

引文格式:唐凯,郭大东,张莲,司俊康,杜宇翔,毕宏生. 龙胆泻肝汤对大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎的治疗作用 [J]. 眼科新进展,2015,35(4):305-309. doi:10. 13389/j. enki. rao. 2015. 0082

【实验研究】

# 龙胆泻肝汤对大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎的治疗作用<sup>△</sup>

唐凯 郭大东 张莲 司俊康 杜宇翔 毕宏生

**作者简介:**唐凯,男,1989年6月出生,山东泰安人,硕士研究生。联系电话:15006402827;E-mail: tangkaieye@163.com

**About TANG Kai:** Male, born in June, 1989. Postgraduate student. Tel: 15006402827; E-mail: tangkaieye@163.com

**收稿日期:**2014-09-05  
**修回日期:**2014-12-23  
**本文编辑:**周志新

<sup>△</sup>**基金项目:**国家自然科学基金资助(编号:81373826);山东省中医药科技发展计划项目(编号:2013ZDK-083);山东省医药卫生科技发展计划项目(编号:2013WS0251)

**作者单位:**250002 山东省济南市,山东中医药大学(唐凯,张莲,司俊康,杜宇翔);250002 山东省济南市,山东中医药大学眼科研究所(郭大东,毕宏生);250002 山东省济南市,山东中医药大学附属眼科医院(唐凯,司俊康,毕宏生)

**通讯作者:**毕宏生, E-mail: bhs201307@163.com

**Received date:** Sep 5, 2014  
**Accepted date:** Dec 23, 2014

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No: 81373826); Development Project of Science and Technology of Traditional Chinese Medicine of Shandong Province (No: 2013ZDK-083); Development Project of Medicine and Health Science Technology of Shandong Province (No: 2013WS0251)

From the Department of Ophthalmology, Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TANG Kai, ZHANG Lian, SI Jun-Kang, DU Yu-Xiang), Jinan 250002, Shandong Province, China; Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (GUO Da-Dong, BI Hong-Sheng), Jinan 250002, Shandong Province, China; Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TANG Kai, SI Jun-Kang, BI Hong-Sheng), Jinan 250002, Shandong Province, China

**Responsible author:** BI Hong-Sheng, E-mail: bhs201307@163.com

## Treatment efficacy of Longdan Xiegan Tang on rats with experimental autoimmune uveitis

TANG Kai, GUO Da-Dong, ZHANG Lian, SI Jun-Kang, DU Yu-Xiang, BI Hong-Sheng

**【Key words】** Longdan Xiegan Tang; experimental autoimmune uveitis; inflammation; histopathology; aqueous humor protein; albumin; globulin

**【Abstract】 Objective** To study the treatment efficacy of Longdan Xiegan Tang on rats with experimental autoimmune uveitis (EAU). **Methods** Lewis rats were randomly divided into control group (6 rats), EAU group (18 rats) and LXT group (18 rats). Rats in EAU and LXT groups were immunized with interphotoreceptor retinoid-binding protein, and then the changes of physiological features were recorded during the observational duration. Further, rats in LXT group were treated with Longdan Xiegan Tang when inflammation symptom was observed in eyes. The changes of histopathology were compared on day 12 post immunization, and aqueous humor protein, albumin and globulin in serum were detected every 4 days. **Results** The model of uveitis with burning-heat in the liver and gallbladder type has successfully been constructed. Uveitis inflammation was observed on day 5 and the severity peaked on day 12 post immunization. The rectal temperature of EAU rats was higher than those of normal ones on day 1, day 7, day 10 and day 12 post immunization ( $P=0.020, 0.000, 0.015, 0.001$ ). On day 12, the concentrations of aqueous humor protein were ( $36.03 \pm 3.23$ )  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  in EAU group and ( $24.67 \pm 2.60$ )  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  in LXT group, respectively, and there was statistically significant differences ( $P=0.000$ ). Meanwhile, the morphologic changes of organizational structure of retina also showed significant differences between EAU group and LXT group on day 12 ( $P=0.000$ ). Moreover, the levels of albumin in EAU group on day 4, day 8 and day 12 post immunization were lower than that in the control group ( $P=0.045, 0.000, 0.033$ ), the levels of albumin in LXT group on day 4 and day 8 post immunization were lower than that in the control group ( $P=0.045, 0.005$ ), and returned to the normal at day 12; The level of globulin in EAU group on day 12 post immunization was higher than that in the control group ( $P=0.047$ ), while no difference was found in LXT group. **Conclusion** Longdan Xiegan Tang can efficiently alleviate anterior chamber inflammation and reduce inflammatory cell infiltration of EAU rats, protect the organization structure of eyes, enhance the antioxidant capacity, restore immune state, and has an ideal efficacy on uveitis.

**【关键词】** 龙胆泻肝汤;实验性自身免疫性葡萄膜炎;炎症;组织病理学;房水蛋白;白蛋白;球蛋白

**【摘要】 目的** 探讨龙胆泻肝汤对大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)的治疗作用。**方法** Lewis大鼠随机分为对照组6只、EAU组18只和LXT组18只,光感受器间维生素A结合蛋白免疫EAU组和LXT组大鼠。观察大鼠生理特征及眼部炎症变化,出现葡萄膜炎炎症时给予LXT组大鼠龙胆泻肝汤灌胃;免疫后12 d比较各组大鼠眼组织病理学差异;免疫后每隔4 d检测房水蛋白及血清中白蛋白、球蛋白变化。**结果** 成功制备了EAU大鼠模型;免疫后5 d大鼠开始出现葡萄膜炎症状,12 d炎症最重。EAU大鼠肛温在1 d、7 d、10 d和12 d高于对照组( $P=0.020, 0.000, 0.015, 0.001$ );免疫后12 d, EAU组房水蛋白浓度为( $36.03 \pm 3.23$ )  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , LXT组为( $24.67 \pm 2.60$ )  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,差异有显著统计学意义( $P=0.000$ );组织病理学显示EAU组视网膜结构破坏程度明显高于LXT组( $P=0.000$ )。EAU组免疫后4 d、8 d及12 d白蛋白均低于对照组( $P=0.045, 0.000, 0.033$ ), LXT组4 d和8 d白蛋白低于正常( $P=0.045, 0.005$ ),但12 d时恢复至正常;12 d时EAU组球蛋白明显高于正常( $P=0.047$ ), LXT组未见明显异常。**结论** 龙胆泻肝汤能有效减轻EAU大鼠前房炎症,减少炎症细胞浸润,保护眼部组织结构,增强机体抗氧化能力,调节免疫状态,对EAU发挥治疗作用。

自身免疫性葡萄膜炎是与视网膜蛋白免疫反应相关的一种致盲性眼病<sup>[1]</sup>。目前,自身免疫性葡萄膜炎的治疗仍以免疫抑制疗法为主,包括激素和激素替代治疗,长期使用副作用明显<sup>[2]</sup>。近几年来,中药因其独特优势在葡萄膜炎的治疗中逐渐受到关注。龙胆泻肝汤由龙胆草、黄芩、山栀子、泽泻、木通、车前子、当归、生地黄、柴胡和生甘草共十味中药组成,有较强的免疫调节作用<sup>[3]</sup>,临床应用发现龙胆泻肝汤对前葡萄膜炎有一定的治疗作用<sup>[4,5]</sup>。使用视网膜蛋白作为抗原诱发的实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis,EAU)动物模型被广泛应用于人类自身免疫性葡萄膜炎发病机理及药物治疗的研究<sup>[1,6]</sup>。本研究旨在探索龙胆泻肝汤对 Lewis 大鼠EAU的治疗作用,为临床用药提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 6~8 周龄雌性 SPF 级 Lewis 大鼠,体质量 160~180 g(北京维通利华实验动物有限公司)。实验大鼠饲养于山东中医药大学眼科研究所动物房。实验研究方案、实验动物的应用和喂养过程均得到山东中医药大学实验室动物管理和使用委员会的批准。实验动物的饲养和使用遵循 ARVO 关于眼科研究动物实验的要求。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 光感受器间维生素 A 结合蛋白(IRBP, 1177-1191, 氨基酸序列: ADGSS-WEGVGVVPDV, 上海生工生物工程股份有限公司合成);结核菌素(tuberculin, TB)(美国 Difco 公司);完全弗氏佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)(美国 Sigma 公司);龙胆泻肝汤配方颗粒(产品批号: 1311007W, 华润三九医药股份有限公司);Genesis-D 动物眼部照相机(日本 Kowa 公司);MC-347 电子体温计(大连欧姆龙有限公司);K5600 超微量分光光度计(北京凯奥科技发展有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及处理** 采用随机数字表法将大鼠分为对照组 6 只、模型组(EAU 组)18 只和龙胆泻肝汤干预组(LXT 组)18 只。参照文献<sup>[7-8]</sup>方法建立大鼠 EAU 模型,即在 EAU 组和 LXT 组每只大鼠后肢足垫、两侧腹壁及躯干上皮下各注射 100  $\mu$ L 含有 35  $\mu$ g IRBP1177-1191 和 35  $\mu$ g TB 的 CFA 乳糜液;对照组大鼠注射等量只含 TB 的 CFA 乳糜液。当 LXT 组大鼠开始出现眼部炎症反应时,给予每只大鼠 10 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>龙胆泻肝汤灌胃处理。3 组均随机选出 3 只大鼠用于肛温、摄食量、饮水量的测量。

**1.2.2 EAU 大鼠生理特征** 于免疫后每天相同时间点用体温计测量并记录 3 组大鼠的肛温,测量时首先促使大鼠排便干净,再将体温计探头插入大鼠直肠约 6 cm 处,待数值稳定后读数,连续测量 20 d。每 3 d 记录 3 组大鼠摄食量和饮水量的变化。

**1.2.3 EAU 大鼠眼部炎症观察及组织病理学检查** 免疫后每天定时通过 Genesis-D 动物眼部照相机观察 EAU 组和 LXT 组大鼠眼部炎症情况。于免疫后 12 d,各组随机选择 3 只大鼠腹腔注射 100 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>水合氯醛麻醉处死,用弯镊摘除同侧眼球,立即置于多聚甲醛溶液中固定 24 h。之后眼球标本脱水、包埋、切片,行苏木精-伊红染色。参照文献<sup>[9]</sup>方法对眼部炎症进行分级。

**1.2.4 EAU 大鼠房水蛋白测量及血清白蛋白、球蛋白检验** 分别于免疫后 4 d、8 d、12 d、16 d 及 20 d,100 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>水合氯醛麻醉 EAU 及 LXT 组各 3 只大鼠,前房穿刺,虹吸管收集房水,分别注入无菌 EP 管中。同时行心脏采血 3 mL,注入血生化管中,立即送至检验科分析血清中白蛋白、球蛋白含量。收集的大鼠房水使用 K5600 超微量分光光度计进行蛋白浓度检测,每个样品重复测量 3 次,取平均值用于分析处理。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,计量资料均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,经 Levene 检验显示方差齐。统计学差异比较均采用单因素方差分析,各组间的两两比较采用 LSD 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 EAU 大鼠生理特征** 对照组、EAU 组和 LXT 组大鼠免疫前肛温分别为(38.22 $\pm$ 0.19) $^{\circ}$ C、(38.20 $\pm$ 0.20) $^{\circ}$ C、(38.17 $\pm$ 0.15) $^{\circ}$ C,3 组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。免疫后 1 d,3 组大鼠肛温均分别高于免疫前肛温,差异均有统计学意义( $P=0.020$ 、0.015、0.018),3 组间差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$ )。随后,EAU 组肛温分别在免疫后 7 d、10 d 和 12 d 高于对照组,差异均有统计学意义( $P=0.000$ 、0.015、0.001);LXT 组肛温分别在免疫后 6 d、7 d、10 d 和 12 d 高于对照组,差异均有统计学意义( $P=0.039$ 、0.002、0.016、0.018);2 组各时间点间肛温差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$ ,见图 1)。

**Figure 1** Curves of rectal temperature of rats in three groups. Compared with the normal,  $^{\#}P<0.05$ ,  $^{\#\#}P<0.01$  3 组大鼠肛温变化曲线。与免疫前正常肛温比较,  $^{\#}P<0.05$ ,  $^{\#\#}P<0.01$

大鼠免疫后 1~3 d 摄食量、饮水量均显著低于免疫前正常值,但 3 组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。随后 4~18 d 观察发现,EAU 组摄食量、饮水量与各自免疫前正常值相比差异均无统计学意义

**表 1 3 组大鼠摄食量、饮水量变化**

Table 1 Changes of diet and drinking of rats in three groups

| Days post immunization | Diet (m/g)                 |                            |                            | Drinking (V/mL)            |                            |                              |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
|                        | Control group              | EAU group                  | LXT group                  | Control group              | EAU group                  | LXT group                    |
| Normal                 | 31.53 ± 2.04               | 33.19 ± 2.85               | 32.47 ± 2.33               | 60.33 ± 2.52               | 59.24 ± 1.92               | 61.04 ± 2.27                 |
| 1-3 days               | 21.74 ± 3.01 <sup>##</sup> | 21.33 ± 3.21 <sup>##</sup> | 19.90 ± 3.70 <sup>##</sup> | 51.03 ± 2.16 <sup>##</sup> | 48.23 ± 1.75 <sup>##</sup> | 48.33 ± 1.65 <sup>##</sup>   |
| 4-6 days               | 31.23 ± 3.50               | 32.13 ± 2.68               | 31.77 ± 1.57               | 61.00 ± 2.86               | 60.20 ± 2.59               | 62.03 ± 2.52                 |
| 7-9 days               | 31.87 ± 3.67               | 33.20 ± 3.73               | 33.77 ± 3.44               | 59.10 ± 2.31               | 60.43 ± 1.91               | 67.43 ± 2.87 <sup>##*</sup>  |
| 10-12 days             | 32.57 ± 2.80               | 33.90 ± 2.31               | 32.77 ± 1.37               | 58.23 ± 1.97               | 57.83 ± 1.46               | 66.77 ± 2.66 <sup>##**</sup> |
| 13-15 days             | 32.43 ± 2.89               | 34.43 ± 3.44               | 32.33 ± 1.82               | 57.00 ± 1.76               | 56.43 ± 2.38               | 65.47 ± 2.36 <sup>##**</sup> |
| 16-18 days             | 32.87 ± 3.89               | 33.67 ± 1.80               | 32.67 ± 2.17               | 58.13 ± 2.23               | 57.27 ± 2.12               | 66.00 ± 2.17 <sup>##**</sup> |

Note: Compared with the normal, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; Compared with EAU group at the same time point, <sup>\*</sup> $P < 0.01$

**2.2 EAU 大鼠眼部炎症变化** 通过 Genesis-D 动物眼部照相机观察发现,免疫后 5 d EAU 组和 LXT 组大鼠开始出现虹膜血管轻度扩张、充血。免疫后 12 d 两实验组大鼠均出现最严重眼部炎症表现,如

(均为  $P > 0.05$ );LXT 组摄食量与其免疫前正常值相比差异均无统计学意义(均为  $P > 0.05$ ),但 7~9 d、10~12 d、13~15 d 及 16~18 d 饮水量均明显高于正常,且高于 EAU 组(均为  $P < 0.01$ ,见表 1)。

虹膜严重充血、前房大量纤维蛋白渗出、瞳孔膜闭、眼球突出等,EAU 组大鼠炎症评分为  $3.75 \pm 0.45$ ,LXT 组大鼠炎症评分为  $3.33 \pm 0.77$ (图 2),随后炎症反应逐渐减轻,至免疫后 20 d 基本消退。

Figure 2 Inflammation symptom of anterior segment of rats on day 12. A: Control group; B: EAU group; C: LXT group 免疫后 12 d 大鼠眼前节炎症表现。A: 对照组;B: EAU 组;C: LXT 组

房水蛋白定量分析显示,对照组大鼠房水蛋白浓度为  $(2.01 \pm 0.49) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,免疫后 12 d,EAU 组房水蛋白浓度为  $(36.03 \pm 3.23) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,LXT 组为  $(24.67 \pm 2.60) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,均显著高于对照组(均为  $P = 0.000$ ),EAU 组与 LXT 组相比差异有显著统计学意义( $P = 0.000$ )。随后房水蛋白浓度开始下降,免疫后 16 d,EAU 组房水蛋白浓度为  $(15.79 \pm 1.69) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,LXT 组为  $(8.99 \pm 1.35) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,均显著高于对照组(均为  $P = 0.000$ ),EAU 组与 LXT 组相比差异有显著统计学意义( $P = 0.000$ )。免疫后 20 d,EAU 组房水蛋白浓度为  $(7.24 \pm 1.10) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,仍显著高于对照组( $P = 0.001$ ),LXT 组房水蛋白浓度为  $(3.79 \pm 0.57) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与对照组比较差异无统计学意义( $P = 0.169$ ),EAU 组与 LXT 组相比差异有统计学意义( $P = 0.018$ )。

组织病理学检查显示免疫后 12 d,EAU 组大鼠虹膜重度粘连,前房、虹膜、睫状体和视网膜内见大

量淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞浸润,视网膜全层破坏、结构紊乱,炎症评分为  $3.44 \pm 0.53$ ;LXT 组大鼠虹膜粘连,但前房、虹膜、睫状体和视网膜仅表现为轻度到中度的炎症细胞浸润,炎症评分为  $1.89 \pm 0.60$ (图 3)。2 组间视网膜炎症评分差异有显著统计学意义( $P = 0.000$ )。

**2.3 EAU 大鼠血清白蛋白、球蛋白检验** 血生物化学分析结果显示,对照组大鼠血清白蛋白含量为  $(31.13 \pm 2.61) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,EAU 组大鼠白蛋白水平在免疫后 4 d、8 d、12 d 均低于对照组( $P = 0.045$ 、 $0.000$ 、 $0.033$ );LXT 组大鼠白蛋白水平在免疫后 4 d 和 8 d 低于对照组( $P = 0.045$ 、 $0.005$ ),但在免疫后 12 d 与对照组相比差异无统计学意义( $P = 0.094$ )。对照组大鼠血清球蛋白含量为  $(24.27 \pm 2.87) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,EAU 组和 LXT 组大鼠球蛋白水平在免疫后 4~12 d 均有升高趋势,12 d 时 EAU 组球蛋白水平明显高于对照组( $P = 0.047$ )。对照组大鼠白球比值(Al-

bumin/Globulin, A/G) 为  $1.27 \pm 0.25$ , 免疫后 8 d 和 12 d EAU 组 A/G 降低, 与对照组相比差异有统计学意义 ( $P=0.014, 0.034$ ); LXT 组 A/G 仅在免疫后 8 d 低于对照组 ( $P=0.022$ ), 随后 A/G 回升(表 2)。

**Figure 3** Histopathology of iris, ciliary body and retina of rats on day 12 (HE,  $\times 200$ ). A-C: Control group; D-F: EAU group; G-I: LXT group  
免疫后 12 d 大鼠虹膜、睫状体、视网膜组织病理学 (HE,  $\times 200$ )。A ~ C: 对照组; D ~ F: EAU 组; G ~ I: LXT 组

**表 2 EAU 组和 LXT 组大鼠总蛋白、白蛋白、球蛋白及白球比值的变化**

| Table 2 Changes of total protein, albumin, globulin and albumin/globulin of rats in EAU group and LXT group |   |                  |   |                                 |  |                  |                          |                          |
|---|---|------------------|---|---------------------------------|--|------------------|--------------------------|--------------------------|
| Days post immunization  | Total protein ( $\rho/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |                  | Albumin ( $\rho/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |                                 | Globulin ( $\rho/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |                  | Albumin/Globulin         |                          |
|   | EUA group   | LXT group        | EUA group                                       | LXT group                       | EUA group  | LXT group        | EUA group                | LXT group                |
| 4 days  | $53.37 \pm 0.95$                                      | $53.43 \pm 1.15$ | $26.57 \pm 2.50^{\Delta\Delta}$                 | $26.57 \pm 2.58^{\Delta}$       | $26.70 \pm 1.60$                                 | $26.87 \pm 1.46$ | $1.00 \pm 0.20$          | $0.97 \pm 0.15$          |
| 8 days  | $50.13 \pm 6.65^{\Delta}$                             | $52.73 \pm 1.95$ | $21.80 \pm 1.11^{\Delta\Delta}$                 | $24.43 \pm 4.10^{\Delta\Delta}$ | $28.37 \pm 7.78$                                 | $28.33 \pm 3.61$ | $0.83 \pm 0.21^{\Delta}$ | $0.87 \pm 0.25^{\Delta}$ |
| 12 days   | $56.23 \pm 1.55$                                      | $56.07 \pm 0.87$ | $26.23 \pm 3.50^{\Delta}$                       | $27.37 \pm 1.40$                | $30.00 \pm 2.69^{\Delta}$                        | $28.73 \pm 1.98$ | $0.90 \pm 0.17^{\Delta}$ | $0.97 \pm 0.15$          |
| 16 days   | $55.80 \pm 2.23$                                      | $55.77 \pm 0.45$ | $27.83 \pm 3.02$                                | $29.30 \pm 1.71$                | $27.93 \pm 4.19$                                 | $26.47 \pm 2.03$ | $1.03 \pm 0.25$          | $1.13 \pm 0.15$          |
| 20 days   | $58.13 \pm 1.32$                                      | $51.57 \pm 2.94$ | $31.57 \pm 2.49$                                | $27.43 \pm 2.48$                | $26.57 \pm 1.27$                                 | $25.47 \pm 1.37$ | $1.20 \pm 0.17$          | $1.10 \pm 0.17$          |

Note: Compared with control group,  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

### 3 讨论

在本研究中, 我们通过 IRBP1177-1191 乳糜液免疫 Lewis 大鼠, 制备了大鼠 EAU 模型。对大鼠生理特征的观察发现, 大鼠接受抗原免疫后 1 d、7 d、10 d 及 12 d 肛温均明显高于正常, 与我们之前报道 EAU 大鼠肛温仅在 1 d 升高的结果<sup>[10]</sup>不相符, 可能与之前研究中大鼠未彻底排便从而影响肛温测量有关。通过对照组肛温的补充观察发现, 免疫后 1 d 肛温的升高更多地与应激反应相关, 而 7 d、10 d 及 12 d 肛温的升高与大鼠机体对抗原的免疫反应有关。在以往研究中, 我们已经发现大鼠接受抗原免疫后摄食、饮水量的减少可能与大鼠对 TB 的反应有关<sup>[10]</sup>。在本实验中, 我们把对大鼠摄食、饮水的观察细分到每 3 d 统计一次, 发现 3 组大鼠摄食量、饮

水量均在 1 ~ 3 d 低于各组免疫前连续 3 d 测量的正常值, 分析其原因, 可能与水合氯醛麻醉、抗原免疫伤痛及 TB 反应导致大鼠精神倦怠、食欲不振等症状有关, 且在剩余时间段 3 组大鼠间摄食并无差异, LXT 组大鼠在 7 d 后饮水量均高于对照组和 EAU 组, 与较高浓度龙胆泻肝汤灌胃相关。因此, 并不能简单通过摄食、饮水量的变化来判断 EAU 大鼠模型的成功与否。

Lewis 大鼠 EAU 模型是一种成熟的、被广泛接受的急性前葡萄膜炎动物模型<sup>[11]</sup>。通过对 EAU 大鼠眼部炎症观察发现, 免疫后 12 d 时前房炎症反应最重, 表现为重度纤维蛋白渗出、前房积脓、虹膜严重充血纹理不清、瞳孔膜闭等症状。免疫后 12 d 前房穿刺取房水发现, 房水处于相对凝固状态、量少, 超微量分光光度计定量分析显示 EAU 组、LXT 组房

水蛋白浓度均明显高于正常值,与炎症观察结果相一致。EAU 大鼠眼前节的炎症表现与中医对肝胆火炽型葡萄膜炎的描述相一致,即黄液上冲、黄仁色暗、纹理不清、瞳神紧小、展缩失灵等,再结合其生理特征变化,认为该症状符合肝胆火炽型葡萄膜炎。因此,我们选择了龙胆泻肝汤进行对症治疗。通过龙胆泻肝汤干预,免疫 12 d 后 LXT 大鼠眼部炎症比 EAU 组减轻,并通过测量大鼠房水蛋白浓度加以印证。免疫后 12 d、16 d 及 20 d LXT 组大鼠房水蛋白浓度均明显低于 EAU 组,说明龙胆泻肝汤能够减轻大鼠 EAU 症状,加速炎症消退,促进血-房水屏障的修复。

虽然 Lewis 大鼠 EAU 模型主要表现为眼前节的症状,但通过病理学分析,我们发现免疫后 12 d 时 EAU 组大鼠视网膜也表现为明显的炎症损伤,包括炎症细胞浸润和视网膜组织结构紊乱。龙胆泻肝汤表现出对 EAU 大鼠视网膜结构非常明显的保护作用,免疫后 12 d LXT 组大鼠视网膜仅表现为轻到中度的炎症细胞浸润,且视网膜结构相对完整。

最新研究表明,氧化应激在葡萄膜炎的发生和发展中发挥重要作用,氧化应激介导的光感受器细胞损伤是实验性或人类自身免疫性葡萄膜炎的早期病理改变,调节或控制氧化应激有助于改善葡萄膜炎的症状<sup>[12-13]</sup>。白蛋白作为机体最重要的内源性抗氧化剂之一<sup>[14]</sup>,其含量的下降已被证实与葡萄膜炎发病具有重要相关性<sup>[13,15]</sup>。我们的研究发现 EAU 大鼠在免疫后 4 d、8 d 及 12 d 白蛋白水平均低于对照组,而龙胆泻肝汤干预的大鼠白蛋白水平在 12 d 时恢复至正常,表明龙胆泻肝汤在治疗大鼠 EAU 的同时能够增强机体抗氧化能力,减少氧化应激损伤,但具体机制尚待进一步研究。球蛋白是由淋巴细胞产生的一种血清蛋白,具有重要的免疫调节作用,自身免疫性葡萄膜炎发病时机体处于免疫亢进状态,免疫球蛋白升高,并且对葡萄膜炎的中医辨证分型也有指导意义<sup>[16]</sup>。EAU 组大鼠免疫后 12 d 球蛋白高于对照组,而龙胆泻肝汤干预的大鼠球蛋白水平一直处于相对稳定状态,表明龙胆泻肝汤能够降低机体对自身抗原的免疫应答。

综上所述,Lewis 大鼠经 IRBP1177-1191 免疫后眼部炎症表现符合中医肝胆火炽型葡萄膜炎症型,使用龙胆泻肝汤对症治疗取得较为理想的结果。龙胆泻肝汤能够有效减少房水蛋白浓度,减轻纤维蛋

白渗出,对血-房水屏障有一定保护作用;同时,龙胆泻肝汤对 EAU 大鼠眼部组织结构也表现出明显的保护作用,能够减少炎症细胞浸润,减轻组织结构的破坏;此外,龙胆泻肝汤还能够增强机体抗氧化能力,调节机体免疫状态。总之,龙胆泻肝汤通过多种途径改善机体自身免疫反应,为自身免疫性葡萄膜炎的治疗提供了新的思路,但其发挥作用的具体机制还需要进一步的研究。

## 参考文献

- 1 Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9): 3073-3083.
- 2 于晋懿,卢弘. 非感染性葡萄膜炎的免疫抑制治疗[J]. 眼科新进展, 2014, 34(7): 695-700.
- 3 Lee TY, Chang HH. Longdan Xiegan Tang has immunomodulatory effects on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells and attenuates pathological signs in MRL/lpr mice [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 25(5): 677-685.
- 4 吴奇志,李梅. 龙胆泻肝汤方颗粒治疗急性前葡萄膜炎 31 例总结[J]. 湖南中医杂志, 2011, 27(1): 25-26.
- 5 向圣锦,王毓琴,李艳,郑美琴. 龙胆泻肝汤对 HLA-B27 相关性急性前葡萄膜炎患者血清相关细胞因子水平的影响[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(1): 58-61.
- 6 Fang CB, Zhou DX, Zhan SX, He Y, Lin Z, Huang C, et al. Amelioration of experimental autoimmune uveitis by leflunomide in Lewis rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62071.
- 7 Cui Y, Shao H, Sun D, Kaplan HJ. Regulation of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)-specific Th1 and Th17 cells in anterior chamber-associated immune deviation (ACAIID) [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(12): 5811-5817.
- 8 Tian Q, Bi H, Cui Y, Guo D, Xie X, Su W, et al. Qingkailing injection alleviates experimental autoimmune uveitis in rats via inhibiting Th1 and Th17 effector cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(11): 1991-1996.
- 9 Agarwal RK, Silver PB, Caspi RR. Rodent models of experimental autoimmune uveitis [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 900: 443-469.
- 10 刘正峰,崔彦,李娇,滕达,唐凯,毕宏生. 实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠的发病特点[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(7): 588-592.
- 11 Ke Y, Jiang G, Sun D, Kaplan HJ, Shao H. Ocular regulatory T cells distinguish monophasic from recurrent autoimmune uveitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(9): 3999-4007.
- 12 Yadav UC, Kalariya NM, Ramana KV. Emerging role of antioxidants in the protection of uveitis complications [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(6): 931-942.
- 13 杨婷婷,邓娟,梁雪梅. 葡萄膜炎患者血清胆红素、尿酸及白蛋白浓度分析[J]. 眼科新进展, 2014, 34(4): 358-360.
- 14 Ihara H, Hashizume N, Hasegawa T, Yoshida M. Antioxidant capacities of ascorbic acid, uric acid, alpha-tocopherol, and bilirubin can be measured in the presence of another antioxidant, serum albumin [J]. *J Clin Lab Anal*, 2004, 18(1): 45-49.
- 15 Isik A, Koca SS, Ustundag B, Selekt S. Decreased total antioxidant response and increased oxidative stress in Behcet's disease [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2007, 212(2): 133-141.
- 16 邓伟力,滕春燕,汪永时. 葡萄膜炎患者的免疫球蛋白和补体 C3 测定与中医辨证分型的关系[J]. 中国医药学报, 2002, 17(9): 564.