虎杖苷对干眼症大鼠炎症反应的影响及机制Δ

赵丽琼[1*]，魏瑞华[2#]（1.天津医科大学眼科医院/眼视光学院/眼科研究所/国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心天津市分中心/天津市视网膜功能与疾病重点实验室视光中心，天津 300384；2.天津医科大学眼科医院/眼视光学院/眼科研究所/国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心天津市分中心/天津市视网膜功能与疾病重点实验室屈光角膜科，天津 300384）

中图分类号 R965　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408(2024)18-2213-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.18.05

摘　要　目的 基于蛋白激酶A（PKA）/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白（CREB）信号通路，探讨虎杖苷（PD）对干眼症（DED）大鼠炎症反应的影响及潜在机制。**方法** 将雄性SD大鼠随机分为空白对照组（Normal组）、模型组（单纯DED组）、0.05%PD组、0.5%PD组和0.5%PD+PKA抑制剂H-89组（0.5%PD+H-89组），每组15只。除Normal组外，其余各组大鼠通过眼球表面注射氢溴酸东莨菪碱12.5 mg/d的方式制备DED模型；与此同时，各药物组给予相应药液（0.5%、0.05%的PD，滴眼，每天3次；1 mg/kg的H-89，腹腔注射，每天1次），共7 d。检测各组大鼠的泪液分泌量、角膜荧光素染色评分和结膜组织杯状细胞密度，观察其角膜组织病理变化，检测其角膜组织中炎症因子（肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β、白细胞介素6）水平和PKA/CREB信号通路相关蛋白的表达情况。**结果** 与Normal组比较，单纯DED组大鼠角膜组织上皮层增厚，基质层细胞排列紊乱、疏松且部分缺失，核间距较大，有大量炎症细胞浸润；泪液分泌量、结膜组织杯状细胞密度和PKA、CREB蛋白的磷酸化水平均显著降低，角膜荧光素染色评分和角膜组织中炎症因子水平均显著升高（$P<0.05$）。与单纯DED组比较，0.05%PD、0.5%PD组大鼠的角膜组织病理损伤有所缓解，各定量指标均显著改善，且0.5%PD组的改善效果更优（$P<0.05$）；而H-89可显著逆转PD对各指标的改善作用（$P<0.05$）。**结论** PD可增加DED大鼠的泪液分泌量和结膜组织杯状细胞密度，减轻其角膜组织炎症反应和病理损伤，上述作用与激活PKA/CREB信号通路有关。

关键词　虎杖苷；干眼症；炎症反应；PKA/CREB信号通路

Effects of polydatin on inflammatory response in dry eye disease rats and its mechanism

ZHAO Liqiong[1], WEI Ruihua[2] (1. Optometry Center, Tianjin Medical University Eye Hospital/School of Optometry/Eye Institute/Tianjin Branch of National Clinical Research Center for Eye, Ear, Nose and Throat Diseases/Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin 300384, China; 2. Dept. of Refractive Keratology, Tianjin Medical University Eye Hospital/School of Optometry/Eye Institute/Tianjin Branch of National Clinical Research Center for Eye, Ear, Nose and Throat Diseases/Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin 300384, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of polydatin (PD) on the inflammatory response in dry eye disease (DED) rats and its potential mechanism based on protein kinase A (PKA)/cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB) signaling pathway. **METHODS** Male SD rats were randomly divided into blank control group (normal group), model group (simple DED group), 0.05%PD group, 0.5%PD group and 0.5%PD+PKA inhibitor H-89 group (0.5%PD+H-89 group), with 15 rats in each group. Except for the normal group, the rats in other groups were prepared with a DED model by injecting scopolamine hydrobromide 12.5 mg/d onto the surface of eyeball. At the same time, each drug group was given corresponding liquid medicine (0.5% or 0.05% PD, eye drip, 3 times a day; 1 mg/kg H-89, intraperitoneal injection, once a day) for 7 d in total. The tear secretion, corneal fluorescein staining score and conjunctival goblet cell density of rats were detected in each group; the pathological changes of corneal tissues were observed, and the levels of inflammatory factors (tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, interleukin-6) and the expression of PKA/CREB signaling pathway-related proteins were detected in corneal tissues. **RESULTS** Compared with normal group,

Δ**基金项目** 国家自然科学基金项目（No.82070929）；天津市医学重点学科（专科）建设项目（No.TJYXZDXK-037A）

＊**第一作者** 医师，硕士。研究方向：眼表疾病及眼视光学。E-mail：zhaoliqiong001@126.com

＃**通信作者** 主任医师，博士。研究方向：眼表疾病及眼视光学。E-mail：rwei@tmu.edu.cn

the corneal epithelium of rats in the simple DED group was thickened, stromal layer cells were disordered and partially absent, nuclear spacing was larger, and a large number of inflammatory cells infiltrated; the tear secretion, conjunctival goblet cell density and the phosphorylation levels of PKA and CREB in corneal tissues were reduced significantly, while the corneal fluorescein staining score and the levels of inflammatory factors in corneal tissue were increased significantly ($P<0.05$). Compared with the simple DED group, the pathological injuries of corneal tissues of rats in 0.05%PD and 0.5%PD groups were alleviated, each quantitative index was significantly improved, and the improvement effect of 0.5%PD group was more obvious ($P<0.05$). H-89 could reverse the improvement effect of PD on each index significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** PD can increase tear secretion and the conjunctival goblet cell density, and reduce the inflammatory response and pathological injury of corneal tissue in DED rats. The above effects are related to the activation of PKA/CREB signaling pathway.

KEYWORDS polydatin; dry eye disease; inflammatory response; PKA/CREB signaling pathway

干眼症（dry eye disease，DED）是一种常见的泪腺、眼表、结膜组织疾病，由泪膜稳定性降低、角膜和结膜炎症反应加重、神经感觉异常所致，临床症状多样，以眼部不适、视力下降为主。DED的患病率逐年升高，现已成为备受关注的公共卫生问题[1]。该病的临床治疗主要包括手术干预、药物（如人工泪液、激素类滴眼液）治疗等，但上述方法均存在不同程度的风险和副作用[2]。目前，学者普遍认为，角膜、结膜炎症反应是DED发病的主要环节[3]。因此，寻找一种能够抑制炎症反应且副作用少的药物，对DED的临床治疗至关重要。

中医药因安全性高、作用广泛等特点而受到学者广泛关注。研究显示，中药及其提取物、单体（如杞菊地黄汤、石斛提取物、刺槐素等）对DED均有明显的治疗作用[4—6]。虎杖苷（polydatin，PD）来自中药虎杖，是一种天然的白藜芦醇苷类成分，具有抑制炎症和氧化反应、抗菌、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等作用[7]。Park等[8]研究发现，PD滴眼液能有效缓解DED大鼠的泪液减少、角膜不规则和损伤、泪膜破裂等病变，并可减轻结膜组织的氧化应激和炎症反应，但具体作用机制尚未阐明。有研究指出，当机体内环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）水平升高时，蛋白激酶A（protein kinase A，PKA）/cAMP反应元件结合蛋白（cAMP response element binding protein，CREB）信号通路会被激活，促炎性细胞因子的过度表达将被抑制，从而使DED大鼠的眼表炎症有所减轻，眼膜稳定性和角膜完整性得以恢复[9—10]。基于此，本研究以氢溴酸东莨菪碱（scopolamine hydrobromide，SCOP）诱导建立DED大鼠模型，基于PKA/CREB信号通路初步探究PD对DED大鼠炎症反应的影响及潜在机制，以期为DED的治疗提供新靶点和新药物。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ST-360型酶标仪（上海科华生物工程股份有限公司）、BX53型显微镜（日本Olympus公司）、SLM-7E型裂隙灯（北京九辰智能医疗设备有限公司）、Universal Hood Ⅲ型凝胶成像系统（美国BD公司）等。

1.2 主要药品与试剂

PD对照品（批号B20533，纯度≥98%）、SCOP对照品（批号S302239，纯度98%）均购自上海源叶生物科技有限公司；PKA抑制剂H-89的对照品（批号B1427，纯度≥98%）购自美国Sigma-Aldrich公司；荧光素钠试纸（批号202203045）购自南京凯基生物科技发展有限公司；过碘酸希夫染色（periodic acid-Schiff staining，PAS）试剂、苏木精-伊红（HE）染色试剂盒（批号分别为BSBA-4080A、BSBA-4021）均购自北京中杉金桥生物技术有限公司；白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、IL-6酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒和BCA蛋白定量试剂盒（批号分别为PI303、PT516、PI328、P0010S）均购自上海碧云天生物技术有限公司；兔源PKA、CREB、磷酸化PKA（phosphorylated PKA，p-PKA）、磷酸化CREB（phosphorylated CREB，p-CREB）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）多克隆抗体及辣根过氧化酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号分别为12232-1-AP、12208-1-AP、29314-AP、28792-1-AP、10494-1-AP、SA00001-2）均购自美国Proteintech公司。

1.3 实验动物

本研究所用实验动物为清洁级SD大鼠，共75只，雄性，体重180～200 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2021-0006。所有大鼠均饲养于温度20～23 ℃、相对湿度50%～60%、每12 h明暗循环的动物房内，自由摄食、饮水。本研究方案经天津医科大学眼科医院医学伦理委员会批准（伦理批准号2023-185）。

2 方法

2.1 DED模型的制备与分组

将适应性喂养1周的75只SD大鼠按随机数字表法分为空白对照组（Normal组）、模型组（单纯DED组）、0.05%PD组、0.5%PD组和0.5%PD+PKA抑制剂H-89组（0.5%PD+H-89组），每组15只。除Normal组外，其余各组大鼠均采用眼球表面注射SCOP 12.5 mg/d的方式制备DED模型，每天注射4次（分别为上午9、12时和下午3、6时注射），每只眼睛5 μL，连续注射7 d[5]。在造模期间，保持动物房内空气流通并维持相对湿度为50%～60%。若检测到造模大鼠的泪液分泌量减少、结膜组织杯状细胞密度降低、角膜荧光染色增多（具体检测方法见后文），则表明模型复制成功。

2.2 给药

在注射SCOP的同时（每天上午9、12时和下午3时），0.05%PD组、0.5%PD组大鼠分别以0.05%、0.5%的PD（用生理盐水为溶剂）滴眼，每天3次（每天上午9、12时，每只眼睛5 μL；下午3时，每只眼睛10 μL）+腹腔注射生理盐水（体积同H-89），每天1次，共7 d[8]；0.5%PD+H-89组大鼠同法以0.5%的PD滴眼，每天3次+腹腔注射H-89（以生理盐水为溶剂）1 mg/kg，每天1次，共7 d[9]。Normal组和单纯DED组大鼠同法以生理盐水滴眼+腹腔注射同体积生理盐水，共7 d。

2.3 大鼠泪液分泌量检测

末次给药后，采用泪腺分泌实验检测各组大鼠的泪液分泌量。将经酚红浸润的棉线放置在距离大鼠外眼角约1/3处的下穹隆内，60 s后拔出，记录棉线红色部分的长度（mm），以此表示大鼠的泪液分泌量。

2.4 大鼠角膜组织上皮损伤情况评估

采用荧光素染色法检测。泪液分泌实验结束后，将荧光素钠试纸用生理盐水浸湿，备用。随机选取每组5只大鼠，用试纸尖端轻触其下眼睑内侧并停留片刻，在3次手动眨眼后于裂隙灯钴蓝光下观察大鼠角膜的染色情况。将其每个角膜分为4个象限，采用4点评分法对每个象限的角膜组织上皮损伤情况进行评分，具体标准为：绿色染色缺失，记0分；绿色染色呈点状且分散，记1分；绿色染色为成群点状，记2分；绿色染色呈片状，记3分；4个象限的得分总和即为大鼠角膜荧光素染色评分，评分越高，表明角膜组织上皮损伤越严重[11]。

2.5 大鼠结膜组织杯状细胞密度检测

采用PAS法检测。角膜组织上皮损伤情况评估完成后，将所有大鼠脱颈椎处死，取其结膜组织适量，于4%多聚甲醛中固定48 h后，行常规石蜡包埋、连续切片，制备结膜组织切片。经PAS后，在显微镜下观察大鼠结膜组织杯状细胞的形态并拍照，计算各组大鼠结膜组织杯状细胞的密度（即每100 μm^2结膜组织内杯状细胞的个数）。

2.6 大鼠角膜组织病理损伤观察

采用HE染色法观察。选取每组另5只大鼠的角膜组织适量，于4%多聚甲醛中固定48 h后，行常规石蜡包埋、连续切片，制备角膜组织切片。经HE染色后，在显微镜下观察大鼠角膜组织的病理损伤情况并拍照。每组剩余5只大鼠的角膜组织于－80 ℃下冻存，备用。

2.7 大鼠角膜组织中炎症因子水平检测

采用ELISA法检测。取“2.6”项下冻存的各组大鼠角膜组织适量，加入生理盐水研磨，制备组织悬液。离心后取上清液，根据相应试剂盒说明书方法，使用酶标仪检测大鼠角膜组织中IL-1β、TNF-α、IL-6的水平。

2.8 大鼠角膜组织中通路相关蛋白表达情况检测

采用Western blot法检测。取“2.6”项下冻存的各组大鼠角膜组织适量，采用RIPA蛋白裂解液提取其角膜总蛋白，经BCA法测定蛋白浓度后进行变性处理。取变性蛋白适量，进行凝胶电泳分离后以湿转法转移至聚偏二氟乙烯膜上，用脱脂奶粉封闭；加入PKA、CREB、p-PKA、p-CREB、GAPDH一抗（稀释比例均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；再加入相应二抗（稀释比例为1∶5 000），于室温下孵育2 h；然后滴加ECL试剂显影，使用凝胶成像系统采集图像，以目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）的条带灰度值比值表示各目的蛋白的表达水平，以p-PKA与PKA、p-CREB与CREB蛋白的表达水平比值表示PKA、CREB蛋白的磷酸化水平。

2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 7.0软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x} \pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 PD对DED大鼠泪液分泌量的影响

与Normal组比较，单纯DED组大鼠的泪液分泌量显著减少（$P<0.05$）。与单纯DED组比较，0.05%PD组、0.5%PD组大鼠的泪液分泌量均显著增加，且0.5%PD组显著多于0.05%PD组（$P<0.05$）。与0.5%PD组比较，0.5%PD+H-89组大鼠的泪液分泌量显著减少（$P<0.05$）。结果见表1。

表1　各组大鼠泪液分泌量、角膜荧光素染色评分和结膜组织杯状细胞密度比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	泪液分泌量（n=15）/mm	角膜荧光素染色评分（n=5）/分	杯状细胞密度（n=15）/（个/100 μm²）
Normal组	8.43±1.20	0.24±0.08	85.74±10.45
单纯DED组	3.56±0.77[a]	10.35±1.04[a]	31.40±6.38[a]
0.05%PD组	5.86±0.94[b]	6.36±0.76[b]	54.37±6.12[b]
0.5%PD组	7.92±1.32[bc]	3.04±0.49[bc]	79.65±8.42[bc]
0.5%PD+H-89组	5.37±0.85[d]	6.82±0.88[d]	50.11±5.69[d]

a：与Normal组比较，P<0.05；b：与单纯DED组比较，P<0.05；c：与0.05%PD组比较，P<0.05；d：与0.5%PD组比较，P<0.05。

3.2　PD对DED大鼠角膜组织上皮损伤的影响

与Normal组比较，单纯DED组大鼠角膜组织中的绿色荧光明显增多，其角膜荧光素染色评分显著升高（P<0.05）。与单纯DED组比较，0.05%PD组、0.5%PD组大鼠角膜组织中的绿色荧光均有所减少，其角膜荧光素染色评分均显著降低，且0.5%PD组显著低于0.05%PD组（P<0.05）。与0.5%PD组比较，0.5%PD+H-89组大鼠角膜组织中的绿色荧光明显增多，其角膜荧光素染色评分显著升高（P<0.05）。结果见表1、图1。

3.3　PD对DED大鼠结膜组织杯状细胞密度的影响

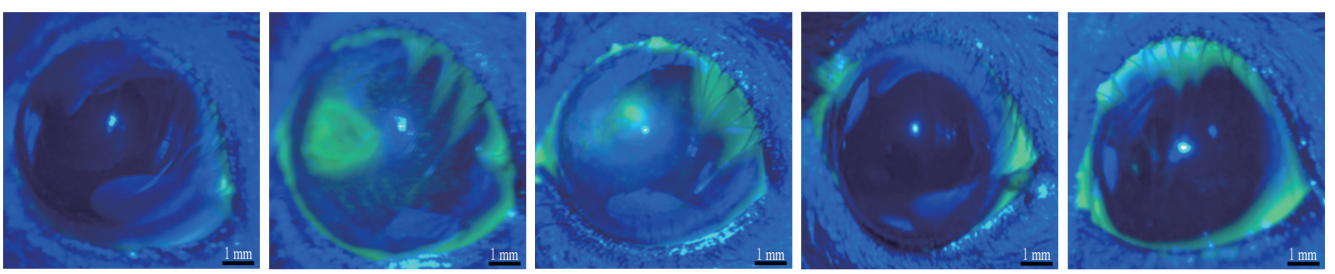
与Normal组比较，单纯DED组大鼠的结膜组织杯状细胞密度显著降低（P<0.05）。与单纯DED组比较，0.05%PD组、0.5%PD组大鼠的结膜组织杯状细胞密度均显著升高，且0.5%PD组显著高于0.05%PD组（P<0.05）。与0.5%PD组比较，0.5%PD+H-89组大鼠的结膜组织杯状细胞密度显著降低（P<0.05）。结果见表1、图2。

3.4　PD对DED大鼠角膜组织病理损伤的影响

Normal组大鼠角膜组织上皮细胞发育良好，基质层细胞排列紧密、形态正常，未见明显病变。与Normal组比较，单纯DED组大鼠角膜组织上皮层增厚，基质层细胞排列紊乱、疏松且部分缺失，核间距较大，有大量炎症细胞浸润。与单纯DED组比较，0.05%PD组、0.5%PD组大鼠角膜组织基质层细胞排列稍紧密、核间距缩小，炎症细胞浸润减少，病理损伤有所恢复，其中0.5%PD组大鼠的病理损伤恢复更为明显。与0.5%PD组比较，0.5%PD+H-89组大鼠的角膜组织病理损伤严重，炎症细胞浸润明显。结果见图3。

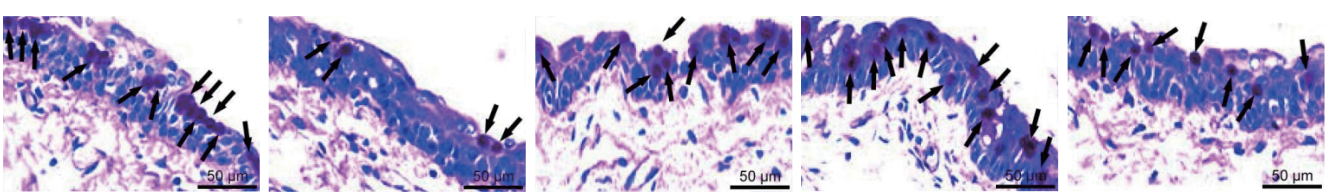
3.5　PD对DED大鼠角膜组织中炎症因子水平的影响

与Normal组比较，单纯DED组大鼠角膜组织中IL-1β、TNF-α、IL-6水平均显著升高（P<0.05）。与单纯DED组比较，0.05%PD组、0.5%PD组大鼠角膜组织中上述炎症因子水平均显著降低，且0.5%PD组显著低于0.05%PD组（P<0.05）。与0.5%PD组比较，0.5%PD+



A. Normal组　B. 单纯DED组　C. 0.05%PD组　D. 0.5%PD组　E. 0.5%PD+H-89组

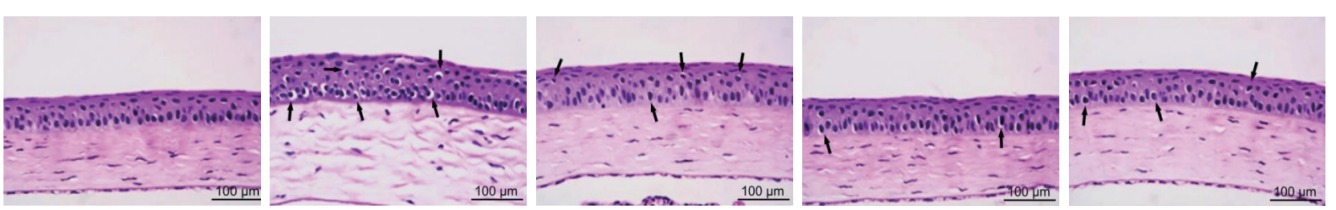
图1　各组大鼠角膜组织上皮损伤的裂隙灯图像（荧光素染色）



A. Normal组　B. 单纯DED组　C. 0.05%PD组　D. 0.5%PD组　E. 0.5%PD+H-89组

箭头：杯状细胞。

图2　各组大鼠结膜组织杯状细胞观察的显微图（PAS）



A. Normal组　B. 单纯DED组　C. 0.05%PD组　D. 0.5%PD组　E. 0.5%PD+H-89组

箭头：炎症细胞。

图3　各组大鼠角膜组织病理损伤观察的显微图（HE染色）

H-89组大鼠角膜组织中IL-1β、TNF-α、IL-6水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。

表2　各组大鼠角膜组织中IL-1β、TNF-α、IL-6水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$，pg/mg）

组别	IL-1β	TNF-α	IL-6
Normal组	7.21±1.33	4.10±0.73	3.26±0.51
单纯DED组	37.86±4.50[a]	15.23±1.94[a]	12.44±1.45[a]
0.05%PD组	22.58±2.43[b]	10.46±1.30[b]	8.83±0.94[b]
0.5%PD组	11.15±1.48[bc]	5.59±0.82[bc]	4.25±0.56[bc]
0.5%PD+H-89组	26.50±2.96[d]	11.67±1.32[d]	9.12±1.03[d]

a：与Normal组比较，$P<0.05$；b：与单纯DED组比较，$P<0.05$；c：与0.05%PD组比较，$P<0.05$；d：与0.5%PD组比较，$P<0.05$。

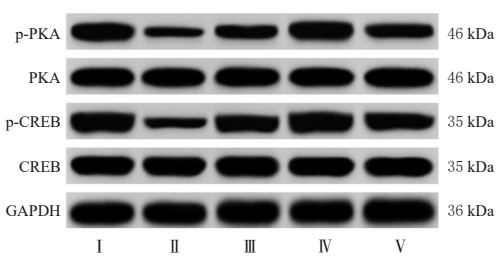
3.6　PD对DED大鼠角膜组织中通路相关蛋白表达的影响

与Normal组比较，单纯DED组大鼠角膜组织中PKA、CREB蛋白的磷酸化水平均显著降低（$P<0.05$）。与单纯DED组比较，0.05%PD组、0.5%PD组大鼠角膜组织中PKA、CREB蛋白的磷酸化水平均显著升高，且0.5%PD组显著高于0.05%PD组（$P<0.05$）。与0.5%PD组比较，0.5%PD+H-89组大鼠角膜组织中PKA、CREB蛋白的磷酸化水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表3、图4。

表3　各组大鼠角膜组织中通路相关蛋白表达情况比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	p-PKA/PKA	p-CREB/CREB
Normal组	0.88±0.09	0.94±0.09
单纯DED组	0.31±0.03[a]	0.37±0.04[a]
0.05%PD组	0.54±0.05[b]	0.62±0.06[b]
0.5%PD组	0.80±0.08[bc]	0.85±0.09[bc]
0.5%PD+H-89组	0.49±0.05[d]	0.56±0.06[d]

a：与Normal组比较，$P<0.05$；b：与单纯DED组比较，$P<0.05$；c：与0.05%PD组比较，$P<0.05$；d：与0.5%PD组比较，$P<0.05$。



Ⅰ：Normal组；Ⅱ：单纯DED组；Ⅲ：0.05%PD组；Ⅳ：0.5%PD组；Ⅴ：0.5%PD+H-89组。

图4　各组大鼠角膜组织中通路相关蛋白表达的电泳图

4　讨论

DED的发病机制较为复杂，主要与炎症反应，泪膜成分及其稳定性、完整性密切相关[12]。DED会促进炎症反应的发生，可通过激活炎症相关信号通路而进一步加重炎症反应；同时，炎症反应也会刺激眼表，进而加重DED症状[13]。现阶段，临床尚无根治DED的特效药物，只能依靠人工泪液或外科手术来帮助患者缓解眼部不适。因此，探究治疗DED且能缓解炎症反应的新型、安全药物，已成为医药领域研究的热点之一。本研究通过眼球表面注射SCOP制备DED大鼠模型，结果显示，与Normal组比较，单纯DED组大鼠的泪液分泌量、结膜组织杯状细胞密度均显著减少或降低，角膜荧光素染色评分和角膜组织中炎症因子（IL-1β、TNF-α、IL-6）水平均显著升高，角膜组织上皮层增厚，基质层细胞排列紊乱、疏松且部分缺失，核间距较大，存在大量炎症细胞浸润。这说明大鼠角膜、结膜组织均存在明显的病理损伤，炎症反应严重，具有典型的DED症状，提示DED模型复制成功。

PD是来自虎杖的天然活性成分，具有良好的抗炎作用，在炎症性疾病中得到了广泛的应用。曹瑾等[14]研究发现，PD能够缓解DED大鼠的眼表功能障碍。本研究发现，经0.05%、0.5%的PD干预后，DED大鼠的泪液分泌量、结膜组织杯状细胞密度均较单纯DED组显著增多或升高，角膜荧光素染色评分和角膜组织中IL-1β、TNF-α、IL-6水平均较单纯DED组显著降低，角膜组织基质层细胞排列稍紧密、核间距缩小，炎症细胞浸润减少，病理损伤有所恢复，与Park等[8]的研究结果基本一致。这提示PD对DED具有一定的改善作用，可缓解干眼症状，抑制炎症反应的发生。

PKA是G蛋白偶联受体家族成员，被激活后可调控下游CREB蛋白的磷酸化，从而抑制炎症因子的分泌和表达，对炎症性疾病具有较好的干预作用[15]。Cammalleri等[16]研究发现，加巴喷丁可通过调节PKA/CREB信号通路来增加DED兔泪液的分泌。本研究发现，单纯DED组大鼠角膜组织中PKA、CREB蛋白的磷酸化水平均较Normal组显著降低，说明PKA/CREB信号通路在DED大鼠中处于失活状态；经0.05%、0.5%的PD干预后，大鼠角膜组织中PKA、CREB蛋白的磷酸化水平均较单纯DED组显著升高，表明PKA/CREB信号通路被激活。为验证该信号通路在PD改善DED大鼠炎症反应中的作用，本研究在0.5%PD的基础上联用了PKA抑制剂H-89，结果显示，H-89逆转了PD对DED大鼠炎症反应及相关因子或蛋白的改善作用，初步证实了PD可能通过激活PKA/CREB信号通路来减轻DED大鼠的炎症反应。

综上所述，PD可增加DED大鼠的泪液分泌量和结膜组织杯状细胞密度，减轻其角膜组织炎症反应和病理损伤，上述作用可能与激活PKA/CREB信号通路有关。然而，PD对DED大鼠的干预作用机制研究尚不充分，还需进一步探究其他途径。

参考文献

[1] ROLANDO M, MERAYO-LLOVES J. Management strategies for evaporative dry eye disease and future perspective[J]. Curr Eye Res, 2022, 47(6): 813-823.

[2] MOHAMED H B, ABD EL-HAMID B N, FATHALLA D, et al. Current trends in pharmaceutical treatment of dry eye disease: a review[J]. Eur J Pharm Sci, 2022, 175: 106206.

[3] NGUYEN A, KOLLURU A, BEGLARIAN T. Dry eye disease: a review of anti-inflammatory therapies[J]. Taiwan J Ophthalmol, 2023, 13(1): 3-12.

[4] 林忠嗣，于晓斌，张正，等. 杞菊地黄汤加减联合中药熏蒸治疗干眼症及对泪液IL-6、MMP-9水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(7)：133-138.
LIN Z S, YU X B, ZHANG Z, et al. Qiju dihuang tang combined with Chinese medicine fumigation in treatment of dry eye and its effect on levels of tear IL-6 and MMP-9 [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(7): 133-138.

[5] 白雪，刘艳茹，王海. 刺槐素通过调控TLR4通路对干眼症大鼠的保护作用及其机制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2022，24(7)：2740-2747.
BAI X, LIU Y R, WANG H. Protective effects of acacetin on xerophthalmia rats by regulating TLR4 pathway and its mechanism[J]. Modern TCM Materia Medica-World Sci Technol, 2022, 24(7): 2740-2747.

[6] LING J W, CHAN C L, HO C Y, et al. The extracts of *Dendrobium* alleviate dry eye disease in rat model by regulating aquaporin expression and MAPKs/NF-κB signalling[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11195.

[7] KARAMI A, FAKHRI S, KOOSHKI L, et al. Polydatin: pharmacological mechanisms, therapeutic targets, biological activities, and health benefits[J]. Molecules, 2022, 27(19): 6474.

[8] PARK B, JO K, LEE T G, et al. Polydatin inhibits NLRP3 inflammasome in dry eye disease by attenuating oxidative stress and inhibiting the NF-κB pathway[J]. Nutrients, 2019, 11(11): 2792.

[9] 陈敬君，马贤聪，杨泉，等. 芍药苷调控环磷酸腺苷/蛋白激酶A/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白通路对脑卒中大鼠的影响[J]. 安徽医药，2022，26(6)：1073-1078.
CHEN J J, MA X C, YANG Q, et al. The effect of paeoniflorin on stroke rats by regulating cAMP/PKA/CREB pathway[J]. Anhui Med Pharm J, 2022, 26(6): 1073-1078.

[10] RU Y S, HUANG Y, LIU H J, et al. α-Melanocyte-stimulating hormone ameliorates ocular surface dysfunctions and lesions in a scopolamine-induced dry eye model via PKA-CREB and MEK-Erk pathways[J]. Sci Rep, 2015, 5: 18619.

[11] 姚倩，田蕴霖，周歆，等. 环孢素A滴眼液联合维生素A治疗大鼠干眼症的效果及作用机制[J]. 山东医药，2020，60(16)：26-29.
YAO Q, TIAN Y L, ZHOU X, et al. Effect of cyclosporine A eye drops combined with vitamin A on dry eye syndrome in rats and its mechanism[J]. Shandong Med J, 2020, 60(16): 26-29.

[12] YAZDANI M, ELGSTØEN K B P, ROOTWELT H, et al. Tear metabolomics in dry eye disease: a review[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(15): 3755.

[13] MESSMER E M, AHMAD S, BENITEZ DEL CASTILLO J M, et al. Management of inflammation in dry eye disease: recommendations from a European panel of experts[J]. Eur J Ophthalmol, 2023, 33(3): 1294-1307.

[14] 曹瑾，龚兰兰，吕旭东. 虎杖苷激活MEK/ERK信号通路改善东莨菪碱诱导的干眼症大鼠眼表功能障碍和病变[J]. 中国免疫学杂志，2024，40(5)：1089-1095.
CAO J, GONG L L, LYU X D. Polydatin activates MEK/ERK signaling pathway to improve ocular surface dysfunction and pathology in rats with scopolamine-induced dry eye disease[J]. Chin J Immunol, 2024, 40(5): 1089-1095.

[15] YU L T, LIU S X, ZHOU R X, et al. Atorvastatin inhibits neuronal apoptosis via activating cAMP/PKA/p-CREB/BDNF pathway in hypoxic-ischemic neonatal rats[J]. FASEB J, 2022, 36(4): e22263.

[16] CAMMALLERI M, AMATO R, OLIVIERI M, et al. Effects of topical gabapentin on ocular pain and tear secretion[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 671238.

（收稿日期：2024-03-07　修回日期：2024-07-08）
（编辑：张元媛）