

抗炎三肽 KdPT 对小鼠眼干燥症的治疗作用

王 华, 许元生, 宋 燕*

(广州领晨医疗科技有限公司, 广州 510663)

摘要 为探讨抗炎三肽 KdPT 治疗眼干燥症的疗效, 用 0.2% 苯扎氯铵溶液处理 8 周龄雄性 BALB/c 小鼠, 建立眼干燥症模型; 造模 4 周后, 将小鼠随机分为模型对照组, 阳性对照组和 KdPT 的低、中、高剂量组。每组分别给予生理盐水、人工泪液和 1、10、100 μg/mL KdPT。治疗 3、5、7、10、14 d 后, 观察眼表面形态, 进行荧光素钠染色评分; 治疗 14 d 后用酚红棉线测定泪液分泌量; 治疗 14 d 后处死动物取出右眼角膜进行组织病理学分析。实验结果显示, 治疗 3、5、7、10、14 d 后, 各组小鼠的状态和体重无明显异常。治疗 14 d 后, KdPT 可促进泪液分泌, 修复受损角膜上皮, 对小鼠眼干燥症有显著治疗作用。KdPT 有可能被开发为一种新型的眼干燥症治疗药物。

关键词 眼干燥症; 三肽; KdPT; 荧光素钠染色; 泪液分泌

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)01-0100-04

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210114

引用本文 王华, 许元生, 宋燕. 抗炎三肽 KdPT 对小鼠眼干燥症的治疗作用 [J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(1): 100–103.

Cite this article as: WANG Hua, XU Yuansheng, SONG Yan. Therapeutic effect of anti-inflammatory tripeptide KdPT on ophthalmoxerosis in mice [J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(1): 100–103.

Therapeutic effect of anti-inflammatory tripeptide KdPT on ophthalmoxerosis in mice

WANG Hua, XU Yuansheng, SONG Yan*

Guangzhou Link Health Pharma Co., Ltd., Guangzhou 510663, China

Abstract This study was designed to investigate the therapeutic effect of anti-inflammatory tripeptide KdPT on ophthalmoxerosis. Male BALB/c mice, 8-week old, were treated with 0.2% benzalkonium chloride solution to establish the ophthalmoxerosis model. Four weeks after modeling, the mice were randomly divided into control group, positive group and the low, medium, high dose groups of KdPT. Each group was given normal saline, artificial tears and 1, 10, 100 μg/mL KdPT, respectively. After 3, 5, 7, 10 and 14 days of treatment, the morphology of the eye surface was observed, and the fluorescein sodium staining score was performed. The amount of tear secretion was measured by phenol red cotton thread and the right corneas were taken out for histopathological analysis after 14 days of treatment. Data showed that there was no significant abnormality in general state and the weight of mice in each group at each time point of treatment. After 14 days of treatment, KdPT can promote the secretion of tear, repair the damaged corneal epithelium, and showed a significant therapeutic effect on ophthalmoxerosis in mice. Based on the data, it is possible for KdPT to be developed as a novel drug for ophthalmoxerosis.

Key words ophthalmoxerosis; tripeptide; KdPT; sodium fluorescein staining; tear secretion

眼干燥症是由于泪液的量或质或流体动力学异常引起的泪膜不稳定和(或)眼表损害, 从而导致眼不适症状及视功能障碍的一类疾病。目前世界范围内眼干燥症发病率为 5.5%~33.7%, 我国眼干燥症的发病率为 21%~30%^[1]。

研究表明, 炎症是眼干燥症发病的关键环节, 抗炎已经成为治疗眼干燥症(特别是中重度眼干燥症)的重要手段^[2-4]。目前治疗眼干燥症常用的抗炎药物主要有糖皮质激素类或环孢菌素 A 滴眼液等, 然而长期使用糖皮质激素有升高眼压^[5]、存

在诱发青光眼及白内障的潜在风险,而环孢素滴眼液则具有刺激性强的缺点^[6],因此,开发新的安全有效的治疗眼干燥症的局部抗炎药物具有重要的临床意义。

KdPT(Lys-D-Pro-Thr)是一种衍生自 α -促黑色素细胞激素(α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)的抗炎三肽,具有多重抗炎活性。有文献报道, α -MSH 可以用于治疗眼干燥症和修复角膜损伤^[7-9],但目前尚未有 KdPT 对眼干燥症的治疗作用的报道,本研究通过建立苯扎氯铵诱导小鼠眼干燥症模型,考察了 KdPT 对眼干燥症的治疗作用,为新型眼干燥症治疗药物的开发提供数据支持。

1 材 料

1.1 试 剂

KdPT(纯度大于 98%,批号:C613160802-YJ1,深圳市健元医药科技有限公司);人工泪液滴眼液、荧光素钠滴眼液(中山大学附属眼科医院);泪液检测酚红棉线(天津晶明新技术开发有限公司);苯扎氯铵(批号:BCBX5919,美国 Sigma 公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

兰羚 KJ5D 裂隙灯(苏州康捷医疗股份有限公司);JB-P5 包埋机、JB-L5 冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);KD-P 组织摊片机(浙江科迪仪器设备有限公司);E100 显微镜、DS-U3 成像系统(日本尼康公司)。

1.3 动 物

SPF 级 BALB/c 小鼠(7 周龄,15~17 g)120 只,雄性,购自中山大学药学院实验动物中心,实验动物合格证号为:44007200064321,实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2010-0102,在温度 20 ℃~25 ℃ 和湿度 50%~70% 进行 12 h 光/暗循环饲养。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方 法

2.1 小鼠眼干燥症模型的构建及分组给药

SPF 级 BALB/c 小鼠 120 只,雄性,适应 1 周后,造模动物右眼滴入 0.2% 苯扎氯铵溶液 5 μ L,每天 2 次,持续 4 周,诱导小鼠蒸发过快型眼干燥症模

型。正常对照组给予生理盐水,其他操作均相同。造模 4 周后进行荧光素钠染色,按荧光素钠染色评分随机分为 6 组:正常对照组(以生理盐水造模)、模型对照组、KdPT 低、中、高剂量组、人工泪液组,每组 10 只动物,分别滴眼给予相应药物处理(正常对照组和模型对照组给予生理盐水,KdPT 低、中、高剂量组分别给予 1、10、100 μ g/mL 的 KdPT,阳性对照组给予人工泪液),给药体积为每眼 5 μ L,每日 2 次。

2.2 角膜荧光素钠染色

分别于给药 3、5、7、10、14 d 后在裂隙灯钴蓝光下观察并记录小鼠眼表形态,同时进行荧光素钠染色评分。荧光素钠染色方法为:吸取 1% 荧光素钠溶液 5 μ L 滴至小鼠眼表,并闭合眼睑使荧光素钠均匀涂布于角膜表面,90 s 后用生理盐水 200 μ L 冲洗 3 次,棉签轻轻吸取眼睛周围液体后,用裂隙灯显微镜钴蓝光下观察角膜上皮荧光素钠染色情况。将眼表分为 4 个象限,并对每个象限进行评分,评分分为 4 个等级:无染色为 0 分;轻微的点状染色为 0.5 分;弥漫的点状染色为 1 分;覆盖少于 1/3 角膜的弥漫染色为 2 分;覆盖 1/3 至 2/3 角膜的弥漫染色为 3 分;覆盖超过 2/3 角膜的弥漫染色为 4 分,4 个象限总分为 12 分,得分越高表示眼干燥症越严重。

2.3 酚红棉线

给药治疗 14 d 后,麻醉并固定小鼠,用显微结膜镊轻拉小鼠下眼睑暴露下结膜囊,将酚红棉线一端置于下睑内侧结膜囊内 60 s 后取出,测量被泪液浸湿的酚红棉线红色部分总长度。

2.4 组织病理分析

给药治疗 14 d 后,将小鼠麻醉后处死,迅速取下包括上下眼睑在内的整个眼球,眼球固定液固定并染色,制作病理切片,光学显微镜下观察角膜组织的病理学变化。

2.5 统计分析

实验数据由 GraphPad Prism 7.0 生物统计学软件进行统计学处理:计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Two-Way ANOVA 结合 Dunnett's 多重比较法进行分析;采用方差分析结合 Dunnett's 多重比较法进行分析;计数资料采用 Kruskal-Wallis 秩和检验进行分析;采用 One-Way ANOVA 结合 Dunnett's 多重比较法进行分析。

3 结 果

3.1 一般状态观察与体重

各组小鼠一般状态均无明显异常,与模型对照组相比,各治疗组小鼠体重均无统计学差异($P > 0.05$)。

3.2 角膜荧光素钠染色评分

治疗7、14 d后,与正常对照组相比,模型对照组荧光素钠染色评分显著升高,具有统计学差异($P < 0.01$),说明造模成功;与模型对照组相比,各治疗组的荧光素钠评分均有不同程度的降低,其中以KdPT高剂量组和阳性对照组最为明显,且有显著的统计学差异($P < 0.01$),见图1和图2。

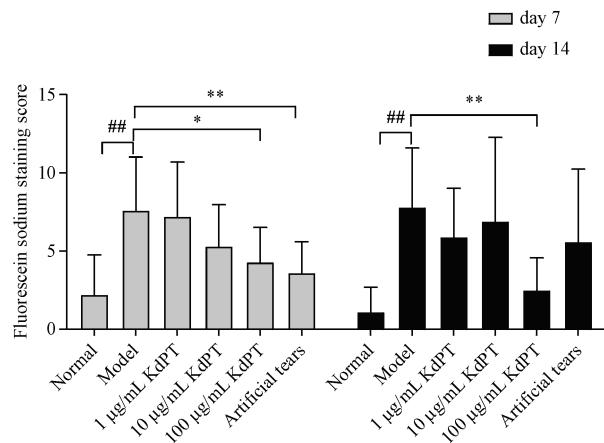


Figure 1 Corneal fluorescent staining scores of each treatment group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

$\#P < 0.01$ vs normal group; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs model group

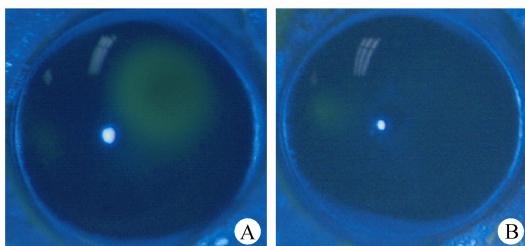


Figure 2 Corneal fluorescein sodium staining of model control group (A) and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KdPT group (B)

3.3 泪液分泌量测定

与正常对照组相比,模型对照组小鼠酚红棉线长度明显缩短,泪液分泌量明显降低($P < 0.01$),说明造模成功;与模型对照组相比,KdPT各治疗组和阳性对照组均可增加酚红棉线长度,

促进泪液分泌,且KdPT中剂量组、高剂量组、阳性对照组有显著的统计学差异($P < 0.01$),见图3。

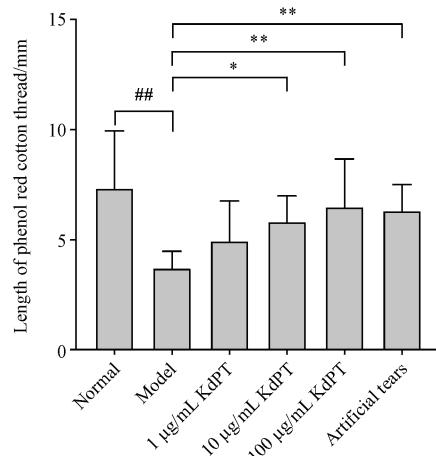


Figure 3 Lacrimal secretion of each treatment group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

$\#P < 0.01$ vs normal group; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs model group

3.4 病理学变化

与模型对照组相比,各治疗组的病理评分均有不同程度的降低,其中以KdPT高剂量组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阳性对照组最为明显,且有显著的统计学差异($P < 0.01$),见图4。组织病理结果显示,模型对照组角膜上皮厚度不均匀,局部变窄,并出现裂隙,基质重度肿胀,表现为裂隙扩张。KdPT治疗明显改善眼干燥症小鼠的角膜组织病理评分,特别是高剂量组角膜上皮厚度均匀,细胞形态正常,无角质,基质厚度均匀,无血管、无炎症,见图5,提示KdPT治疗明显修复了受损的角膜上皮。

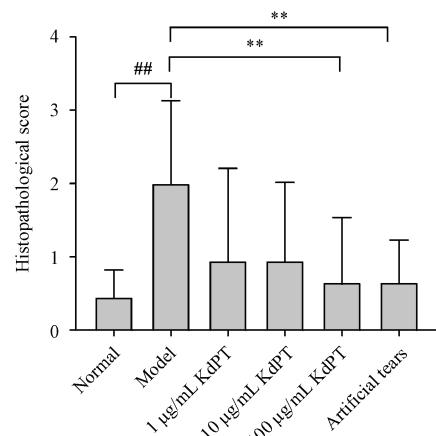


Figure 4 Corneal histopathological score of each treatment group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

$\#P < 0.01$ vs normal group; $**P < 0.01$ vs model group

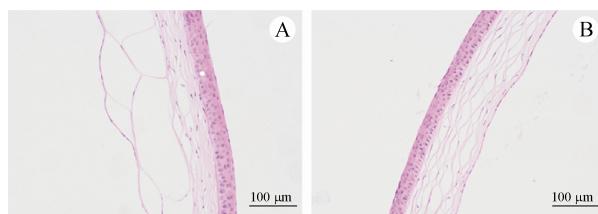


Figure 5 Corneal histopathology of model control group and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KdPT group

A:Model group;B:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KdPT group

4 讨 论

KdPT 为衍生自促黑激素 α -MSH 的抗炎三肽, 具有多重抗炎活性, 对多种炎症性疾病有良好的治疗作用。文献报道, KdPT 对溃疡性结肠炎^[10-11]、鼻炎^[12]、银屑病^[13]等疾病有明显的治疗作用, 目前 KdPT 治疗溃疡性结肠炎的研究在国外已进入临床Ⅱ期, 在国内进入临床Ⅰ期(国内代号为 LH025, 由广州领晟医疗科技有限公司开发), 具有良好的开发前景。本研究通过建立苯扎氯铵诱导小鼠眼干燥症模型, 考察了 KdPT 对眼干燥症的治疗作用, 研究结果表明, KdPT 治疗可促进泪液分泌, 修复受损的角膜上皮, 对小鼠眼干燥症具有明显的治疗作用, 有可能开发为眼干燥症的新型治疗药物。本研究为 KdPT 开展眼干燥症的临床开发提供了数据支持, 增加了药物潜在的适应证, 具有重要的研究价值。

炎症是眼干燥症发病的关键因素^[3], IL-1R 是参与眼干燥症发生的重要受体^[14-16], KdPT 是 IL-1R 的抑制剂, 能够阻断多种炎症因子(如 IL-1 β 等)与 IL-1R 的结合, 从而阻断炎症通路, 这可能是 KdPT 能够治疗眼干燥症的作用机制之一。

本研究首次证实了 KdPT 三肽对蒸发过强型小鼠眼干燥症模型具有显著的治疗作用, 后续研究中将考察 KdPT 对其他眼干燥症模型的有效性和安全性, 同时对其作用机制进行更加深入地研究, 为 KdPT 用于眼干燥症治疗的临床开发积累更多的数据。

References

- [1] Consensus on clinical diagnosis and treatment of dry eyes (2013)[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2013, **49**(1): 73-75.
- [2] Liu ZG, Yang WZ. Dry eye and its pathogenesis[J]. *Ophthal-*
- mol CHN*. 2005, **14**(5): 343-345.
- [3] Wei Y, Asbell PA. The core mechanism of dry eye disease is inflammation[J]. *Eye Contact Lens*, 2014, **40**(4): 248-256.
- [4] Yamaguchi T. Inflammatory response in dry eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, **59**(14): DES192-DES199.
- [5] Jung HH, Ji YS, Sung MS, et al. Long-term outcome of treatment with topical corticosteroids for severe dry eye associated with Sjögren's syndrome[J]. *Chonnam Med J*, 2015, **51**(1): 26-32.
- [6] de Paiva CS, Pflugfelder SC, Ng SM, et al. Topical cyclosporine A therapy for dry eye syndrome[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, **9**: CD010051.
- [7] Pavan J, Lukenda A, Stambuk N, et al. Effects of alpha-MSH on corneal epithelial lesions in rats[J]. *Coll Antropol*, 2012, **36**(4): 1407-1411.
- [8] Ru YS, Huang Y, Liu HJ, et al. A-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.
- [9] Dou ZX, Ru YS, Liu HJ. Combinatorial protective effects of α -melanocyte-stimulating hormone and carboxymethylcellulose on ocular surface in dry eye rat model[J]. *Chin J Exp Ophthalmol(中华实验眼科杂志)*, 2017, **35**(6): 498-505.
- [10] Bettenworth D, Buyse M, Böhm M, et al. The tripeptide KdPT protects from intestinal inflammation and maintains intestinal barrier function[J]. *Am J Pathol*, 2011, **179**(3): 1230-1242.
- [11] Kucharzik T, Lemnitz G, Abels C, et al. Mo1216 tripeptide KdPT accelerates disease remission in patients with mild to moderate active ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 2014, **146**(5): S-588.
- [12] Li CJ, Ge H, Cui LJ, et al. Molecular mechanism of action of K (D)PT as an IL-1RI antagonist for the treatment of rhinitis[J]. *RSC Adv*, 2014, **4**(89): 48741-48749.
- [13] Mykwick N, Klenner L, Baumann C, et al. The tripeptide KdPT ameliorates ongoing psoriasis-like skin inflammation in murine and human skin[J]. *Exp Dermatol*, 2017, **26**(4): 328-334.
- [14] Narayanan S, Corrales RM, Farley W, et al. Interleukin-1 receptor-1-deficient mice show attenuated production of ocular surface inflammatory cytokines in experimental dry eye [J]. *Cornea*, 2008, **27**(7): 811-817.
- [15] Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, et al. Targeting IL-1 in Sjögren's syndrome[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, **17**(4): 393-401.
- [16] Vijmasi T, Chen FY, Chen YT, et al. Topical administration of interleukin-1 receptor antagonist as a therapy for aqueous-deficient dry eye in autoimmune disease[J]. *Mol Vis*, 2013, **19**: 1957-1965.