

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.18.012

实验研究

润目逍遥散对干眼肝经郁热证模型小鼠角膜、泪腺组织 miR-146a-5p 与 IRAK1/TRAF6/NF- κ B 信号通路的影响刘婷婷¹, 陈彦坤¹, 刘培¹, 蒋鹏飞¹, 谭亢¹, 颜春薇¹, 彭清华^{1,2}✉

1. 湖南中医药大学, 湖南省长沙市岳麓区含浦科教园学士路 300 号, 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院

[摘要] **目的** 从 miR-146a-5p 与白细胞介素 1 受体相关激酶 1/肿瘤坏死因子受体相关因子 6/核因子 κ B (IRAK1/TRAF6/NF- κ B) 信号通路探讨润目逍遥散治疗干眼肝经郁热证的可能机制。**方法** 80 只 C57BL/6J 小鼠随机分为正常组、模型组、激动剂组、抑制剂组、玻璃酸钠组和润目逍遥散高、中、低剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组小鼠采用苯扎氯铵溶液滴眼联合慢性疼痛刺激构建干眼肝经郁热证小鼠模型。于造模第 30 日开始, 润目逍遥散高、中、低剂量组小鼠分别给予润目逍遥散每次 29、14.5、7.25 g/kg, 每日 2 次灌胃; 玻璃酸钠组小鼠双眼给予玻璃酸钠滴眼液每次每只眼 5 μ l, 每日 2 次; 激动剂组小鼠双眼每次每只眼给予 agomir-146a-5p 2 nmol 滴眼, 抑制剂组小鼠双眼给予 antagomir-146a-5p 5 nmol 滴眼, 隔日 1 次, 每周 3 次; 正常组、模型组小鼠按 1 ml/(100 g·d) 灌胃去离子水。各组均持续干预 14 天, 最后一次干预后次日检测各组小鼠泪液分泌量、泪膜破裂时间、角膜荧光素染色情况、易激惹程度评分; HE 染色观察各组小鼠角膜、泪腺的病理情况; 检测角膜、泪腺炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、miR-146a-5p 表达; 检测角膜中基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 表达, 角膜、泪腺中 IRAK1、TRAF6、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65) 蛋白及 mRNA 表达, 磷酸化核因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65) 蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠泪液分泌量减少、泪膜破裂时间缩短、易激惹程度评分增高 ($P < 0.05$), 病理显示角膜中央出现染色、有明显角膜损伤, 泪腺腺泡细胞体积增大, 排列紊乱, 大量炎性细胞浸润, 新生血管增多的表现; 角膜、泪腺组织中 IL-1 β 、TNF- α 表达升高, miR-146a-5p 表达降低, IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白与 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达升高, 角膜中 MMP-3、MMP-9 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 润目逍遥散高剂量组上述各指标均显著改善, 而玻璃酸钠组和润目逍遥散中、低剂量组部分指标改善 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 激动剂组角膜、泪腺 IRAK1、TRAF6 mRNA 及 IRAK1、TRAF6、p-NF- κ B p65 蛋白表达降低; 与抑制剂组相比, 润目逍遥散各剂量组角膜、泪腺中部分 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达下降 ($P < 0.05$)。**结论** 润目逍遥散可以通过上调 miR-146a-5p 负调控肝经郁热证干眼模型小鼠角膜及泪腺中 IRAK1/TRAF6/NF- κ B 信号通路, 从而抑制炎症反应减轻眼表组织损伤, 且以高剂量效果最好。

[关键词] 干眼; 肝经郁热证; 润目逍遥散; 角膜; 泪腺组织; 炎症反应

干眼是一种多因素导致的慢性眼表疾病, 是由泪液的质、量及动力学异常导致的泪膜不稳定或眼

表微环境失衡, 可伴有眼表炎症反应、组织损伤及神经异常, 造成眼部多种不适症状和/或视功能障碍^[1]。干眼以女性、老年人多发^[2], 而电子产品、隐形眼镜的使用将干眼发病人群扩大至青少年^[3]。干眼归属于中医学“神水将枯”“白涩症”“干涩昏花症”等范畴, 如《目经大成》载: “此症轮廓无

基金项目: 国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目 (ZK1801YK015); “刘良院士工作站”指导项目 (21YS002); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20210679)

✉ 通讯作者: pqh410007@126.com

伤,但视而昏花,开闭则干涩异常”。肝经郁热证是干眼的常见证型之一^[4],本团队根据临床经验提出清肝解郁、养阴明目治法,从经典名方丹栀逍遥散加减创制润目逍遥散,且临床疗效肯定^[5-6]。

现代研究显示,miR-146a-5p可抑制炎症因子表达从而减少干眼的炎症反应^[7]。miR-146a可负向调控白细胞介素1受体相关激酶1 (IRAK1)和肿瘤坏死因子受体相关因子6 (TRAF6)表达来抑制核因子 κ B (NF- κ B)活性,减少炎症因子的表达并减轻炎症的症状^[8-10]。因此,本实验拟基于miR-146a-5p调控IRAK1/TRAF6/NF- κ B信号通路探讨润目逍遥散治疗干眼肝经郁热证的可能作用机制,为其临床应用提供实验基础。本研究经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准编号:LL2021042807)。

1 材料

1.1 动物

健康清洁级雌性C57BL/6J小鼠80只,体重质量18~20 g,6~8周龄,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SYXK(湘)2019-0004。饲养于湖南中医药大学实验动物中心,实验动物使用许可证编号:SYXK(湘)2019-0009。动物购进后适应性喂养1周,自由摄食饮水,室温(25±3)℃,相对湿度为50%~70%,光/暗周期12 h/12 h(光照时间6:00-18:00),保持安静环境。

1.2 药物

润目逍遥散组成:北柴胡12 g,当归10 g,白芍10 g,茯苓10 g,白术10 g,枸杞子10 g,菊花10 g,密蒙花10 g,生姜6 g,牡丹皮10 g,栀子10 g,甘草6 g。饮片购自湖南中医药大学第一附属医院,将中药饮片浸泡30 min,武火煮沸转文火煎煮30 min取药液,所剩药渣按前法再煎1次,将两次药液混匀后过滤,浓缩成相当于生药2.9 g/ml的药液,4℃保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

苯扎氯铵(批号B802166),上海麦克林生化科技股份有限公司;miR-146a-5p激动剂agomir-146a-5p(批号miR40000158-4-5)、miR-146a-5p抑制剂antagomir-146a-5p(批号miR30000158-4-5),广州锐博生物技术有限公司;荧光素钠(批号20172200300)、酚红棉线(批号20192160086),天津晶明公司;戊巴比妥钠(批号57-33-0),美国Sigma公司;苏木素伊红(HE)染色试剂盒(批号

G1120),索莱宝生物科技有限公司;RIPA裂解液(批号P0013K)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号P0012S),碧云天生物技术有限公司;二氨基联苯胺(DAB)(批号K346889-2),DAKO公司;白细胞介素1 β (IL-1 β)抗体(批号AF5103)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)抗体(批号AF7014)、磷酸化核因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65)抗体(批号AF3387),江苏亲科生物研究中心有限公司;基质金属蛋白酶3 (MMP-3)抗体(批号ab52915)、IRAK1抗体(批号ab238)、TRAF6抗体(批号ab33915)、基质金属蛋白酶9 (MMP-9)抗体(批号ab283575)、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65)抗体(批号ab32536),英国Abcam公司;通用RNA提取试剂盒(批号LS1040),上海普洛麦格公司;反转录试剂盒(批号E147)、PCR试剂盒(批号E096),苏州近岸蛋白科技有限公司;蛋白预制胶(批号F15420gel),北京义翘神州科技股份有限公司;转膜液(批号WB4600),苏州新赛美生物科技有限公司。

病理切片机(型号RM2016),上海徕卡仪器有限公司;裂隙灯显微镜(型号KJ900A-2),苏州康捷医疗股份有限公司;正置光学显微镜(型号Nikon Eclipse)E100,日本尼康公司;分光光度计(型号701-058112)、高速冷冻离心机(型号75002455),赛默飞公司;显微镜成像系统(型号Nikon DS-U3),日本尼康公司;蛋白表达成像系统(型号721BR08666),Bio-Rad公司;荧光定量PCR仪(型号480 II/96),Light Cycler公司。

1.4 分组及造模方法

将80只C57BL/6J小鼠适应性喂养7天后按随机数字表法分为正常组,模型组,润目逍遥散高、中、低剂量组,玻璃酸钠组,激动剂组,抑制剂组,每组10只。除正常组外,其余各组小鼠参照前期研究^[11]采用苯扎氯铵溶液滴眼联合慢性疼痛刺激(夹尾刺激)造模法构建干眼肝经郁热证小鼠模型:小鼠饲养于相对湿度<30%、空气流动速度(2.2±0.2) m/s的干燥箱环境中,采用0.2%的苯扎氯铵溶液用移液枪滴入小鼠双侧眼内,每次5 μ l,每日2次,持续滴眼28天;并在造模期间,每间隔24 h采取禁食、禁水、70~90 dB白噪音干扰,且于造模第15天添加夹尾悬挂每日20 min,持续14天。此造模方法可诱发小鼠眼表炎症反应和慢性心理应激,当小鼠出现泪液分泌量(无麻醉情况下)减少、泪膜破裂时间缩短、角膜荧光素染色明显、易

激惹程度评分^[12]提高,与正常小鼠比较有显著性差异,说明干眼肝经郁热证模型建立成功^[11]。正常组小鼠正常饲养在相对湿度50%~70%的环境中。

1.5 给药方法

于造模第30日开始,按照人与动物体表面积换算^[13],润目逍遥散高、中、低剂量组小鼠分别给予润目逍遥散每次29、14.5、7.25 g/kg灌胃,每日2次,其中中剂量是临床等效剂量;玻璃酸钠组小鼠双眼给予玻璃酸钠滴眼液,每只眼每次5 μl,每日2次;激动剂组、抑制剂组小鼠双眼每次每只眼给予 agomir-146a-5p (2 nmol)、antagomir-146a-5p (5 nmol) 滴眼,隔日1次,每周3次;正常组、模型组小鼠按1 ml/(100 g·d)灌胃去离子水。各组均连续干预14天。

1.6 观察指标与方法

末次给药24 h后,各组小鼠予1%戊巴比妥钠0.4 ml/只腹腔麻醉,收集角膜、泪腺组织。采用简单抽签法随机选取3只小鼠角膜、泪腺组织固定于4%多聚甲醛中用于HE检测;再采用简单抽签法选取3只小鼠角膜、泪腺组织用于免疫组化检测;剩余小鼠角膜、泪腺组织冻存于-80℃以备实时荧光定量PCR及Western Blot法检测。

1.6.1 泪液分泌量、泪膜破裂时间及角膜荧光染色 泪液分泌量、泪膜破裂时间仅正常组、模型组、玻璃酸钠组及润目逍遥散高、中、低剂量组检测,激动剂和抑制剂并不是治疗干眼的临床药物,作为通路抑制剂未检测。

1) 泪液分泌量:最后一次干预后次日,小鼠无麻醉下向下轻拉下眼睑,镊子夹取粉红棉线,将棉线的1 mm部分置于眼结膜15 s,位置在下睑距外眦角约1/3,在显微镜下以毫米为单位用尺测量酚红棉线湿润染红长度。

2) 泪膜破裂时间:将1 μl 1%的荧光素钠液体滴入小鼠的结膜囊,用纸吸出多余液体,10 s后手动将小鼠眼瞬目3次,在裂隙灯显微镜的钴蓝光下进行观察,瞬目开始到角膜出现第1个黑色斑点的时间,采用秒表计时,重复3次后取平均值。

3) 角膜荧光染色:将1 μl 1%的荧光素钠液体滴入小鼠的结膜囊,用吸纸吸出多余液体,秒表计时10 s后将小鼠的眼瞬目3次,在裂隙灯显微镜的钴蓝光下观察染色情况。

1.6.2 易激惹程度评分 小鼠易激惹程度评分判定^[12]:无表现计0分;捉持颈部时出现尖叫、惊跳计1分;捉持颈部时反抗剧烈欲咬人或咬人计2分;提拿尾部时即出现尖叫、惊跳甚至咬人或与同笼小鼠频繁打斗计3分。仅正常组、模型组、玻璃酸钠组及润目逍遥散高、中、低剂量组检测。

1.6.3 HE染色法观察小鼠角膜、泪腺病理组织形态 小鼠单只眼睛的角膜、泪腺组织固定后,脱水浸蜡、包埋、切片,苏木素染色、伊红染色,脱水封片,光学显微镜检,图像采集分析,观察角膜、泪腺组织病理形态变化。

1.6.4 免疫组化法检测小鼠角膜、泪腺 IL-1β、TNF-α 蛋白阳性表达情况 小鼠单只眼睛的角膜、泪腺组织,经石蜡包埋,60℃烤片2 h,脱蜡水化,热处理柠檬酸抗原修复缓冲液修复,3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶,滴加IL-1β、TNF-α一抗(均1:200)4℃孵育过夜,洗片3次,滴加与一抗相应种属的二抗(1:10 000),室温孵育50 min。DAB显色,苏木素复染,脱水封片,显微镜镜检。出现棕褐色颗粒即为阳性表达。

1.6.5 实时荧光定量PCR检测 IRAK1、TRAF6、NF-κB p65 mRNA 表达和 miR-146a-5p 表达 小鼠单只眼睛的冰冻角膜、泪腺组织,加裂解液匀浆,冰上裂解5 min,提取总RNA进行逆转录,使用分光光度计测定样本浓度、纯度。使用反转录试剂盒进行反转录成cDNA进行逆转录反应,按说明书要求加入设计的引物及反应试剂,混合后于PCR仪进行检测,以GAPDH作为内参对照,引物序列由武汉金开瑞生物工程有限公司合成,详见表1。茎环法 mmu-miR-146a-5p、茎环法 U6 引物逆转录反应,使用 miRNA qRT-PCR 试剂盒配制 20 μl 体系进行

表1 小鼠角膜及泪腺组织 IRAK1、TRAF6、NF-κB p65 引物序列

Table 1 Primers sequences of IRAK1, TRAF6, NF-κB p65 for mouse cornea and lacrimal gland tissues

基因名	上游 (5'-3')	下游 (5'-3')	长度/bp
IRAK1	TTCAGCTTTGGGGTGCT	TGGGTGCTTTTCAGGGT	137
TRAF6	GACGGTAAAGTGCCCAAA	CAAGAAACCTGCCTCCTG	177
NF-κB p65	CTGCACTCTATGGCTCAGG	GGGACAGCGACACCTTT	126
GAPDH	CATCCTGACCTATGGCGTAGCAATC	CTCCTCGTTGTTCTTCGGTAGTGAC	251

注: IRAK1, 白细胞介素1受体相关激酶1; TRAF6, 肿瘤坏死因子受体相关因子6; NF-κB p65, 核因子κB p65。

qPCR, miR-146a-5p 引物为广州锐博生物科技有限公司专利产品。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算扩增产物相对含量。

1.6.6 Western Blot 法检测 MMP-3、MMP-9、IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达 小鼠单只眼睛的冰冻角膜、泪腺组织,提取其中角膜、泪腺总蛋白样本,BCA 蛋白浓度测定后,取样本进行电泳(130 v 恒压,40 min),采用湿转法进行转膜(400 mA 恒流,30 min),放于快速封闭液中封闭 10 min,在 4℃下摇床孵育过夜,IRAK1(1:1000)、TRAF6(1:5000)、NF- κ B p65(1:5000)、p-NF- κ B p65(1:1000)、MMP-3(1:5000)、MMP-9(1:1000)、 β -actin(1:10 000),洗膜,孵育对应二抗 1 h(1:10 000),曝光后采用 Image J Pro Plus 6.0 软件分析图像灰度值,将目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值作为蛋白相对表达量进行后续统计分析。MMP-3、MMP-9 仅正常组、模型组、玻璃酸钠组及润目逍遥散高、中、低剂量组检测。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,符合正态分布的数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,满足方差齐性检验时,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 法或 SNK 法检验;不满足方差齐性用 Dunnett T^* 法。不符合正态分布的数据以中位数(四分位数) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,多组

间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

实验过程中,正常组 1 只小鼠腋下可扪及自发性肿块,未知其病因,故剔除;造模各组小鼠因打斗、应激各组均死亡 1 只。

2.1 小鼠泪液分泌量、泪膜破裂时间、易激惹程度评分比较

表 2 示,与正常组比较,模型组泪液分泌量减少、泪膜破裂时间缩短、易激惹程度评分提高($P<0.05$)。与模型组比较,润目逍遥散高、中剂量组和玻璃酸钠组泪液分泌量明显增多、泪膜破裂时间显著延长,润目逍遥散高、中、低剂量组小鼠易激惹程度评分降低($P<0.05$)。玻璃酸钠组与润目逍遥散各剂量组之间各指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠角膜荧光染色结果

正常组小鼠角膜清澈,未见损伤;模型组小鼠角膜中央出现荧光染色,有明显角膜损伤;润目逍遥散各剂量组和玻璃酸钠组小鼠角膜损伤均有不同程度的改善,润目逍遥散随剂量的升高改善越明显。

2.3 各组小鼠角膜、泪腺组织病理学比较

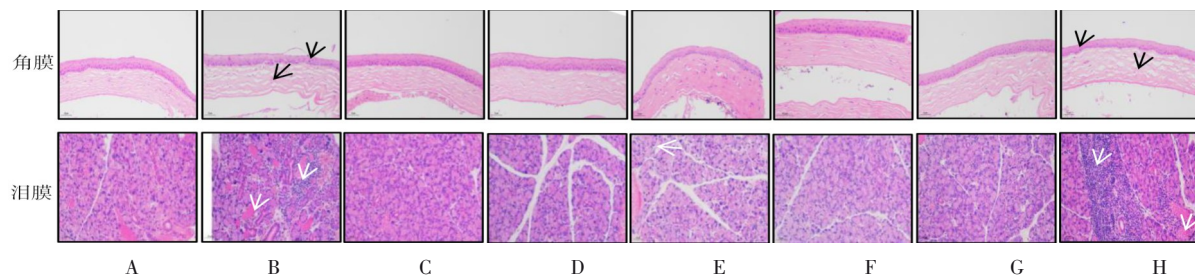
图 1 示,正常组小鼠角膜表面光滑,角膜组织

表 2 各组小鼠泪液分泌量、泪膜破裂时间、易激惹程度评分比较

Table 2 Comparison of tear secretion, tear film rupture time, and irritability scores of mice in each group $[M(P_{25}, P_{75})]$

组别	鼠数	泪液分泌量/mm	泪膜破裂时间/s	易激惹程度评分/分
正常组	9	9.0 (8.9, 25.0)	3.5 (3.0, 4.0)	1.0 (1.0, 1.5)
模型组	9	3.5 (3.5, 4.3) ^{a)}	1.0 (0.8, 1.3) ^{a)}	3.0 (2.5, 3.0) ^{a)}
玻璃酸钠组	9	8.5 (7.5, 8.9) ^{b)}	3.0 (3.0, 4.0) ^{b)}	2.0 (1.0, 2.0)
润目逍遥散高剂量组	9	8.5 (7.9, 8.8) ^{b)}	3.5 (3.0, 4.0) ^{b)}	1.0 (0.5, 1.5) ^{b)}
润目逍遥散中剂量组	9	8.0 (7.6, 8.6) ^{b)}	3.0 (3.0, 3.2) ^{b)}	1.0 (1.0, 1.0) ^{b)}
润目逍遥散低剂量组	9	6.3 (5.8, 7.6)	2.5 (2.0, 2.8)	1.0 (1.0, 2.0) ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。



注: 黑色箭头指示为角膜上皮, 白色箭头指示为泪腺腺泡。

A, 正常组; B, 模型组; C, 润目逍遥散高剂量组; D, 润目逍遥散中剂量组; E, 润目逍遥散低剂量组; F, 玻璃酸钠组; G, 激动剂组; H, 抑制剂组。

图 1 各组小鼠角膜、泪腺组织 HE 染色结果 (×200)

Figure 1 HE staining results of corneal and lacrimal gland tissues of mice in each group (×200)

4~6层上皮细胞，层次清晰，排列紧密，角膜基质层整齐；模型组小鼠角膜上皮层数缺损，伴有表皮上层细胞脱落，基质层排列紊乱，水肿；润目逍遥散各剂量组小鼠角膜切片较模型组小鼠角膜切片其上皮细胞层脱落、基质层水肿均有所减轻，其病理状态随中药剂量增高而呈减轻的趋势；玻璃酸钠组和激动剂组较模型组的角膜上皮层清晰、基质层排列有序；抑制剂组角膜上皮层排列紊乱，角膜基质排列紊乱、水肿。

正常组小鼠泪腺小叶大小一致，腺泡细胞呈锥形，胞质内酶原颗粒多，无炎症细胞浸润；模型组腺泡细胞体积增大，排列紊乱，且出现空泡样变化、大量炎性细胞浸润，新生血管增多的表现；润目逍遥散各剂量组、玻璃酸钠组、激动剂组腺泡细胞空泡减少，炎性细胞浸润减轻，新生血管减少；而抑制剂组可见大量炎性细胞浸润，腺泡细胞排列紊乱、新生血管形成。

2.4 各组小鼠角膜、泪腺炎症因子表达比较

图2示，与正常组比较，模型组、抑制剂组小鼠角膜、泪腺组织IL-1β、TNF-α蛋白表达均明显升高，主要在细胞质表达，呈棕黄染色颗粒；与模型组比较，润目逍遥散各剂量组和玻璃酸钠组、激动剂组小鼠角膜、泪腺IL-1β、TNF-α表达含量有不同程度降低，呈棕黄染色颗粒不同程度减少。

2.5 各组小鼠角膜MMP-3、MMP-9蛋白表达比较

表3示，与正常组比较，模型组角膜MMP-3、MMP-9蛋白表达均升高（ $P<0.05$ ）。与模型组比较，润目逍遥散高剂量组和玻璃酸钠组角膜MMP-3、MMP-9蛋白表达降低，润目逍遥散低剂量组角膜MMP-3蛋白亦降低（ $P<0.05$ ）。玻璃酸钠组和润目逍遥散各剂量组之间各指标差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

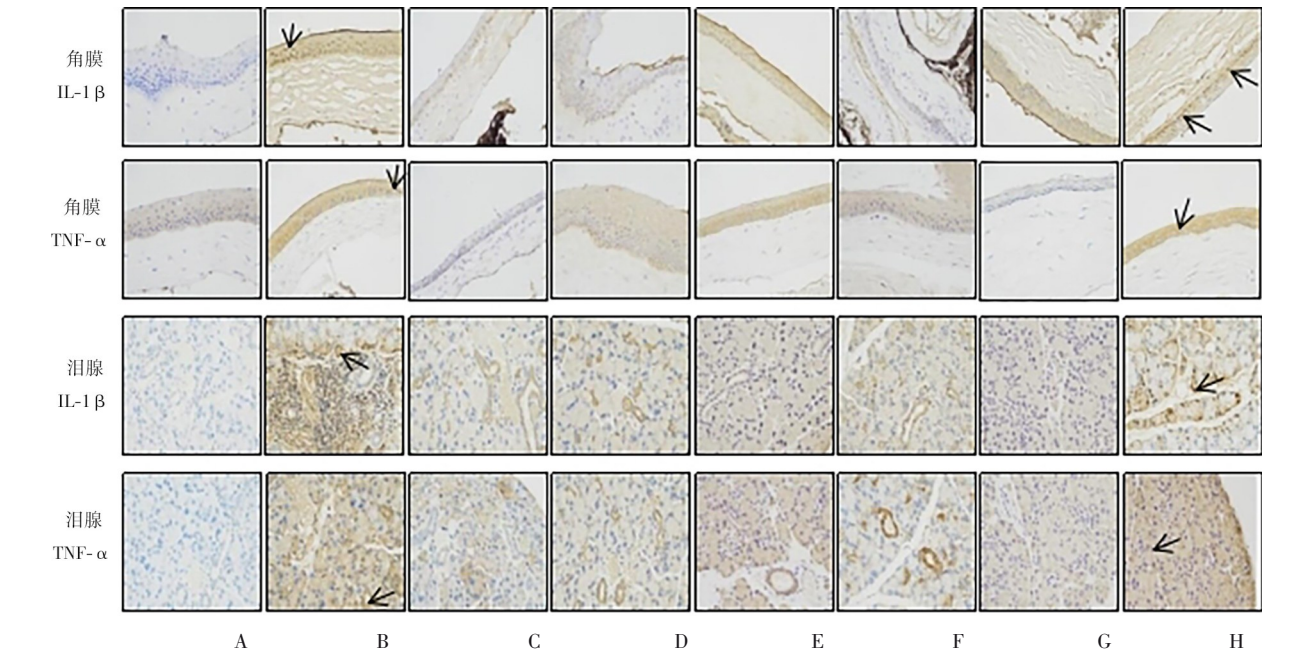
表3 各组小鼠角膜中MMP-3、MMP-9蛋白表达比较
 Table 3 Comparison of MMP-3 and MMP-9 protein expression in the cornea of mice in each group (β -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MMP-3	MMP-9
正常组	3	0.15±0.02	0.09±0.01
模型组	3	0.24±0.03 ^{a)}	0.16±0.01 ^{a)}
玻璃酸钠组	3	0.17±0.02 ^{b)}	0.11±0.01 ^{b)}
润目逍遥散高剂量组	3	0.18±0.02 ^{b)}	0.11±0.01 ^{b)}
润目逍遥散中剂量组	3	0.21±0.02	0.15±0.01
润目逍遥散低剂量组	3	0.20±0.02 ^{b)}	0.15±0.01

注：MMP-3，基质金属蛋白酶3；MMP-9，基质金属蛋白酶9。
 a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.6 各组小鼠角膜、泪腺中miR-146a-5p表达比较

表4示，与正常组相比，模型组角膜中miR-146a-5p表达上调（ $P<0.01$ ）。与模型组和抑制剂组相比，润目逍遥散各剂量组、玻璃酸钠组及激动



注：黑色箭头标注为阳性表达。
 IL-1β，白细胞介素1β；TNF-α，肿瘤坏死因子α；A，正常组；B，模型组；C，润目逍遥散高剂量组；D，润目逍遥散中剂量组；E，润目逍遥散低剂量组；F，玻璃酸钠组；G，激动剂组；H，抑制剂组。
 图2 各组小鼠角膜、泪腺炎症因子表达（免疫组化，×200）
 Figure 2 Expression of inflammatory factors in the cornea and lacrimal gland of mice in each group (immunohistochemistry, ×200)

剂组角膜及泪腺中 miR-146a-5p 表达均显著上升 ($P<0.05$)。润目逍遥散高剂量组角膜及泪腺中 miR-146a-5p 表达高于玻璃酸钠组 ($P<0.05$)。与激动剂组比较,润目逍遥散各剂量组、玻璃酸钠组及抑制剂组角膜及泪腺中 miR-146a-5p 表达降低 ($P<0.05$)。润目逍遥散各剂量组角膜、泪腺组织中 miR-146a-5p 的表达呈剂量依赖性降低 ($P<0.05$)。

表4 各组小鼠角膜、泪腺中 miR-146a-5p 表达比较

Table 4 Comparison of miR-146a-5p expression in cornea and lacrimal gland of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	角膜	泪腺
正常组	3	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	1.11±0.03 ^{a)}	1.29±0.07
激动剂组	3	2.03±0.03 ^{b)}	5.43±0.04 ^{b)}
抑制剂组	3	0.87±0.06 ^{c)}	0.81±0.37 ^{c)}
玻璃酸钠组	3	1.24±0.03 ^{b)c)d)}	2.28±0.07 ^{b)c)d)}
润目逍遥散高剂量组	3	1.65±0.05 ^{b)c)d)e)}	4.06±0.05 ^{b)c)d)e)}
润目逍遥散中剂量组	3	1.29±0.02 ^{b)c)d)f)}	2.65±0.19 ^{b)c)d)f)}
润目逍遥散低剂量组	3	1.22±0.01 ^{b)c)d)f)g)}	1.88±0.09 ^{b)c)d)f)g)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与激动剂组比较, $P<0.05$; d) 与抑制剂组比较, $P<0.05$; e) 与玻璃酸钠组比较, $P<0.05$; f) 与润目逍遥散高剂量组比较, $P<0.05$; g) 与润目逍遥散中剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.7 各组小鼠角膜、泪腺中 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达比较

表5示,与正常组相比,模型组角膜、泪腺中 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达均上升 ($P<$

0.05)。与模型组比较,玻璃酸钠组角膜中 IRAK1、TRAF6 mRNA 表达及泪腺中 NF- κ B p65 mRNA 表达降低;润目逍遥散高剂量组角膜、泪腺中各指标 mRNA 表达均降低;润目逍遥散中剂量组角膜 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达和泪腺 TRAF6 mRNA 表达均降低;润目逍遥散低剂量组仅泪腺中 TRAF6 mRNA 表达降低;激动剂组角膜中各指标 mRNA 表达及泪腺中 IRAK1、TRAF6 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。与激动剂组比较,抑制剂组角膜、泪腺中各指标 mRNA 升高,润目逍遥散低剂量组角膜中各指标及泪腺中 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。与抑制剂组比较,玻璃酸钠组角膜中各指标 mRNA 表达降低;润目逍遥散各剂量组角膜中各指标 mRNA 表达及泪腺中 TRAF6 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。与玻璃酸钠组比较,润目逍遥散高、中剂量组角膜 TRAF6 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。

2.8 各组小鼠角膜、泪腺中 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达比较

表6、表7示,与正常组比较,模型组角膜、泪腺中 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达均上升 ($P<0.05$)。与模型组比较,激动剂组角膜、泪腺中 IRAK1、TRAF6、p-NF- κ B p65 蛋白表达降低;抑制剂组泪腺中 TRAF6 蛋白表达升高;玻璃酸钠组角膜 IRAK1、TRAF6 蛋白表达降低,泪腺中 NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达降低;润目逍遥散高剂量组角膜中各指标蛋白表达及润目逍遥散各剂量组泪腺中各指标蛋白表达均降

表5 各组小鼠角膜、泪腺中 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 比较表达

Table 5 Comparison of mRNA expression of IRAK1, TRAF6, and NF- κ B p65 in the cornea and lacrimal gland of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	角膜			泪腺		
		IRAK1	TRAF6	NF- κ B p65	IRAK1	TRAF6	NF- κ B p65
正常组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	2.04±0.06 ^{a)}	2.63±0.1 ^{a)}	4.39±0.08 ^{a)}	1.79±0.06 ^{a)}	5.41±0.33 ^{a)}	1.76±0.09 ^{a)}
激动剂组	3	1.23±0.14 ^{b)}	1.60±0.20 ^{b)}	2.46±0.20 ^{b)}	1.20±0.05 ^{b)}	2.33±0.09 ^{b)}	1.32±0.03
抑制剂组	3	3.66±0.05 ^{c)}	2.71±0.11 ^{c)}	3.90±0.02 ^{c)}	1.84±0.07 ^{c)}	5.66±0.12 ^{c)}	1.72±0.01 ^{c)}
玻璃酸钠组	3	0.98±0.02 ^{b)d)}	2.36±0.27 ^{b)d)}	2.99±0.51 ^{d)}	1.54±0.08	5.05±0.52	1.32±0.06 ^{b)}
润目逍遥散高剂量组	3	1.19±0.07 ^{b)d)}	1.49±0.16 ^{b)d)e)}	2.76±0.02 ^{b)d)}	1.07±0.11 ^{b)}	2.38±0.05 ^{b)d)}	1.25±0.09 ^{b)}
润目逍遥散中剂量组	3	1.53±0.01 ^{b)d)}	1.78±0.06 ^{b)d)e)}	3.01±0.03 ^{b)d)}	1.38±0.17	2.77±0.19 ^{b)d)}	1.39±0.14
润目逍遥散低剂量组	3	1.95±0.11 ^{c)d)e)}	2.38±0.11 ^{c)d)}	4.28±0.05 ^{c)d)}	1.49±0.15	3.47±0.15 ^{b)c)d)}	1.54±0.01 ^{c)d)}

注: IRAK1, 白细胞介素1受体相关激酶1; TRAF6, 肿瘤坏死因子受体相关因子6; NF- κ B p65, 核因子 κ B p65。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与激动剂组比较, $P<0.05$; d) 与抑制剂组比较, $P<0.05$; e) 与玻璃酸钠组比较, $P<0.05$ 。

表 6 各组小鼠角膜 IRAK1/TRAF6/NF-κB 信号通路蛋白表达比较

Table 6 Comparison of protein expression of IRAK1/TRAF6/NF-κB signalling pathway in corneas of mice in each group

(/β-actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IRAK1	TRAF6	NF-κB p65	p-NF-κB p65
正常组	3	0.14±0.01	0.15±0.02	0.15±0.01	0.10±0.01
模型组	3	0.40±0.03 ^{a)}	0.22±0.03 ^{a)}	0.22±0.00 ^{a)}	0.14±0.01 ^{a)}
激动剂组	3	0.17±0.02 ^{b)}	0.08±0.01 ^{b) c)}	0.22±0.01	0.12±0.01 ^{b)}
抑制剂组	3	0.45±0.06 ^{c)}	0.25±0.03 ^{c) e)}	0.26±0.00 ^{c)}	0.19±0.01 ^{c)}
玻璃酸钠组	3	0.18±0.01 ^{b) d)}	0.17±0.03 ^{b) c) d)}	0.21±0.01	0.13±0.01 ^{d)}
润目逍遥散高剂量组	3	0.25±0.03 ^{b) c) d)}	0.16±0.02 ^{b) c) d)}	0.19±0.01 ^{b) c)}	0.10±0.01 ^{b) c) d) e)}
润目逍遥散中剂量组	3	0.37±0.04 ^{c) d) e)}	0.20±0.04 ^{c)}	0.21±0.02	0.14±0.01 ^{c) d)}
润目逍遥散低剂量组	3	0.28±0.03 ^{b) c) d)}	0.21±0.03 ^{c)}	0.23±0.01	0.15±0.01 ^{c) d) e)}

注：IRAK1，白细胞介素 1 受体相关激酶 1；TRAF6，肿瘤坏死因子受体相关因子 6；NF-κB p65，核因子 κB p65；p-NF-κB p65，磷酸化核因子 κB p65。

a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与激动剂组比较， $P<0.05$ ；d) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ ；e) 与玻璃酸钠组比较， $P<0.05$ 。

表 7 各组小鼠泪腺 IRAK1/TRAF6/NF-κB 信号通路蛋白表达比较

Table 7 Comparison of protein expression of IRAK1/TRAF6/NF-κB p65 mRNA in the lacrimal gland of mice in each group

(/β-actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IRAK1	TRAF6	NF-κB p65	p-NF-κB p65
正常组	3	0.71±0.03	0.95±0.02	0.19±0.02	0.34±0.06
模型组	3	1.31±0.06 ^{a)}	1.50±0.03 ^{a)}	0.46±0.02 ^{a)}	0.76±0.07 ^{a)}
激动剂组	3	0.56±0.02 ^{b) e)}	0.65±0.00 ^{b) e)}	0.26±0.04 ^{b)}	0.53±0.04 ^{b)}
抑制剂组	3	1.37±0.13 ^{c)}	1.57±0.03 ^{b) c) e)}	0.48±0.04 ^{c) e)}	0.66±0.05 ^{c) e)}
玻璃酸钠组	3	1.24±0.11 ^{c)}	1.48±0.02 ^{c)}	0.30±0.01 ^{b)}	0.55±0.04 ^{b)}
润目逍遥散高剂量组	3	0.85±0.07 ^{b) c) d) e)}	0.54±0.01 ^{b) c) d) e)}	0.25±0.02 ^{b) d) e)}	0.36±0.03 ^{b) c) d) e)}
润目逍遥散中剂量组	3	0.91±0.08 ^{b) c) d) e)}	0.73±0.02 ^{b) c) d) e)}	0.30±0.03 ^{b) d)}	0.49±0.03 ^{b) d)}
润目逍遥散低剂量组	3	1.01±0.05 ^{b) c) d) e)}	0.74±0.03 ^{b) c) d) e)}	0.35±0.04 ^{b) c) d)}	0.48±0.03 ^{b) d)}

注：IRAK1，白细胞介素 1 受体相关激酶 1；TRAF6，肿瘤坏死因子受体相关因子 6；NF-κB p65，核因子 κB p65；p-NF-κB p65，磷酸化核因子 κB p65。

a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与激动剂组比较， $P<0.05$ ；d) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ ；e) 与玻璃酸钠组比较， $P<0.05$ 。

低 ($P<0.05$)。与激动剂组比较，抑制剂组角膜、泪腺中各指标蛋白表达均升高；玻璃酸钠组角膜中 TRAF6 蛋白表达和泪腺中 IRAK1、TRAF6 蛋白表达升高；润目逍遥散高剂量组角膜中 IRAK1、TRAF6 蛋白表达和泪腺中 IRAK1 蛋白表达升高，角膜中 NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白和泪腺 TRAF6、p-NF-κB p65 蛋白表达降低；润目逍遥散中、低剂量组角膜中 IRAK1、TRAF6、p-NF-κB p65 蛋白表达升高，泪腺中 IRAK1、TRAF6 蛋白表达升高；润目逍遥散低剂量组泪腺中 NF-κB p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与抑制剂组比较，玻璃酸钠组和润目逍遥散高剂量组角膜中 IRAK1、TRAF6、p-NF-κB p65 蛋白表达降低，润目逍遥散各剂量组泪腺中各指标蛋白表达均降低 ($P<0.05$)。与玻璃酸钠组比较，润目逍遥散高剂量组角膜中 p-NF-κB p65 蛋

白表达和泪腺中各指标蛋白表达均降低，润目逍遥散中、低剂量组泪腺中 IRAK1、TRAF6 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。

3 讨论

《素问·宣明五气篇》言：“五脏化液……肝为泪”，《王旭高临证医案》言：“夫五志过极，多从火化，哭泣无泪，目涩昏花，皆属阳亢而阴不上承”。情志过极，易于化火，火性炎上，煎灼津液，泪化无源，则目涩。情志刺激，可致肝郁，郁而化火，火热耗竭津液为肝经郁热证干眼的发病机制，因此治疗不可单纯补阴以润目。我们认为，肝经郁热证干眼治疗当从肝着手，治以清肝解郁、养阴明目。润目逍遥散以丹栀逍遥散加枸杞子、密蒙花、菊花化裁而来，方中枸杞子滋补肝肾、益精明目，

密蒙花养肝血明目,菊花清肝明目,此三味药入肝经,明目清热,直达病位;牡丹皮清热凉血以清血中伏火,栀子泻火除烦并能导热下行,合用以平其火热;柴胡入肝经、疏肝气,亦可作为引经药;白芍酸甘,敛阴养血、柔肝缓急;当归辛温,养血活血,当归、白芍与柴胡相伍,使血气和而肝气柔,养肝体而助肝用;白术、茯苓、甘草益气健脾制肝旺。诸药合用,共同发挥清肝解郁、养阴明目的功效。本研究结果显示,与正常组比较,模型组小鼠泪液分泌量减少、泪膜破裂时间缩短、易激惹程度评分提高,小鼠角膜中央出现荧光染色,有明显角膜损伤;病理显示角膜上皮层数缺损,伴有表皮上层细胞脱落,基质层排列紊乱、水肿,泪腺腺泡细胞体积增大,排列紊乱,且出现空泡样变化、大量炎性细胞浸润,说明造模成功。与模型组相比,润目逍遥散高、中剂量组和玻璃酸钠组干预后泪液分泌量增多,泪膜破裂时间延长,角膜荧光着色减少,小鼠激惹程度下降,角膜、泪腺病理组织损伤状态减轻,说明润目逍遥散高、中剂量及玻璃酸钠可缓解干眼眼表症状,且效果无明显差异。

现代研究显示,眼部遭受损伤,机体应激启动炎症反应清除病原体和修复组织,反应过度后炎症扩大,NF- κ B 通路被激活,多种炎症基因的表达上升,如 IL-1 β 、TNF- α 、IL-17 等炎症因子和 MMP-3、MMP-9 等基质金属蛋白酶的表达升高^[14]。高表达的 IL-1 β 和 TNF- α 可再次导致炎症细胞的浸润和活化,进而刺激角膜表皮上层细胞出现脱落、排列紊乱、凋亡等^[15]。免疫组化结果显示,与模型组比较,润目逍遥散各剂量组和玻璃酸钠组角膜、泪腺炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 表达减少,润目逍遥散高剂量组和玻璃酸钠组角膜 MMP-3、MMP-9 蛋白表达降低,提示各药物干预组可抑制眼部炎症反应。

为了证明润目逍遥散是否通过 miR-146a-5p 抑制眼表炎症反应,本实验采用 miR-146a-5p 的激动剂和抑制剂 agomir-146a-5p、antagomir-146a-5p 对小鼠眼表滴注进行对照。agomir-146a-5p 和 antagomir-146a-5p 采用以胆固醇修饰 miRNA,可以增加药物的膜穿透性,提高药物活性和体内/外半衰期,而且还可穿过血脑屏障^[16]。本实验结果显示,转染后激动剂组角膜和泪腺无明显病理损伤,而抑制剂组角膜上皮层排列紊乱,角膜基质排列紊乱、水肿,泪腺炎性细胞浸润,腺泡细胞排列紊乱。另外,激动剂组小鼠角膜、泪腺 miR-146a-5p 表达较模型组升高,IL-1 β 、TNF- α 表达含量有不同程度

降低。以上结果说明 miR-146a-5p 参与了眼部炎症反应。而润目逍遥散各剂量组与玻璃酸钠组角膜、泪腺 miR-146a-5p 表达升高,提示润目逍遥散和玻璃酸钠可能也通过提高 miR-146a-5p 表达从而抑制炎症反应。

研究显示,IRAK1/TRAF6/NF- κ B 信号通路中,miR-146a-5p 作为 NF- κ B 依赖性基因,直接下调促炎性细胞因子的产生,负反馈调节 TRAF6 和 IRAK1 蛋白^[17-18]。IRAK1 和 TRAF6 通过 toll 样受体 (TLR) 信号诱导,磷酸化后导致转录因子 NF- κ B 的核易位,产生促炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-6^[19]。NF- κ B 作为重要的转录因子,调控炎症、凋亡、应激反应、伤口愈合、血管生成和淋巴管生成等关键过程^[20],与眼表多种疾病密切相关,包括化学损伤、过敏性眼病、干眼病、翼状胬肉等^[21]。现已证实,miR-146a-5p 为 IRAK1 和 TRAF6 的内源性阻遏物^[22-23]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组角膜、泪腺中 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白均明显升高,说明 IRAK1/TRAF6/NF- κ B 信号通路被激活;与模型组比较,润目逍遥散高剂量组各指标 mRNA 及蛋白表达均下调,而玻璃酸钠组和润目逍遥散中、低剂量组只有部分指标 mRNA 及蛋白表达下调,提示润目逍遥散高剂量对角膜和泪腺 IRAK1/TRAF6/NF- κ B 信号通路抑制作用最显著。另外,与模型组比较,激动剂组角膜、泪腺 IRAK1、TRAF6 mRNA 及 IRAK1、TRAF6、p-NF- κ B p65 蛋白表达降低,说明激动剂确实发挥了抑制通路激活的作用。与激动剂组相比,虽然润目逍遥散低剂量组角膜 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达上升,泪腺 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达上升,润目逍遥散中、低剂量组角膜、泪腺 IRAK1、TRAF6 蛋白表达上升,但也可以通过抑制 IRAK1/TRAF6/NF- κ B 信号通路达到减轻眼表炎症、缓解眼表症状的作用。结合与抑制剂组相比,润目逍遥散各剂量组角膜、泪腺中部分 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达下降,反证润目逍遥散治疗干眼可能是通过抑制 IRAK1/TRAF6/NF- κ B 信号通路的活化减轻炎症反应,减少促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 的产生和分泌。与玻璃酸钠组相比,润目逍遥散各剂量组角膜、泪腺中 IRAK1、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达亦下降,说明润目逍遥散与玻璃酸钠同样具有减轻眼表炎症反应的作用。

综上所述,润目逍遥散可以通过上调 miR-146a-5p 负调控肝经郁热证干眼模型小鼠角膜及泪腺中

IRAK1/TRAF6/NF- κ B 信号通路,减轻眼表组织损伤,且以高剂量效果最好。本研究初步探讨了润目逍遥散治疗干眼的抗炎机制,但尚未对信号通路开展深入研究,存在一定局限性,有待后续研究进一步探索和完善。

参考文献

- [1]亚洲干眼协会中国分会,海峡两岸医药卫生交流协会眼科学专业委员会眼表与泪液病学组,中国医师协会眼科医师分会眼表与干眼学组. 中国干眼专家共识:定义和分类(2020年)[J]. 中华眼科杂志, 2020, 56(6): 418-422.
- [2]MATOSSIAN C, MCDONALD M, DONALDSON KE, et al. Dry eye disease: consideration for women's health[J]. J Women's Health (Larchmt), 2019, 28(4): 502-514.
- [3]HUANG R, SU C, FANG L, et al. Dry eye syndrome: comprehensive etiologies and recent clinical trials[J]. Int Ophthal, 2022, 42(10): 3253-3272.
- [4]彭清华. 中医眼科学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2012.
- [5]欧晨,杨毅敬,周亚莎,等. 彭清华辨治干眼经验[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(11): 5207-5209.
- [6]彭俊,周亚莎,陈柯竹,等. 彭清华教授运用逍遥散治疗眼科疾病举隅[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(1): 45-47.
- [7]YIN L, ZHANG M, HE T, et al. The expression of miRNA-146a-5p and its mechanism of treating dry eye syndrome[J]. J Clin Lab Anal, 2020, 35(1): e23571.
- [8]MANN M, MEHTA A, ZHAO JL, et al. Author correction: an NF- κ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3338.
- [9]HENRY S, CHENG HS, SIVACHANDRAN N, et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways[J]. EMBO Mol Med, 2013, 5(7): 1017-1034.
- [10]LI S, YUE Y, XU W, et al. MicroRNA-146a represses mycobacteria-induced inflammatory response and facilitates bacterial replication via targeting IRAK-1 and TRAF-6[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e81438.
- [11]刘培,蒋鹏飞,彭俊,等. 干眼肝经郁热证小鼠模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 302-309.
- [12]MA XL, CHEN JX, LI YB, et al. Study on the syndrome biological basis of essential hypertension based on literature mining[J]. Heart, 2012, 98 (Suppl 2): E91.
- [13]陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [14]STERN ME, PFLUGFELDER SC. Inflammation in dry eye[J]. Ocul Surf, 2004, 2(2): 124-130.
- [15]WEI Y, ASBELL PA. The core mechanism of dry eye disease is inflammation[J]. Eye Contact Lens, 2014, 40(4): 248-256.
- [16]吕雅楠,多奕仑,程志刚,等. 胆固醇修饰多肽药物研究进展[J]. 药物生物技术, 2023, 30(3): 299-307.
- [17]TAGANOV KD, BOLDIN MP, CHANG KJ, et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33): 12481-12486.
- [18]HE X, JING Z, CHENG G. MicroRNAs: new regulators of toll-like receptor signalling pathways[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 945169. doi: 10.1155/2014/945169.
- [19]JIANG W, KONG L, NI Q, et al. MiR-146a ameliorates liver ischemia/reperfusion injury by suppressing IRAK1 and TRAF6[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101530.
- [20]SRIVASTAVA SK, RAMANA KV. Focus on molecules: nuclear factor-kappaB[J]. Exp Eye Res, 2009, 88(1): 2-3.
- [21]LAN W, PETZNICK A, HERYATI S, et al. Nuclear Factor- κ B: central regulator in ocular surface inflammation and diseases[J]. Ocul Surf, 2012, 10(3): 137-148.
- [22]KANHERE A, HERTWECK A, BHATIA U, et al. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements[J]. Nat Commun, 2012, 3: 1268. doi: 10.1038/ncomms2260.
- [23]梁雪,吕磊,钱立庭,等. miR-146a-5p 靶向 IRAK1、TRAF6 抑制小细胞肺癌耐药[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(3): 333-339.

Effects of *Runmu Xiaoyao Powder* (润目逍遥散) for Dry Eyes Mice with Liver-Meridian Constraint-Heat Syndrome on miR-146a-5p and IRAK1/TRAF6/NF- κ B Signalling Pathway in Cornea and Lacrimal Gland Tissue

LIU Tingting¹, CHEN Yankun¹, LIU Pei¹, JIANG Pengfei¹, TAN Kang¹, YAN Chunwei¹, PENG Qinghua^{1,2}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of the treatment of dry eye with liver-meridian constraint-heat syndrome by *Runmu Xiaoyao Powder* (润目逍遥散) by miR-146a-5p and interleukin-1 receptor-associated kinase 1/tumour necrosis factor receptor associated factor 6/nuclear factor- κ B (IRAK1/TRAF6/NF- κ B) signalling

pathway. **Methods** Eighty C57BL/6J mice were randomly divided into normal group, model group, agonist group, inhibitor group, sodium hyaluronate group, and *Runmu Xiaoyao Powder* high-, medium-, and low-dose groups, with 10 mice in each group. Except for the normal group, the mice of dry eye with liver-meridian constraint-heat syndrome were modeled by using benzalkonium chloride solution eye drops combined with chronic pain stimulation. Beginning on the 30th day of modelling, mice in *Runmu Xiaoyao Powder* high-, medium-, and low-dose groups were given 29, 14.5, and 7.25 g/kg of *Runmu Xiaoyao Powder* respectively twice daily by gavage; mice in sodium hyaluronate group were given 5 μ l of sodium hyaluronate drops twice daily; mice in the agonist group were given 2 nmol of agomir-146a-5p drops in each eye at a time, and those in the inhibitor group were given 5 nmol of antagomir-146a-5p drops in each eye, with every other day, 3 times per week; mice in the normal and model groups were gavaged with deionised water at 1 ml/(100 g·d). The intervention was continued for 14 days in each group, and mice in each group were examined for tear secretion, tear film rupture time, corneal fluorescein staining, and irritability scores on the day following the last intervention; HE staining was used to observe the pathological conditions of the cornea and lacrimal glands in each group; corneal and lacrimal gland inflammatory factors, such as interleukin 1 β (IL-1 β), tumour necrosis factor α (TNF- α), miR-146a-5p expression, were examined; matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression in cornea, IRAK1, TRAF6, nuclear factor κ B p65 (NF- κ B p65) protein and mRNA expression in cornea and lacrimal gland, and phosphorylated nuclear factor κ B p65 (p-NF- κ B p65) protein expression were detected. **Results** Compared with the normal group, mice in the model group showed reduced tear secretion, shorter tear film rupture time, higher irritability score ($P<0.05$), and pathological examination showed staining in the centre of the cornea, obvious corneal damage, increased volume of lacrimal gland follicular cells, disordered arrangement, a large number of inflammatory cell infiltration, and increased neovascularisation; corneal and lacrimal gland tissues showed elevated expression of IL-1 β and TNF- α , decreased expression of miR-146a-5p, elevated expression of IRAK1, TRAF6, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65 protein and IRAK1, TRAF6, NF- κ B p65 mRNA, and elevated expression of MMP-3, MMP-9 protein in the cornea ($P<0.05$). Compared with the model group, all of the above indexes were significantly improved in high-dose group of *Runmu Xiaoyao Powder*, while some indexes were improved in the sodium hyaluronate group and the middle- and low-dose *Runmu Xiaoyao Powder* groups ($P<0.05$). Compared with the model group, corneal and lacrimal IRAK1 and TRAF6 mRNA and IRAK1, TRAF6 and p-NF- κ B p65 protein expression decreased in the agonist group; compared with the inhibitor group, IRAK1, TRAF6, NF- κ B p65 mRNA and protein expression in the cornea and lacrimal gland in the *Runmu Xiaoyao Powder* groups decreased ($P<0.05$). **Conclusion** *Runmu Xiaoyao Powder* can negatively regulate the IRAK1/TRAF6/NF- κ B signalling pathway in the cornea and lacrimal gland of mice with dry eye of liver-meridian constraint-heat syndrome by up-regulation of miR-146a-5p, so as to inhibit inflammatory response and reduce the damage of the ocular surface tissues, and the high doses group showed the best effect.

Keywords dry eyes; liver-meridian constraint-heat syndrome; *Runmu Xiaoyao Powder* (润目逍遥散); cornea; lacrimal gland tissue; inflammatory response

(收稿日期: 2024-04-24; 修回日期: 2024-07-18)

[编辑: 邓 媛]