

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

董 慧, 郑华成, 王伟婷, 赵海霞

(内蒙古医科大学附属第一医院眼视光中心, 呼和浩特 010050)

摘要 目的 本研究通过人工模拟的干燥环境(空气湿度<30%)联合皮下注射氢溴酸东莨菪碱诱导混合型干眼症(DED)小鼠模型,并探究维生素 B₁₂ 滴眼液如何调控 DED 小鼠角膜基质金属蛋白酶 9(MMP-9)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的表达水平。方法 C57BL/6 雌鼠 50 只,10 只小鼠为 A 组(空白组),其余 40 只小鼠采用干燥环境(空气湿度<30%)联合皮下注射氢溴酸东莨菪碱诱导 DED 小鼠模型,分别对所有小鼠进行基础泪液分泌实验(SIT)、泪膜破裂时间(TBUT)和角膜荧光素染色评分(CFS)检测,最终选择符合造模标准的小鼠入组,并随机分为 B 组(模型组)、C 组(PBS 组)、D 组(维生素 B₁₂ 组),药物处理第 0、7、14、21 天对每组小鼠进行 TBUT、SIT、CFS 及角膜炎症程度的评估,从宏观角度分析维生素 B₁₂ 滴眼液治疗 DED 的疗效。药物处理 21 d 后,采用颈椎脱臼法处死所有小鼠并取角膜组织,进行 HE 染色观察各组小鼠角膜组织的形态学变化,ELISA 法和免疫组织化学染色检测各组小鼠角膜组织中 MMP-9 及 TNF- α 的表达水平。**结果** 干燥环境(空气湿度<30%)联合皮下注射氢溴酸东莨菪碱诱导 DED 小鼠的 DED 相关指标的变化:SIT 显著减少、TBUT 显著缩短、角膜荧光素点染增加及 CFS 均显著升高($P<0.05$),表明 DED 模型成功建立,共 30 只 DED 小鼠入组。DED 模型建立成功且未进行药物干预时,B 组、C 组、D 组之间 TBUT、SIT、角膜荧光素点染情况及 CFS 差异均无统计学意义;B 组、C 组、D 组分别与 A 组比较,SIT 减少、TBUT 缩短、角膜荧光素点染明显和 CFS 均增加,且各项指标的差异均有统计学意义($P<0.05$)。药物干预后,D 组(维生素 B₁₂ 组)各项指标分别与 B 组、C 组比较:SIT 明显增加、TBUT 显著延长、角膜荧光素点染减少,角膜较前清亮,荧光素点染减少,CFS 降低,且差异均有统计学意义($P<0.05$)。ELISA 和免疫组织化学染色结果均显示,与 A 组相比,B 组和 C 组角膜组织中 MMP-9 和 TNF- α 的表达量均显著升高($P<0.05$);D 组角膜组织中 MMP-9 和 TNF- α 的表达量较 B 组和 C 组均有所下降,但仍较 A 组高($P<0.05$)。**结论** MMP-9 及 TNF- α 两种炎症因子均参与 DED 的发生发展。维生素 B₁₂ 滴眼液可能通过促进角膜上皮修复改善眼表不适症状。维生素 B₁₂ 滴眼液可能通过降低小鼠角膜组织中 MMP-9 及 TNF- α 的表达,增加泪液分泌量,延长泪膜破裂时间,减少角膜荧光素点染,减轻角膜炎症反应,从而达到治疗 DED 的目的。

关键词 干眼症模型;MMP-9;TNF- α ;维生素 B₁₂ 滴眼液;炎症介质

中图分类号 R 777

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2026)03 - 0424 - 08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2026.03.006

干眼症(dry eye disease, DED)是指由各种原因导致的泪液质或量异常、泪膜稳定性下降的慢性眼表炎性疾病。两版国际干眼指南^[1-2]均将 DED 分为 3 种类型:泪液分泌减少型、蒸发过强型和混合型。混合型 DED 是临床上最常见的 DED,因此,本研究预计采取风扇模拟干燥环境联合皮下注射氢溴酸

东莨菪碱来诱导混合型 DED 模型。

维生素 B₁₂ 在 DED 治疗中的潜在作用近年来受到关注。有报道^[3]称,维生素 B₁₂ 滴眼液可能通过增加睫状肌血流量来增加睫状肌的调节灵敏度,增加泪液分泌量,进而缓解视疲劳患者的干眼症状。Yang et al^[4]提到维生素 B₁₂ 雾化治疗 DED 时,在改善症状和体征方面有显著效果,尤其是在提高泪膜破裂时间和角膜上皮修复方面表现出相对较强的作用,证实了维生素 B₁₂ 在 DED 相关角膜上皮损伤修复中的作用。近年来,大量动物实验及临床研究^[5-6]认为 DED 是以眼表产生炎症介质和趋化因子为特征的眼表疾病,炎症反应是 DED 发病的最主要机制。其中,基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和肿瘤坏死因子 α (tumor necro-

2025-12-08 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81460090);内蒙古自治区卫生健康委医疗卫生科技计划项目(编号:202201332);内蒙古自治区自然科学基金项目(编号:2023LHMS08005);内蒙古医科大学高等教育教学改革研究与实践项目(编号:NYJXGGSJ2024008)

作者简介:董 慧,女,硕士研究生;

赵海霞,女,博士,教授,博士生导师,通信作者,E-mail:nmgzhzx@163.com

sis factor- α , TNF- α) and 与 DED 的发病过程密切相关。因此,本研究欲探索维生素 B₁₂ 滴眼液对 DED 小鼠角膜 MMP-9 和 TNF- α 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物的筛选和饲养条件 雌性 C57BL/6 小鼠 50 只,6~8 周龄,体质量 18~22 g。研究期间,所有实验动物饲养于恒温环境中(室温 22~25 °C),12 h 明暗交替(AM 8:00—PM 8:00)。本研究经内蒙古医科大学附属医院医学伦理委员会批准(伦理批准号:YJS2025053),本研究所涉及的所有实验方法及处理均遵循《赫尔辛基宣言》。

1.2 主要实验试剂及仪器 东莨菪碱氢溴酸盐购自上海麦克林生化科技股份有限公司,维生素 B₁₂ 滴眼液购自日本参天制药有限公司,泪液检测酚红棉线、荧光素钠眼科检测试纸购自天津景明技术开发有限公司,兔抗鼠 MMP-9 多克隆抗体、兔抗鼠 TNF- α 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,小鼠 MMP-9 和 TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司;眼科显微手术器械购自上海生物科技有限公司,裂隙检查仪 011356 购自日本拓普康(TOPCON)公司,显微镜玻片扫描仪 LV1、组织包埋机购自德国徕卡公司,半自动石蜡切片机 S700 购自深圳瑞沃德生命科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 诱导 DED 动物模型 50 只健康雌性 C57BL/6J 小鼠,于恒温环境、12 h 明暗交替的环境中适应性饲养 1 周后,随机选取 40 只采用人工模拟的干燥环境(空气湿度<30%)联合皮下注射氢溴酸东莨菪碱(0.5 mg/mL,剂量为 0.5 mL,TID,持续 3 周),诱导混合型 DED 模型;其余 10 只作为空白组(A 组, $n=10$)置于正常湿度房间中正常饲养即可。造模后,测得所有小鼠的基础泪液分泌实验(schirmer I test, SIT)、泪膜破裂时间(tear break up time, TBUT)和角膜荧光素染色评分(corneal fluorescence staining score, CFS),筛选造模成功的小鼠入组,入组标准为 TBUT<(2.5 \pm 0.5)s、CFS \geq 12^[7-8]。

1.3.2 实验动物分组 造模后,根据上述入组标准选取 30 只 DED 小鼠模型入组,随机分为 3 组,分别为 B 组(模型组, $n=10$)、C 组(PBS 组, $n=10$)、D 组(VitB₁₂ 组, $n=10$)。A、B 组正常喂养,不给予任何处置;C、D 组分别用 PBS 和维生素 B₁₂ 滴眼液滴眼治疗,治疗 21 d 后处死各组小鼠,取角膜组织进行 HE

染色初步评估各组小鼠角膜组织形态学差异,采用 ELISA 和免疫组织化学染色法检测各组小鼠角膜组织中 MMP-9 及 TNF- α 的表达水平。

1.3.3 SIT 实验 由于小鼠配合欠佳,故测量前采取腹腔注射 4% 水合氯醛(0.1 mL/10 g)麻醉小鼠;由于小鼠结膜囊容量较小,故采用酚红棉线检测泪液分泌量。左手轻轻拉开小鼠下睑,右手用显微镊夹取一根酚红棉线,放置于下睑中外 1/3 结膜囊内,随后手动闭合小鼠眼睑,计时 15 s,取出酚红棉线,用游标卡尺测量酚红棉线由黄色变为红色部分的长度即为泪液分泌量,单位为毫米(mm),测量 3 次,取平均值记录。

1.3.4 TBUT 继上述步骤后,确保小鼠仍处于麻醉状态,右手持荧光素钠眼科检查试纸蘸取少量生理盐水,左手轻轻拉开小鼠下睑,将荧光素染色液滴入结膜囊内,手动使小鼠瞬目数次,荧光素染液在角膜上分布均匀后,将小鼠置于裂隙灯显微镜,先保持小鼠眼睑闭合,随后手动扒开眼睑,此刻计时,观察角膜上出现第一个黑斑的时间,即为泪膜破裂时间,单位为秒(s),测量 3 次,取平均值记录。

1.3.5 CFS 继上述步骤后,确保小鼠仍处于麻醉状态,在裂隙灯显微镜下用钴蓝光观察小鼠角膜荧光素点染情况,拍照记录并评分,每次由同一人评分。参考 Pauly et al^[9] 的评分方法,将角膜平均分为 4 个象限,每个象限分 5 个等级,计分范围 0~4 分,4 个象限共计 16 分,评分标准如下表(表 1)。

表 1 角膜荧光素染色评分标准

Tab. 1 Grading criteria of corneal fluorescein staining

CFS score	Corneal staining
0	Clear, no staining
1	Minor staining, fewer than 30 lesions
2	The number of staining dots exceeds 30, but they do not form a continuous pattern
3	Diffuse staining, no patchy staining
4	Patchy staining

1.3.6 制作石蜡切片并进行 HE 染色 4% 多聚甲醛固定眼球;将样本置于浓度递增的酒精脱水;清洗后包埋浸蜡;展片、烤片,置于干燥玻片盒内保存,备用。二甲苯脱蜡,各级浓度酒精(高→低);PBS 返蓝;伊红染色,各级浓度酒精(低→高),二甲苯透明,晾干后用中性树胶封片。

1.3.7 免疫组织化学染色 脱蜡水化;3% 过氧化氢溶液灭活内源性酶;抗原修复;滴加 5% BSA 封闭液,将切片放置于湿盒中,再将湿盒放于 37 °C 水浴

锅中 20 min 进行封闭;一抗孵育;二抗孵育;滴加 DAB 显色剂;苏木精染色;1% 盐酸酒精分化;脱水;中性树脂胶封片。

1.3.8 ELISA 实验 给予药物治疗 21 d 后处死各组小鼠并取下角膜,每组 10 个,放入含 500 μL PBS 的 EP 管中,4 °C,1 000 r/min 离心 10 min 取上清液。分别设标准品孔、待测样本孔。

加样;洗板;加生物素-抗体标记工作液;洗板;加 HRP-链霉素亲和素洗板;加 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)显色底物;当标准孔中呈现较明显的蓝色梯度时,即可加反应终止液终止反应,向每孔加入 50 μL 反应终止液,颜色将由蓝色立即变为黄色;测量吸光度 A 值

1.4 统计学处理 采用 ImageJ 图像分析软件分析免疫组织化学染色图片。采用 GraphPad Prism 9.5 软件对数据进行分析,符合正态分布的数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,若满足方差齐则采用 Turkey 事后检验进行组间多重比较;若方差不齐采用 Brown-Forsythe 和 Welch ANOVA 检验进行矫正,多组间两两比较采用 Dunnett *t* 检验进行显著性分析。采用双因素方差分析比较各组间在不同时间点的差异。在本研究中,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干燥环境联合氢溴酸东莨菪碱诱导 DED 小鼠模型的效果及评价 与 A 组相比,B 组、C 组、D 组 SIT 和 TBUT 均缩短,CFS 增加,以上各项指标的差异均有统计学意义($P<0.05$);B 组、C 组、D 组之间上述各项指标的差异均无统计学意义($P>0.05$)(表 2)。

A 组角膜清亮,未见分泌物及角膜荧光素着色,B 组、C 组、D 组角膜荧光素均可见明显着色,有少许分泌物(图 1)。

2.2 DED 相关指标的变化分析

2.2.1 SIT 实验 不同时间点组内比较:D 组 SIT 逐

表 2 诱导 DED 小鼠模型的效果及评价 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Efficacy and evaluation of induced dry eye syndrome mouse models ($\bar{x}\pm s$)

Group	SIT (mm)	TBUT (s)	CFS
A	8.42±0.43 ^{#&}	5.48±0.22 ^{#&}	0±0 ^{#&}
B	2.72±0.37 [*]	2.46±0.32 [*]	13.70±0.95 [*]
C	2.65±0.36 [*]	2.40±0.17 [*]	13.40±0.84 [*]
D	2.66±0.20 [*]	2.38±0.21 [*]	13.10±1.10 [*]
F value	672.0	286.3	637.1

^{*} $P<0.05$ vs A group; [#] $P<0.05$ vs B group; [&] $P<0.05$ vs D group.

渐增加,组内不同时间点比较,除处理第 7 天与第 0 天无差别外,各时间点较 B 组和 C 组增加,但尚未超过 A 组,且差异均有统计学意义($P<0.05$);B 组 SIT 除处理第 21 天与第 0 天有差异外,其他时间点两两比较差异均无统计学意义($P>0.05$);A 组和 C 组 SIT 各时间点组内相比,差异均无统计学意义($P>0.05$)(表 3 和图 2)。

同一时间点组间比较:治疗前,B 组、C 组、D 组之间 SIT 差异无统计学意义($P>0.05$);与 A 组相比,B 组、C 组、D 组各时间点 SIT 均减少($P<0.05$);随着治疗时间的延长,D 组 SIT 除治疗第 7 天与 C 组差异无统计学意义外,其余各时间点与其他 3 组差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 各组小鼠不同时间点 SIT (mm, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 3 SIT of mice in each group at different time points (mm, $\bar{x}\pm s$)

Group	0 d	7 d	14 d	21 d
A	8.42±0.43 ^{#&}	8.45±0.30 ^{#&}	8.50±0.29 ^{#&}	8.25±0.39 ^{#&}
B	2.72±0.37 [*]	2.55±0.22 ^{*&}	2.44±0.23 ^{*&}	2.30±0.22 ^{*&}
C	2.65±0.36 [*]	2.69±0.26 [*]	2.61±0.26 ^{*&}	2.72±0.49 ^{*&}
D	2.66±0.20 [*]	2.96±0.32 ^{*#}	5.60±0.35 ^{*#}	7.32±0.51 ^{*#}

^{*} $P<0.05$ vs A group; [#] $P<0.05$ vs B group; [&] $P<0.05$ vs D group.

2.2.2 泪膜破裂时间(TBUT) 不同时间点组内比较:A 组组内比较除第 21 天较第 0 天明显缩短外,其余各时间点组内比较差异均无统计学意义($P>0.05$);D 组随着治疗时间的延长,TBUT 逐渐延长($P<0.05$);B 组和 C 组内各时间点比较,TBUT 变化

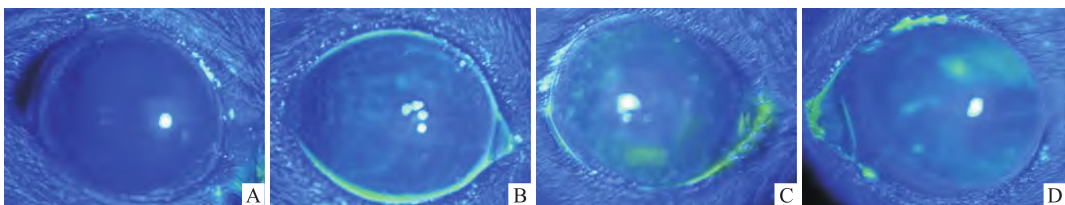


图 1 造模后各组小鼠角膜荧光素染色

Fig. 1 Corneal fluorescein staining of mice in each group after molding

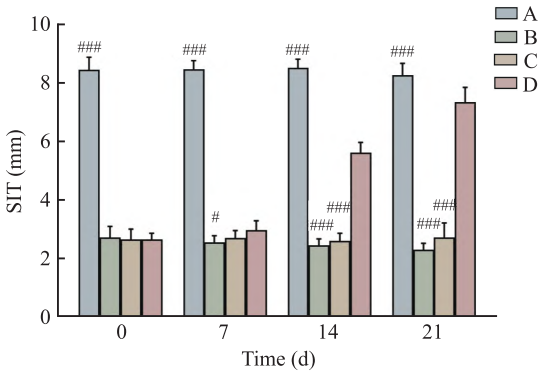


图2 各组小鼠不同时间点泪液分泌量

Fig. 2 SIT of mice in each group at different time points

$P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs D group.

不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表4和图3)。

同一时间点组间比较:治疗前,B组、C组、D组之间TBUT差异无统计学意义($P > 0.05$);B组、C组、D组各时间点分别与A组进行比较,TBUT均明显缩短,差异均有统计学意义($P < 0.05$);各时间点组间比较时,D组TBUT比相同时间点B组和C组均延长,但尚未超过A组,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表4 各组小鼠不同时间点TBUT (s, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 TBUT of mice in each group at different time points (s, $\bar{x} \pm s$)

Group	0 d	7 d	14 d	21 d
A	5.48±0.22 [#]	5.15±0.34 ^{*#}	5.10±0.36 [#]	4.95±0.37 [#]
B	2.46±0.32 [*]	2.25±0.24 [*]	2.28±0.15 ^{*#}	2.13±0.28 ^{*#}
C	2.40±0.17 [*]	2.61±0.42 ^{*#}	2.44±0.28 ^{*#}	2.38±0.30 ^{*#}
D	2.38±0.21 [*]	3.18±0.42 ^{*#}	3.66±0.27 ^{*#}	4.57±0.24 ^{*#}

* $P < 0.05$ vs A group; # $P < 0.05$ vs B group; [#] $P < 0.05$ vs D group.

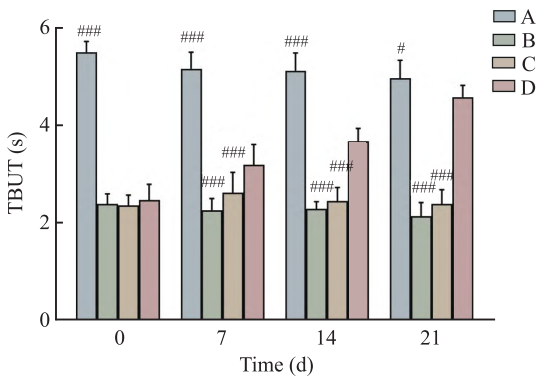


图3 各组小鼠不同时间点泪膜破裂时间

Fig. 3 TBUT of mice in each group at different time points

$P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs D group.

2.2.3 角膜荧光素染色情况及其评分(CFS) A组小鼠结膜各时间点均无充血,角膜清亮,无分泌

物,角膜无荧光素着色;B组和C组小鼠角膜各时间点均有明显荧光素着色,但区别不明显;在未开始治疗时,D组与A组相比,角膜着色较明显,经过21 d维生素B₁₂滴眼液治疗后,角膜情况逐渐较前好转,仅角膜周边有少许荧光素着色,角膜清亮(图4)。

不同时间点组内比较:随着维生素B₁₂滴眼液治疗时间的延长,D组CFS逐渐降低($P < 0.05$);A组和B组各时间点组内比较时,差异无统计学意义($P > 0.05$);C组CFS除第21天与第0天差异有统计学意义外,其他各时间点两两比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表5和图5)。

同一时间点组间比较:治疗前,B组、C组、D组CFS之间差异无统计学意义($P > 0.05$),B组、C组、D组CFS均较A组明显升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$);维生素B₁₂滴眼液治疗后,D组CFS除第7天与C组差异无统计学意义外,其他各时间点与其他3组差异均有统计学意义,明显较B组和C组降低,但仍较A组高($P < 0.05$)。

表5 各组小鼠不同时间点CFS ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 CFS of mice in each group at different time points ($\bar{x} \pm s$)

Group	0 d	7 d	14 d	21 d
A	0±0 [#]	0±0 [#]	0±0 [#]	0±0 [#]
B	13.70±0.95 [*]	13.20±1.23 ^{*#}	13.60±1.08 ^{*#}	14.00±1.33 ^{*#}
C	13.40±0.84 [*]	12.70±1.70 [*]	12.20±0.92 ^{*#}	11.70±1.16 ^{*#}
D	13.10±1.10 [*]	11.90±1.52 ^{*#}	8.50±1.27 ^{*#}	5.80±1.03 ^{*#}

* $P < 0.05$ vs A group; # $P < 0.05$ vs B group; [#] $P < 0.05$ vs D group.

2.3 角膜组织的形态学变化 A组角膜上皮表面较为光滑,细胞形态整齐,而B组和C组角膜上皮水肿且细胞的厚度增加,表层上皮出现较大的不规则细胞,角膜基质层中有较多的炎性细胞浸润。相比之下,D组角膜上皮细胞形态较为规整、光滑,角膜组织学形态优于B组和C组,角膜上皮厚度及角膜上皮形态与A组接近(图6)。

2.4 角膜组织中MMP-9和TNF- α 的浓度变化

2.4.1 ELISA 实验结果 治疗21 d后各组小鼠角膜组织中MMP-9的浓度变化如下:D组MMP-9的浓度较B组和C组明显下降,但仍比A组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。B组、C组、D组角膜组织中MMP-9浓度均较A组高($P < 0.05$);B组和C两组角膜组织中MMP-9的差异无统计学意义($P > 0.05$)(图7)。

治疗21 d后各组小鼠角膜组织中TNF- α 的浓度变化如下:D组TNF- α 的浓度较B组和C组下降,但

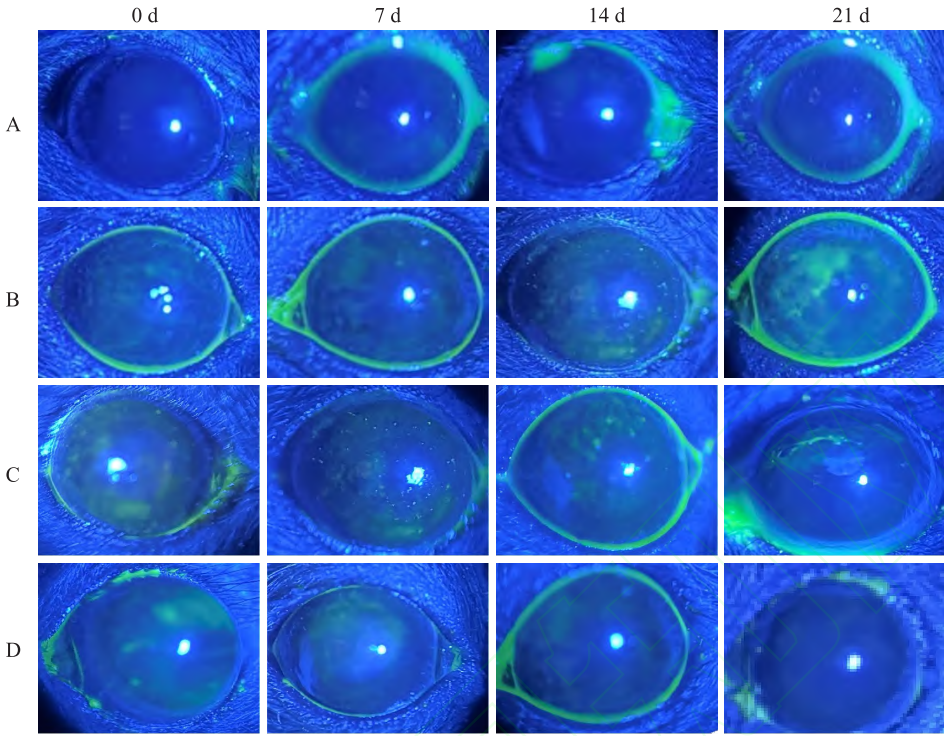


图4 各组小鼠不同时间点角膜荧光素染色

Fig. 4 Fluorescein staining of the cornea of mice in each group at different time points

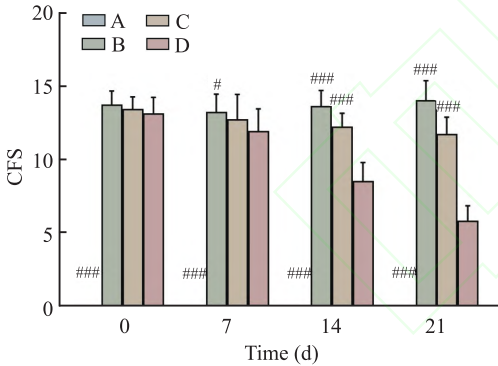


图5 各组小鼠不同时间点角膜荧光素钠染色评分

Fig. 5 CFS of mice in each group at different time points

$P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs D group.

仍较A组高。差异均有统计学意义($P < 0.05$);B组、C组、D组角膜组织中TNF- α 浓度均较A组高($P < 0.05$);B组和C两组角膜组织中TNF- α 的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4.2 免疫组织化学染色结果 免疫组织化学染

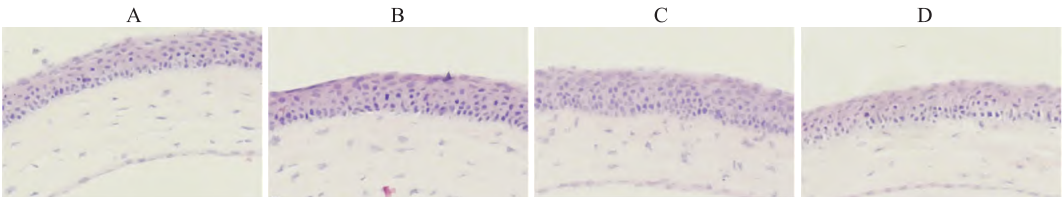


图6 各组小鼠角膜组织HE染色 ×20

Fig. 6 Hematoxylin and eosin staining of corneal tissue of mice in each group ×20

色可以对角膜组织中的MMP-9和TNF- α 的表达进行初步定位、定量、定性评估,阳性产物染为棕黄色(图8)。

与A组相比,B组、C组、D组角膜组织中MMP-9和TNF- α 的表达水平均显著增加($P < 0.05$);与B组和C组相比,D组MMP-9和TNF- α 的表达水平均显著下降($P < 0.05$);B组和C组之间相比,MMP-9和TNF- α 的表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)(图9)。

3 讨论

在DED发病过程中,眼表炎症的恶性循环会加重角膜上皮的损伤^[10],因此,及时阻断眼表炎症的发生发展具有重要意义。MMP-9是一种重要的蛋白酶,参与干DED的发生发展。MMP-9能够分解角膜上皮细胞的膜蛋白,破坏角膜上皮的完整性,从而影响角膜上皮屏障功能^[11]。在MMP-9敲除的小

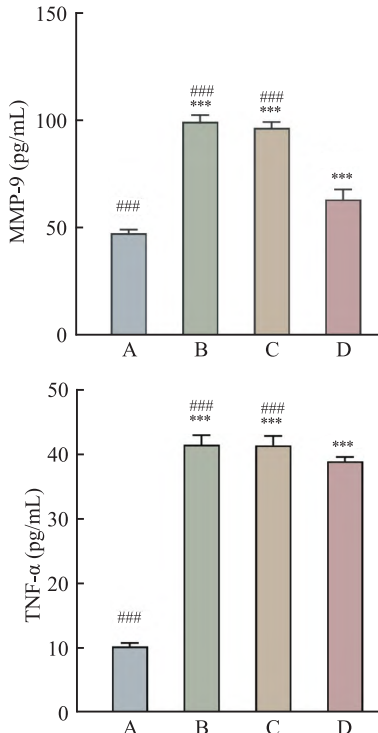


图7 ELISA法检测各组小鼠角膜组织中MMP-9和TNF-α的浓度

Fig. 7 Measurement of MMP-9 and TNF-α concentrations in corneal tissue of mice in each group using ELISA

***P<0.001 vs A group; ###P<0.001 vs D group.

鼠模型中,角膜上皮疾病的发生率显著降低,干眼症状也得以改善^[12]。这表明MMP-9不仅参与了DED的病理过程,还可能通过促进细胞凋亡进一步加剧眼表损伤;DED患者眼表组织中TNF-α水平显著升高,且其水平与疾病严重程度呈正相关^[13]。TNF-α通过激活多种炎症通路,导致眼表上皮细胞和免疫细胞的活化,进而引发局部炎症反应。这种

炎症反应不仅会破坏泪腺组织的正常功能,还会导致泪液分泌减少和泪膜稳定性下降。

本研究进一步探索了DED模型中MMP-9和TNF-α表达量的关系。在模型组角膜组织中,MMP-9和TNF-α的表达量较空白组明显增加,且空白组和模型组中MMP-9的浓度均较TNF-α高,这提示,在早期DED患者中,可能MMP-9的升高更容易被检测到。另外,经维生素B₁₂滴眼液治疗后,MMP-9和TNF-α的浓度均降低,但仍高于空白组,这说明维生素B₁₂在降低角膜组织MMP-9和TNF-α的表达方面有一定的作用,但尚未能使其恢复至正常水平,这表明,除此之外可能还有其他作用机制有待探索。

通过观察,显示维生素B₁₂滴眼液能显著改善DED小鼠的多项DED相关指标。与模型组和PBS组相比,经维生素B₁₂滴眼液治疗的小鼠,SIT明显增加、TBUT显著延长,角膜荧光素染色阳性区域减少,CFS下降。

组织学检测进一步证实了维生素B₁₂的治疗效果。HE染色表明了维生素B₁₂组小鼠的角膜上皮形态更为规整;同时,ELISA和免疫组织化学染色结果表明,该组角膜组织中MMP-9和TNF-α的表达量相较于模型组显著降低。而PBS组与模型组相比,MMP-9和TNF-α的表达水平几乎无差别。这表明,维生素B₁₂滴眼液可能通过降低角膜组织中MMP-9和TNF-α的表达量缓解干眼症状。研究^[14]表明DED与氧化应激存在关联,而透明质酸/维生素B₁₂滴眼液能够减轻氧化应激和炎症反应,从而改善干眼症状。这些研究结果与本研究相似,均证实了维

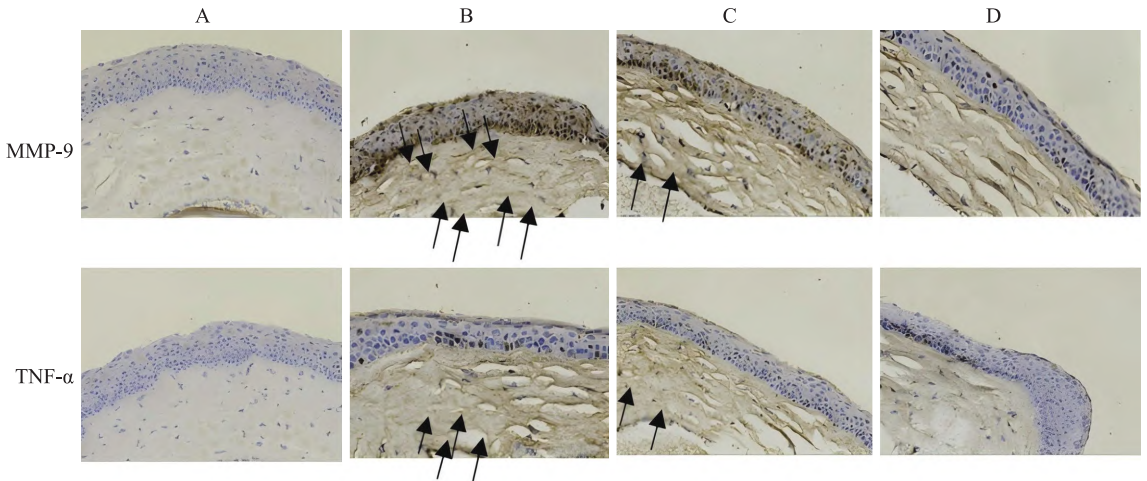


图8 各组小鼠角膜组织MMP-9和TNF-α的表达情况 ×20

Fig. 8 Expression of MMP-9 and TNF-α in corneal tissue of mice in each group ×20

The black arrow indicates a positive staining result.

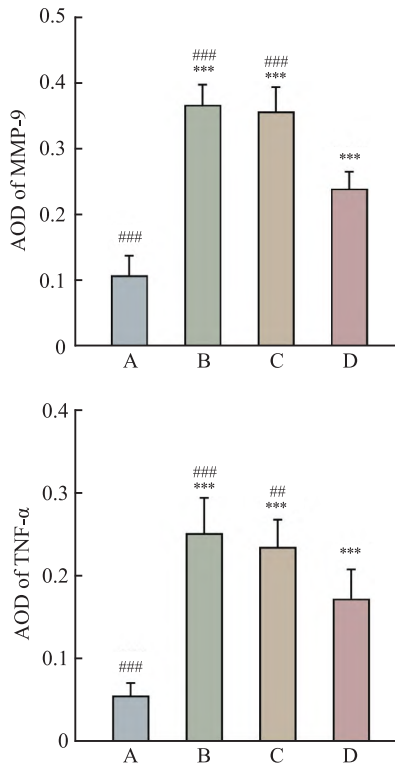


图9 免疫组织化学染色法检测各组小鼠角膜组织中 MMP-9 和 TNF-α 的表达水平

Fig. 9 Immunohistochemical staining was used to detect the expression levels of MMP-9 and TNF-α in the corneal tissues of mice in each group

***P<0.001 vs A group; **P<0.01, ###P<0.001 vs D group.

生素 B₁₂能够抑制炎症反应,对缓解DED症具有积极作用。

参考文献

[1] The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)[J]. Ocul Surf, 2007, 5(2): 75-92. doi: 10.1016/s1542-0124(12)70081-2.

[2] Craig J P, Nichols K K, Akpek E K, et al. TFOS DEWS II definition and classification report [J]. Ocul Surf, 2017, 15(3): 276-83. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.008.

[3] 郭 嫻, 杨洪滨, 冯卓蕾. 维生素B12滴眼液缓解视频终端视疲劳的临床观察[J]. 国际眼科杂志, 2016, 16(7): 1329-31. doi: 10.3980/j.issn.1672-5123.2016.7.32.

[3] Guo Q, Yang H B, Feng Z L. Clinical observation of vitamin B₁₂ eye drops for vision fatigue caused by visual display terminals[J]. Int Eye Sci, 2016, 16(7): 1329-31. doi: 10.3980/j.issn.1672-5123.2016.7.32.

[4] Yang J, Liu Y, Xu Y, et al. A new approach of ocular nebulization with vitamin B₁₂ versus oxytocin for the treatment of dry eye disease: an *in vivo* confocal microscopy study[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 2381-91. doi:10.2147/DDDT.S203464.

[5] Wang H H, Chen W Y, Huang Y H, et al. Interleukin-20 is involved in dry eye disease and is a potential therapeutic target[J]. J Biomed Sci, 2022, 29(1): 36. doi: 10.1186/s12929-022-00821-2.

[6] Menon N G, Goyal R, Lema C, et al. Proteoglycan 4 (PRG4) expression and function in dry eye associated inflammation[J]. Exp Eye Res, 2021, 208: 108628. doi: 10.1016/j.exer.2021.108628.

[7] 王彦方. 碱性成纤维细胞生长因子对干眼小鼠模型眼表白细胞介素-10和白细胞介素-1β蛋白表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(14): 1671-4. doi:10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.14.025.

[7] Wang Y F. Effects of basic fibroblast growth factor on the expression of interleukin-10 and interleukin-1β in ocular surface of dry eye mice model [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2018, 34(14): 1671-4. doi:10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.14.025.

[8] 夏金丹. S100A8/A9激活Wnt/β-catenin信号通路调控眼表鳞状上皮化生的机制研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2021. doi: 10.27234/d.cnki.gnhuu.2021.000054.

[8] Xia J D. The mechanism of S100A8/A9 activating Wnt/β-catenin signaling pathway to regulate squamous Metaplasia of ocular surface [D]. Hengyang: University of South China, 2021. doi: 10.27234/d.cnki.gnhuu.2021.000054.

[9] Pauly A, Brignole-Baudouin F, Labbé A, et al. New tools for the evaluation of toxic ocular surface changes in the rat [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(12): 5473-83. doi: 10.1167/iovs.06-0728.

[10] 董 慧, 刘 佳, 赵天祺, 等. 基于Wnt/β-catenin通路探讨干眼症的发病机制[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(12): 2246-51. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.025.

[10] Dong H, Liu J, Zhao T Q, et al. The pathogenesis of dry eye disease was explored based on the Wnt/β-catenin pathway[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(12): 2246-51. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.025.

[11] Gordon G M, Ledee D R, Feuer W J, et al. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells[J]. J Cell Physiol, 2009, 221(2): 402-11. doi:10.1002/jcp.21869.

[12] Pflugfelder S C, Farley W, Luo L, et al. Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye [J]. Am J Pathol, 2005, 166(1): 61-71. doi:10.1016/S0002-9440(10)62232-8.

[13] Shettle L, McLaurin E, Martel J, et al. Topical anti-TNFα agent licamimab (OCS-02) relieves persistent ocular discomfort in severe dry eye disease: a randomized phase II study[J]. Clin Ophthalmol, 2022, 16: 2167-77. doi:10.2147/OPHT.S366836.

[14] Macri A, Scanarotti C, Bassi A M, et al. Evaluation of oxidative stress levels in the conjunctival epithelium of patients with or without dry eye, and dry eye patients treated with preservative-free hyaluronic acid 0.15 % and vitamin B₁₂ eye drops [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2015, 253(3): 425-30. doi: 10.1007/s00417-014-2853-6.

Effect of vitamin B₁₂ eye drops on the expression of MMP-9 and TNF- α in the cornea of mice with dry eye disease

Dong Hui, Zheng Huacheng, Wang Weiting, Zhao Haixia

(*Ophthalmic Optics Center of Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050*)

Abstract Objective To investigate how vitamin B₁₂ eye drops regulate MMP-9 and TNF- α expression levels in the corneas of dry eye disease (DED) mouse model induced by a combination of an artificially simulated dry environment (air humidity <30%) and subcutaneous injection of hyoscine hydrobromide. **Methods** Fifty C57BL/6 female mice were used in the study. 10 mice formed A group (blank control), while the remaining 40 mice were subjected to dry eye disease induction through subcutaneous injection of scopolamine hydrobromide in a controlled environment with <30% air humidity. All mice underwent schirmer I test (SIT), tear break-up time (TBUT), and corneal fluorescence staining score (CFS) evaluations. Mice meeting modeling criteria were randomly assigned to three groups: B group (model group), C group (PBS control), and D group (vitamin B₁₂ group). 0, 7, 14, and 21 days after treatment, each group received TBUT, SIT, CFS, and corneal inflammation assessments. Macroscopic analysis evaluated the efficacy of vitamin B₁₂ eye drops in treating dry eye. After 21 days of treatment, all mice were euthanized *via* cervical dislocation and their corneas analyzed using HE staining to examine morphological changes. ELISA and immunohistochemical methods were employed to detect MMP-9 and TNF- α expression levels in corneal tissues across groups. **Results** In dry environments (air humidity <30%), subcutaneous injection of scopolamine hydrobromide induced changes in dry eye-related indicators in mice: SIT significantly decreased, TBUT significantly shortened, corneal fluorescein staining increased, and CFS all significantly elevated ($P < 0.05$), indicating successful establishment of the dry eye model. A total of 30 dry eye mice were enrolled. When the dry eye model was successfully established without drug intervention, no statistically significant differences were observed between B group, C group and D group in terms of TBUT, SIT, corneal fluorescein staining, or CFS. Compared with A group, B group, C group and D group showed statistically significant differences in reduced SIT, shortened TBUT, increased corneal fluorescein staining, and elevated CFS ($P < 0.05$). After drug intervention, D group (vitamin B₁₂ group) exhibited significantly increased SIT, prolonged TBUT, reduced corneal fluorescein staining, clearer corneas, decreased fluorescein staining, and lower CFS compared with B and C groups ($P < 0.05$). ELISA and immunohistochemical staining results showed that compared with A group, B and C groups exhibited significantly increased expression of MMP-9 and TNF- α in corneal tissues ($P < 0.05$). D group showed decreased expression of MMP-9 and TNF- α compared with B and C groups but remained higher than A group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of MMP-9 and TNF- α in the corneal tissues of mice with dry eye is elevated, suggesting that both inflammatory factors, MMP-9 and TNF- α , are involved in the development of dry eye. Vitamin B₁₂ eye drops may improve the symptoms of ocular surface discomfort by promoting the repair of the corneal epithelium. Vitamin B₁₂ eye drops may increase tear secretion, prolong tear film break up time, reduce corneal fluorescein staining, and alleviate the inflammatory reaction of the cornea by decreasing the expression of MMP-9 and TNF- α in the corneal tissues of the mice, thus playing a therapeutic role in the treatment of dry eye disease.

Key words dry eye disease model; MMP-9; TNF- α ; vitamin B₁₂ eye drops; inflammatory mediators

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 81460090); Health Science and Technology Program of the Health Commission of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 202201332); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2023LHMS08005); Higher Education Teaching Reform Research and Practice Project of Inner Mongolia Medical University (No. NYJXGGSJ2024008)

Corresponding author Zhao Haixia, E-mail: nmghzhx@163.com