

本文引用: 江 芝, 王 磊, 刘学武, 张小冬, 彭冬冬, 陈相池, 王小青, 姜德建, 夏新华. 基于 Bax/Bcl-2 信号通路探究钩藤提取物对实验兔复发性单纯疱疹病毒性角膜炎的作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(6): 1014-1020.

基于 Bax/Bcl-2 信号通路探究钩藤提取物对实验兔复发性单纯疱疹病毒性角膜炎的作用

江 芝^{1,2}, 王 磊³, 刘学武², 张小冬², 彭冬冬², 陈相池², 王小青², 姜德建², 夏新华^{1*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208; 2. 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司, 湖南 长沙 410331; 3. 中南大学湘雅基础医学院, 湖南 长沙 410013

〔摘要〕目的 基于 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)/B 细胞淋巴瘤因子-2(Bcl-2)信号通路探究钩藤提取物对实验兔复发性单纯疱疹病毒性角膜炎(HSK)的作用。方法 选用普通级大耳白兔 40 只, 随机分为正常对照组、模型对照组、阿昔洛韦组、钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组, 每组 8 只。除正常对照组外, 其余各组均采用 型单纯疱疹病毒感染眼部, 并于感染后 21 d(眼部感染症状恢复后), 采用紫外线诱导复发性感染, 以制备复发性 HSK 模型。模型对照组经眼滴入等量生理盐水, 阿昔洛韦组每天灌胃阿昔洛韦, 钩藤水提取物组和钩藤醇提取物组每天经眼滴入相应的钩藤提取物, 连续干预 14 d。分别于诱导复发后次日(给药前)、给药 7 d、给药 14 d 进行角膜荧光染色评分; 于给药前、给药 14 d 进行泪液病毒滴度检测; 于给药 14 d 后进行角膜组织病理学检查, 并采用 Western blot 检测角膜组织中 Bax、Bcl-2、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)的蛋白表达水平。结果 与正常对照组比较, 模型对照组角膜荧光染色评分、泪液病毒滴度和角膜组织病理评分显著升高($P<0.01$); 与模型对照组比较, 给药 14 d, 钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组和阿昔洛韦组角膜荧光染色评分和泪液病毒滴度均降低($P<0.05$, $P<0.01$), 阿昔洛韦组、钩藤醇提取物组的角膜组织病理评分显著降低($P<0.01$)。与正常对照组比较, 模型对照组角膜的 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达均显著增加($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达显著减少($P<0.01$); 与模型对照组比较, 钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组 Caspase-3、Bax 蛋白表达减少($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达增加($P<0.05$)。与钩藤水提取物组比较, 钩藤醇提取物组给药 7 d 和 14 d 的角膜荧光染色评分显著减小($P<0.01$), 泪液病毒滴度和角膜组织病理评分均显著降低($P<0.01$)。结论 钩藤不同工艺提取物对复发性 HSK 具有显著治疗作用, 其药理作用机制可能与其调节 Bax/Bcl-2/Caspase-3 凋亡信号通路, 抑制病毒感染引起的角膜细胞凋亡有关, 且钩藤醇提取物的药效作用更强。

〔关键词〕 型单纯疱疹病毒; 单纯疱疹病毒性角膜炎; 钩藤提取物; Bcl-2 相关 X 蛋白; B 细胞淋巴瘤因子-2; 胱天蛋白酶-3
〔中图分类号〕R285.5 〔文献标志码〕A 〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.06.004

Effects of *Uncaria rhynchophylla* extracts on recurrent herpes simplex keratitis in experimental rabbits via the Bax/Bcl-2 signaling pathway

JIANG Zhi^{1,2}, WANG Lei³, LIU Xuewu², ZHANG Xiaodong², PENG Dongdong², CHEN Xiangchi²,
WANG Xiaoqing², JIANG Dejian², XIA Xinhua^{1*}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs & Hunan Prima Drug Research Center Co., Ltd., Changsha, Hunan 410331, China; 3. Xiangya School of Basic Medical Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China

〔Abstract〕 Objective To investigate the effects of *Uncaria rhynchophylla* extracts on recurrent herpes simplex keratitis

〔收稿日期〕2025-03-16

〔基金项目〕湖南省自然科学基金项目(2024JJ8140); 湖南省重点研发计划项目(2023DK2006); 长沙市“小荷”青年人才创新项目([2022]056)。

〔通信作者〕* 夏新华, 男, 博士, 博士研究生导师, 教授, E-mail: xiaxinhua001@163.com。

(HSK) in experimental rabbits based on the Bcl-2-associated X protein (Bax)/B-cell lymphoma factor 2 (Bcl-2) signaling pathway. **Methods** Forty common-grade big-eared white rabbits were randomly divided into normal control group, model control group, acyclovir group, aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla* group, and alcoholic extract of *Uncaria rhynchophylla* group, with eight rabbits in each group. Except for the normal control group, all other groups were infected ocularly with herpes simplex virus type I (HSV-I). Twenty-one days after infection (when ocular infection symptoms had resolved), recurrent infection was induced using ultraviolet light to establish a recurrent HSK model. The model control group was administered an equal volume of normal saline via ocular drops, the acyclovir group received oral gavage of acyclovir daily, and the aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla* group and the alcoholic extract of *Uncaria rhynchophylla* group were treated with the corresponding extracts via ocular drops daily for 14 consecutive days. Corneal fluorescence staining scores were assessed on the day after recurrence induction (before administration), on the 7th and 14th day of administration. Tear viral titers were measured before administration and on the 14th day of administration. Corneal histopathological examinations were conducted, and the protein expression levels of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in corneal tissue were checked by Western blot on the 14th day after administration. **Results** Compared with the normal control group, the model control group showed a significant increase in corneal fluorescein staining scores ($P<0.01$), tear viral titers, and corneal histopathological scores ($P<0.01$). After 14 days of administration, compared with the model control group, the alcoholic extract of *Uncaria rhynchophylla* group, and the acyclovir group all exhibited decreased corneal fluorescein staining scores and tear viral titers ($P<0.05$ or $P<0.01$). The acyclovir group and the alcoholic extract of *Uncaria rhynchophylla* group had significantly reduced corneal histopathological scores ($P<0.01$). Compared with the normal control group, the model control group showed significantly increased protein expression levels of Bax and Caspase-3 ($P<0.01$) and significantly decreased protein expression level of Bcl-2 ($P<0.01$) in the cornea. Compared with the model control group, the aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla* group and the alcoholic extract of *Uncaria rhynchophylla* group had significantly reduced protein expression levels of Caspase-3 and Bax ($P<0.05$, $P<0.01$) and significantly increased protein expression level of Bcl-2 ($P<0.05$) in the cornea. Compared with the water extract group of *Uncaria*, the alcoholic extract group of *Uncaria* showed significantly lower corneal fluorescein staining scores at 7 and 14 days of administration ($P<0.01$). The alcoholic extract group of *Uncaria* had significantly lower tear virus titers and corneal tissue pathological scores ($P<0.01$). **Conclusion** Different extracts of *Uncaria rhynchophylla* have significant therapeutic effects on recurrent HSK, and the pharmacological mechanism may be related to their regulation of the Bax/Bcl-2/Caspase-3 apoptotic signaling pathway, thereby inhibiting virus-induced corneal cell apoptosis. Moreover, the alcoholic extract of *Uncaria rhynchophylla* demonstrates stronger pharmacological efficacy.

[**Keywords**] herpes simplex virus type I; herpes simplex keratitis; *Uncaria rhynchophylla* extracts; Bcl-2-associated X protein; B-cell lymphoma factor 2; Caspase-3

型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type I, HSV-I)主要感染面部,可通过直接接触或体内重复侵袭感染眼部导致单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)^[1]。HSV-I 因其具有较强的免疫逃逸能力^[1-3],在急性感染后常潜伏于宿主的三叉神经元^[3-5],使其在体内不易被彻底清除,并导致条件性的反复发作性感染^[4-6],最终造成角膜白斑而致盲,是引起全球致盲的主要原因^[4-5]。临床治疗药物以 DNA 多聚酶抑制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂为代表,且多联合用药。但药物联用增加了不良反应和毒性反应的发生风险^[7],如长期口服抗病毒药物存在肾毒性等不良反应,长期局部使用糖皮质激素可能引起眼压升高、白内障、黄斑变性等并发症^[8]。因此,同时兼具多重药理活性的药物将具有更高的开发价值。钩藤作为我国传统中药,具有清热平肝、熄风定惊的功效,药理作用研究主要集中于降压、抗

氧化应激、抗神经细胞凋亡、抗炎和抗纤维化、抗抑郁等,较少有研究涉及直接抗菌及抗病毒作用^[9-10]。本研究通过观察钩藤提取物对复发性 HSK 模型的治疗作用,为钩藤提取物的新用途和进一步的开发提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级日本大耳白兔 40 只,雌雄各半,体质量 2.5~3.0 kg,动物质量合格证号:42010000006435;实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2021-0011,购于武汉市万千佳兴生物科技有限公司。在湖南普瑞玛药物研究中心有限公司普通环境生物安全实验室饲养,实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2020-0015,生物安全实验室备案编号:[202405312]BSL2-04。动物实验经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司实验动

物管理伦理委员会批准,伦理审批号:IACUC-2021(2)045,实验过程遵循 3R 原则。

1.2 主要药品及试剂

钩藤饮片(通道湘春中药材专业合作社,批号:20210506);阿昔洛韦片(广东彼迪药业有限公司,批号:20210502)。

中性红染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号:20210813);荧光素钠(上海麦克林生化科技有限公司,批号:C10642034);兔抗胱天蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(爱博泰克生物科技有限公司,货号:A0214);兔抗 B 细胞淋巴瘤因子-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体、兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)抗体(美国 Cell Signaling Technology,货号:2872S、277S);人胚胎肾细胞293(HEK293T)(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:202017);HSV- (美国模式菌种收集中心,编号:ATCCVR-773)。

1.3 主要仪器

HOPE-MED8130B 型皮肤光毒性实验检测仪(天津开发区合普工贸有限公司);KJ5S1 型手持裂隙灯显微镜(苏州康捷医疗股份有限公司);3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);DMIL 型倒置显微镜、DFC420C 型病理成像系统(德国 Leica 公司);YXQ-50A 型立式压力灭菌器(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司)。

1.4 药液制备

取钩藤带钩茎枝,按 1:1 加水或 75%乙醇浸泡 30 min 制备钩藤水提取物或醇提取物,加热煮沸提取 2 h,得到提取液,过滤,60 ℃减压浓缩成水提取浸膏(每克浸膏含 4.138 5 g 生药材)或醇提取浸膏(每克浸膏含 2.983 5 g 生药材),均采用生理盐水溶解配制成每毫升药液含 0.1 g 生药材,置于 4 ℃冰箱保存备用^[11]。

1.5 造模方法

参考文献[10]培养方法进行 HSV- 的培养,并制备成半数组织细胞感染剂量为 $10^{-4.88}/0.1$ mL(相当于 5.3×10^5 PFU/mL)的病毒液,用于大耳白兔眼部感染。参照文献[12-13]建立兔复发性 HSK 模型。日本大耳白兔采用乙醚吸入轻微麻醉,用 6 mm 环钻在左眼角膜中央作一压痕,并以 6.5 号针头在压痕内作“#”划痕(深度仅限上皮层),向兔左眼结膜囊内滴入单纯性疱疹病毒原液 100 μ L/眼(5.3×10^4

PFU/眼)诱导原发性感染,以眼部出现感染症状(眼睑肿胀,泪液及分泌物增加)为原发性感染造模成功的标准^[3,10]。

于原发性感染后继续观察 21 d(D1~D21),直至眼部感染症状均消失。于观察期结束后当天(D21)采用紫外线(光源 TW20,波长 302 nm,照射剂量 200 mJ/cm²)照射角膜 3 min,以诱导 HSK 复发^[12-13]。于诱导复发后次日进行角膜荧光染色评分和泪液病毒滴度检测,以角膜荧光染色评分显著增大,且泪液中能检出病毒即判定成功制备复发性 HSK 模型^[12-13]。

1.6 分组及给药方法

选用检疫合格日本大耳白兔 40 只,雌雄各半,按体质量随机分为正常对照组、模型对照组、阿昔洛韦组、钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组,每组 8 只。除正常对照组外,其余各组均建立复发性 HSK 模型。正常对照组不予干预,模型对照组经眼滴入等量生理盐水,钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组均于诱导复发后次日开始连续 14 d(D22~D35)经眼滴入钩藤提取物药液 50 μ L/眼,阿昔洛韦组灌胃阿昔洛韦 46.7 mg/kg^[14]。分别于诱导复发后次日(D22,给药前)、给药 7 d、给药 14 d 后(D29、D36)进行角膜荧光染色评分;于诱导复发后次日和给药 14 d 进行泪液采集和病毒滴度检测。进一步于给药结束后解剖,取眼球,分离角膜组织,分别进行组织病理学检查和组织蛋白表达检测。

1.7 荧光染色法观察角膜损伤情况

采用荧光素钠 0.1 mL/只滴注眼部,进行角膜荧光素染色,并采用裂隙灯进行角膜损伤的病变评分,具体评分标准如下^[17,15-16]:0 分,正常的透明角膜;0.1~0.9 分,角膜荧光素钠染色呈点状,上皮病变数为 1 到 9 个;1 分,角膜荧光素钠染色呈点状,点状上皮病变 10 个以上,或小溃疡面积在 25%以下;2 分,角膜荧光素钠染色呈片状,角膜溃疡面积在 25%~50%;3 分,角膜荧光素钠染色呈片状,角膜溃疡面积在 50%~75%;4 分,角膜荧光素钠染色呈片状,角膜溃疡面积在 75%~100%。得分越高,表明角膜损伤程度越严重。

1.8 空斑法观察泪液病毒滴度

采用蘸有 DMEM 培养液的棉签擦拭左右两侧角膜,将其放入装有 1 mL DMEM 的无酶 EP 管中,将 3 次擦拭液均匀混合后,按 10 倍梯度稀释 5 个稀

释度,采用空斑计数法进行病毒滴度检测,观察空斑形态并记录空斑数,计算病毒滴度(PFU/mL)=(每孔平均空斑个数×病毒稀释度倒数)/每孔病毒接种量(mL)。病毒滴度越大,表明泪液中的病毒数量越多,角膜感染病毒程度越严重^[7]。

1.9 HE染色观察角膜组织的病理变化

大耳白兔按 15 mg/kg 静脉注射 10 mg/mL 丙泊酚乳状注射液麻醉,解剖取角膜组织,福尔马林固定,石蜡包埋、切片、HE 染色,置于光镜下观察角膜组织病理学变化,分别按角膜上皮细胞坏死和缺损、上皮细胞增生、基质炎症细胞浸润程度进行分级和评分,并将总分进行加和作为角膜病变的整体病变评分。具体评分标准如下^[7,17]:无异常(NSL),计 0 分;轻度病变(+),计 1 分;中度病变(++),计 2 分;重度病变(+++),计 3 分。病理评分越高,表示角膜病变越严重。

1.10 Western blot 检测角膜组织中的相关蛋白表达

取新鲜的角膜组织,在预冷的 RIPA 缓冲液中进行匀浆,离心去除未裂解的组织,收集离心上清液总蛋白,进行蛋白浓度检测。取角膜总蛋白 50 μ g 上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。用一抗(Caspase-3、Bax、Bcl-2)按 1:1 000 稀释,并与 PVDF 膜 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 15 min。用 HRP 标记的二抗室温孵育 90 min,TBST 洗 3 次,每次 15 min,ECL

化学发光法曝光扫描拍照,用 Quantity One 4.6.8 软件定量灰度值,以 β -actin 为内参对照,测量各组的 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达水平。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学处理,体外试验采用 *Bliss* 法进行 IC_{50} 和 EC_{50} 的计算。各组数据在分析前进行正态性检验和方差齐性检验,正态分布数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,非正态分布数据用中位数表示。两组均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组角膜荧光染色评分情况

正常对照组大耳白兔给药期间的眼部均未见异常,模型对照组、阿昔洛韦组、钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组大耳白兔在诱导复发后次日的角膜均可见片状染色,且各组动物间的染色面积基本一致。钩藤醇提取物组和阿昔洛韦组给药 7 d 和 14 d 的角膜可见点状染色;钩藤醇提取物组给药 7 d 和 14 d 的角膜仍可见片状染色,但染色面积显著减小。详见图 1A~E。

与正常对照组比较,模型对照组、阿昔洛韦组、钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组在诱导复发后次日均可见角膜荧光染色评分显著升高($P < 0.01$)。与

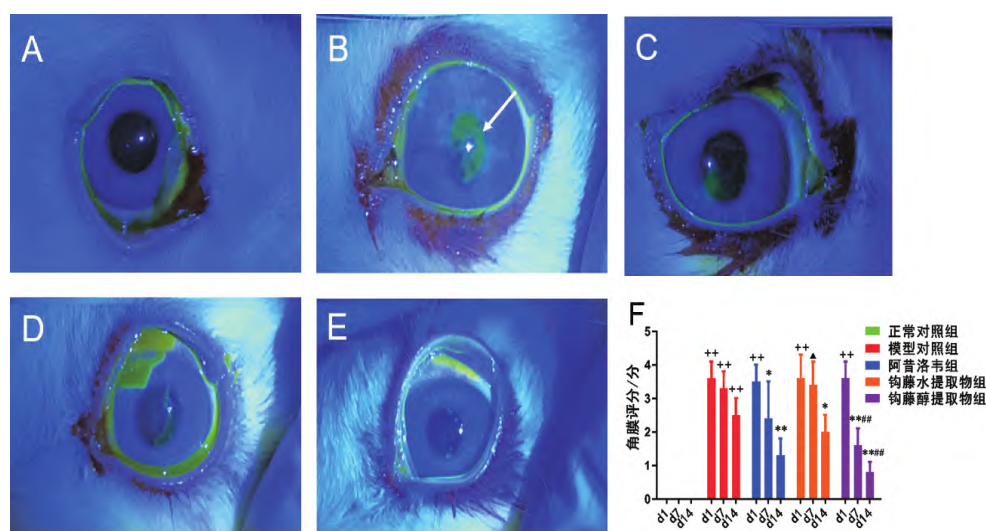


图1 实验兔复发性 HSK 模型角膜荧光素钠染色及角膜评分

Fig.1 Changes in corneal fluorescein sodium staining and corneal scoring in recurrent HSK model of experimental rabbits

注:A、B、C、D、E 分别为正常对照组、模型对照组、阿昔洛韦组、钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组的角膜荧光素钠染色图,箭头指向处显示为荧光染料聚集;F 为角膜评分柱形图。与正常对照组比较,⁺⁺ $P < 0.01$;与模型对照组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与阿昔洛韦组比较,[▲] $P < 0.05$;与钩藤水提取物组比较,^{###} $P < 0.01$ 。

模型对照组比较,阿昔洛韦组和钩藤醇提取物组给药 7 d 和 14 d 后的角膜荧光染色评分均降低($P<0.05$, $P<0.01$),钩藤水提取物组给药 14 d 后的角膜荧光染色评分降低($P<0.05$)。与阿昔洛韦组比较,钩藤水提取物组给药 7 d 的角膜荧光染色评分升高($P<0.05$);与钩藤水提取物组比较,钩藤醇提取物组给药 7 d 和 14 d 后的角膜荧光染色评分均显著降低($P<0.01$)。详见图 1F。

2.2 各组泪液病毒滴度情况

与正常对照组比较,模型对照组、阿昔洛韦组、钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组诱导复发后次日的泪液病毒滴度均显著升高($P<0.01$);与模型对照组比较,阿昔洛韦组、钩藤水提取物组和钩藤醇提取物组泪液病毒滴度均显著降低($P<0.01$);与阿昔洛韦组比较,钩藤水提取物组泪液病毒滴度显著升高($P<0.01$);与钩藤水提取物组比较,钩藤醇提取物组泪液病毒滴度显著减少($P<0.01$)。详见图 2。

2.3 各组角膜组织病理变化

正常对照组动物角膜未见上皮细胞缺损、变性坏死、增生和基质炎症细胞浸润;模型对照组角膜可见中度角膜病变,包括角膜上皮细胞变性坏死、缺损和增生,以及基质的炎症细胞浸润,上皮缺损发生率为 100%;阿昔洛韦组角膜可见轻度角膜病变,但病变类型仅包括轻度的上皮增生和少量的基质炎症细胞浸润;钩藤水提取物组角膜上皮细胞可见轻度

的变性和增生,伴有大量的基质炎症细胞浸润;钩藤醇提取物组角膜仅见轻度的上皮增生和少量的基质炎症细胞浸润。详见图 3A~E。

与正常对照组比较,模型对照组角膜病理评分显著增大($P<0.01$);与模型对照组比较,阿昔洛韦组和钩藤醇提取物组角膜病理评分均显著减小($P<0.01$);与阿昔洛韦组比较,钩藤水提取物组角膜病理评分增加($P<0.05$);与钩藤水提取物组比较,钩藤醇提取物组的角膜病理评分显著降低($P<0.01$)。详见图 3F。

2.4 各组角膜组织相关蛋白表达水平情况

与正常对照组比较,模型对照组角膜的 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达均显著增加($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达显著减少($P<0.01$);与模型对照组比较,钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组 Caspase-3、Bax 蛋白表达减少($P<0.05$, $P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达增加($P<0.05$)。详见图 4。

3 讨论

HSK 是由 HSV-1 感染引起的病毒性角膜病变^[1,15],其病变类型包括上皮型、基质型和内皮型,其中基质型 HSK 通常分为基质免疫型和基质坏死型^[15-17]。基质免疫型 HSK 由角膜基质对 HSV-1 抗原的迟发超敏反应引起,其角膜上皮通常完好无损;基质坏死型 HSK 在基质炎症浸润的基础上伴有角

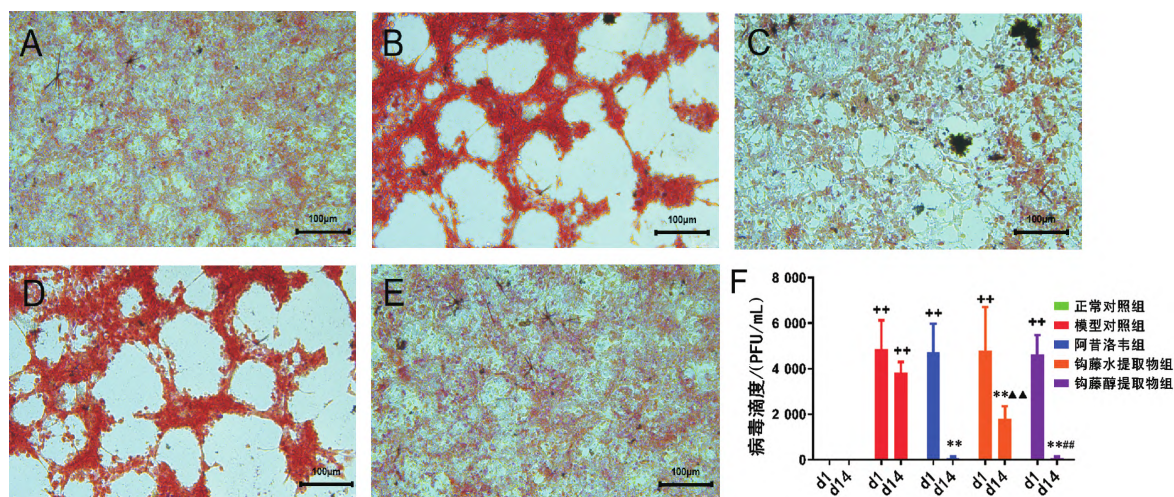


图 2 实验兔复发性 HSK 模型泪液病毒滴度($\times 100$)

Fig.2 Tear virus titers in recurrent HSK model of experimental rabbits ($\times 100$)

注:A、B、C、D、E 分别为正常对照组、模型对照组、阿昔洛韦组、钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组的泪液病毒空斑法培养图;F 为泪液病毒滴度计数的柱形图。与正常对照组比较,++ $P<0.01$;与模型对照组比较,** $P<0.01$;与阿昔洛韦组比较,▲ $P<0.01$;与钩藤水提取物组比较,■ $P<0.01$ 。

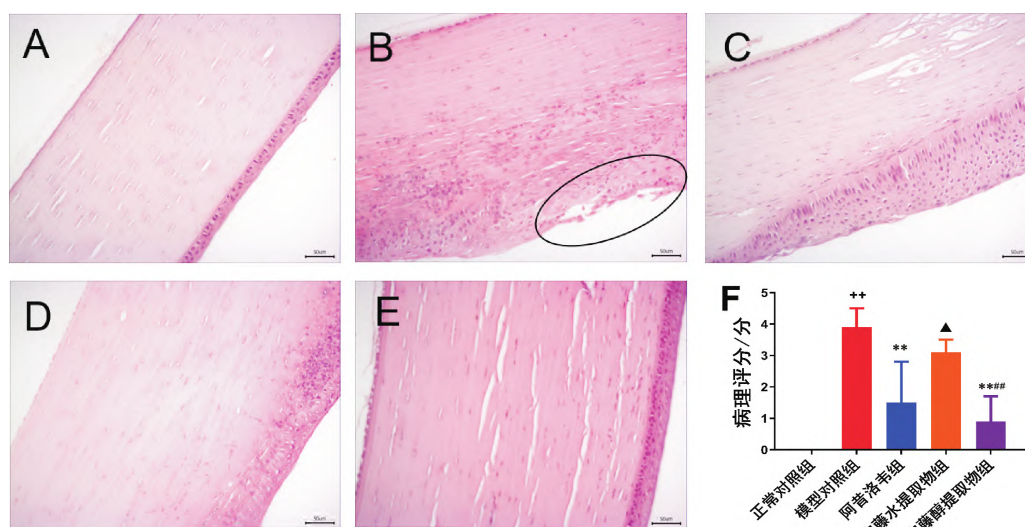


图3 实验兔复发性 HSK 模型角膜组织病理检查($\times 200$)

Fig.3 Pathological examination of corneal tissue in recurrent HSK model of experimental rabbits ($\times 200$)

注:A、B、C、D、E 分别为正常对照组、模型对照组、阿昔洛韦组、钩藤水提取物组、钩藤醇提取物组的角膜组织病理图, B 图的椭圆形框为角膜缺损部位;F 为角膜病理评分柱形图。与正常对照组比较, $^{**}P<0.01$; 与模型对照组比较, $^{**}P<0.01$; 与阿昔洛韦组比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与钩藤水提取物组比较, $^{##}P<0.01$ 。

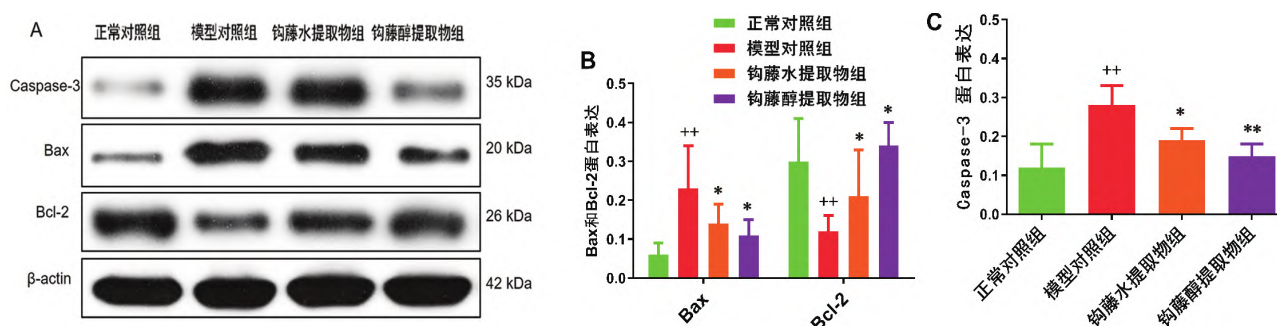


图4 各组角膜组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平情况

Fig.4 Protein expression levels of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in corneal tissue of each group

注:与正常对照组比较, $^{**}P<0.01$;与模型对照组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

膜上皮细胞的缺损、坏死,可能是由 HSV-1 活动性感染和免疫性炎症共同引起的^[18]。

本研究结果显示,HSV-1 以 5.3×10^4 PFU/眼的感染造模剂量能构建至少持续时间 14 d 的兔 HSK 模型,表现为角膜呈点状和树枝状荧光染色,且泪液中病毒滴度显著增加,提示角膜存在组织缺损和活性的病毒感染,角膜损伤符合基质坏死型 HSK 的病变特征,病变类型包括角膜上皮细胞变性坏死、缺损和增生,以及基质的炎症细胞浸润^[3,15-16]。钩藤水提取物和钩藤醇提取物能降低 HSK 家兔模型的角膜荧光染色评分,降低模型的泪液病毒滴度。钩藤醇提取物能显著改善角膜组织病变,钩藤水提取物对角膜组织病变的改善作用不明显,提示钩藤提取物对家兔 HSK 模型具有显著治疗作用,且钩藤醇提取物的治疗作用显著优于钩藤水提取物。

角膜上皮细胞 (corneal epithelial cells, CEC) 是角膜的初始防御层,对于防止 HSV-1 穿透更深并与基质神经丛相互作用至关重要^[17-19]。感染后,HSV-1 触发 CEC 凋亡,破坏上皮屏障并加重感染^[10,19-21]。钩藤及其提取物则能抑制不同疾病的组织细胞凋亡,如寨旭等^[22]的研究显示,异钩藤碱能通过胞外信号调节激酶信号通路调控大鼠急性胰腺炎细胞的炎症和凋亡。侯丛岭等^[23]研究显示,异钩藤碱通过上调 miR-19205p 调控肿瘤坏死因子- α 诱导人支气管上皮细胞凋亡。因此,本研究将钩藤提取物针对 HSK 的机制研究聚焦于细胞凋亡,通过检测角膜组织中经典的凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 的表达量探索钩藤不同工艺提取物对角膜细胞凋亡的影响^[24-25]。本研究结果显示,与正常对照组比较,模型对照组角膜组织的 Bax、Caspase-3 蛋白表达增加,Bcl-2 蛋

白表达减少;经钩藤提取物干预后,与模型对照组比较,钩藤水提取物组和醇提取物组的促凋亡 Bax、Caspase-3 蛋白表达减少,抑凋亡 Bcl-2 蛋白表达增加,且醇提取物对上述 3 个蛋白的调节程度更强。上述结果提示,实验兔 HSK 模型的角膜损伤可能与角膜组织 Bax/Bcl-2/Caspase-3 凋亡信号通路改变有关,而钩藤提取物改善 HSK 角膜病变的作用机制可能与其调节 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平来抑制角膜细胞凋亡有关。

综上所述,钩藤不同工艺提取物对复发性 HSK 具有治疗作用,其药理作用机制可能与其调节 Bax/Bcl-2/Caspase-3 凋亡信号通路,抑制病毒感染引起的角膜细胞凋亡有关,且钩藤醇提取物的药效作用更强。

参考文献

- [1] AVITABILE E, MENOTTI L, GIORDANI B, et al. Vaginal lactobacilli supernatants protect from herpes simplex virus type 1 infection in cell culture models[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(5): 2492.
- [2] 张晶晶, 李琦涵. 单纯疱疹病毒 型感染的天然免疫反应及其逃逸机制[J]. *生物技术通讯*, 2020, 31(4): 478-485.
- [3] YIN D, LING S K, WANG D W, et al. Targeting herpes simplex virus with CRISPR-Cas9 cures herpetic stromal keratitis in mice[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(5): 567-577.
- [4] SHRESTHA P, PAUDEL S. Stromal keratitis among herpes simplex keratitis patients in a tertiary eye hospital: A descriptive cross-sectional study[J]. *JNMA*, 2022, 60(256): 1008-1010.
- [5] RANI A, ERGÜN S, KARNATI S, et al. Understanding the link between neurotropic viruses, BBB permeability, and MS pathogenesis[J]. *Journal of Neurovirology*, 2024, 30(1): 22-38.
- [6] BELLO-MORALES R, ANDREU S, LÓPEZ-GUERRERO J A. The role of herpes simplex virus type 1 infection in demyelination of the central nervous system[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(14): 5026.
- [7] 李鹏伟, 刘江川, 卢 萍, 等. 药物治疗单纯疱疹病毒基质型角膜炎的研究进展[J]. *眼科学报*, 2022, 37(8): 651-657.
- [8] 潘志强. 合理使用眼局部药物以避免药源性眼表损伤[J]. *中华眼科杂志*, 2021(8): 561-563.
- [9] 谭桂玉, 万凌云, 张 坤, 等. 钩藤的药理作用及临床应用研究进展[J]. *广西科学*, 2024, 31(1): 1-8.
- [10] 王 珍, 梁丽娜, 马群英, 等. 双秦眼用凝胶对复发性单疱病毒性角膜炎小鼠的干预研究[J]. *中国中医眼科杂志*, 2022, 32(9): 684-690.
- [11] 胡宇婷, 唐 欣, 刘丽花, 等. HPLC 法测定不同商品规格桂林产钩藤中 4 种生物碱的含量[J]. *广西中医药大学学报*, 2023, 26(1): 40-44.
- [12] 朱越峰, 陈菊仙, 屠叔丹, 等. 银翘散对单纯疱疹病毒性角膜炎小鼠 TNF- α 和 IFN- γ 表达的影响[J]. *北方药学*, 2024, 21(9): 8-11, 15.
- [13] 肖书毓, 俞 莹, 陶津华. BALB/c 小鼠单纯疱疹病毒性角膜炎复发感染模型的建立及鉴定[J]. *中华实验眼科杂志*, 2021, 39(2): 107-112.
- [14] 赵 伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010(5): 52-53.
- [15] 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 我国角膜上皮损伤临床诊治专家共识(2016 年)[J]. *中华眼科杂志*, 2016(9): 5.
- [16] CHODOSH J. The herpetic eye disease study: Topical corticosteroid trial for herpes simplex stromal keratitis: A paradigm shifting clinical trial[J]. *Ophthalmology*, 2020, 127(4S): S3-S4.
- [17] 孙博强, 王琼艳, 潘冬立. 单纯疱疹病毒潜伏和激活机制研究进展[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2019, 48(1): 89-101.
- [18] KHAN A A, SRIVASTAVA R, CHENTOUFI A A, et al. Therapeutic immunization with a mixture of herpes simplex virus 1 glycoprotein D-derived "asymptomatic" human CD8⁺ T-cell epitopes decreases spontaneous ocular shedding in latently infected HLA transgenic rabbits: Association with low frequency of local PD-1⁺ TIM-3⁺ CD8⁺ exhausted T cells[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(13): 6619-6632.
- [19] KALEZIC T, MAZEN M, KUKLINSKI E, et al. Herpetic eye disease study: Lessons learned[J]. *Current Opinion in Ophthalmology*, 2018, 29(4): 340-346.
- [20] DUTT S, ACHARYA M, GOUR A, et al. Clinical efficacy of oral and topical acyclovir in herpes simplex virus stromal necrotizing keratitis[J]. *Indian Journal of Ophthalmology*, 2016, 64(4): 292-295.
- [21] CHANG J Y, YAO Y, SUN X H, et al. JAG1 mediates apoptosis in herpes simplex keratitis by suppressing autophagy via ROS/JAG1/NOTCH1/pULK1 signaling pathway[J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2024, 41(1): 1-19.
- [22] 寨 旭, 裴红红, 刘 俊, 等. 异钩藤碱对大鼠急性胰腺炎细胞的炎症和凋亡改善及 ERK 信号通路调控作用[J]. *山东医药*, 2024, 64(12): 15-19.
- [23] 侯从岭, 芦晓帆, 雷小婷, 等. 异钩藤碱上调 miR-192-5p 对 TNF- α 诱导的人支气管上皮细胞凋亡和炎症因子释放的作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021, 47(3): 595-607.
- [24] 胡善明, 王亚楠, 许正茂, 等. Bcl-2 家族分子在细胞凋亡中的作用研究进展[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(10): 85-89.
- [25] 程宇凌, 任艳萍. caspase-3 和核因子- κ B 在细胞凋亡外途径中的双向作用研究进展[J]. *广东医学*, 2016, 37(18): 2837-2840.

(本文编辑 田梦妍)