

杞菊地黄丸含药血清对高渗诱导角膜上皮细胞线粒体凋亡相关过程的影响

张文晶¹ 祝悦² 颀瑞萍^{1*}

(¹甘肃中医药大学附属医院眼科, 兰州 730020; ²甘肃中医药大学中医临床学院, 兰州 730000)

摘要 该文旨在评价杞菊地黄丸含药血清对高渗诱导HCE-T角膜上皮细胞损伤的保护作用, 并探讨其与线粒体凋亡相关过程的关系。体外培养HCE-T细胞, 在DMEM/F12培养体系中将培养基最终渗透浓度调至500 mOsmol/L, 建立高渗诱导的体外干眼相关细胞损伤模型。采用不同体积分数的杞菊地黄丸含药血清进行干预, 筛选最佳干预条件后, 将细胞分为Control、Model和QJDH组。CCK-8检测细胞活力; ELISA检测细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、IL-17和TNF- α 含量; 试剂盒检测胞内MDA、SOD水平以及上清液中LDH水平; 采用荧光酶标仪检测Caspase-9活性; Annexin V-FITC/PI流式细胞术检测细胞凋亡率, 并以TF2-DEVD-FMK流式检测Caspase-3/7活化水平; DCFH-DA、TMRE和MitoSOXTM分别检测细胞ROS、线粒体膜电位和线粒体超氧化物水平; Western blot检测Bax、Bcl-2、AIF、EndoG和Cyt-C蛋白水平。与Control组比较, Model组细胞活力和SOD水平降低, 炎症因子(IL-1 β 、IL-6、IL-17和TNF- α)水平、MDA水平、LDH水平、细胞凋亡率、Caspase-9活性、Caspase-3/7活化水平、细胞ROS水平及线粒体超氧化物水平均升高, 线粒体膜电位降低; Bax、AIF、EndoG和Cyt-C蛋白水平升高, Bcl-2水平降低($P<0.05$)。与Model组比较, QJDH组上述指标总体呈相反变化趋势($P<0.05$)。杞菊地黄丸含药血清可减轻高渗诱导的HCE-T角膜上皮细胞损伤, 伴随氧化应激水平降低、线粒体功能改善及线粒体凋亡相关指标下调, 提示其保护作用可能与调节线粒体凋亡相关过程有关, 这为高渗环境下角膜上皮细胞损伤相关疾病的临床干预提供了潜在的实验依据, 也为进一步挖掘杞菊地黄丸的作用靶点与具体分子机制奠定了研究基础。

关键词 杞菊地黄丸; 干眼; 角膜上皮细胞; 高渗损伤; 线粒体凋亡

Effect of Qijudihuang Pill-Containing Serum on the Process of Mitochondrial Apoptosis in Corneal Epithelial Cells Induced by Hyperosmolarity

ZHANG Wenjing¹, ZHU Yue², XIE Ruiping^{1*}

(¹Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China;

²Clinical College of Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract This study aims to evaluate the protective effect of Qijudihuang pill-containing serum on hyperosmolarity-induced HCE-T corneal epithelial cell injury, and to explore its relationship with mitochondrial apoptosis-related processes. HCE-T cells were cultured *in vitro*, and the final osmotic pressure of the medium was adjusted to 500 mOsmol/L in DMEM/F12 culture system to establish a dry eye related cell injury model induced by hyperosmolarity *in vitro*. The cells

收稿日期: 2026-07-19 接受日期: 2026-09-14

甘肃省自然科学基金(批准号: 25JRRA976)、兰州市科技计划项目(批准号: 2024-9-94)、甘肃中医药大学科学研究与创新基金(批准号: 2023KCYB-19)和颀瑞萍甘肃省名中医传承工作室建设项目(批准号: 甘中医药发〔2024〕7号)资助的课题

*通信作者。Tel: 0931-8639530, E-mail: GzfyXierp@163.com

Received: July 19, 2026

Accepted: September 14, 2026

This work was supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (Grant No.25JRRA976), the Science and Technology Program of Lanzhou City (Grant No.2024-9-94), the Scientific Research and Innovation Foundation of Gansu University of Chinese Medicine (Grant No.2023KCYB-19), and the XIE Ruiping Construction Project of Famous Chinese Medicine Inheritance Studio in Gansu Province (Grant No.Gan TCM Development No. (2024) 7)

*Corresponding author. Tel: +86-931-8639530, E-mail: GzfyXierp@163.com

were treated with different volume fractions of Qijudihuang pill-containing serum. After screening the optimal intervention conditions, the cells were divided into Control, Model and QJDH groups. Cell viability was detected by CCK-8 assay. The levels of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α in the culture supernatant were detected by ELISA. The levels of MDA (malondialdehyde) and SOD (superoxide dismutase) in the cells and LDH in the supernatant were detected by kits. The activity of Caspase-9 was detected by fluorescent microplate reader. Annexin V-FITC/PI flow cytometry was used to detect the apoptosis rate, and TF2-DEVD-FMK flow cytometry was used to detect the activation of Caspase-3/7. DCFH-DA, TMRE and MitoSOXTM were used to detect the levels of ROS, mitochondrial membrane potential and mitochondrial superoxide, respectively. The protein levels of Bax, Bcl-2, AIF, EndoG and Cyt-C were detected by Western blot. Compared with the Control group, the cell viability and SOD level were decreased, the inflammatory factor (IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α) levels, MDA level, LDH level, apoptosis rate, Caspase-9 activity, Caspase-3/7 activation level, ROS level and mitochondrial superoxide level were increased, and mitochondrial membrane potential was decreased in the Model group. The protein levels of Bax, AIF, EndoG and Cyt-C were increased, and the level of Bcl-2 was decreased ($P<0.05$). Compared with the Model group, the above indicators in the QJDH group showed opposite changes ($P<0.05$). Qijudihuang pill-containing serum can alleviate hyperosmolarity-induced HCE-T corneal epithelial cell injury, accompanied by the reduction of oxidative stress, the improvement of mitochondrial function and the down-regulation of mitochondrial apoptosis related indicators, suggesting that its protective effect may be related to the regulation of mitochondrial apoptosis related processes, providing a potential experimental basis for clinical intervention of corneal epithelial cell injury related diseases in hyperosmolarity environment. It also lays a research foundation for further exploring the target and specific molecular mechanism of Qijudihuang pill.

Keywords Qijudihuang pill; dry eye; corneal epithelial cells; hyperosmotic injury; mitochondrial apoptosis

干眼(dry eye disease, DED)是一种因泪液质或量异常或泪液动力学异常而导致泪膜稳定性下降,并伴有眼部不适和眼表组织损害的眼表疾病^[1],临床上以眼部干涩、异物感、视疲劳、乃至视力波动为主要表现。眼表微环境破坏、炎性细胞浸润及组织结构损伤是DED发病过程中的核心病理改变^[2]。DED属于常见的眼表疾病,影响着全球数百万人^[3]。目前,人工泪液是用于DED治疗的首选方法,但只能短时间内滋润眼睛,且对重症患者疗效不佳;环孢素A等抗炎药物可用于抑制炎症,但只能起到暂时的缓解作用,且存在副作用^[4]。因此探索安全、有效且具有多靶点调节作用的干预措施具有重要的临床与社会意义。

中医学将该病归属于中医眼科外障病范畴,其与“白涩症”“神水将枯症”“干涩昏花症”等类似。《诸病源候论·目涩候》^[5]中记载:“液竭者,则目涩……令泣下而数欠,泣竭则目涩。”,提示目涩的发生与津液耗损有关。现代研究对干眼患者的中医证型分布规律进行了探讨^[6]。杞菊地黄丸具有滋养肝肾、明目的作用,是治疗眼部病症的经典方剂之一。该方由枸杞子、菊花、熟地黄、酒萸肉、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓组成。其中熟地黄有滋阴填髓、补肾益精的功效,酒萸肉则可补益肝肾、收涩固精,山药则能补脾固肾,三者

被称为“三补”。泽泻具有利湿泄浊的作用,茯苓有利水渗湿的功效,牡丹皮则能凉血清虚热,三者合称“三泻”。“三补”与“三泻”结合,形成基础方剂。此外,该方还在此基础上加入了枸杞子和菊花。枸杞子有滋补肝肾、益精明目的作用,菊花则具有清肝热、明目的功效。各药配伍使用,可发挥滋养肝肾、清肝明目的作用^[7]。既往临床研究表明,在氟米龙滴眼液治疗基础上联合应用杞菊地黄丸,可进一步延长肝肾阴亏型干眼患者的泪膜破裂时间、增加泪液分泌量并降低角膜荧光素染色评分,且与单用氟米龙滴眼液相比不良反应总发生率的差异无统计学意义^[8]。然而,其保护角膜上皮细胞的具体作用机制尚未明确。本研究将经典中药复方杞菊地黄丸与干眼发病机制中的线粒体凋亡途径相结合,选取高渗培养的角膜上皮细胞株HCE-T,建立体外上皮细胞损伤模型,从分子水平揭示杞菊地黄丸保护角膜上皮细胞的作用机制,为DED的病理机制研究及临床防治思路提供理论依据和实验支撑。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞

本实验使用40只SPF级SD大鼠,雌雄各半,其购自甘肃中医药大学实验动物中心[动物生产许可证

号: SYXK(甘) 2021-004]。大鼠饲养于甘肃中医药大学实验动物中心SPF级实验室[许可证编号: SCXK(甘) 2020-0001], 饲养条件为温度(21±4) °C、湿度(55±5)%、12 h明/12 h暗的光照周期, 实验动物可自由饮水进食。HCE-T细胞(货号: CL-0743)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。实验方案已获得甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号: SY2025-224)。

1.2 药物与试剂

药物与试剂包括: 杞菊地黄丸(九芝堂股份有限公司, 货号: 202501032), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)[翌圣生物科技(上海)股份有限公司, 货号: 40130ES76], 胰酶-EDTA溶液、磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)(吉诺生物医药技术有限公司, 货号: GNM25200、GNM20012), CCK-8检测试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)探针DCFH-DA、四甲基罗丹明乙酯(tetramethylrhodamine ethyl ester, TMRE)(上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号: C0038、S0033、C2001S), 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(国药集团化学试剂有限公司, 货号: 30072418), MitoSOX™线粒体超氧化物试剂(美国ThermoFisher Scientific公司, 货号: M36008), Bax、Bcl-2抗体(美国CST公司, 货号: 2772、3498), AIF、EndoG、细胞色素C(cytochrome C, Cyt-C)、GAPDH抗体(英国Abcam公司, 货号: ab32516、ab76122、ab133504、ab181602), MDA试剂盒、SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司, 货号: A003-1、A001-3), TF2-DEVD-FMK(美国AAT Bioquest公司, 货号: 22823)。

1.3 仪器与设备

仪器与设备包括: 倒置荧光显微镜(日本OLYMPUS公司, 型号: IX51)、显微成像相机(加拿大Q-IMAGING公司, 型号: MicroPublisher)、旋涡混合仪(上海泸西分析仪器厂有限公司, 型号: WH-2)、荧光酶标仪(无锡华卫德朗仪器有限公司, 型号: DR-200Bs)、电泳仪(北京六一生物科技有限公司, 型号: DYY-6C)。

1.4 主要方法

1.4.1 杞菊地黄丸含药血清制备 将实验大鼠随机分为空白血清组、含药血清组, 每组各20只。含药血清组大鼠给予0.82 g/kg剂量的杞菊地黄丸溶液灌胃, 空白血清组大鼠给予等体积的生理盐水灌胃, 每天2次, 连续灌胃7 d。末次灌胃2 h后, 使用1%的戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔注射麻醉大鼠, 心脏采血, 在4 °C离心

机中以3 500 r/min转速离心10 min, 收集血清, 过滤除菌后于56 °C灭活, -80 °C冰箱保存, 备用。

1.4.2 高渗诱导HCE-T细胞损伤模型的建立 细胞培养: 角膜上皮细胞株HCE-T常规培养于DMEM/F12完全培养基(含10% FBS、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素), 置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中, 每2~3 d传代1次, 取对数生长期细胞用于实验。高渗造模: 以DMEM/F12基础培养基配制高渗培养基, 添加氯化钠(NaCl)至终浓度为90 mmol/L, 充分混匀, 此时培养基的最终渗透浓度约为500 mOsmol/L。将HCE-T细胞以5×10³/孔的密度接种于96孔板(或相应培养器皿), 待细胞贴壁至约80%融合度后, 弃去原完全培养基, 加入上述高渗培养基继续培养, 建立体外DED细胞模型^[9]。

1.4.3 杞菊地黄丸含药血清最佳干预条件筛选 取对数生长期HCE-T细胞以5×10³/孔的密度接种于96孔板, 设置0%、5%、10%、15%、20%和25%杞菊地黄丸含药血清组, 分别干预24、48和72 h。各含药血清体积分数组均以空白血清补足, 使各组总血清体积分数保持一致。干预后弃培养液, PBS清洗, 每孔加入10 μL CCK-8试剂, 37 °C孵育4 h, 于450 nm波长处测定吸光度(D)值。

1.4.4 细胞分组与给药 HCE-T细胞在DMEM/F12完全培养基[含10% FBS、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素、10 ng/mL表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和5 μg/mL胰岛素]中, 于37 °C、5% CO₂和饱和湿度条件下培养24 h。细胞贴壁后分为: Control组(等渗培养基+15%空白血清)、Model组(最终渗透浓度约为500 mOsmol/L的高渗培养基+15%空白血清)和QJDH组(最终渗透浓度约为500 mOsmol/L的高渗培养基+15%杞菊地黄丸含药血清)。各组均处理48 h。

1.4.5 ELISA法检测细胞上清液中IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α的水平 给药48 h后收集各组培养基, 在4 °C离心机中以3 000 r/min转速离心5 min后收集上清液。按照试剂盒说明书配制标准品, 标准曲线浓度依次为1 000、500、250、125、62.50、31.25和15.63 pg/mL, 并设0 pg/mL空白孔。每孔加入100 μL标准品或待测样品, 于37 °C孵育80 min; 弃去孔内液体, 每孔加入200 μL 1×洗涤液洗涤3次, 每次静置1~2 min。每孔加入100 μL生物素化抗体工作液, 于37 °C孵育50 min, 洗涤3次; 每孔加入100 μL链霉

亲和素-HRP工作液,于37℃孵育50 min,再洗涤5次。每孔加入90 μL TMB底物液,于37℃避光显色20 min,随后加入50 μL终止液终止反应。荧光酶标仪检测450 nm波长处的吸光度值。以标准品为参照,计算IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α的浓度。

1.4.6 试剂盒检测胞内MDA、SOD水平以及上清液中LDH水平 给药结束后收集6孔板中的细胞上清液,在4℃离心机中以3 000 r/min转速离心10 min,去除悬浮细胞和碎片后检测上清液中LDH的含量。其余6孔板于4℃、3 000 r/min条件下离心10 min,弃去上清后加入适量细胞提取液,超声破碎细胞。在4℃离心机中以3 000 r/min离心10 min,取上清液,分别按照相应试剂盒操作说明,依次检测细胞内MDA、SOD的水平。

1.4.7 荧光酶标仪检测Caspase-9活性 收集各组细胞,按Caspase-9活性检测试剂盒说明书制备细胞裂解液,加入荧光底物(Ac-LEHD)₂-R110,37℃避光孵育1 h后,使用荧光酶标仪测定荧光强度,以相对荧光强度反映Caspase-9活性。

1.4.8 流式细胞术检测细胞凋亡水平 PBS洗涤细胞后,加入0.25%胰酶-EDTA溶液,于37℃消化至细胞变圆、脱落,加入完全培养基终止消化,轻柔吹打制成单细胞悬液。4℃条件下2 000 r/min离心5 min,弃去上清液后收集细胞沉淀;采用Annexin V-FITC结合液轻柔重悬细胞后,完成细胞计数。取1×10⁵个重悬后的细胞至1.5 mL EP管,2 000 r/min离心5 min,弃上清,加入90 μL Annexin V-FITC结合液再次轻柔重悬细胞。向上述细胞悬液中依次加入5 μL Annexin V-FITC、5 μL碘化丙啶染色液,轻柔混匀后,置于室温条件下避光孵育5 min。孵育结束后将样品上机检测,分析细胞凋亡状态并计算细胞凋亡率。

1.4.9 流式细胞仪检测荧光探针TF2-DEVD-FMK标记的Caspase-3/7活化水平 收集各组细胞,4℃条件下2 000 r/min离心5 min去上清,用0.5 mL无血清培养基重悬细胞。加入1 μL TF2-DEVD-FMK染色液,阴性对照不加染料,颠倒混匀。37℃避光孵育1 h后,于相同条件下再次离心洗涤并重悬细胞,采用流式细胞仪检测(激发波长488 nm、发射波长525 nm),以TF2-DEVD-FMK阳性细胞百分比表示Caspase-3/7相对活化水平。

1.4.10 DCFH-DA检测细胞ROS的水平 弃去培养基,用PBS或无血清培养基清洗3次。用PBS或无血清培养基将DCFH-DA按1:1 000稀释配制工作液并预热。在37℃水浴锅中避光孵育30 min,用PBS

或无血清培养基清洗3次。滴加Hoechst 33342染核,室温避光孵育30 min,用PBS或无血清培养基清洗。染色后尽快在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.11 TMRE荧光探针检测细胞线粒体膜电位 弃去培养基,用PBS或无血清培养基清洗1次。用检测缓冲液将TMRE按1:1 000稀释配制工作液。在37℃水浴锅中避光孵育30 min,用预热的无血清培养基清洗3次。在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.12 MitoSOX™检测线粒体超氧化物水平 去除细胞培养液,将MitoSOX™试剂以13 μL DMSO配制为5 mmol/L储存液,再用细胞培养液按1:10 000稀释为工作液。37℃避光孵育30 min,去除工作液,以37℃预温的新鲜培养液清洗3次。加入Hoechst 33342染核,室温避光孵育30 min,再以培养液清洗3次。染色后尽快在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.13 Western blot法检测Bax、Bcl-2、AIF和EndoG、Cyt-C蛋白表达情况 提取各组细胞总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白,每个样品总蛋白上样量为40 μg,加入5×蛋白上样缓冲液,于95~100℃处理5 min。进行SDS-PAGE电泳,浓缩胶采用80 V恒压电泳,分离胶采用120 V恒压电泳,直至溴酚蓝到达胶板下沿。电泳结束后,将PVDF膜用甲醇活化3 min,按300 mA恒流进行湿转,转膜时间根据目的蛋白相对分子质量进行调整。转膜后将膜置于封闭液中室温封闭1 h,加入一抗(1:1 000)于4℃孵育过夜;TBST洗膜3次,每次5 min;加入相应二抗(1:1 000),室温孵育30 min,再用TBST洗膜4次,每次5 min。随后加入新鲜配制的ECL发光液(A液:B液=1:1)进行显影,根据发光强度调整曝光时间,采集图像并进行条带灰度分析。

1.5 统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行统计分析。各实验均独立重复3次。采用Shapiro-Wilk检验评价正态性,Levene检验评价方差齐性。符合正态分布且方差齐的数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;含药血清体积分数和干预时间筛选数据比较采用双因素方差分析;其余符合正态分布且方差齐的多组数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。方差不齐时采用Welch方差分析并行Games-Howell比较。非正态分布数据以M(P25, P75)表示,采用Kruskal-Wallis检验进行分析,并采用Dunn-Bonferroni进行校正。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 杞菊地黄丸含药血清最佳干预条件筛选

与Control组比较,经500 mOsmol/L渗透浓度的饱和氯化钠溶液干预后HCE-T细胞活力明显降低;10%、15%、20%、25%的杞菊地黄丸含药血清均能在干预24 h、48 h、72 h时明显提高细胞活力,且15%的杞菊地黄丸含药血清干预24~48 h时细胞活力提高更为显著,48~72 h时细胞活力提高较为缓慢,故选择15%的杞菊地黄丸含药血清干预48 h作为后续实验条件(图1)。

2.2 各组细胞存活率比较

与Control组相比,Model组HCE-T细胞存活率

显著降低($P<0.01$);与Model组比较,QJDH组细胞存活率显著升高($P<0.01$)(图2)。

2.3 各组细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 含量比较

与Control组比较,Model组细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 含量均显著升高($P<0.01$);与Model组比较,QJDH组细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 含量均显著降低($P<0.01$)(图3)。

2.4 各组细胞内MDA、SOD水平以及上清液中LDH水平比较

如图4所示,与Control组比较,Model组胞内MDA、上清液中LDH水平升高,胞内SOD水平降低

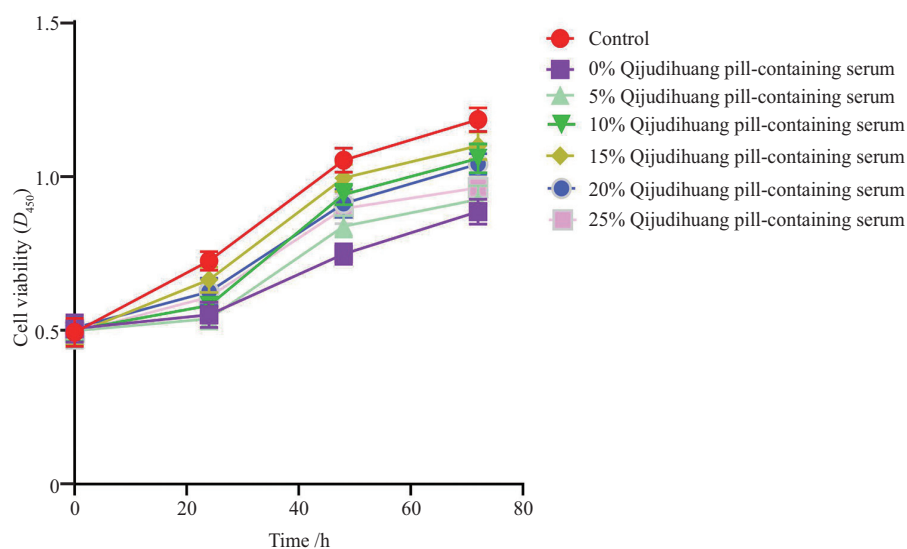
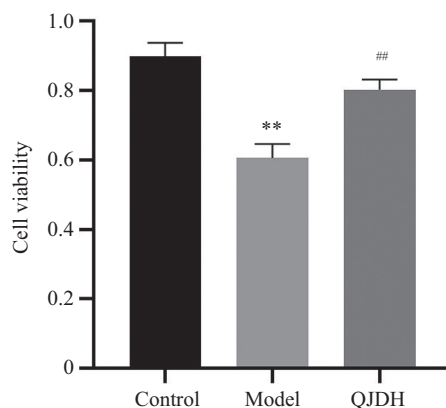


图1 不同体积分数杞菊地黄丸含药血清对HCE-T细胞活力的影响

Fig.1 Effect of different volume fractions of Qijudihuang pill-containing serum on HCE-T cell viability

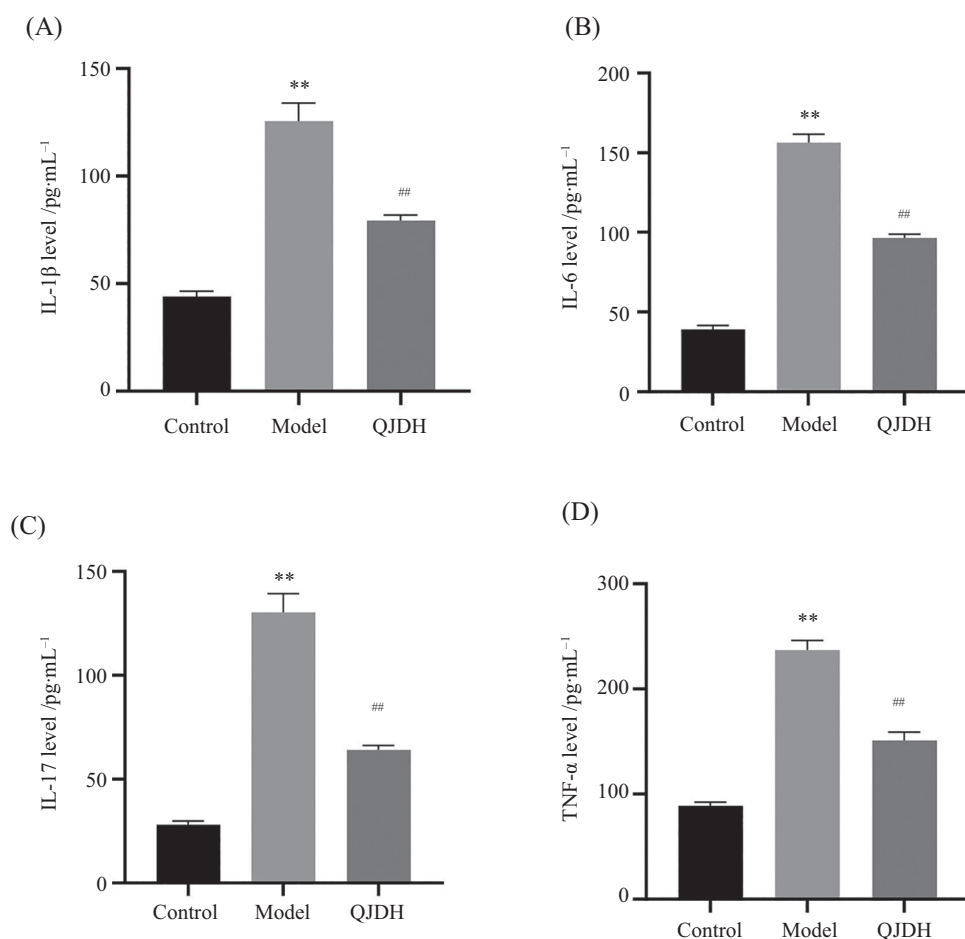


** $P<0.01$, 与Control组比较; ## $P<0.01$, 与Model组比较。

** $P<0.01$ compared with the Control group; ## $P<0.01$ compared with the Model group.

图2 杞菊地黄丸含药血清对各组细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of Qijudihuang pill-containing serum on cell viability in each group of cells

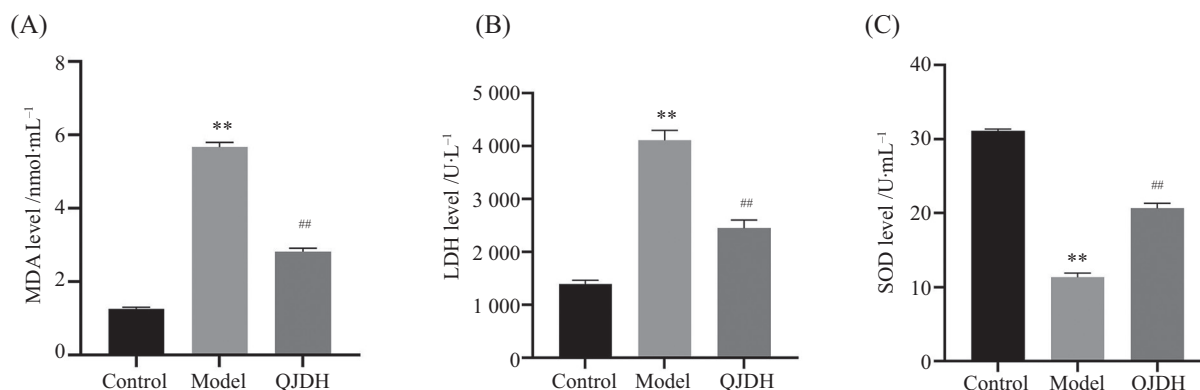


A: 各组细胞IL-1 β 水平; B: 各组细胞IL-6水平; C: 各组细胞IL-17水平; D: 各组细胞TNF- α 水平。 ** P <0.01, 与Control组比较; ## P <0.01, 与Model组比较。

A: IL-1 β level in each group; B: IL-6 level in each group; C: IL-17 level in each group; D: TNF- α level in each group. ** P <0.01 compared with the Control group; ## P <0.01 compared with the Model group.

图3 杞菊地黄丸含药血清对各组细胞IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 水平的影响

Fig.3 Effect of Qijudihuang pill-containing serum on the levels of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α in each group of cells

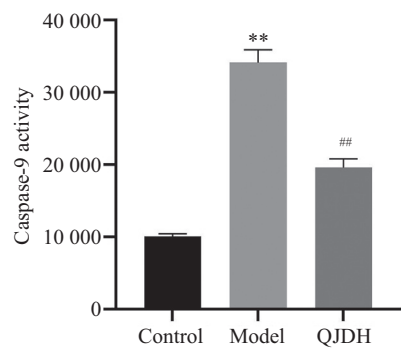


A: 各组细胞内MDA水平; B: 各组细胞上清液中LDH水平; C: 各组细胞内SOD水平。 ** P <0.01, 与Control组比较; ## P <0.01, 与Model组比较。

A: intracellular MDA level in each group; B: LDH level in the supernatant of each group; C: intracellular SOD levels in each group. ** P <0.01 compared with Control group; ## P <0.01 compared with the Model group.

图4 杞菊地黄丸含药血清对各组细胞胞内MDA、SOD水平以及上清液中LDH水平的影响

Fig.4 Effects of Qijudihuang pill-containing serum on intracellular MDA and SOD levels and LDH level in the supernatant of each group of cells

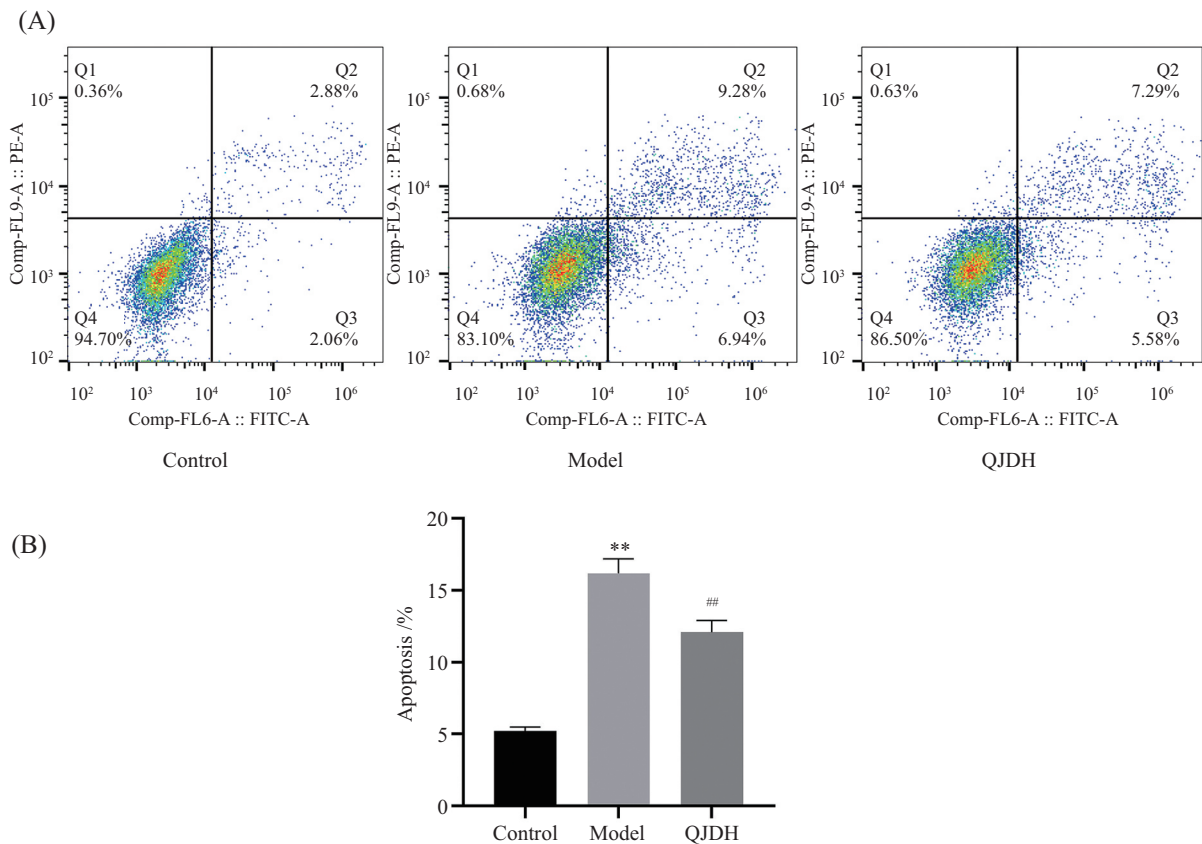


** $P < 0.01$, 与Control组比较; ## $P < 0.01$, 与Model组比较。

** $P < 0.01$ compared with the Control group; ## $P < 0.01$ compared with the Model group.

图5 杞菊地黄丸含药血清对各组细胞Caspase-9活性的影响

Fig.5 The effect of Qijudihuang pill-containing serum on Caspase-9 activity in each group of cells



A: 流式细胞术检测细胞凋亡率; B: 各组细胞凋亡率统计分析。 ** $P < 0.01$, 与Control组比较; ## $P < 0.01$, 与Model组比较。

A: the apoptosis rate was detected by flow cytometry; B: statistical analysis of apoptosis rate in each group. ** $P < 0.01$ compared with the Control group;

$P < 0.01$ compared with the Model group.

图6 杞菊地黄丸含药血清对各组细胞凋亡的影响

Fig.6 Effect of Qijudihuang pill-containing serum on cell apoptosis in each group

($P < 0.01$); 与Model组比较, QJDH组胞内MDA、上清液中LDH水平降低, 胞内SOD水平升高($P < 0.01$)。

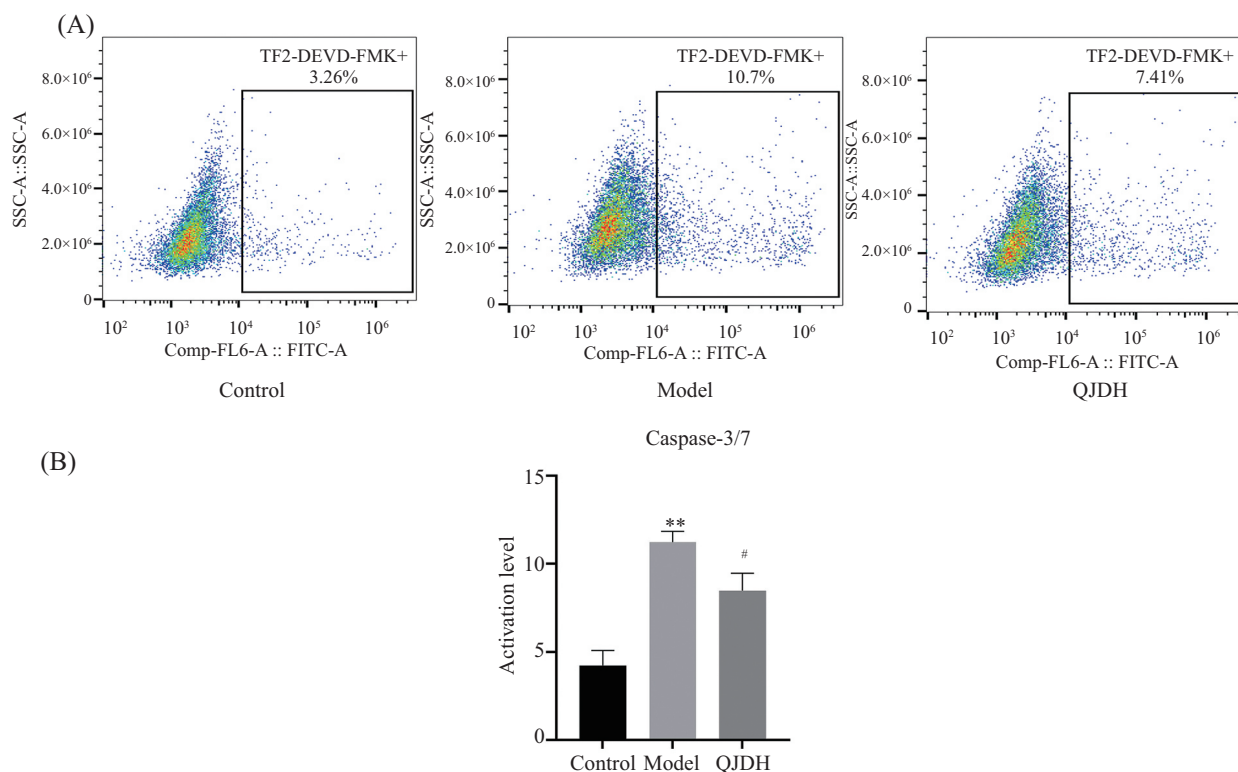
2.5 各组细胞Caspase-9活性比较

与Control组比较, Model组细胞中Caspase-9活性显著升高($P < 0.01$); 与Model组比较, QJDH组细胞

中Caspase-9活性显著降低($P < 0.01$)(图5)。

2.6 各组细胞凋亡的比较

与Control组比较, Model组细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$); 与Model组比较, QJDH组细胞凋亡率显著降低($P < 0.01$)(图6)。



A: 流式细胞术检测细胞Caspase-3/7活化水平; B: 各组细胞Caspase-3/7活化水平统计分析。** $P<0.01$, 与Control组比较; # $P<0.05$, 与Model组比较。

A: flow cytometry for detecting cellular Caspase-3/7 activation levels; B: statistical analysis of Caspase-3/7 activation levels in each group of cells. ** $P<0.01$ compared with the Control group; # $P<0.05$ compared with the Model group.

图7 杞菊地黄丸含药血清对各组细胞Caspase-3/7活化水平的影响

Fig.7 The effect of Qijudihuang pill-containing serum on the Caspase-3/7 activation levels in each group of cells

2.7 各组细胞Caspase-3/7活化水平的比较

与Control组比较, Model组Caspase-3/7活化水平显著升高($P<0.01$); 与Model组比较, QJDH组Caspase-3/7活化水平显著降低($P<0.05$)。这说明QJDH可明显抑制HCE-T细胞的凋亡(图7)。

2.8 各组细胞ROS水平的比较

与Control组比较, Model组细胞ROS水平显著升高($P<0.01$); 与Model组比较, QJDH组细胞ROS水平显著降低($P<0.01$)(图8)。

2.9 各组细胞线粒体膜电位的比较

与Control组比较, Model组细胞线粒体内红色荧光强度显著下降, 表明线粒体膜电位降低($P<0.01$); 与Model组比较, QJDH组细胞线粒体内红色荧光强度显著升高, 表明线粒体膜电位明显升高($P<0.01$)(图9)。

2.10 各组细胞线粒体超氧化物水平比较

与Control组比较, Model组细胞线粒体内红色荧光强度显著升高, 表明细胞线粒体超氧化物水平升高($P<0.01$); 与Model组比较, QJDH组细胞线粒体

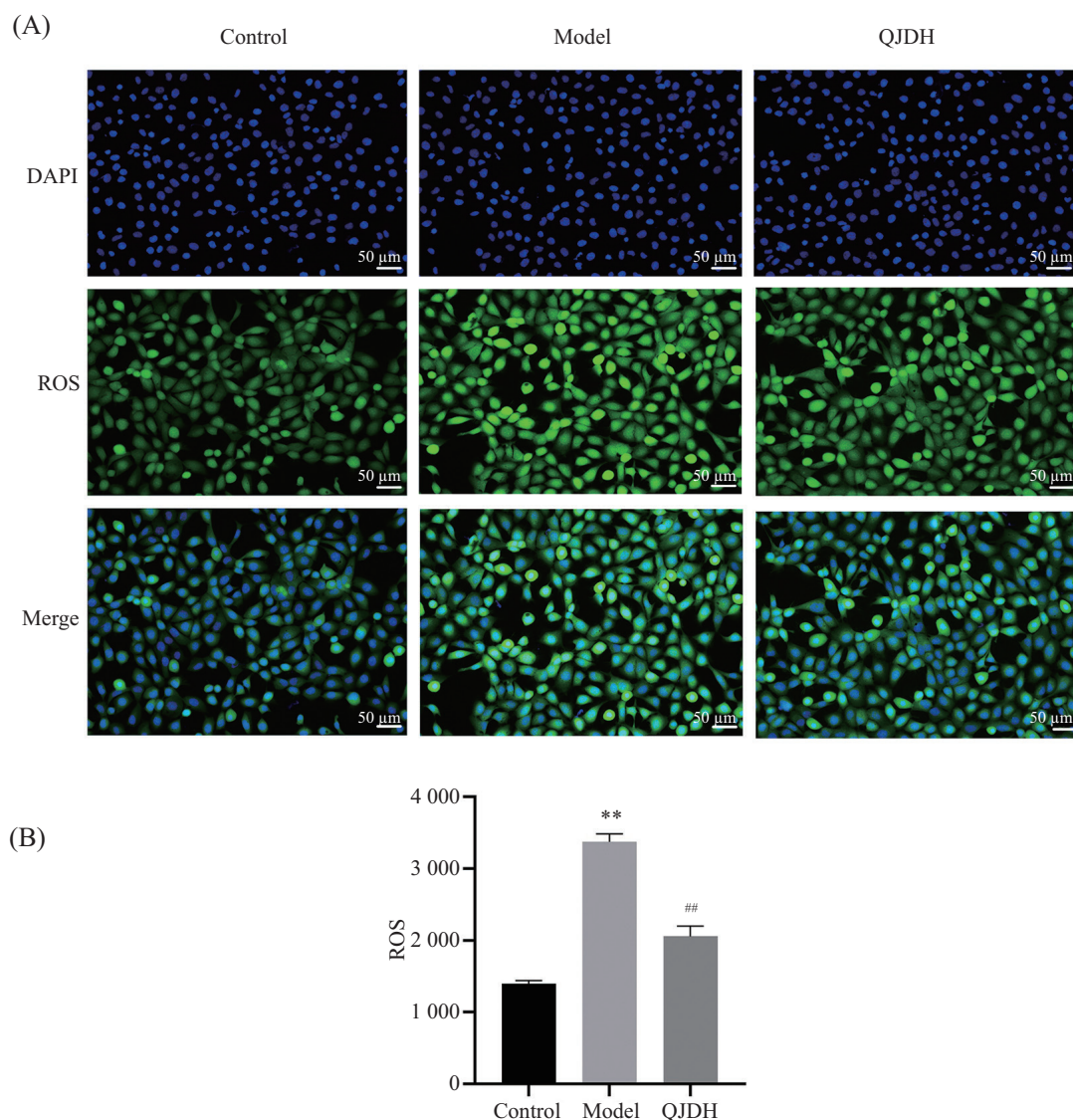
内红色荧光强度显著降低, 表明细胞线粒体超氧化物水平降低($P<0.01$)(图10)。

2.11 各组细胞Bax、Bcl-2、AIF、EndoG、Cyt-C蛋白水平比较

与Control组比较, Model组Bax、AIF、EndoG、Cyt-C蛋白表达水平显著升高($P<0.01$), Bcl-2表达水平显著降低($P<0.01$); 与Model组比较, QJDH组Bax、AIF、EndoG、Cyt-C蛋白表达水平显著降低($P<0.05$), Bcl-2表达水平显著升高($P<0.05$)(图11)。

3 讨论

DED是一种常见的多因素性眼表疾病, 也是患者寻求眼科诊疗的重要原因之一^[10]。其患病率受地区、人群及诊断标准影响^[11]。体外研究表明, 高渗透培养可诱导人角膜上皮细胞ROS生成、脂质过氧化、炎症因子释放、线粒体膜电位下降及细胞死亡^[12]。本研究通过将培养基最终渗透浓度调至约500 mOsmol/L, 构建角膜上皮细胞损伤模型, 重点



A: DCFH-DA检测细胞ROS水平; B: 各组细胞ROS水平统计分析。** $P < 0.01$, 与Control组比较; ## $P < 0.01$, 与Model组比较。

A: DCFH-DA was used to detect the ROS level; B: statistical analysis of ROS levels in each group of cells. ** $P < 0.01$ compared with the Control group; ## $P < 0.01$ compared with the Model group.

图8 杞菊地黄丸含药血清对各组细胞ROS水平的影响

Fig.8 Effect of Qijudi Huang pill-containing serum on ROS level in each group

评价杞菊地黄丸含药血清对细胞损伤表型及线粒体凋亡相关指标的影响。

中医学认为, DED的发生与阴液亏耗、目失濡养密切相关, 杞菊地黄丸具有滋肾养肝、清肝明目之功。既往研究表明, 杞菊地黄丸对DED具有一定的临床疗效^[13-14]。本研究进一步从细胞水平发现, 杞菊地黄丸含药血清可减轻高渗诱导的HCE-T细胞损伤, 降低炎症因子水平并改善氧化应激状态, 提示其对角膜上皮细胞具有一定的保护作用。DED作为一种慢性眼表疾病, 长期的炎症反应能够破坏眼表屏障, 眼表微环境破坏、炎性细胞浸润、组织结构

损伤和角膜神经异常是DED发病过程中的核心病理改变^[15-16]。现有研究表明, 高渗刺激可通过诱导ROS积累和氧化应激, 导致角膜上皮细胞线粒体膜电位下降、ATP生成量减少及凋亡增加^[17]。进一步研究证实, 高渗可促进Cyt-C释放和Caspase-3活化, 形成“高渗-氧化应激-线粒体损伤-凋亡”的机制链^[18]。最新研究证实, 维持线粒体的稳态或增强角膜上皮细胞的抗氧化能力, 可有效减轻高渗所致的角膜上皮细胞损伤^[12]。本研究结果显示, 高渗处理后角膜上皮细胞损伤模型的上清液中IL-1 β 、IL-6、IL-17和TNF- α 水平升高, 同时MDA、LDH、细胞ROS和

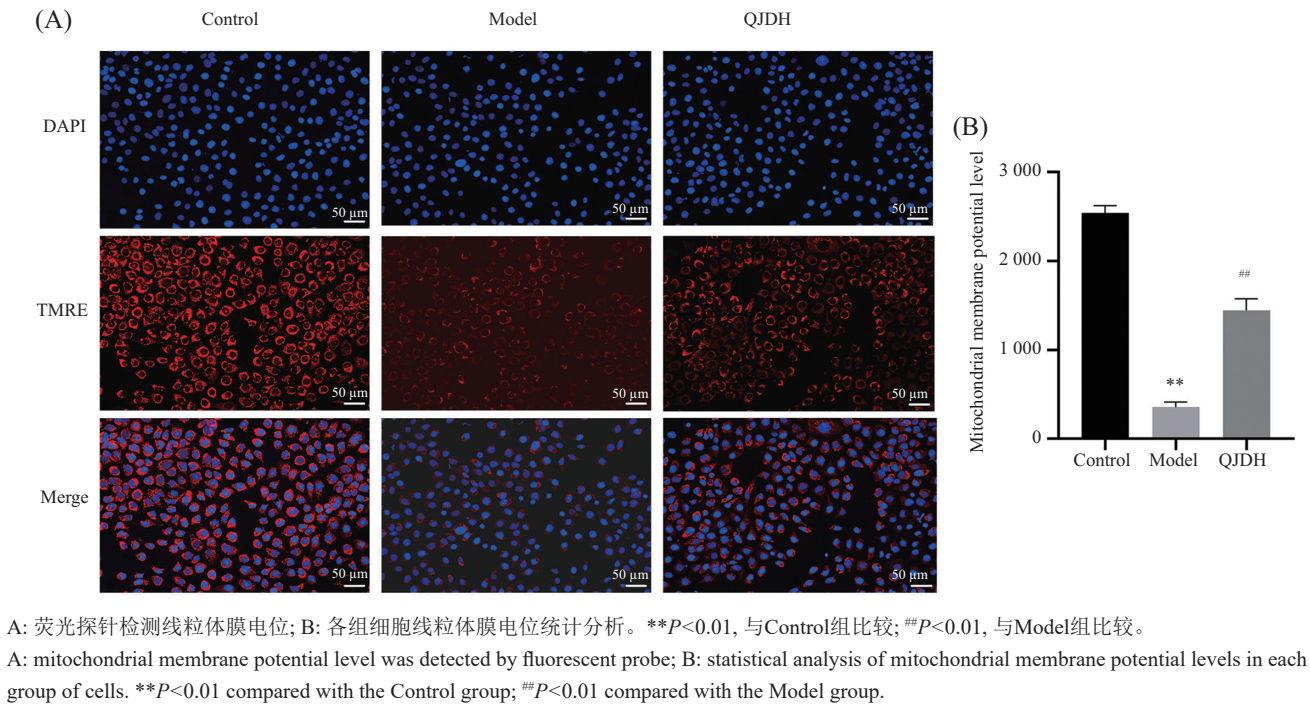


图9 杞菊地黄丸含药血清对各组细胞线粒体膜电位的影响
Fig.9 Effect of Qijudihuang pill-containing serum on mitochondrial membrane potential in each group

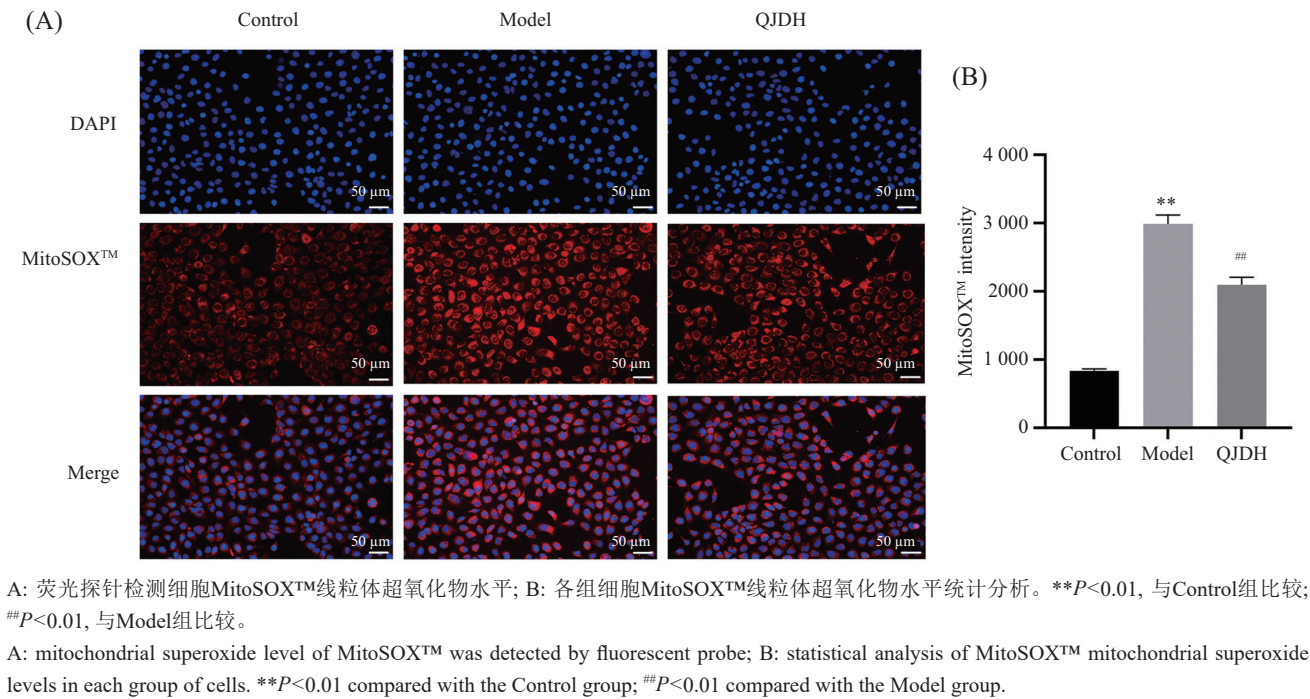
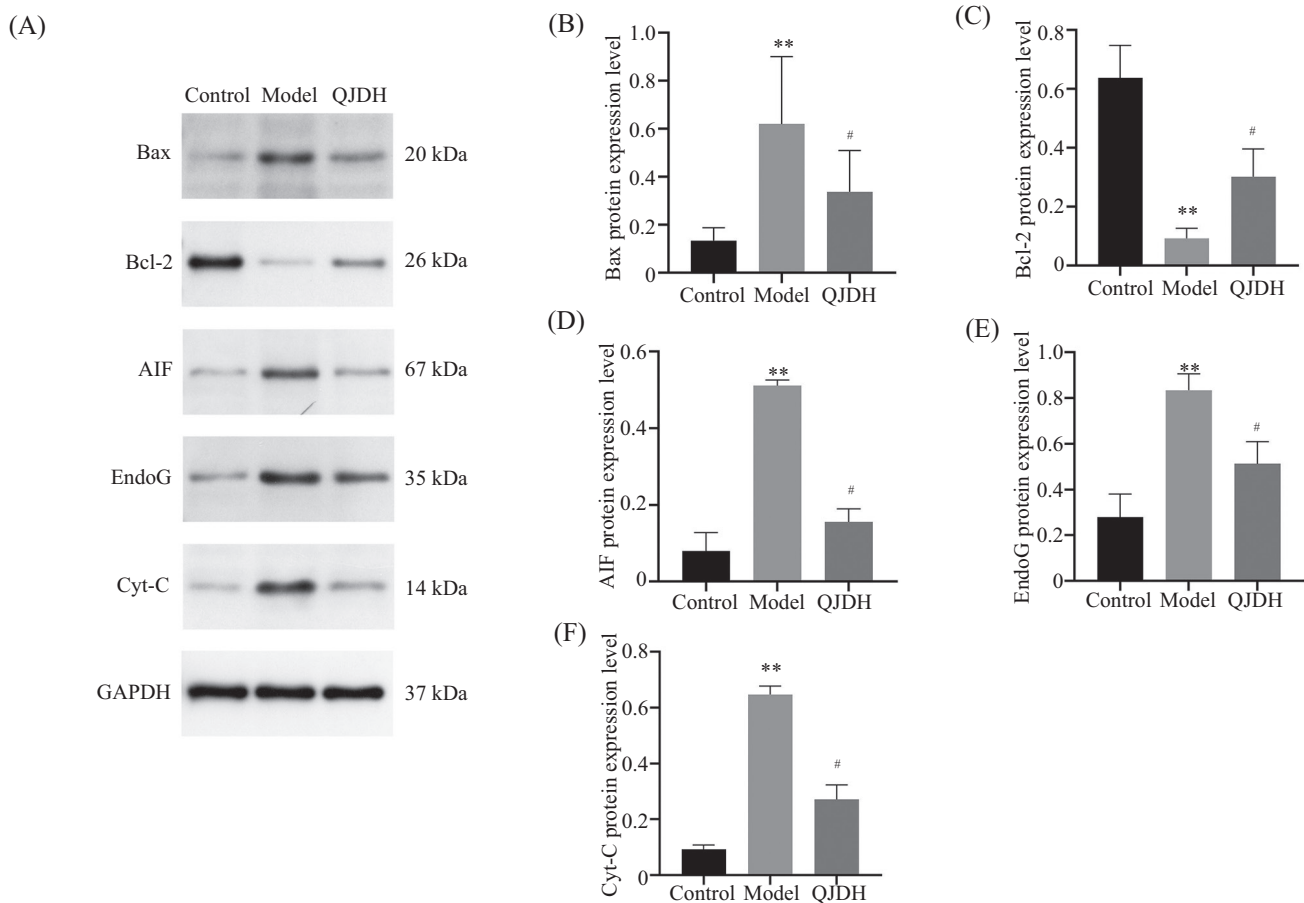


图10 杞菊地黄丸含药血清对各组细胞MitoSOX™线粒体超氧化物水平的影响
Fig.10 Effect of Qijudihuang pill-containing serum on the level of MitoSOX™ mitochondrial superoxide in each group of cells

线粒体超氧化物水平升高, SOD水平降低, 并伴线粒体膜电位下降和细胞凋亡增加, 且经杞菊地黄丸含药血清处理后的各组上述变化总体得到逆转。这说明杞菊地黄丸可以降低高渗所导致的角膜上皮细

胞损伤中炎症因子水平, 减轻氧化应激, 抑制ROS产生。
在线粒体凋亡相关过程中, Cyt-C水平变化以及 Caspase-9和 Caspase-3/7的活化均与线粒体 Cas-



A: Western blot检测Bax、Bcl-2、AIF、EndoG、Cyt-C蛋白表达情况; B: Bax蛋白表达统计分析; C: Bcl-2蛋白表达统计分析; D: AIF蛋白表达统计分析; E: EndoG蛋白表达统计分析; F: Cyt-C蛋白表达统计分析。** $P < 0.01$, 与Control组比较; # $P < 0.05$, 与Model组比较。

A: Western blot was used to detect the protein expression of Bax, Bcl-2, AIF, EndoG, and Cyt-C; B: statistical analysis of Bax protein expression; C: statistical analysis of Bcl-2 protein expression; D: statistical analysis of AIF protein expression; E: statistical analysis of EndoG protein expression; F: statistical analysis of Cyt-C protein expression. ** $P < 0.01$ compared with the Control group; # $P < 0.05$ compared with the Model group.

图11 杞菊地黄丸含药血清对各组细胞Bax、Bcl-2、AIF、EndoG、Cyt-C蛋白水平的影响

Fig.11 Effects of Qijudi Huang pill-containing serum on Bax, Bcl-2, AIF, EndoG and Cyt-C protein levels in each group of cells

pase依赖性凋亡通路密切相关, 而AIF和EndoG参与Caspase非依赖性细胞死亡过程^[19-20]。研究发现, 在细胞凋亡过程中, 促凋亡蛋白Bax可在线粒体外膜发生寡聚化并形成促凋亡蛋白复合物, 而抗凋亡蛋白Bcl-2可抑制这一过程^[21]。此外, 当线粒体膜电位下降时, 线粒体内膜通透性增加, Cyt-C等蛋白质从线粒体内释放到细胞质中, 并与凋亡蛋白质相结合, 继而引发细胞凋亡^[22]。本研究结果显示, 高渗处理后Bax、Cyt-C、AIF和EndoG蛋白水平升高, Bcl-2蛋白水平降低, 并伴随Caspase-9活性及Caspase-3/7活化水平升高; 杞菊地黄丸含药血清干预后, 上述变化总体呈相反趋势, 提示杞菊地黄丸含药血清的保护效应与线粒体凋亡相关过程相关。本研究结果仅明确了杞菊地黄丸含药血清对相关

蛋白表达与Caspase活化的调控作用, 后续可通过分子对接、基因敲除/敲降等实验, 进一步明确杞菊地黄丸中活性成分与线粒体凋亡通路中关键靶点的结合作用, 深入解析其分子调控机制, 为杞菊地黄丸在泪液高渗相关眼表疾病治疗中的应用提供更充分的实验依据。

综上, 杞菊地黄丸含药血清可减轻高渗诱导的HCE-T角膜上皮细胞损伤, 其作用表现为炎症因子水平和氧化应激指标下降、线粒体膜电位升高及细胞凋亡减少, 并伴线粒体凋亡相关蛋白和Caspase活化水平改变。本研究表明杞菊地黄丸通过对线粒体介导的凋亡途径的调控, 抑制角膜上皮细胞的凋亡, 从而达到保护高渗诱导的HCE-T角膜上皮细胞的作用。

参考文献 (References)

- [1] 董慧, 郑华成, 王伟婷, 等. 维生素B12滴眼液对干眼症小鼠角膜MMP-9与TNF- α 表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2026, 61(3): 424-431.
Dong H, Zheng H C, Wang W T, et al. Effect of vitamin B12 eye drops on the expression of MMP-9 and TNF- α in the cornea of mice with dry eye disease [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2026, 61(3): 424-431.
- [2] Stapleton F, Argüeso P, Asbell P, et al. TFOS DEWS III: digest [J]. American Journal of Ophthalmology, 2025, 279: 451-553.
- [3] Xiao K H, Li L, Zhang X M, et al. Global prevalence of dry eye: a systematic review and meta-analysis [J]. Contact Lens & Anterior Eye, 2025, 49(2): 102627.
- [4] Jones L, Craig J P, Markoulli M, et al. TFOS DEWS III: management and therapy [J]. American Journal of Ophthalmology, 2025, 279: 289-386.
- [5] 巢元方. 诸病源候论[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2016: 271-280.
- [6] 赵艳青, 李青松, 黄丽, 等. 干眼中医证型分布规律及症状相关性研究[J]. 中国中医眼科杂志, 2019, 29(1): 19-24.
Zhao Y Q, Li Q S, Huang L, et al. Study on distribution pattern of TCM syndromes of xerophthalmia and correlation between symptoms [J]. China Journal of Chinese Ophthalmology, 2019, 29(1): 19-24.
- [7] Liu F, Tian M. Study on the mechanism of Qiju Dihuang pill in the treatment of ophthalmic diseases based on systems pharmacology [J]. Medicine, 2022, 101(31): e30033.
- [8] 常春丽, 陈泽秦, 刘全保, 等. 杞菊地黄丸联合氟米龙滴眼液治疗肝肾阴虚型干眼症的疗效观察[J]. 天津医药, 2025, 53(5): 547-551.
Chang C L, Chen Z Q, Liu Q B, et al. Observation of curative effect of Qiju Dihuang pill combined with fluorometholone eye drops on dry eye disease due to Yin deficiency of liver and kidney [J]. Tianjin Medical Journal, 2025, 53(5): 547-551.
- [9] Xia R, Zhan B, Tao L M. Triptolide alleviates hyperosmotic stress-induced human corneal epithelial cell damage by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via the TLR4/NF- κ B pathway [J]. Frontiers in Medicine, 2026, 13: 1753857.
- [10] Bradley J L, Özer Stillman I, Pivneva I, et al. Dry eye disease ranking among common reasons for seeking eye care in a large US claims database [J]. Clinical Ophthalmology, 2019, 13: 225-232.
- [11] Britten-Jones A C, Wang M T M, Samuels I, et al. Epidemiology and risk factors of dry eye disease: considerations for clinical management [J]. Medicina, 2024, 60(9): 1458.
- [12] Yu M Y, Xu Y, Liu H, et al. Targeting translocator protein (TSPO) ameliorates inflammation and maintains mitochondrial homeostasis to protect against dry eye [J]. The Ocular Surface, 2026, 40: 117-129.
- [13] 张文晶, 颀瑞萍, 张花治, 等. 基于数据挖掘探讨中医药防治干眼的用药规律与组方特点[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2024, 33(1): 74-81.
Zhang W J, Xie R P, Zhang H Z, et al. To explore the medication rules and formulation characteristics of traditional Chinese medicine for prevention and treatment of dry eye based on data mining [J]. Journal of Minzu University of China (Natural Sciences Edition), 2024, 33(1): 74-81.
- [14] 肖西立, 李涓. 杞菊地黄丸治疗干眼症有效性及安全性的Meta分析[J]. 国际眼科杂志, 2020, 20(1): 96-102.
Xiao X L, Li J. Meta analysis of the efficacy and safety of Qiju Dihuang Pill in the treatment of dry eye [J]. International Eye Science, 2020, 20(1): 96-102.
- [15] Shi J T, He H, Liu A L, et al. Protective effect of calcitonin gene-related peptide on corneal epithelial barrier in experimental dry eye models [J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2026, 67(10): 65.
- [16] Zhang J Y, Lin H B, Li F X, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in trigeminal ganglion corneal neuron injury in dry eye disease [J]. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2023, 16: 1083850.
- [17] Li Y W, Liu H F, Zeng W, et al. Edaravone protects against hyperosmolarity-induced oxidative stress and apoptosis in primary human corneal epithelial cells [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0174437.
- [18] Yang L L, Sui W J, Li Y Q, et al. Substance P inhibits hyperosmotic stress-induced apoptosis in corneal epithelial cells through the mechanism of Akt activation and reactive oxygen species scavenging via the neurokinin-1 receptor [J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149865.
- [19] Czabotar P E, Garcia-Saez A J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2023, 24(10): 732-748.
- [20] Bock F J, Tait S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020, 21(2): 85-100.
- [21] Wolf P, Schoeniger A, Edlich F. Pro-apoptotic complexes of BAX and BAK on the outer mitochondrial membrane [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2022, 1869(10): 119317.
- [22] Bonora M, Giorgi C, Pinton P. Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23(4): 266-285.