment group (4Z gefarnate, 4e gefarnate, 4Z+4E gefarnate) and the saline control group ( $n=8$ ). The normal group was not treated at all. In the other groups, the rat dry eye model was established by subcutaneous injection of scopolamine hydrobromide combined with a fan to simulate the environment of high circulation and low humidity. The basis of the Shirmer I test was evaluated on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days after treatment. The corneal damage volume was evaluated by tear secretion volume and corneal fluorescein staining. The corneal morphological changes

\*[基金项目] 贵州省科学技术基金项目[黔科合 JZ 字(2015)2001]; 贵州省科技计划项目[黔科合(2016)支撑 2848]; 贵州省教育厅青年科技人才成长项目[黔教合 KY 字(2017)155]

\*\* 贵州医科大学 2016 级研究生

\*\*\* 通信作者 E-mail: 272900026@qq.com

网络出版时间: 2020-01-09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20200109.2011.009.html>

were evaluated by HE staining on the 14<sup>th</sup> day after treatment, and the effect of PAS staining on the number of conjunctival goblet cells was evaluated. **Results:** On the 7<sup>th</sup> day of treatment, compared with the saline control group, the 4E configuration of gefarnate significantly increased the tear volume ( $P < 0.01$ ) and decreased the corneal fluorescein sodium staining scores ( $P < 0.05$ ) in dry eye rats; All configurations of gefarnate significantly increased tear volume ( $P < 0.05$ ) and decreased corneal fluorescein sodium staining scores ( $P < 0.05$ ). HE staining showed that the corneal upper cells in different treatment groups had different degrees of pathological changes, and compared with the 4Z configuration, the 4E configuration of gefarnate had better effect on corneal morphology than the 4Z configuration. The results of PAS staining showed that the genomic esters of all configurations significantly increased the number of conjunctival goblet cells in dry eye rats, and the number of goblet cells in the 4E configuration group was significantly higher than that in the 4Z configuration group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Both 4Z and 4E configurations have protective effect on cornea of rats with dry eyes, and 4E configuration is superior to 4Z configuration in tear volume recovery and corneal injury repair.

[**Key words**] rats, Wistar; gefarnate; cornea; dry eye; configurations; conjunctival goblet cells

干眼症又称干燥性角膜结膜炎,是多种因素所致的一种泪液和眼表疾病,包括眼表不适症状、视力变化和泪膜不稳定,并且伴有潜在的眼表损害,是眼科中发病率最高的眼表疾病之一<sup>[1-2]</sup>。目前干眼症的治疗多为人工泪液替代疗法,临床常用的人工泪液大多仅补充水液层,个别制剂中添加了脂质成分以降低泪液蒸发,改善黏蛋白功能的人工泪液国内尚无上市产品,目前国外进入临床研究的主要是 P2Y<sub>2</sub> 受体激动剂(如地夸磷索四钠滴眼液)和黏蛋白分泌激动剂(包括瑞巴派特和吉法酯)2 大类<sup>[3-4]</sup>。吉法酯,商品名惠加强-G,是一种黏蛋白分泌激动剂,临床上用于胃黏膜保护剂,还可以在干眼症中发挥治疗作用<sup>[5-7]</sup>。市售吉法酯为 4Z 构型吉法酯和 4E 构型吉法酯 2 种异构体的混合物<sup>[8]</sup>,但是哪一个构型的吉法酯在干眼症的治疗作用中起主要作用尚不明确。因此,本研究通过建立干眼症大鼠动物模型,使用 Shirmer I 方法测量大鼠泪液分泌体积、角膜荧光素钠染色评价角膜光滑度、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法观察角膜形态学及过碘酸雪夫氏(periodic acid-Schiff, PAS)染色法计数结膜杯状细胞数量,探讨 4Z、4E 吉法酯及混合型吉法酯对干眼症大鼠角膜的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物及分组** 6 周龄的雌性 Wistar 大鼠 40 只,体质量 160 ~ 180 g,购自重庆腾鑫生物技术有

限公司。在各 12 h 明暗周期、温度 22 ℃、湿度 40% ~ 50% 的饲养室饲养 1 周适应后,随机分为正常组、生理盐水对照组、4Z 吉法酯治疗组(4Z 组)、4E 吉法酯治疗组(4E 组)和混合吉法酯治疗组(混合组,4Z:4E = 30:70),每组 8 只。

**1.1.2 药物和试剂** 4Z 构型和 4E 构型吉法酯由贵州医科大学药物化学重点实验室汤磊教授课题组制备(纯度大于 98%),东莨菪碱氢溴酸盐购自上海泰坦科技股份有限公司(批号 P1231580),荧光素钠购自美国 Sigma 公司(批号 46960-100G-F),泪液检查酚红棉线购自天津晶明新技术开发有限公司(批号 20161201),HE 染色试剂盒(批号 G1120)和 PAS 糖原染色试剂盒(批号 G1281)购自北京索莱宝科技有限公司。

**1.1.3 仪器** SLM-2ER 型眼科裂隙灯显微镜检查仪购自重庆康华瑞明科技股份有限公司,NIKON TS100 型倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司, RM2235 型石蜡切片机购自德国 Leica 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 干眼症动物模型** 除正常组外,其余各组大鼠皮下注射 6 g/L 东莨菪碱氢溴酸盐,4 次/d(9 时、12 时、15 时和 18 时)、0.5 mL/次,连续给药 28 d<sup>[9-10]</sup>;期间用风扇增强室内空气对流,除湿机控制空气相对湿度为 30% ~ 40%<sup>[11]</sup>。

**1.2.2 给药方案** 各治疗组大鼠分别使用 10 g/L 相应构型吉法酯滴眼液治疗,5 次/d(9 时、11 时、13 时、15 时及 17 时)、每只眼睛 20 μL/次,连续治疗 14 d;正常组和生理盐水组大鼠用同体积的生理

盐水于相同时间点滴眼。

**1.2.3 Shirmer I 试验** 于治疗前、治疗第 7 及 14 天腹腔注射水合氯醛麻醉大鼠,待角膜反射消失后,将酚红棉线在距离外侧角约 1/3 处的下穹窿中放置 30 s 后拔出,记录棉线红色部分长度(mm)来代表大鼠泪液体积的分泌量<sup>[12]</sup>。

**1.2.4 角膜荧光素钠染色评分** 每次 Shirmer I 试验结束后,每只眼睛滴入 0.01% 荧光素钠 5  $\mu$ L,3 次人工眨眼后在裂隙灯下用钴蓝光观察荧光素钠着色情况并拍照。将眼表分为 4 个象限,每个象限根据染色情况评分,具体评分标准是无染色为 0 分,分散、点状染色为 1 分,成群点状染色为 2 分,成片状染色为 3 分;4 个象限评分总和为该鼠的角膜染色评分<sup>[13-14]</sup>。

**1.2.5 HE 染色** 治疗第 14 天时,麻醉后冰上处死大鼠,立即摘除左右眼球,置固定液保存于 4  $^{\circ}$ C;常规石蜡脱水,进半苯半蜡前沿角巩膜缘剪开眼球并去除玻璃体,常规石蜡包埋,平行于眼轴作 6  $\mu$ m 连续切片,烤片后石蜡切片脱蜡至水,放入苏木精染料 10 min 后蒸馏水清洗 3 次,伊红染料 5 min 后常规脱水封片,显微镜下观察角膜组织形态并拍照。

**1.2.6 PAS 染色** 石蜡切片常规脱蜡后蒸馏水浸泡 10 min,按照 PAS 糖原染色试剂盒说明书步骤对切片进行染色后,梯度酒精脱水,二甲苯透明后树脂封片,每个切片在显微镜下取 3 个视野计数杯状细胞、取平均,并拍照。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用  $t$  检验; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

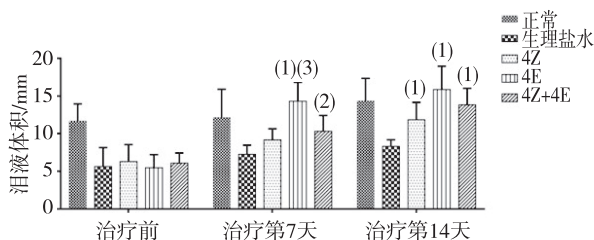
## 2 结果

### 2.1 泪液体积

治疗前,各治疗组大鼠与生理盐水组之间泪液体积比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗第 7 天时,4E 组和混合组大鼠的泪液体积大于生理盐水和 4Z 组大鼠,差异均有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );治疗第 14 天时,各组大鼠的泪液体积均略有所升高,各治疗组泪液体积明显高于生理盐水组大鼠( $P < 0.01$ ),但同期各治疗组大鼠之间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 角膜荧光素钠染色评分

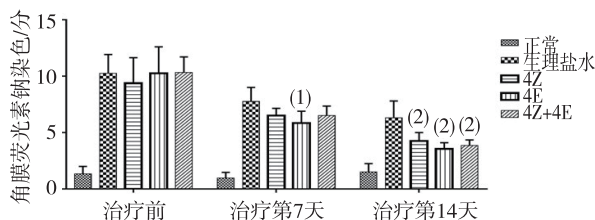
治疗前,各治疗组大鼠与生理盐水组之间角膜



注:与同期生理盐水组比较, <sup>(1)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>(2)</sup>  $P < 0.05$ ;  
<sup>(3)</sup> 与同期 4Z 组比较,  $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠泪液体积的比较  
Fig. 1 Tear volume of rats in each group after treatment

荧光素钠染色评分比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗第 7 天时,4E 组大鼠角膜荧光素钠染色评分低于与生理盐水组( $P < 0.05$ ),其余治疗组与生理盐水组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗第 14 天,各治疗组大鼠角膜荧光素钠染色评分明显低于生理盐水组( $P < 0.01$ ),但各治疗组之间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 2。



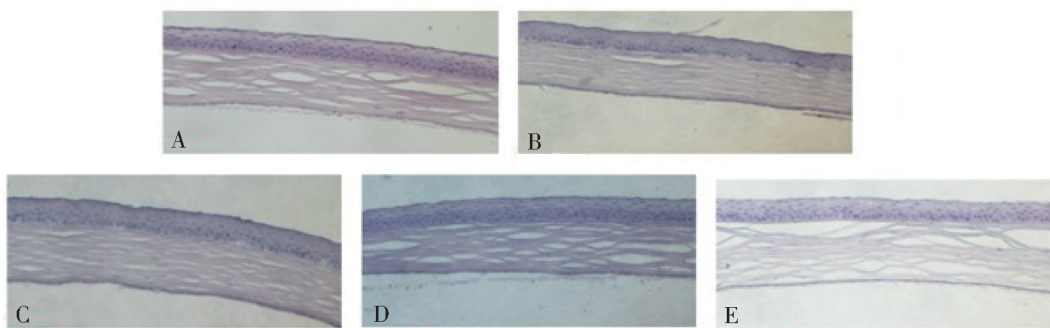
注:与生理盐水组相比, <sup>(1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>(2)</sup>  $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠角膜荧光素钠染色评分

Fig. 2 Difference of corneal fluorescein sodium staining score in each group of rats

### 2.3 HE 染色

与正常组大鼠比较,生理盐水组大鼠角膜上皮细胞略有增厚,各层细胞分层不明显,细胞体积变大、排列不紧密、核间距较大,部分基底层细胞缺失出现空泡,且上表层细胞有脱落现象,越靠近角膜表面细胞逐渐变成鳞状上皮细胞;与生理盐水组大鼠相比,各治疗组大鼠角膜的病理变化有一定程度减轻,即细胞排列变得紧密,核间距减小,鳞状上皮细胞减少;4Z 组大鼠的角膜表皮上层细胞变得光滑,基底层细胞还有部分空泡出现;4E 组和混合组上层细胞细胞排列最为规则,且基底层排列紧密无空隙。见图 3。



注:A 为正常组,B 为生理盐水组,C 为 4Z 组,D 为 4E 组,E 为混合组。

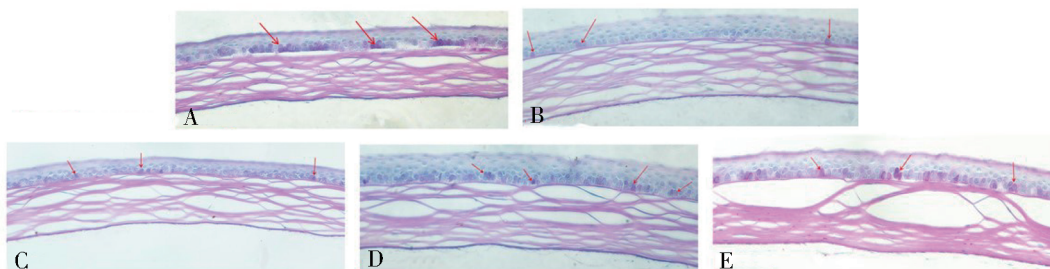
图 3 治疗第 14 天时各组大鼠角膜形态学改变(HE, ×200)

Fig. 3 Difference of HE staining in cornea of rats in each group(HE, ×200)

## 2.4 PAS 染色及杯状细胞计数

PAS 染色结果显示,杯状细胞分布于结膜的上皮细胞层,染色后呈玫红色(箭头所指出),可分泌黏蛋白润湿角膜和结膜、保护眼表,与正常组大鼠相比,生理盐水组大鼠结膜杯状细胞明显减少(见

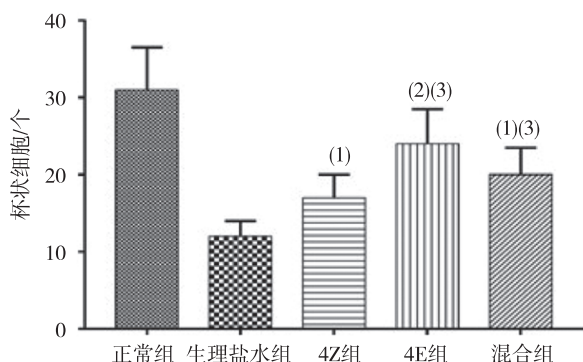
图 4)。杯状细胞计数结果显示,各治疗组大鼠结膜杯状细胞数量分别高于生理盐水组大鼠,差异均有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );4E 组和混合组大鼠杯状细胞数量均高于 4Z 组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 5。



注:A 为正常组,B 为生理盐水组,C 为 4Z 组,D 为 4E 组,E 为混合组;箭头所示为杯状细胞。

图 4 治疗第 14 天时各组大鼠 PAS 染色(200 ×)

Fig. 4 The difference of PAS staining among different groups of rats(200 ×)



注:与生理盐水组比较, <sup>(1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>(2)</sup>  $P < 0.01$ ;

<sup>(3)</sup> 与 4Z 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 5 治疗第 14 天时各组大鼠杯状细胞计数

Fig. 5 Goblet cell counts in each group of rats

## 3 讨论

干眼症是一种眼表自身免疫性疾病,目前尚无

特效治疗药物,影响超过 35% 的人群,其核心病变是因泪液长期质或量的改变引起泪膜不稳定而导致的眼表损伤<sup>[12]</sup>。泪膜是位于角膜前端的一层泪液薄膜,由具有润湿和清洁眼表作用的泪液组成,正常人眨眼时泪液就会均匀分布于眼表形成泪膜,任何原因引起泪膜的不稳定均会引起眼表疾病<sup>[13]</sup>。干眼症患者由于长时间的泪液缺失会引起眼表一系列的变化,角膜荧光素钠染色能直观反映眼表损伤情况,HE 染色可以观察角膜上皮细胞的形态学改变。本次研究结果显示,与正常组大鼠相比,造模组大鼠由于药物和环境的影响,从第 7 天开始泪液明显减少,持续干扰第 14 天时能观察到角膜荧光素钠染色评分明显升高,同时通过 HE 染色可观察到角膜上皮细胞鳞状化生,严重时可见上皮细胞脱落。眼表给予不同构型吉法酯治疗后,角膜荧光素钠染色和 HE 染色结果都显示吉法酯能明显改善干眼症大鼠的眼表损伤情况,且 4E 吉法



酯优于 4Z 吉法酯。这与泪液体积的结果相互印证,各构型吉法酯对于眼症大鼠都有保护作用,且 4E 构型吉法酯治疗后第 7 天疗效明显,4Z 构型吉法酯治疗第 14 天时才能发挥比较好的治疗效果。

黏蛋白是一类大分子糖化蛋白分泌细胞,主要是参加角膜上皮细胞防御机制,固定泪膜水液层,防止泪液水分流失,使其形成凝胶,从而达到稳定泪膜的作用<sup>[14]</sup>。已有研究显示干眼症患者通常伴随着结膜杯状细胞内部总量和分布的变化,其缺失可以导致黏蛋白分泌减少,引起泪膜不稳定<sup>[15]</sup>;眼表上皮细胞分泌产生膜结合型黏蛋白,与分泌性黏蛋白形成保护、润滑眼表的亲水性屏障,有助于泪液的稳定性以及保持泪膜的亲水性<sup>[16-17]</sup>。黏蛋白主要就是由结膜杯状细胞分泌,PAS 染色结果显示,2 种吉法酯在治疗第 14 天后都能增加干眼症大鼠的结膜杯状细胞数量( $P < 0.05$ ),且 4E 治疗组的杯状细胞数量多于 4Z 治疗组及混合治疗组( $P < 0.05$ ),与 4Z 吉法酯和混合吉法酯相比,4E 构型吉法酯能更好地增强干眼症大鼠泪膜稳定性。这种构型差异带来的药效差异可能是因为药物分子的双键或刚性或半刚性结构导致分子内自由旋转受到限制而产生的,药物结构中的某些官能团在空间排列上出现差异,几何异构体空间结构上的差异均可影响药物分子的理化性质,导致药物分子在生物体中吸收、分布和代谢产生差异、最终导致药理药效的不同。

综上所述,4Z、4E 及混合式吉法酯都能对于眼症大鼠在增加泪液体积、降低眼表损伤和增加结膜杯状细胞数量等方面有不同程度的保护,且 4E 构型吉法酯在增加泪液体积和减少角膜荧光素钠染色评分方面明显优于 4Z 构型吉法酯,对吉法酯的使用具有指导意义。

## 4 参考文献

- [1] 麻凯,李青松,张振永,等. 干眼症的物理治疗研究进展[J]. 国际眼科杂志,2018,18(4):660-663.
- [2] 王淑兰. 干眼症研究进展的综述[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,8(11):424-425.
- [3] 祁俏然,沈光林,马晓萍. 眼表黏蛋白的研究进展及其与干眼的相关性[J]. 国际眼科杂志,2016,16(4):681-685.
- [4] 肖哲夫,李江玲,黄俊珺. 补水方法治疗干眼症的临床观察[J]. 中国医学创新,2015(8):94-96.
- [5] NAKAMURA M, ENDO K, NAKATA K, et al. Gefarnate stimulates secretion of mucin-like glycoproteins by corneal epithelium in vitro and protects corneal epithelium from desiccation in vivo[J]. Exp Eye Res, 1997, 65(4):569-574.
- [6] TOSHIDA H, NAKATA K, HAMANO T, et al. Effect of gefarnate on the ocular surface in squirrel monkeys[J]. Cornea, 2002, 21(3):292-299.
- [7] 杨水平,陈剑,陈敏. 吉法酯与安贺拉眼液联合应用治疗碱灼伤干眼的实验研究[J]. 中国职业医学,2008,35(6):464-467.
- [8] 周训蓉,王建塔,朱高峰,等. 吉法酯中几何异构体的研究[J]. 化学试剂,2012,34(3):266-268.
- [9] 吴莉峰,石镇港,曾贵荣,等. 干眼症动物模型和药效评价研究进展[J]. 中南药学,2018,16(10):1355-1359.
- [10] RU Y, HUANG Y, LIU H, et al.  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone ameliorates ocular surface dysfunctions and lesions in a scopolamine-induced dry eye model via PKA-CREB and MEK-Erk pathways[J]. Scientific Reports, 2016, 5(1):18619-18633.
- [11] KIM C E, LEE J H, YEON Y K, et al. Effects of silk fibroin in murine dry eye[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):44364-44373.
- [12] 吴德佩,杨军. 针刺对于眼症患者泪液黏蛋白 5AC 表达的影响[J]. 中国中医眼科杂志,2012,22(4):267-269.
- [13] MASSIE I, SPANIOL K, GEERLING G, et al. Cryopreservation and hypothermic storage of lacrimal gland: towards enabling delivery of regenerative medicine therapies for treatment of dry eye syndrome[J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2017, 11(12):3373-3384.
- [14] QIN L, PEI C, KANG Q Y, et al. Effect of dihydrotestosterone on the expression of mucin 1 and the activity of Wnt signaling in mouse corneal epithelial cells[J]. Int J Ophthalmol, 2016, 9(11):1535-1540.
- [15] 王欣,柯碧莲. 黏蛋白相关的干眼症治疗药物研究进展[J]. 世界临床药物,2017,38(3):204-209.
- [16] 张顺华,卞爱玲,赵岩,等. 结膜角膜染色评分在干燥综合征诊断中的意义[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志,2014,8(4):268-272.
- [17] 楚莹莹. 富氢盐水对大鼠干眼模型眼表的保护作用[D]. 天津:天津医科大学,2017.  
(2019-10-28 收稿,2019-12-29 修回)  
中文编辑:严征;英文编辑:丁廷森