阿魏酸钠对角膜内皮功能障碍及CEC损伤的影响及潜在机制Δ

宋　辉*,姚为华,余晨曦,舒百全,刘　易,韦　康(黄冈市中心医院眼科,湖北 黄冈　438000)

中图分类号　R965;R772.21　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2023)15-1840-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.15.10

摘　要　目的　探讨阿魏酸钠(SF)对角膜内皮功能障碍及角膜内皮细胞(CEC)损伤的影响及潜在机制。**方法**　将雄性新西兰兔分为对照组、苯扎氯铵(BAK)组和BAK+SF组,每组6只。除对照组外,其余组以前房注射BAK建立大泡性角膜病变模型,BAK+SF组于术后次日腹腔注射SF溶液200 mg/kg,每天2次,连续14 d。观察各组兔角膜透明度和基质水肿情况(术前及术后第1、7、14天),检测其角膜厚度(术后第14天)和眼内压(术后第1～14天);于术后第14天,评估其角膜内皮结构并检测功能相关蛋白[鬼笔环肽、胞质紧密连接蛋白1(ZO-1)、钠钾ATP酶、Ki67]的表达情况。于术后14 d采集BAK组角膜组织,分离、培养原代兔CEC,将其分为空白组和不同质量浓度SF组,检测不同培养时间下各组细胞的活力和Ras同源基因家族A(RhoA)、骨形成蛋白受体1A(BMPR1A)、BMRP2蛋白的表达情况。**结果**　与BAK组比较,BAK+SF组兔角膜透明度和基质水肿情况逐渐好转,且角膜厚度显著减小($P<0.05$);其CEC仅缺损至B区,且表现为正常的六边形内皮细胞结构;其角膜内皮组织中鬼笔环肽、ZO-1、钠钾ATP酶、Ki67蛋白的表达均显著升高($P<0.05$)。当SF质量浓度≤200 mg/L时,其对兔CEC的增殖有一定的促进作用,具有浓度依赖性($P<0.05$)和时间依赖趋势,且50、100、200 mg/L的SF可浓度依赖性地上调细胞中RhoA、BMPR1A、BMPR2蛋白的表达($P<0.05$)。**结论**　SF可改善大泡性角膜病变模型兔受损角膜内皮的透明度,减轻基质水肿,减小角膜厚度,维持角膜内皮结构完整性并促进角膜内皮功能恢复;该成分还可促进兔CEC的增殖,此作用可能与激活RhoA-Rho激酶-骨形成蛋白信号通路有关。

关键词　阿魏酸钠;角膜内皮细胞;大泡性角膜病变;Ras同源基因家族A-Rho激酶-骨形成蛋白信号通路

Effect and potential mechanism of sodium ferulate on corneal endothelial dysfunction and CEC injury

SONG Hui, YAO Weihua, YU Chenxi, SHU Baiquan, LIU Yi, WEI Kang (Dept. of Ophthalmology, Huanggang Central Hospital, Hubei Huanggang 438000, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effect and potential mechanism of sodium ferulate (SF) on corneal endothelial dysfunction and corneal endothelial cell (CEC) injury. **METHODS** The male New Zealand rabbits were divided into control group, benzalkonium chloride (BAK) group and BAK+SF group, with 6 rabbits in each group. Except for control group, the other groups were given BAK into the anterior chamber to induce bullous keratopathy model, and BAK+SF group then given SF solution 200 mg/kg intraperitoneally the next day after surgery, twice a day, for consecutive 14 d. The transparency of corneal and edema of corneal stroma in each group of rabbits (before and on the 1st, 7th, and 14th day after surgery) were observed, and the corneal thickness (14th day after surgery) and intraocular pressure (1st to 14th day after surgery) were measured. On the 14th day after operation, the corneal endothelial structure was evaluated and the expressions of functionally related proteins [phalloidin, zonula occludens-1 (ZO-1), Na^+/K^+-ATPase, Ki67] were detected. On the 14th day after surgery, the corneal tissue was collected in BAK group, the primary rabbit CECs were isolated and cultured, and they were divided into blank group and SF groups with different mass concentrations. The cell viabilities after being cultured for different time, and the protein expressions of Ras homologous gene family A (RhoA), bone morphogenetic protein receptor 1A (BMPR1A) and BMRP2 were determined in each group. **RESULTS** Compared with BAK group, the transparency of corneal and edema of corneal stroma were gradually improved, and the corneal thickness was significantly decreased in BAK+SF group ($P<0.05$). The rabbit CECs in BAK+SF group were only damaged to zone B and showed a normal hexagonal endothelial cells structure. The protein expressions of phalloidin, ZO-1, Na^+/K^+-ATPase and Ki67 in BAK+SF group were significantly increased ($P<0.05$). When SF concentration was lower than and equal to 200 mg/L, it could promote the proliferation of rabbit CEC, in concentration manner ($P<0.05$) and time-dependent trend. SF at concentrations of 50, 100, and 200 mg/L could up-regulate the protein expressions of RhoA, BMPR1A and BMPR2 in concentration-dependent manner ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** SF can improve the transparency of corneal and edema of corneal stroma in bullous keratopathy model rabbits, reduce corneal thickness, maintain the integrity of corneal endothelium structure, and promote the recovery of corneal endothelial function; this compound can promote the proliferation of CEC, the mechanism of which may be related to the activation of RhoA-ROCK-BMP pathway.

KEYWORDS　sodium ferulate; corneal endothelial cells; bullous keratopathy; RhoA-ROCK-BMP pathway

Δ**基金项目**　湖北省卫生计生科研项目(No.WJ2020F087)

＊**第一作者**　主治医师。研究方向:玻璃体视网膜疾病。E-mail:songhui8264@163.com

角膜的内层被六边形的角膜内皮细胞（corneal endothelial cell，CEC）覆盖，CEC在角膜基质和房水之间形成一道物理屏障，并将房水从基质泵入前房[1]。除衰老外，糖尿病、慢性阻塞性肺疾病等全身性疾病，假性剥脱综合征、干眼症、Fuchs角膜内皮营养不良等局部眼部疾病，以及白内障超声乳化术、激光晶状体囊切开术等眼部手术都有可能造成CEC丢失，一旦内皮细胞密度（endothelial cell density，ECD）低于临界点，基质便会出现水肿甚至导致视力丧失[2]。由于CEC在体内的增殖能力有限，故目前尚无可提高角膜内皮疾病患者ECD的有效手段。近期研究显示，预防性局部应用阿魏酸钠（sodium ferulate，SF）可改善利多卡因麻醉诱导的猫眼角膜内皮损伤和炎症反应[3]。SF是阿魏酸的钠盐，可通过清除活性氧簇和上调细胞保护系统活性来增强细胞应激反应，属于一种强效抗氧化剂[4]；此外，SF可抑制Rho激酶（Rho-associated protein kinase，ROCK）等酶的激活和/或表达[5]。有研究证实，ROCK抑制剂ripasudil可在低ECD患者的白内障手术中发挥较好的角膜内皮保护作用[6]。基于此，本课题组推测SF可能有助于在眼部手术期间保护患者的角膜内皮。本研究拟初步探讨SF对大泡性角膜病变模型兔角膜内皮损伤的改善作用及对CEC增殖的促进作用，并探究其潜在机制，以期为CEC的修复提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Ⅸ71型荧光显微镜（日本Olympus公司）、Tanon 5200型化学发光成像仪（美国PerkinElmer公司）、SRBM-17型相差显微镜（日本Nikon公司）、ST-2201型裂隙灯（苏州康捷医疗股份有限公司）、SLM-6H（B）型眼前节照相系统（上海涵飞医疗器械有限公司）、AccuPen型手持眼压仪（美国ACCTOME公司）、SYNERGY-H1型多功能酶标仪（美国BioTek公司）、ArcScan Insight® 100型眼前节超声成像系统（广州宏达医疗设备有限公司）、LRHS-300-Ⅲ型加湿培养箱（广州沪瑞明仪器有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

注射用SF[批号0911207，规格0.1 g（以$C_{10}H_9NaO_4\cdot 2H_2O$计）]购自山东罗欣药业集团股份有限公司；苯扎氯铵（benzalkonium chloride，BAK）溶液[批号190509G05，规格150 mL∶0.15 g（0.10%）]购自广东洛斯特制药有限公司；左氧氟沙星滴眼液[批号CV2112，规格5 mL∶24.4 mg（按$C_{18}H_{20}FN_3O_4$计）]购自参天制药（中国）有限公司；DMEM高糖培养液购自上海善然生物科技有限公司；Opti-MEM培养液购自美国Invitrogen公司；茜素红染液购自美国MilliporeSigma公司；兔Ki67单克隆抗体（批号H300）、异硫氰酸荧光素（FITC）标记的山羊抗兔IgG二抗（批号SA1064）、4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）染液均购自美国Santa Cruz公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗小鼠IgG二抗（货号ab9882）购自南京沃博生物科技有限公司；兔抗人骨形成蛋白受体1A（bone morphogenetic protein receptor 1A，BMPR1A）、BMPR2多克隆抗体（货号分别为JN119、BY-K1012R）均购自北京百奥莱博科技有限公司；兔抗人鬼笔环肽单克隆抗体（货号abs47047480）购自上海爱必信生物科技有限公司；兔抗人钠钾ATP酶单克隆抗体（货号BJ-K6092）购自上海邦景实业有限公司；兔抗人胞质紧密连接蛋白1（zonula occludens-1，ZO-1）单克隆抗体（货号IMG-31199）、小鼠Ras同源基因家族A（Ras homologous gene family A，RhoA）单克隆抗体（货号ARH05）、小鼠抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）单克隆抗体（货号H00002597-Q01）、MTT试剂（货号10009591-1）均购自武汉艾美捷科技有限公司；T-PER试剂购自美国Pierce公司；FNC涂料混合物购自美国Biologicals公司；其余试剂均为分析纯或实验室常用规格，水为蒸馏水。

1.3 实验动物

SPF级健康雄性新西兰兔（2.0～2.5 kg）由北京科兴中维生物技术有限公司提供，动物使用许可证号为SYXK（京）2020-0054。所有动物均饲养于武汉大学基础医学院动物中心[室温为（22±2）℃，相对湿度为60%±5%，12 h明暗交替]。兔角膜的使用符合《ARVO关于眼科和视力研究中动物使用声明》要求，本方案由武汉大学基础医学院动物中心机构动物护理和使用委员会批准（序号DL2019-028）。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 动物模型的建立

通过吸入4%异氟醚溶液对兔进行麻醉，随后将0.05%BAK溶液0.1 mL注入其右眼前房，用该溶液冲洗前房30 min，再用0.9%氯化钠溶液和左氧氟沙星滴眼液冲洗90 s，每天1次。动物左眼不进行处理，作为对照。术后使用裂隙灯观察，每周检查1次，若出现角膜混浊、角膜水肿、角膜增厚超过正常厚度的3倍、前房积血、眼部感染、青光眼或其他并发症状，表明大泡性角膜病变兔模型复制成功[7]。

2.1.2 动物分组与给药

将新西兰兔分为对照组、BAK组和BAK+SF组，每组6只。BAK组和BAK+SF组兔按“2.1.1”项下方法复制大泡性角膜病变模型，BAK+SF组于次日腹腔注射SF溶液200 mg/kg（以DMEM高糖培养液为溶剂，剂量参考预实验结果和Tsai等[8]、Chen等[9]研究设置），每天2次，连续14 d；对照组兔不予任何处理。

2.1.3 兔角膜状态评估

分别于术前（第0天）及术后第1、7、14天利用眼前节照相系统和裂隙灯观察各组兔的角膜透明度和基质

水肿情况；于术后第14天使用眼前节超声成像系统测量其角膜厚度；于术后第1天起，每天使用手持眼压仪测量其眼内压。上述检查均在麻醉后进行。

2.1.4　兔角膜内皮结构观察及功能相关蛋白表达检测

于术后第14天，以心内注射过量戊巴比妥钠（85 mg/kg）处死各组兔，立即取下其角膜组织并保存于含Opti-MEM培养液50 mL的试管中。取各组兔一部分角膜组织，内皮面朝上放置，以1%茜素红染液染色3 min，使用相差显微镜观察角膜内皮结构。另取BAK组和BAK+SF组兔剩余角膜内皮组织，采用免疫荧光染色法检测鬼笔环肽、ZO-1、钠钾ATP酶、Ki67蛋白的表达情况：角膜内皮组织以－10 ℃预冷的甲醇固定后，在室温下用1%胎牛血清白蛋白封闭1 h，随后加入鬼笔环肽、ZO-1、钠钾ATP酶、Ki67一抗（稀释比例分别为1∶500、1∶400、1∶500、1∶1 000），孵育60 min；洗涤后，在避光、室温条件下加入FITC标记的IgG二抗（稀释比例为1∶200），孵育45 min；洗涤后，用1.5 mg/mL的DAPI染液复染10 min。使用荧光显微镜于激发波长450～520 nm下捕获图像，并使用Image J 1.48软件检测荧光强度，用以表示鬼笔环肽、ZO-1、钠钾ATP酶、Ki67蛋白的表达情况。

2.2　体外实验

2.2.1　原代兔CEC培养、分组与给药

术后第14天，取BAK组兔的角膜、巩膜组织，置于Optisol液中于4 ℃下保存。剥取角膜内皮并用胶原酶消化，离心收集兔CEC聚集物，以兔CEC培养液（含10%胎牛血清、10 ng/mL碱性成纤维细胞生长因子、25 μg/mL庆大霉素、1.25 μg/mL两性霉素B的Opti-MEM培养液）重悬并接种至涂有FNC的24孔板中，在37 ℃、5%CO_2条件下培养。待原代兔CEC贴壁24 h后，将细胞分为空白组和SF组，SF组兔CEC用不同质量浓度的SF溶液（25、50、100、200、400、800 mg/L，质量浓度参考Jiang等[3]研究设置）处理，空白组仅加入等体积的兔CEC培养液。

2.2.2　兔CEC活力检测

采用MTT法进行检测。取对数生长期的原代兔CEC，以每孔1×10^4个接种至96孔细胞板中，按“2.2.1”项下方法分组、给药、培养，每组设6个复孔。于培养48 h时，加入MTT试剂37 μL孵育4 h；加入二甲基亚砜100 μL，使用多功能酶标仪于590 nm波长下检测各孔的光密度（optical density，OD）值，用以表示细胞活力。细胞以同法接种并分为空白组和不同质量浓度SF组（50、100、200 mg/L），每组设6个复孔。分别于培养12、24、48、72、96 h时，同法检测各孔的OD值，用以表示细胞活力。

2.2.3　兔CEC中RhoA、BMPR1A、BMPR2蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取对数生长期的原代兔CEC，以每孔1×10^4个接种至96孔细胞板中，按“2.2.1”项下方法分组、给药、培养，每组设6个复孔。于培养72 h时，将细胞与含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合物的T-PER试剂充分混合，冰浴15 min后离心，吸取上清液。以BCA法测定蛋白浓度后使蛋白变性。取变性蛋白样品适量，经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至聚偏二氟乙烯膜上，用5%脱脂奶粉封闭1 h，加入RhoA、BMPR1A、BMPR2、GAPDH一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；洗膜后，加入HRP标记的IgG二抗（稀释比例为1∶5 000），室温孵育1 h；洗膜后，以化学发光试剂显色，使用化学发光成像仪成像并使用Quantity One软件分析蛋白条带的灰度值，以目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）的灰度值比值作为目的蛋白的表达水平。

2.3　统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用方差分析和事后Duncan's多重检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　体内实验结果

3.1.1　SF对兔角膜状态的影响

实验期间，对照组兔的角膜基质未出现浑浊及水肿，眼内压正常，角膜状态良好（图略）。BAK组兔的角膜透明度逐渐降低，基质水肿程度逐渐加重，角膜厚度逐渐增加（$P<0.05$），提示大泡性角膜病变模型制备成功。与BAK组比较，BAK+SF组兔的角膜透明度和基质水肿情况均有所好转（图1A、图1B），且角膜厚度显著减小（$P<0.05$，表1）；3组兔的眼内压基本维持在10～20 mmHg（1 mmHg＝0.133 kPa）的正常范围内，组间比较差异均无统计学意义（$P>0.05$，图1C）。

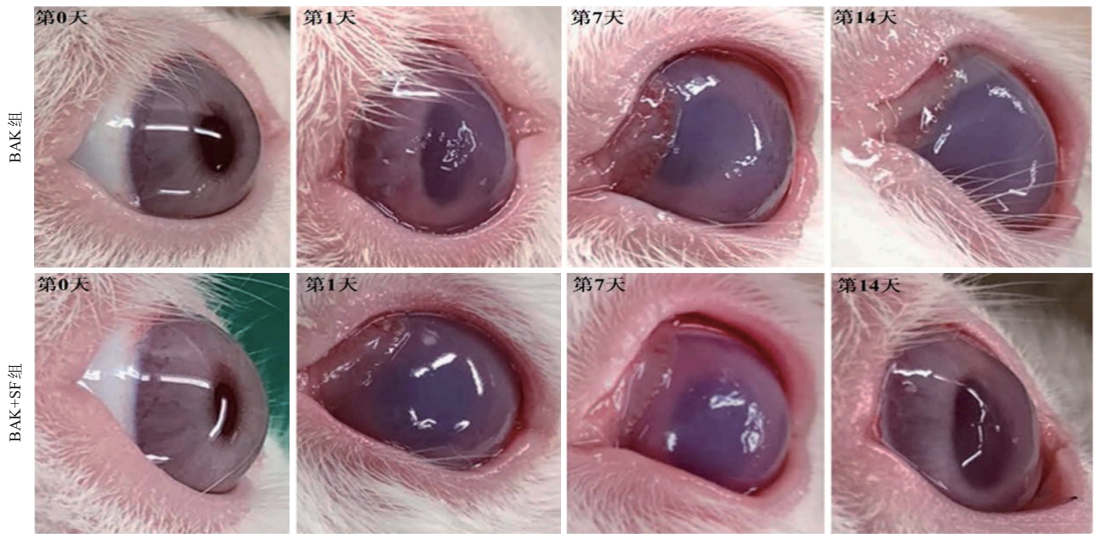
3.1.2　SF对兔角膜内皮结构及功能相关蛋白表达的影响

茜素红染色实验结果显示，BAK组兔角膜内皮缺失，CEC已缺损至C区并表现出不规则的细胞形态；相反，BAK+SF组兔CEC仅缺损至B区并表现为正常的六边形内皮细胞结构（图2A）。免疫荧光染色实验结果显示，与BAK组比较，BAK+SF组兔角膜内皮组织中鬼笔环肽、ZO-1、钠钾ATP酶、Ki67蛋白的表达均显著升高（$P<0.05$，图2B、图2C）。

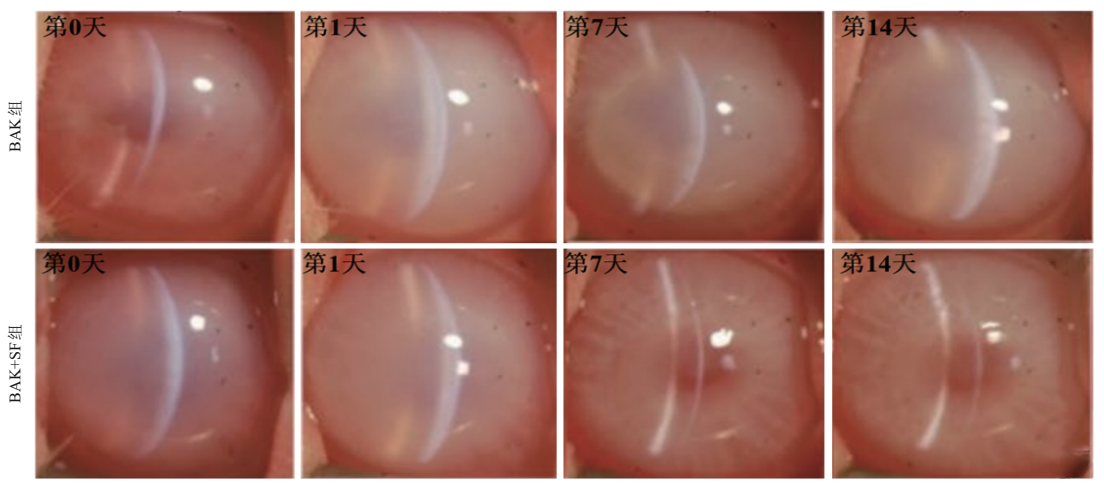
3.2　体外实验结果

3.2.1　SF对兔CEC活力的影响

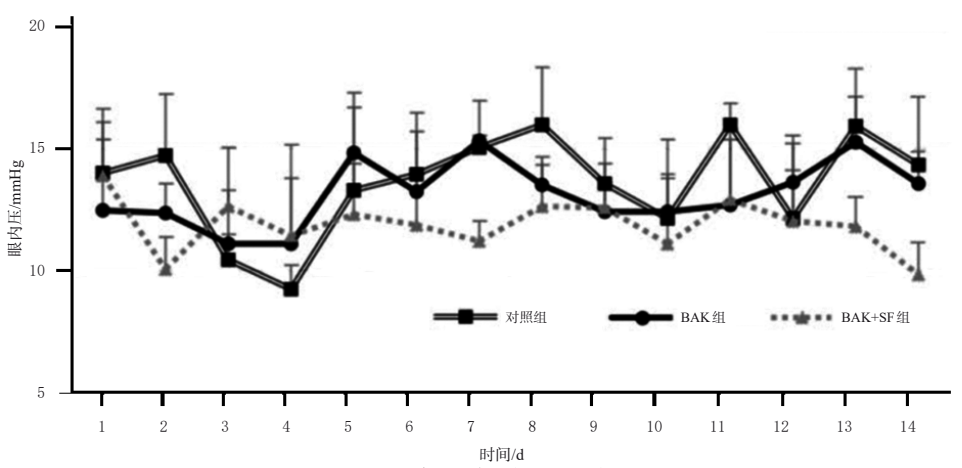
培养48 h且当SF质量浓度≤200 mg/L时，SF对兔CEC的增殖有一定的促进作用，SF 200 mg/L组细胞的OD值显著高于空白组（$P<0.05$，图3A）。进一步实验结果显示，与空白组比较，SF 200 mg/L组细胞的OD值（培养48、72、96 h时）和SF 100 mg/L组细胞的OD值（培养72、96 h时）均显著升高，且具有浓度依赖性（$P<0.05$）和时间依赖趋势（图3B）。



A.角膜透明度(全反射照明的斜视图)



B.基质水肿(裂隙灯观察图)



C.术后眼内压($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

图1　SF对兔角膜透明度、基质水肿和眼内压的影响

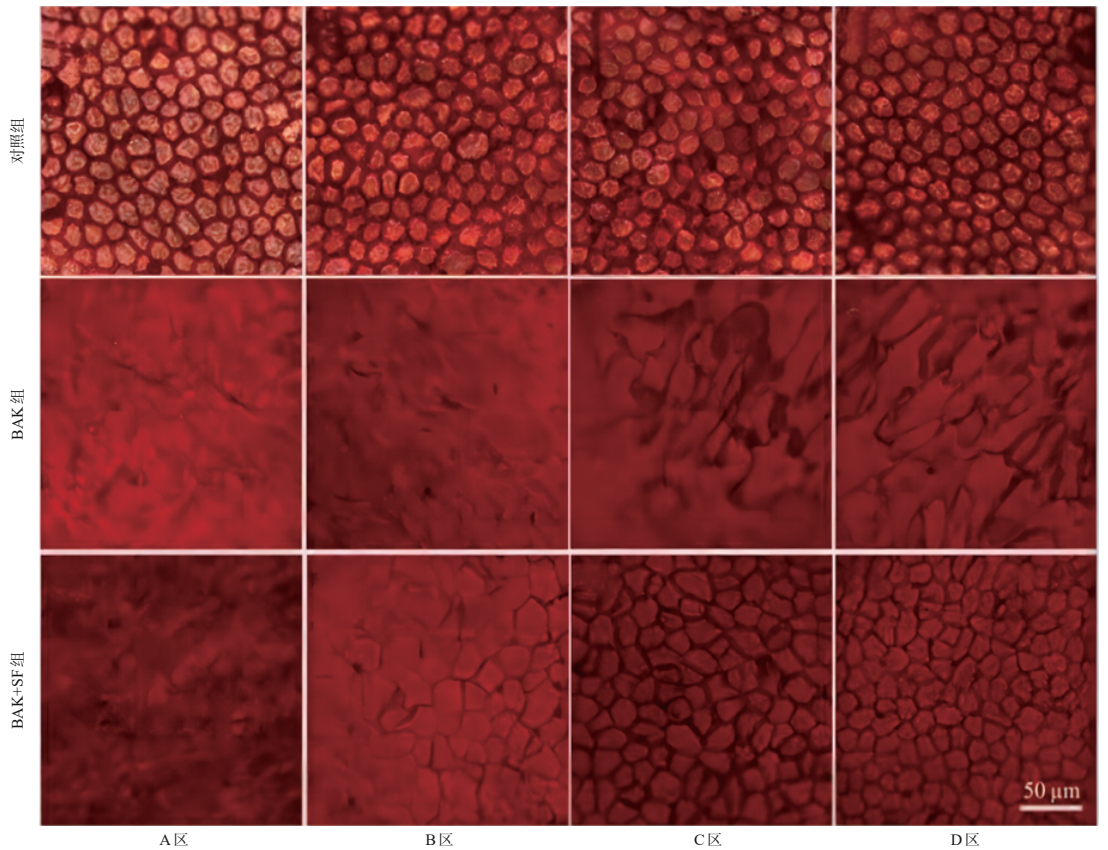
表1　SF对兔角膜厚度的影响($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	A区	B区	C区	D区
对照组	365.7±4.5	365.39±9.9	359.3±2.5	351.3±4.0
BAK组	–	–	–	602.2±46.8[a]
BAK+SF组	–	–	855.0±97.2[a]	438.8±76.0[ab]

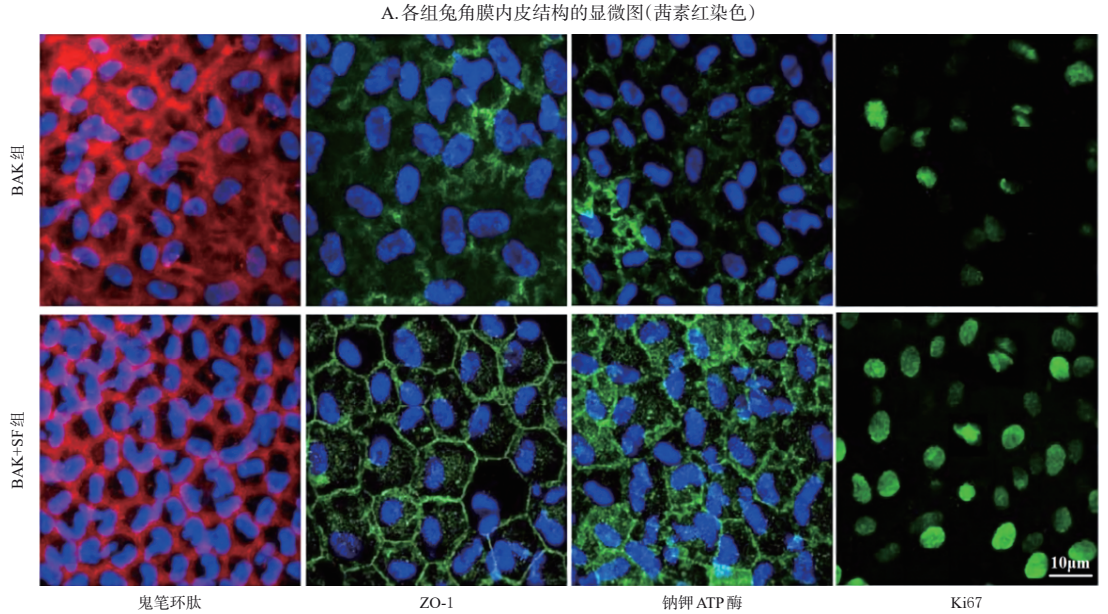
–:不可测量;a:与对照组比较,$P<0.05$;b:与BAK组比较,$P<0.05$。

3.2.2　SF对兔CEC中RhoA、BMPR1A、BMPR2蛋白表达的影响

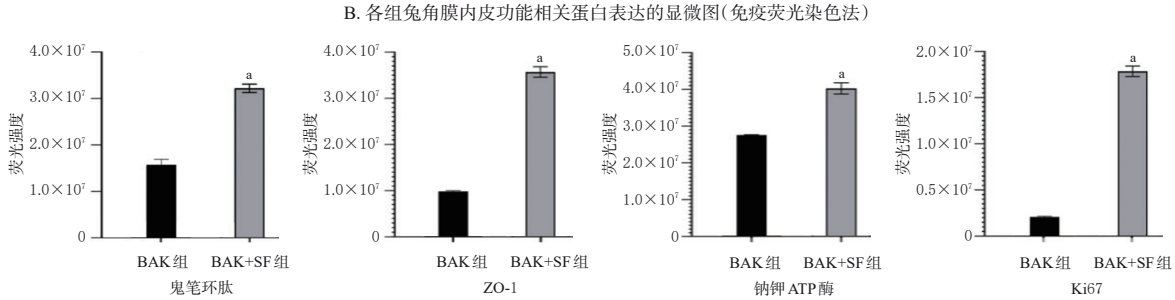
与空白组比较,各药物组兔CEC中RhoA、BMPR1A、BMPR2蛋白的表达水平均显著升高,且具有浓度依赖性($P<0.05$,图4)。



A. 各组兔角膜内皮结构的显微图（茜素红染色）



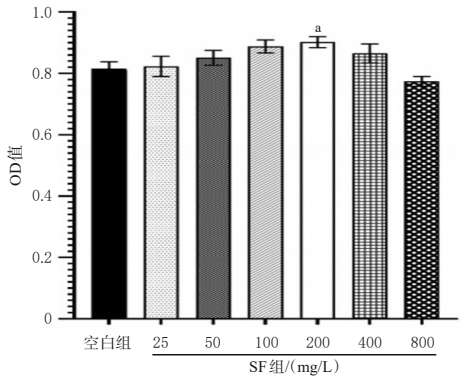
B. 各组兔角膜内皮功能相关蛋白表达的显微图（免疫荧光染色法）



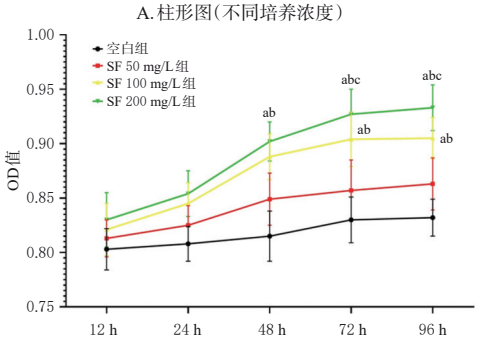
C. 各组兔角膜内皮功能相关蛋白表达的柱形图（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

a：与BAK组比较，$P<0.05$。

图2　SF对兔角膜内皮结构及功能相关蛋白表达的影响



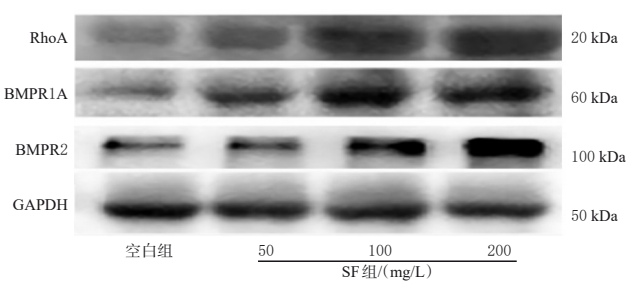
A.柱形图(不同培养浓度)



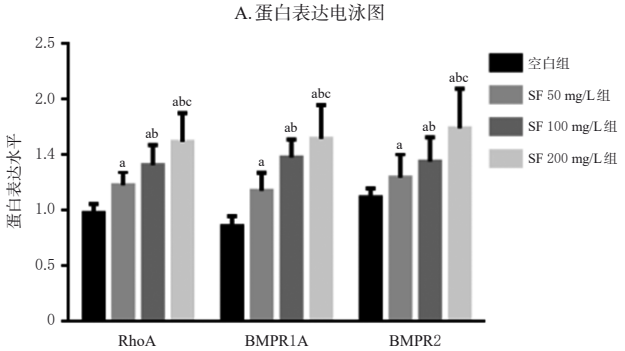
B.折线图(不同培养浓度和不同培养时间)

a:与空白组比较,$P<0.05$;b:与SF 50 mg/L组比较,$P<0.05$;c:与SF 100 mg/L组比较,$P<0.05$。

图3　SF对兔CEC活力的影响($\bar{x}\pm s$,$n=6$)



A.蛋白表达电泳图



B.蛋白表达柱形图($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

a:与空白组比较,$P<0.05$;b:与SF 50 mg/L组比较,$P<0.05$;c:与SF 100 mg/L组比较,$P<0.05$。

图4　SF对兔CEC中RhoA、BMPR1A、BMPR2蛋白表达的影响

4　讨论

退行性眼病和眼内手术均可导致CEC丢失,进而使得ECD下降[2]。除角膜移植可增加ECD外,ROCK抑制剂干预是促进大泡性角膜冷冻后伤口愈合的有效手段之一[10—11]。此外,最近有报道称,负载阿魏酸的纳米凝胶可提高眼表抗氧化水平,促进成纤维细胞生长,有利于受损角膜伤口闭合[8,12]。SF(3-甲氧基-4-羟基-肉桂酸钠)是阿魏酸的钠盐,是一种新型的非肽内皮素受体拮抗药,具有比阿魏酸更高的溶解度和更低的毒性,是可用于临床的药物[4]。临床研究表明,SF可通过激活抗炎系统、增强抗凝调节、增加一氧化氮合成和防止脂质过氧化损伤来促进微循环;该成分还具有一定的抗氧化特性,可参与氧化应激致相关眼病的治疗[13—14]。陈丽华等[15]证实,0.025%和0.1%的SF均可明显抑制角膜新生血管,并促使角膜上皮基底细胞血管内皮因子表达下调,从而有效抑制角膜新生血管的生长;另外,郑姣等[16]研究发现,经SF干预后,氧诱导视网膜病变(oxygen induced retinopathy,OIR)小鼠的视网膜组织血管增生、闭塞、细胞凋亡等均有明显改善,且随着SF浓度的升高,其改善效果越好,表明SF可通过减少细胞凋亡来改善OIR小鼠的视网膜血管生成,进而减轻其视力损伤。这些报道证实了SF在眼病治疗中的重要作用,然而其是否对角膜内皮有类似的保护作用,仍需进一步探讨。

ECD下降是导致角膜内皮功能障碍后视力丧失的主要原因之一。研究发现,当ECD低于500个/mm^{2}时,角膜生理将恶化,从而引发大泡性角膜病变和角膜内皮功能障碍;当角膜内皮进一步损伤时,角膜会出现浑浊并影响视力,甚至造成失明[2]。本研究结果显示,SF可促使大泡性角膜病变模型兔角膜透明度和基质水肿情况好转,并使角膜厚度显著减小,这一结果与Jiang等[3]的研究结果基本一致。本研究结果还显示,BAK+SF组兔CEC从边缘区域(D区)逐渐恢复至中心区域(B区),且多呈六边形,表明SF对兔角膜CEC的生长具有促进作用。有研究指出,鬼笔环肽可结合并稳定纤维状肌动蛋白,可用以判断内皮细胞骨架微丝的变化情况[17];ZO-1可阻断水溶性物质通过,其表达与角膜内皮的屏障完整性密切相关;存在于角膜内皮基底外侧膜上的钠钾ATP酶可通过离子泵将多余的液体泵出基质,在维持角膜内皮透明度中具有重要作用[18];Ki67表达的提升与CEC增殖受到抑制有关[11]。可见,上述蛋白均与角膜内皮功能密切相关。免疫荧光染色实验结果显示,BAK+SF组兔角膜内皮组织中鬼笔环肽、ZO-1、钠钾ATP酶、Ki67蛋白的表达均较BAK组显著升高,提示SF有助于促进兔角膜内皮功能的恢复。随后的MTT实验结果也证实,当SF的干预浓度≤200 mg/L时,该成分对兔CEC的增殖有一定的促进作用,且具有浓度依赖性和时间依赖趋势。

在再生医学领域,ROCK抑制剂可促进急性外科创伤的有效愈合,其对CEC的保护作用已被证实,该作用与促进增殖、增强黏附和抑制凋亡等有关[19—20]。RhoA属于Rho鸟苷三磷酸酶亚家族,在人体内普遍表达,可调节肌动蛋白骨架结构和细胞屏障功能,还可通过激活ROCK而影响细胞信号转导和细胞骨架调节[21]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)是转化生

长因子β超家族成员，在角膜内皮发育和稳态维持中发挥着重要作用。其中，BMP4及其受体BMPR1A、BMPR2在CEC中大量表达，可通过上皮-间充质和内皮-间充质转化而促进角膜内皮的发育和增殖，从而增加胶原蛋白和纤连蛋白的表达，最终促进角膜屏障的修复和愈合[22—23]。本研究结果显示，经不同质量浓度的SF处理后，兔CEC中RhoA蛋白的表达水平显著升高，表明SF可激活RhoA信号，促进RhoA-ROCK信号转导，这是解除有丝分裂阻滞和促进内皮细胞迁移、增殖所必需的[24]。同时本研究结果还显示，在SF作用下，兔CEC中BMPR1A、BMPR2蛋白的表达水平亦显著上调，提示经典的BMP通路被激活，初步证实了RhoA-ROCK-BMP信号通路在角膜内皮愈合过程中的重要价值。

综上所述，SF可改善大泡性角膜病变模型兔受损角膜的透明度，并可减轻基质水肿，减小角膜厚度，维持角膜内皮结构完整性并促进角膜内皮功能恢复；同时，该成分还可促进兔CEC的增殖，作用可能与激活RhoA-ROCK-BMP信号通路有关。

参考文献

[1] PRICE M O, MEHTA J S, JURKUNAS U V, et al. Corneal endothelial dysfunction: evolving understanding and treatment options[J]. Prog Retin Eye Res, 2021, 82: 100904.

[2] KIM Y J, KIM T G. The effects of type 2 diabetes mellitus on the corneal endothelium and central corneal thickness [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 8324.

[3] JIANG G J, FAN T J. Sodium ferulate attenuates lidocaine-induced corneal endothelial impairment[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 4967318.

[4] 张欣，高增平. 阿魏酸的研究进展[J]. 中国现代中药，2020，22(1)：138-147.

[5] WEI Z H, XUE Y R, XUE Y C, et al. Ferulic acid attenuates non-alcoholic steatohepatitis by reducing oxidative stress and inflammation through inhibition of the ROCK/NF-κB signaling pathways[J]. J Pharmacol Sci, 2021, 147(1): 72-80.

[6] ANTONINI M, COASSIN M, GAUDENZI D, et al. Rho-associated kinase inhibitor eye drops in challenging cataract surgery[J]. Am J Ophthalmol Case Rep, 2022, 25: 101245.

[7] WANG M M. Effect of glyceraldehyde cross-linking on a rabbit bullous keratopathy model[J]. J Ophthalmol, 2015, 2015: 171690.

[8] TSAI C Y, WOUNG L C, YEN J C, et al. Thermosensitive chitosan-based hydrogels for sustained release of ferulic acid on corneal wound healing[J]. Carbohydr Polym, 2016, 135: 308-315.

[9] CHEN H C, CHEN Z Y, WANG T J, et al. Herbal supplement in a buffer for dry eye syndrome treatment[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(8): 1697.

[10] WONGVISAVAVIT R, PAREKH M, AHMAD S, et al. Challenges in corneal endothelial cell culture[J]. Regen Med, 2021, 16(9): 871-891.

[11] KIM K W, SHIN Y J, LEE S C S. Novel ROCK inhibitors, sovesudil and PHP-0961, enhance proliferation, adhesion and migration of corneal endothelial cells[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 14690.

[12] GRIMAUDO M A, AMATO G, CARBONE C, et al. Micelle-nanogel platform for ferulic acid ocular delivery [J]. Int J Pharm, 2020, 576: 118986.

[13] 张国治，杨徐宁，许柠. 阿魏酸的功能性研究进展[J]. 粮食加工，2019，44(6)：52-56.

[14] LUO M, LIN H C, WEN Z Q, et al. Sodium ferulate inhibits rat cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin Ⅱ through enhancement of endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2022, 80(2): 251-260.

[15] 陈丽华，江萍，罗彤，等. 阿魏酸钠对大鼠角膜新生血管的抑制作用研究[J]. 眼科研究，2008，26(7)：526-529.

[16] 郑姣，罗新辉，穆歌，等. 阿魏酸钠对氧诱导视网膜病变小鼠肺组织损伤的影响[J]. 遵义医科大学学报，2022，45(6)：754-760.

[17] JEANG L, CHA B J, BIRK D E, et al. Endothelial-stromal communication in murine and human corneas[J]. Anat Rec, 2020, 303(6): 1717-1726.

[18] SUNDARESAN Y, GAIKWAD G G, PRAJAPATI K A, et al. Comparison of structural integrity and functional status of corneal endothelium stored in Cornisol and Optisol-GS[J]. Indian J Ophthalmol, 2019, 67(10): 1579-1584.

[19] 朱娉，姜志昕，郝朋，等. ROCK抑制剂Y-27632在体外培养的兔角膜内皮细胞紫外线损伤修复中的作用[J]. 眼科新进展，2021，41(3)：201-205.

[20] SYED Z A, RAPUANO C J. Rho kinase (ROCK) inhibitors in the management of corneal endothelial disease[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2021, 32(3): 268-274.

[21] CHOI E K, KIM J G, KIM H J, et al. Regulation of RhoA GTPase and novel target proteins for ROCK[J]. Small GTPases, 2020, 11(2): 95-102.

[22] HATOU S, SHIMMURA S. Review: corneal endothelial cell derivation methods from ES/iPS cells[J]. Inflamm Regen, 2019, 39: 19.

[23] SŁONIECKA M, DANIELSON P. Substance P induces fibrotic changes through activation of the RhoA/ROCK pathway in an *in vitro* human corneal fibrosis model[J]. J Mol Med, 2019, 97(10): 1477-1489.

[24] ZHU L P, WANG W J, XIE T H, et al. TGR5 receptor activation attenuates diabetic retinopathy through suppression of RhoA/ROCK signaling[J]. FASEB J, 2020, 34(3): 4189-4203.

（收稿日期：2022-12-20　修回日期：2023-05-31）

（编辑：张元媛）