

文章编号: 1005-0957 (2024) 06-0675-09

• 动物实验 •

电针对干眼大鼠角膜自噬相关蛋白调节作用的研究

杨延婷¹, 莫晓芬², 马睿琦², 杨光¹, 师雅君², 赵越^{1,3}, 纪海洋³, 张丹¹, 郭浩东³, 刘婕¹, 马晓芃^{1,3}

(1. 上海市针灸经络研究所, 上海 200030; 2. 复旦大学附属眼耳鼻喉科医院, 上海 200030; 3. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437)

【摘要】 目的 观察电针对干眼大鼠角膜自噬的调节作用。**方法** 将雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随机分为正常组、模型组、电针组和假针组。除正常组外, 其余 3 组均采用皮下注射东莨菪碱溶液配合吹风制备大鼠干眼模型。电针组和假针组造模后分别予电针及假针刺干预。检测大鼠干预前后泪膜破裂时间和泪液分泌量, 并评估角膜荧光素染色的分值; 应用透射电镜观察大鼠角膜组织的超微结构; 采用蛋白免疫印迹 (Western blotting) 技术检测大鼠角膜微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、P62 和 Beclin-1 的表达, 应用实时聚合酶链式反应 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术检测角膜 LC3 mRNA 的表达。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠泪液分泌量降低, 泪膜破裂时间缩短, 角膜荧光素染色评分升高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 角膜上皮细胞肿胀, 线粒体明显损伤; 角膜 LC3 II 和 Beclin-1 蛋白表达减少, P62 蛋白表达增多, LC3 mRNA 表达减少, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 电针组大鼠泪液分泌量升高, 泪膜破裂时间延长, 角膜荧光素染色评分降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 角膜上皮细胞轻微肿胀, 有自噬小体形成; 角膜 LC3 II 和 Beclin-1 蛋白表达增多, P62 蛋白表达降低, LC3 mRNA 表达增多, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 假针组细胞器肿胀明显, 线粒体损伤明显; 其余指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 电针可以促进干眼大鼠角膜组织中自噬的发生, 促进自噬可能是电针治疗干眼的潜在机制。

【关键词】 针刺疗法; 电针; 干眼; 角膜; 自噬; 大鼠**【中图分类号】** R2-03 **【文献标志码】** A

DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2024.06.0675

Study of electroacupuncture regulating autophagy-related proteins in the cornea of dry eye rats YANG Yanting¹, MO Xiaofeng², MA Ruiqi², YANG Guang¹, SHI Yajun³, ZHAO Yue^{1,3}, JI Haiyang³, ZHANG Dan¹, GUO Haodong³, LIU Jie¹, MA Xiaopeng^{1,3}. 1. Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030, China; 2. Eye & ENT Hospital of Fudan University, Shanghai 200030, China; 3. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

[Abstract] Objective To observe the effect of electroacupuncture in regulating autophagy in the cornea of dry eye rats. **Method** Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a normal group, a model group, an electroacupuncture group, and a sham acupuncture group. Except for the normal group, the other three groups received subcutaneous injection of Scopolamine solution plus exposure to air drought to establish dry eye rat models. After modeling, the electroacupuncture and sham acupuncture groups were given electroacupuncture or sham acupuncture, respectively. Before and after the intervention, tear film break-up time (BUT) and tear production

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81904302); 上海市自然科学基金项目 (22ZR1458500, 21ZR1460100); 上海市卫生健康委员会项目 (20214Y0116, 20234Y0066)

作者简介: 杨延婷 (1990—), 女, 助理研究员, 博士, Email: tcmyyt@126.com

通信作者: 马晓芃 (1973—), 女, 研究员, 博士生导师, Email: pengpengma@163.com

刘婕 (1982—), 女, 助理研究员, Email: yokihilo@hotmail.com

were measured, and corneal fluorescein staining (CFS) was scored; rats' corneal ultrastructure was observed using transmission electron microscopy; Western blotting was adopted to determine the expression of microtubule-associated protein 1 light chain (LC3), P62, and Beclin-1 in the cornea; the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) technique was used to detect the expression of LC3 mRNA in rats' cornea. **Result** Compared with the normal group, the model group had a decreased tear production amount, shortened tear film BUT, and a higher CFS score, all showing statistical significance ($P < 0.05$); the model group also presented swollen corneal epithelial cells with significant damage to mitochondria, reduced protein expression of corneal LC3 II and Beclin-1, increased expression of P62 protein, and decreased expression of LC3 mRNA, and the differences were all statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, the electroacupuncture group had an increased tear secretion amount, extended tear film BUT, and a lower CFS score, all showing statistical significance ($P < 0.05$); in the electroacupuncture group, slightly swollen corneal epithelial cells were found, together with autophagosome formation, and the protein expression of corneal LC3 II and Beclin-1 increased, the P62 protein expression dropped, and the LC3 mRNA expression increased, all showing statistical significance ($P < 0.05$). Compared with the model group, the sham acupuncture group had significant organelle swelling and notable damage to mitochondria; there were no significant differences in the other indexes between these two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture can encourage autophagy in the cornea in dry eye rats, which may be the potential mechanism of electroacupuncture in treating dry eye.

[Key words] Acupuncture therapy; Electroacupuncture; Dry eye; Cornea; Autophagy; Rats

干眼是一种常见的眼表疾病,患病率因地域、年龄和性别等因素有所不同。据统计,在全球范围内干眼的患病率为 5%~50%,亚洲地区的患病率相对较高,中国的干眼患病率为 17%~33%^[1-2]。干眼典型症状为眼表不适、泪液渗透压增加、泪膜不稳定和眼表炎症,严重影响患者的生活质量^[3]。近年来随着电子设备的广泛使用 and 环境污染的加剧,干眼的患病率不断上升。尽管目前已有多种治疗方法,包括人工泪液、抗炎药物、手术治疗等,但其疗效有限且存在一定的不良反应^[4-5]。因此,寻找安全有效的干眼治疗方法有重要的临床意义。

研究表明,炎症是干眼最主要的发病机制^[6-8]。自噬作为一种细胞质降解途径,可以防止外源性危害(包括感染)和内源性炎症,在维持细胞稳态和应对各种应激条件中发挥重要作用^[9]。越来越多的证据表明自噬影响炎症性疾病的发病^[10]。有研究已证实角膜作为眼表的重要组成部分,其自噬水平的动态调节对干眼的发生和发展具有重要作用^[11-12]。

电针疗法作为一种中医外治方法,近年来在干眼的治疗中显示出良好的效果^[13-14],机制研究也取得一定进展^[15-16]。目前尚未见电针对干眼自噬作用的报道,因此本研究建立干眼大鼠模型,观察电针对角膜组织自噬关键蛋白的调节作用,旨在从自噬调控角度探讨电针治疗干眼的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只,清洁级,体质量 (160±20) g,购于上海斯莱克实验动物有限公司,合格证编号为 2015000520991。饲养于上海中医药大学实验动物中心,室温 18~22 °C,室内湿度 50%~70%,昼夜 12 h/12 h 交替。实验开始前进行裂隙灯、眼底镜检查眼前节及眼底无异常、饮水饮食无异常的大鼠方可用于实验。大鼠适应性饲养 1 周后进行实验。本研究所有操作均符合上海中医药大学实验动物伦理委员会规定。

1.2 主要试剂和仪器

氢溴酸东莨菪碱 (S0929, 上海源叶生物有限责任公司);泪液检测试纸 (天津晶明新技术开发有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0011, 江苏碧云天生物科技有限公司);GAPDH 抗体 (2118S, 美国 CST);RIPA 组织细胞快速裂解液 (P0013, 江苏碧云天生物科技有限公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (A0208, 江苏碧云天生物科技有限公司);兔源 LC3 抗体 (ab62721, 美国 abcam);兔源 P62 抗体 (ab240635, 美国 abcam);Trizol (1596-026, 美国 Invitrogen);逆转录试剂盒 (K1622, 美国 Fermentas);裂隙灯显微镜 (苏州六六视觉科技股份有限公司);韩氏电针仪 (南京济生

医疗器械科技有限公司)。

1.3 造模方法

采用完全随机法,将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、电针组和假针组 4 组,每组 10 只。正常组不造模,其余 3 组均采用氢溴酸东莨菪碱皮下注射并置于吹风装置中吹风制备大鼠干眼模型^[17-18]。每日上午 8 点和 11 点以及下午 2 点和 5 点交替在大鼠双下肢肌肉注射氢溴酸东莨菪碱溶液 0.5 mL(溶液规格 0.6 mg/0.1 mL),并将大鼠置于对流风装置中,每日连续在对流风环境中暴露 12 h,连续 10 d。造模结束后,对每组大鼠进行泪液分泌量、泪膜破裂时间和角膜荧光素染色检测。经上述指标验证,造模成功后进行干预治疗。

1.4 实验分组与干预

正常组大鼠除常规检查外不进行造模及干预。造模成功后,模型组大鼠不进行任何干预,只做与电针组相同的固定;电针组大鼠予电针干预。电针干预取双侧丝竹空、风池和光明穴,将大鼠捆绑固定后,用 0.25 mm×25 mm 毫针针刺双侧丝竹空、风池和光明穴,同侧丝竹空和风池穴连接韩氏电针仪,连续波,频率 2 Hz,留针 20 min。每日 1 次,共 7 d。假针组大鼠造模成功后给予假针刺处理,取穴同电针组,针刺时透皮即止,留针 20 min。每日 1 次,共 7 d。

1.5 指标检测

1.5.1 泪液分泌量测试

束缚固定大鼠,准备两条改良泪液检测试纸(1 mm×15 mm),放入大鼠下眼睑外 1/3 结膜囊内,计时 2 min,测量试纸变色长度。重复测量 3 次,取平均值。

1.5.2 泪膜破裂时间观察

束缚固定大鼠,用生理盐水湿润荧光素钠检测试纸条后,将试纸条尖端轻触大鼠下眼睑内侧,辅助大鼠瞬目几次,使荧光素分布均匀。在裂隙灯显微镜钴蓝光下观察角膜第 1 次出现黑色干燥斑点的时间,并记录。反复测量 3 次,取平均值。

1.5.3 角膜荧光素染色评分检测

束缚固定大鼠,用生理盐水湿润荧光素钠检测试纸条后,将试纸条尖端轻触大鼠下眼睑内侧,辅助大鼠瞬目几次,使荧光素分布均匀。在裂隙灯显微镜钴蓝光下观察角膜组织荧光染色情况。将角膜分为 4 个象限,评分方法如下。完全无染色计 0 分,染色少于 5 个荧光点计 1 分,出现块状染色或丝状物计 3 分,介于 1 分

和 3 分两者之间为 2 分。

1.5.4 采用透射电镜观察角膜超微结构

干预结束后处死大鼠,使用眼科镊和眼科剪摘取大鼠眼球,沿角膜边缘分离角膜组织后,一半冻存于 -80 ℃冰箱,另一半角膜组织置于冰盒上,利用刀片将组织切割为小于 1 mm³ 的小块。将其放入 2.5%戊二醛磷酸固定液中固定 12 h。梯度乙醇脱水后,进行包埋和固化,37 ℃恒温烘箱内放置过夜。然后采用超薄切片机切片,厚度为 50 nm。利用 3%醋酸铀-枸橼酸铅进行双染色。应用透射电镜观察,拍片并做记录。

1.5.5 采用蛋白免疫印迹(Western blotting)法检测大鼠角膜微管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、P62 和 Beclin-1 蛋白表达

从 -80 ℃冰箱中取出角膜组织称重剪碎后放入匀浆管中,加入 RIPA 裂解液和 PMSF 蛋白酶抑制剂后,通过组织匀浆机匀浆,冰浴 30 min 后 4 ℃离心 5 min,留取上清液备测。采用二辛可宁酸含量测定(bicinchoninic acid assay, BCA)法测定总蛋白含量。根据样本 OD 值计算出样品总蛋白浓度。上样总体积为 40 μL,加入适量的电泳缓冲液,电压 75 V,电泳 3 h。电压 125 V,转膜 60 min。转膜结束后,将 PVDF 膜取出放入 PBS 缓冲液中平衡,然后修剪成合适大小,放入封闭盒中,加入适量的 5% BSA 封闭液,室温封闭 45 min。封闭结束后转移至封闭盒中,加入用封闭液稀释的一抗中,按照 LC3 一抗浓度 1:500, P62 一抗浓度 1:500, Beclin-1 一抗浓度 1:1 000, β-tubulin 和 GAPDH 浓度为 1:1 000 的比例稀释,4 ℃冰箱孵育过夜。次日取出膜用 PBST 洗膜 4 次,每次均 10 min。加入稀释的 HRP 标记的二抗中室温孵育 1 h。二抗孵育结束后,使用 ECL 发光液将 PVDF 膜淋膜 2 min。吸去发光液,将 PVDF 膜置于凝胶成像系统内自动曝光并保存图像备用。运用 ImageJ 软件对目的蛋白和内参条带进行分析,测定蛋白条带的灰度值。

1.5.6 采用实时定量反转录聚合酶链式反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR)技术检测大鼠角膜 LC3 mRNA 表达

提取角膜组织总 RNA,离心 10 min 后留取上清液,再加入 200 μL 氯仿,混匀,室温静置 2 min,4 ℃离心 10 min;再次留取上清液,加入 600 μL 异丙醇,混匀,

室温静置 15 min, 4 ℃ 离心 15 min; 再加入 40 μL DEPC 水以溶解 RNA, 观察总 RNA 完整性及测定总 RNA 浓度。逆转录合成 cDNA 后进行反转录, 反应总体积为 25 μL, 反应程序为 42 ℃ 60 min; 75 ℃ 5 min; 4 ℃ 5 min;

- 20 ℃ 保存。PCR 扩增反应总体积 20 μL, 反应程序为 95 ℃ 变性 5 min; 退火、延伸。采用 PCR 仪器自带软件进行数据采集与分析。利用 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量 ($\Delta Ct = \text{目标基因 CT 值} - \text{内参 GAPDH CT 值}$)。

表 1 引物序列

基因	探针	上游引物	下游引物	长度
GAPDH	5' ACTCCACGACATACTCAGCACCAGCA 3'	5' CACAGTCAAGGCTGAGAATG 3'	5' GTGGTGAAGACGCCAGTA 3'	138 bps
LC3	5' CTCCTTCATCTGCCTGCTTGTCTGGT 3'	5' GCTGTATAATAGCCTGCGA 3'	5' TGGACGGTCTGATCTTCTG 3'	118 bps

1.6 统计学方法

实验数据采用 SPSS21.0 软件进行统计分析。符合正态性分布的计量数据用均数±标准差表示; 对于不符合正态分布的数据采用中位数(下四分位数, 上四分位数)表示。如果实验数据服从正态分布并方差齐, 则采用单因素方差分析法(One-way ANOVA)进行分析, 组间两两比较则选用最小显著差法(LSD)检验。若资料不符合正态性, 比较采用秩和检验。若数据符合正态分布但方差不齐, 组间两两比较则选用 Games-Howell 法。组内比较采用配对样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠泪液分泌量的变化

干预前, 与正常组比较, 模型组、电针组和假针组大鼠泪液分泌量明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 提示模型制备成功。干预后, 与正常组比较, 模型组大鼠泪液分泌量减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 电针组大鼠泪液分泌量明显提高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。电针组干预后泪液分泌量较干预前增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果提示电针可以促进干眼大鼠泪液分泌。详见图 1。

2.2 4 组大鼠泪膜破裂时间的变化

干预前, 与正常组比较, 模型组、电针组和假针组大鼠泪膜破裂时间明显缩短, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 提示模型制备成功。干预后, 与正常组比较, 模型组和假针组大鼠泪膜破裂时间缩短, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 电针组大鼠泪膜破裂时间较模型组和假针组明显延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。电针组干预后泪膜破裂时间较治疗前延长, 差异有统计

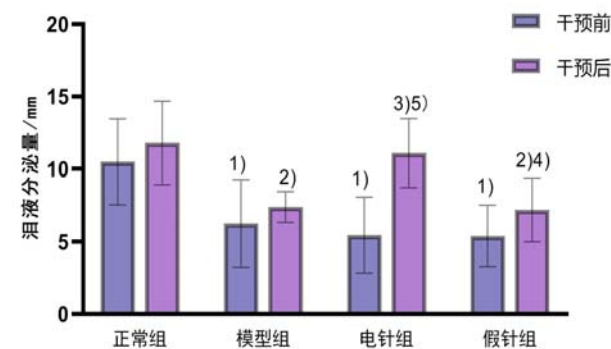
学意义 ($P < 0.05$)。结果提示电针可以延长干眼大鼠泪膜破裂时间, 改善泪膜稳定性。详见图 2。

2.3 4 组大鼠角膜荧光素染色的变化

干预前, 与正常组比较, 其余 3 组大鼠角膜荧光素染色评分明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 提示模型制备成功。干预后, 与正常组比较, 其余 3 组大鼠角膜荧光素染色评分均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 电针组大鼠角膜荧光素染色评分降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。电针组角膜荧光素染色评分较干预前降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果提示电针可以降低干眼大鼠角膜荧光素染色评分, 改善角膜损伤。详见图 3。

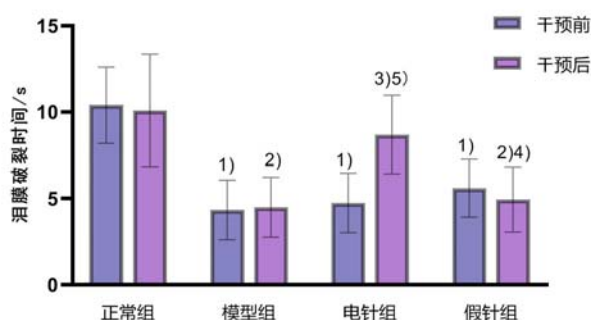
2.4 4 组大鼠角膜组织超微结构观察

在透射电镜下观察发现正常组大鼠角膜上皮细胞结构基本正常, 形态规则, 细胞界限清晰。模型组大鼠角膜上皮细胞明显肿胀, 细胞界线不清楚, 线粒体损伤明显。电针组细胞轻微肿胀, 有自噬体形成。假针组细胞器肿胀明显, 线粒体损伤, 细胞界限不清楚。详见图 4。



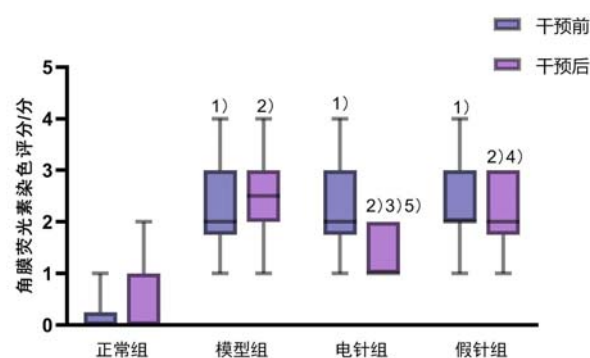
注: 干预前, 与正常组比较 ¹⁾ $P < 0.01$; 干预后, 与正常组比较 ²⁾ $P < 0.01$, 与模型组比较 ³⁾ $P < 0.01$, 与电针组比较 ⁴⁾ $P < 0.01$; 与同组干预前比较 ⁵⁾ $P < 0.05$ 。

图 1 4 组大鼠泪液分泌量的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)



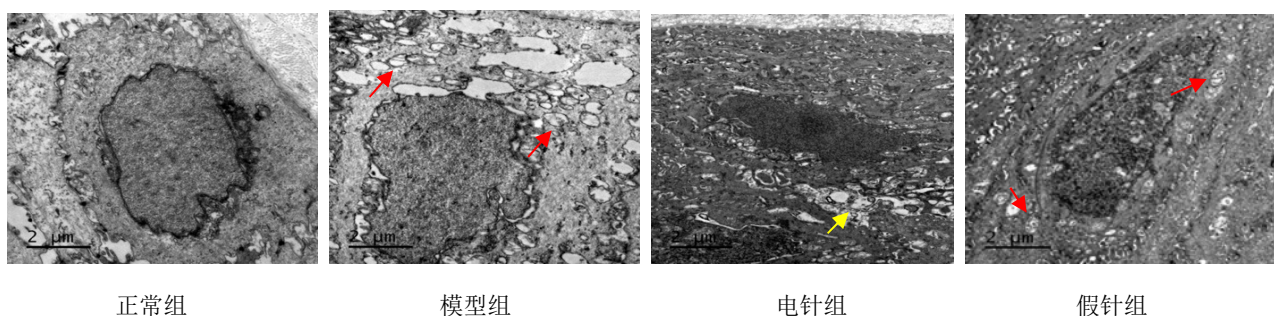
注:干预前,与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;干预后,与正常组比较²⁾ $P<0.01$,与模型组比较³⁾ $P<0.01$,与电针组比较⁴⁾ $P<0.01$;与同组干预前比较⁵⁾ $P<0.05$ 。

图2 4组大鼠泪膜破裂时间比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)



注:干预前,与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;干预后,与正常组比较²⁾ $P<0.01$,与模型组比较³⁾ $P<0.05$,与假针组比较⁴⁾ $P<0.05$;与同组干预前比较⁵⁾ $P<0.05$ 。

图3 4组大鼠角膜荧光素染色评分比较 [$M(P_{25}, P_{75})$, $n=10$]

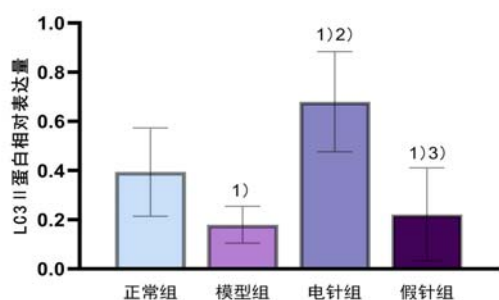


注:红色箭头为受损的线粒体,黄色箭头为自噬体

图4 4组大鼠角膜组织超微结构(透射电镜 5 000×)

2.5 4组大鼠角膜组织 LC3 II 蛋白表达变化

与正常组比较,模型组大鼠角膜组织 LC3 II 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,电针组大鼠角膜组织 LC3 II 蛋白表达升高($P<0.01$),假针组角膜组织 LC3 II 蛋白表达无明显变化($P>0.05$)。结果提示,电针干预可以增加干眼大鼠角膜组织中 LC3 II 蛋白的表达。详见图 5 和图 6。



注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$;与电针组比较³⁾ $P<0.01$ 。

图5 4组大鼠角膜组织 LC3 II 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

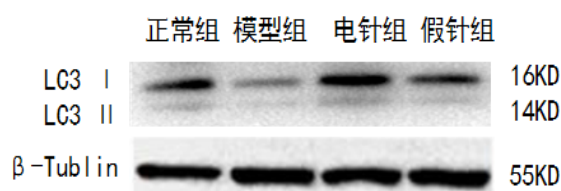


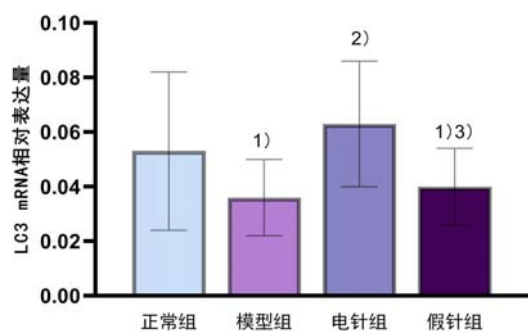
图6 4组大鼠角膜组织 LC3 II 蛋白表达条带

2.6 4组大鼠角膜组织 LC3 mRNA 表达变化

与正常组比较,模型组大鼠角膜组织中 LC3 mRNA 表达降低($P<0.05$)。与模型组比较,电针组大鼠角膜组织中 LC3 mRNA 的表达升高($P<0.01$),假针组角膜组织 LC3 mRNA 的表达无明显变化($P>0.05$)。结果提示,电针干预可以增加大鼠角膜组织中 LC3 mRNA 的表达。详见图 7。

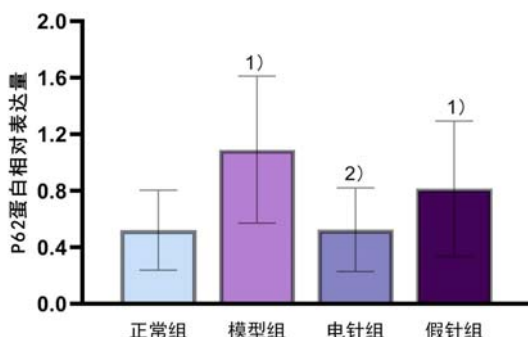
2.7 4组大鼠角膜组织 P62 蛋白表达变化

与正常组比较,模型组大鼠角膜组织中 P62 蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组比较,电针组角膜组织 P62 蛋白表达降低($P<0.05$),假针组角膜组织 P62 蛋白表达无明显变化($P>0.05$)。结果提示,电针干预可以减少大鼠角膜 P62 蛋白表达。详见图 8 和图 9。



注:与正常组比较 ¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较 ²⁾ $P < 0.01$;与电针组比较 ³⁾ $P < 0.01$ 。

图 7 4组大鼠角膜组织 LC3 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)



注:与正常组比较 ¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较 ²⁾ $P < 0.05$ 。

图 8 4组大鼠角膜组织 P62 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

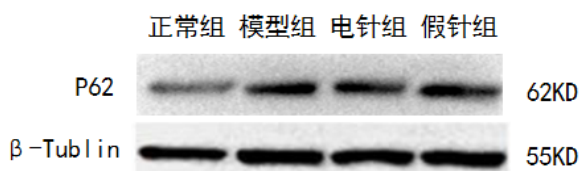


图 9 4组大鼠角膜组织 P62 蛋白表达条带

2.8 4组大鼠角膜组织 Beclin-1 蛋白表达变化

与正常组比较,模型组大鼠角膜组织 Beclin-1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,电针组角膜组织 Beclin-1 蛋白表达增加 ($P < 0.05$),假针组角膜组织 Beclin-1 表达无明显变化 ($P > 0.05$)。结果提示,电针干预可以增加大鼠角膜 Beclin-1 蛋白表达。详见图 10 和图 11。

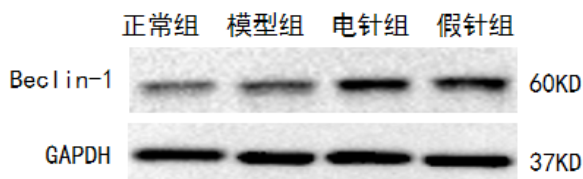
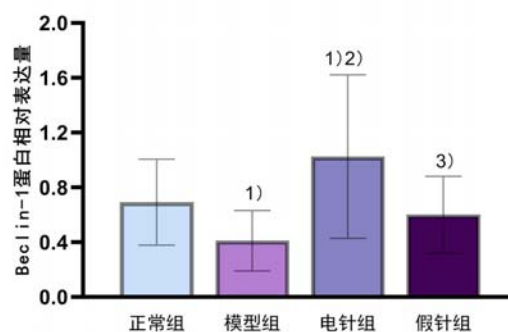


图 10 4组大鼠角膜组织 Beclin-1 蛋白表达条带



注:与正常组比较 ¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较 ²⁾ $P < 0.05$;与电针组比较 ³⁾ $P < 0.05$ 。

图 11 4组大鼠角膜组织 Beclin-1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

干眼症状可以从轻度干涩、异物感发展到严重的眼部疼痛及睁眼困难,已经成为眼科门诊最常见的一类疾病,严重影响着患者的工作和生活。中医古籍中就有针灸疗法治疗眼病的记载^[19-21]。近年来越来越多的研究肯定了针刺治疗干眼的临床疗效^[22-23]。部分机制研究已证实针灸起效可能与改善眼表损伤、调节眼表细胞凋亡、调节免疫、神经和性激素水平有关^[24-25]。本课题组在电针治疗干眼领域开展了系列工作,研究结果提示电针疗法在降低眼部症状积分、促进泪液分泌等方面优于单纯针刺^[22,26]。因此,深入研究电针疗法治疗干眼的作用机制具有重要的意义。丝竹空、风池和光明穴是本课题组临床治疗干眼的有效穴位组方之主穴^[26-27]。丝竹空穴属手少阳三焦经,风池和光明穴属于足少阳胆经,三者均是治疗眼病的常用穴位,合用可疏通眼部经络,畅通泪窍,养血润目,刺激泪液分泌^[28],最终缓解眼部干涩、异物感等症状。

自噬可以通过维持线粒体的稳态来调节炎症反应。而自噬的发生有利于保护眼表的健康,研究已证实存在于眼睛中的自噬相关基因数量高达 40 种,而自噬流程的缺乏会引起多种眼表疾病的发生^[29-31]。泪液渗透压升高引发的眼表炎症是干眼发病的关键,最近的一项研究表明自噬的激活可以保护人角膜上皮细胞免受高渗透应激诱导的炎症反应^[32]。MA S 等^[33]证实于干眼小鼠模型中,自噬诱导有助于减少角膜炎症介质的释放,使用自噬激活剂治疗可以促进干眼小鼠的泪液分泌并减轻角膜上皮损伤。另外有研究发现,泪液中的乳酸素可以通过瞬时上调 LC3 II 来刺激自噬,以恢复

干眼相关的角膜稳态^[34]。但是干眼眼表自噬与炎症之间的相关性研究尚未在针灸机制研究中报道,研究电针对干眼角膜组织中自噬的调节作用具有重要意义。

本研究证实,电针可以提高干眼大鼠的泪液分泌量,延长泪膜破裂时间,降低角膜上皮荧光素染色评分,与既往的研究结果一致^[35-36]。自噬是细胞主要的内源性降解途径,对于清除受损的细胞器、蛋白质聚集和入侵的微生物至关重要。LC3 是自噬过程中的一个关键蛋白,LC3 I 是胞质形式,LC3 II 是与自噬膜结合的形式,LC3 I 转变为 LC3 II 是自噬体形成的关键步骤之一,经常作为自噬流程活跃的标志^[37-38]。利用 Western blotting 和荧光定量 PCR 法检测自噬相关 LC3 蛋白及 mRNA 的表达,结果发现电针组角膜 LC3 II 蛋白及 mRNA 表达增加,明显高于模型组。结合透射电镜观察结果,电针组大鼠角膜组织中有自噬体的形成,推测电针刺激穴位可能引起了角膜组织自噬的发生。P62 是一种多功能蛋白,作为自噬发生的底物,通过与 LC3 结合将被标记的聚集物和细胞器送至自噬体中^[39]。P62 的聚集通常被用作自噬流程受阻的标志^[40]。Beclin-1 是在自噬过程中发挥核心作用的蛋白之一,它对于促进自噬体膜的形成和成熟起着至关重要的作用^[41]。同时它还参与调控多种信号途径,影响细胞的生存和凋亡^[42]。本研究发现,与正常组比较,模型组 P62 升高,Beclin-1 显著降低,提示干眼模型中角膜组织自噬可能受到抑制。与模型组和假针组比较,电针组 P62 蛋白水平显著降低,Beclin-1 显著升高,提示电针干预促进了自噬的发生。

眼表炎症会阻碍或明显抑制自噬通量^[43]。有研究证实干眼小鼠或高渗应激下人角膜上皮细胞增强自噬,可以降低角膜炎症因子的水平,包括肿瘤坏死因子 α 、基质金属蛋白酶 3 和基质金属蛋白酶 9。自噬抑制剂 3-MA 会加剧干眼的临床症状并增加炎症因子的水平,表明促进自噬的药物可以缓解眼表炎症并治疗干眼^[33]。诸多研究已经发现骨化三醇、皮质类固醇氟甲基醇酮和海藻糖等药物可以通过促进自噬以减轻在干燥或高渗应激条件下的干眼的病理改变^[44]。本研究也初步证实电针疗法可能是通过促进自噬来发挥治疗干眼的作用。本研究存在一定的局限性,如自噬检测方法不够全面等,后续研究需要进一步通过设立自噬抑制对照组或使用基因敲除鼠来确证电针对自噬的作用,而电针是通过何种信号通路调控自噬的发生也需要进

行更深入的研究。

参考文献

- [1] FARRAND K F, FRIDMAN M, STILLMAN I O, *et al.* Prevalence of diagnosed dry eye disease in the United States among adults aged 18 years and older[J]. *Am J Ophthalmol*, 2017, 182:90-98.
- [2] LIN I C, KUO Y K, LIU H Y, *et al.* Trends in diagnosed dry eye disease incidence, 2001 to 2015: a nationwide population-based study in Taiwan[J]. *Cornea*, 2022, 41 (11):1372-1377.
- [3] HO T C, FAN N W, YEH S I, *et al.* The Therapeutic effects of a PEDF-derived short peptide on murine experimental dry eye involves suppression of MMP-9 and inflammation[J]. *Transl Vis Sci Technol*, 2022, 11 (10):12.
- [4] HAKIM F E, FAROOQ A V. Dry eye disease: an update in 2022[J]. *JAMA*, 2022, 327 (5):478-479.
- [5] NAIR S, KAUR M, SHARMA N, *et al.* Refractive surgery and dry eye: an update[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2023, 71 (4):1105-1114.
- [6] CHU L, WANG C, ZHOU H. Inflammation mechanism and anti-inflammatory therapy of dry eye[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2024, 11:1307682.
- [7] CAGINI C, DI LASCIO G, TORRONI G, *et al.* Dry eye and inflammation of the ocular surface after cataract surgery: effectiveness of a tear film substitute based on trehalose/hyaluronic acid vs hyaluronic acid to resolve signs and symptoms[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2021, 47 (11):1430-1435.
- [8] WU C M, MAO J W, ZHU J Z, *et al.* DZ2002 alleviates corneal angiogenesis and inflammation in rodent models of dry eye disease via regulating STAT3-PI3K-Akt-NF-kappaB pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45 (1):166-179.
- [9] CHAI P, NI H, ZHANG H, *et al.* The evolving functions of autophagy in ocular health: a double-edged sword[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12 (11):1332-1340.
- [10] DERETIC V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism[J]. *Immunity*, 2021, 54 (3):437-453.

- [11] MARTIN L M, JEYABALAN N, TRIPATHI R, *et al.* Autophagy in corneal health and disease: a concise review[J]. *Ocul Surf*, 2019, 17 (2) : 186-197.
- [12] JEYABALAN N, PILLAI A M, KHAMAR P, *et al.* Autophagy in dry eye disease: therapeutic implications of autophagy modulators on the ocular surface[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2023, 71 (4) : 1285-1291.
- [13] PRINZ J, MAFFULLI N, FUEST M, *et al.* Acupuncture for the management of dry eye disease[J]. *Front Med*, 2022, 16 (6) : 975-983.
- [14] ZHANG D, ZHAO Y, YANG Y T, *et al.* A mechanism study of electroacupuncture for dry eye syndrome by targeting conjunctival cytokine expressions[J]. *Curr Eye Res*, 2020, 45 (4) : 419-427.
- [15] 杨延婷, 董小庆, 郭潇聪, 等. 电针对干眼症兔角膜 TNF- α 、IL-6、MHC-II 调节作用的研究[J]. 上海针灸杂志, 2020, 39 (3) : 365-371.
- [16] 杨延婷, 金悠悠, 杨光, 等. 电针对干眼大鼠结膜 NLRP3 炎症小体及相关蛋白的作用研究[J/OL]. 中国中医基础医学杂志: 1-10[2024-05-30].
- [17] DE PAIVA C S, CORRALES R M, VILLARREAL A L, *et al.* Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83 (3) : 526-535.
- [18] YOON K C, AHN K Y, CHOI W, *et al.* Tear production and ocular surface changes in experimental dry eye after elimination of desiccating stress[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (10) : 7267-7273.
- [19] 曹丽媛, 蒋鹏飞, 彭俊, 等. 干眼证素辨证体系的理论研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43 (12) : 2206-2210.
- [20] 常宇, 陈怡然, 马铁明. 针灸治疗干眼症作用机制及临床研究进展[J/OL]. 辽宁中医药大学学报: 1-16[2024-05-30].
- [21] 王羽, 和丹, 陈云静. 中医特色疗法治疗干眼症的研究进展[J]. 中国临床护理, 2024, 16 (1) : 52-55.
- [22] 刘晓旭, 张丹, 杨延婷, 等. 针刺治疗干眼症疗效观察及对患者生活质量、焦虑抑郁情绪的影响[J]. 上海针灸杂志, 2021, 40 (6) : 744-750.
- [23] PESAVENTO F, LOVATO A, CAPPELLO S, *et al.* Acupuncture in the treatment of dry eye syndrome with anxiety symptoms. a case report[J]. *Eur J Transl Myol*, 2022, 32 (2) : 10482.
- [24] 秦惠钰, 彭清华. 针灸治疗干眼的机制研究[J]. 中医药导报, 2019, 25 (12) : 116-119.
- [25] 杨光, 李茜莹, 杨延婷, 等. 针灸治疗干眼的作用机制研究进展[J]. 上海针灸杂志, 2021, 40 (2) : 219-225.
- [26] YANG G, KONG X, GUO X, *et al.* Effects of electroacupuncture on dry eye: a pilot randomized controlled trial[J]. *Acta Ophthalmol*, 2023, 101 (3) : e315-e326.
- [27] YANG Y, ZHANG D, WU L, *et al.* Electroacupuncture inhibits the corneal ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway in a rat model of dry eye syndrome[J]. *Acupunct Med*, 2022, 40 (1) : 78-88.
- [28] 张翠红, 马晓芑, 吴丹巍, 等. 临床治疗相关的针灸歌赋中眼部疾病治疗用穴分析[J]. 上海针灸杂志, 2011, 30 (3) : 195-197.
- [29] KARNATI R, TALLA V, PETERSON K, *et al.* Lacritin and other autophagy associated proteins in ocular surface health[J]. *Exp Eye Res*, 2016, 144 : 4-13.
- [30] LITON P B, BOESZE-BATTAGLIA K, BOULTON M E, *et al.* Autophagy in the eye: from physiology to pathophysiology[J]. *Autophagy Rep*, 2023, 2 (1) : 2178996.
- [31] PENG H, KAPLAN N, LIU M, *et al.* Keeping an eye out for autophagy in the cornea: sample preparation for single-cell RNA-sequencing[J]. *Methods Mol Biol*, 2023: 37930627.
- [32] LIU Z, CHEN D, CHEN X, *et al.* Autophagy activation protects ocular surface from inflammation in a dry eye model *in vitro*[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (23) : 8966.
- [33] MA S, YU Z, FENG S, *et al.* Corneal autophagy and ocular surface inflammation: a new perspective in dry eye[J]. *Exp Eye Res*, 2019, 184 : 126-134.
- [34] WANG N, ZIMMERMAN K, RAAB R W, *et al.* Lacritin rescues stressed epithelia via rapid forkhead box O3 (FOXO3)-associated autophagy that restores metabolism[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (25) : 18146-18161.
- [35] 傅张倚天, 万咪咪, 赖思华, 等. 电针通过调控 TLR4 介导的炎症信号通路改善糖尿病干眼大鼠角膜炎症的机制研究[J]. 眼科新进展, 2024, 44 (1) : 24-29.

- [36] 万咪咪, 傅张倚天, 何璐平, 等. 基于TREM2介导的炎症信号通路观察电针缓解2型糖尿病干眼大鼠眼表感觉异常的作用机制[J]. 眼科新进展, 2024, 44(4): 258-263.
- [37] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 and autophagy[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 77-88.
- [38] JIANG P, MIZUSHIMA N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells[J]. *Methods*, 2015, 75: 13-18.
- [39] HUANG X, LIU L, YAO J, *et al*. S-acylation regulates SQSTM1/p62-mediated selective autophagy[J]. *Autophagy*, 2023: 1-3.
- [40] KUMAR A V, MILLS J, LAPIERRE L R. Selective autophagy receptor p62/SQSTM1, a pivotal player in stress and aging[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 793328.
- [41] PAPINI N, TODISCO R, GIUSSANI P, *et al*. Impaired autophagy in krabbe disease: the role of BCL2 and Beclin-1 phosphorylation[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5984.
- [42] MENON M B, DHAMIJA S. Beclin-1 phosphorylation at the center of autophagy regulation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 137.
- [43] DIAS-TEIXEIRA K L, SHARIFIAN G M, ROMANO J, *et al*. Autophagy in the normal and diseased cornea[J]. *Exp Eye Res*, 2022, 225: 109274.
- [44] PARK J K, PENG H, KATSNELSON J, *et al*. Micro-RNAs-103/107 coordinately regulate macropinocytosis and autophagy[J]. *J Cell Biol*, 2016, 215(5): 667-685.

收稿日期2024-01-11