

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学 号: 24520111153336

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕士学位论文

# 苯扎氯铵致结膜下组织纤维化机制的研究

The mechanism of benzalkonium chloride induced  
subconjunctival fibrosis

黄彩虹

指导教师姓名: 陈永雄 教授

专 业 名 称: 药 理 学

论文提交日期: 2014 年 05 月

论文答辩时间: 2014 年 05 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2014 年 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为( )课题(组)的研究成果，获得( )课题(组)经费或实验室的资助，在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人（签名）：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（      ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于      年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（      ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

## 摘要

**目的:** 苯扎氯铵 (benzalkonium chloride, BAC) 是滴眼液中最常用的防腐剂。大量临床及实验研究表明, 长期使用含 BAC 的滴眼液会引起一系列的眼表不良反应。本研究主要探讨 BAC 致结膜下组织纤维化的机制。

**方法:** SD 雄性大鼠 45 只, 随机分成对照组、实验组和细胞培养组, 每组 15 只。对照组和实验组分别用 PBS 和 0.01% BAC 滴左眼, 每天两次, 每 12 小时一次。一个月后, 取大鼠左眼球结膜组织提取蛋白和 RNA 及制备石蜡包埋切片; 细胞培养组取大鼠左眼球结膜成纤维细胞(CFs)进行原代培养, 分别用 PBS、0.00005% BAC、0.000075% BAC、0.000075% BAC + LY2157299 (TGF- $\beta$ R1 抑制剂, 200 $\mu$  M)、0.000075% BAC + NS-398 (COX-2 抑制剂, 100 $\mu$  M) 作用于细胞, 24 小时后提取蛋白和 RNA。以 Western Blot (WB) 和 qRT-PCR 方法检测结膜组织和原代培养的 CFs 的细胞外基质 (I 型胶原 $\alpha$  1 链, Col1A1; 纤维连接蛋白-1, FN-1), TGF- $\beta$  信号通路相关分子(TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ R1、TGF- $\beta$ R2、Smad2、Smad3、P-Smad3) 和 COX-2 的蛋白及 mRNA 表达水平, 并以苏木素-伊红染色法 (H&E)、苦味酸-酸性品红染色法 (Van Gieson's)、过碘酸-希夫染色法 (PAS) 和免疫组织化学染色法观察结膜下组织的病理改变及炎症细胞的浸润情况。

**结果:** H&E、Van Gieson's 及 PAS 染色结果显示, 0.01% BAC 处理组球结膜上皮细胞及杯状细胞的形态和数量与 PBS 对照组相比无明显不同, 但结膜下组织成纤维细胞密度轻微增加, 有明显的胶原纤维沉积; 免疫组织化学染色显示, 0.01% BAC 处理组球结膜下组织未见中性粒细胞和巨噬细胞浸润; WB 和 qRT-PCR 结果显示, BAC 处理组球结膜组织和原代培养的 CFs Col1A1、FN-1、COX-2、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ R1、Smad3、P-Smad3 蛋白或 mRNA 的表达均显著高于 PBS 对照组, 而 TGF- $\beta$ R2 和 Smad2 蛋白的表达与 PBS 对照组相比无明显差异; 0.000075% BAC + LY2157299 细胞处理组, P-Smad3、Col1A1 和 FN-1 的蛋白表达均显著低于 0.000075% BAC 处理组; 0.000075% BAC + NS-398 细胞处理组, TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ R1、Smad3、P-Smad3 蛋白表达均显著低于 0.000075% BAC 处理组。

**结论：** BAC 通过 COX-2 激活 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路，引起结膜下成纤维细胞产生大量细胞外基质从而引起结膜下组织纤维化。

**关键词：** 苯扎氯铵；结膜下组织纤维化；转化生长因子- $\beta$ ；环氧合酶-2

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Abstract

**Purpose:** Benzalkonium chloride (BAC) is the most common preservative in ophthalmic preparations. Large bodies of clinical and experimental studies have shown that long term use of topical drugs with BAC can induce a series of ocular surface disease, such as subconjunctival fibrosis. The purpose of this study is to investigate the mechanism underlying subconjunctival fibrosis caused by BAC.

**Methods:** 45 Sprague-Dawley male rats were randomly assigned to control group, experimental group and cell culture group of 15 rats each. In control and experimental groups, the left eye of rats were treated topically with PBS or 0.01% BAC twice daily for one month, respectively. In cell culture group, cells were isolated from left eye of rats and cultured. The primary conjunctival fibroblasts (CFs) were exposed for 24 hours to 0.00005% BAC, 0.000075% BAC, 0.000075% BAC+LY2157299 (a selective TGF- $\beta$ 1 inhibitor, 200 $\mu$  M), 0.000075% BAC+NS-398 (a selective COX-2 inhibitor, 100 $\mu$  M) and PBS, respectively. The expression of extracellular matrix (alpha-1 type I collagen and fibronectin-1), TGF- $\beta$  signaling pathway-related molecules (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, Smad2, Smad3 and phosphorylated Smad3) and COX-2 in bulbar conjunctival tissues and CFs were detected by Western blot (WB) and quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR). The pathological changes of bulbar conjunctival tissue of rats were examined by haematoxylin-eosin (H&E), Van Gieson's, periodic acid-Schiff (PAS) and immunohistochemical staining.

**Results:** Rats treated with 0.01% BAC exhibited a slight increase of the fibroblast density and more compact collagen deposition in the bulbar subepithelial connective tissues compared with rats treated with PBS. While there were no difference in inflammatory cell infiltration and alteration of epithelium and goblet cells in conjunctival tissues between the two groups. WB and qRT-PCR analysis showed that the expression of extracellular matrix (ECM), TGF- $\beta$  signaling pathway-related molecules and COX-2 were markedly increased in the bulbar conjunctival tissues of

rats exposed to 0.01% BAC and in CFs exposed to 0.00005% and 0.000075% BAC. In CFs, BAC-induced ECM expression was obviously decreased by LY2157299, while the BAC-induced activation of TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway was greatly attenuated by NS-398.

**Conclusion:** BAC-induced subconjunctival fibrosis is a consequence of excessive ECM expression of CFs through COX-2-mediated activation of TGF- $\beta$ 1/Smad3 Signaling Pathway.

**Key words:** Benzalkonium chloride; Subconjunctival fibrosis; Transforming growth factor- $\beta$  ; Cyclooxygenase-2.

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
<b>第一章 前 言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 苯扎氯铵与结膜下组织纤维化.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 苯扎氯铵及其结构.....	1
1.1.2 苯扎氯铵的杀菌作用.....	2
1.1.3 苯扎氯铵是滴眼液中最常用的防腐剂.....	2
1.1.4 苯扎氯铵的眼表毒性研究.....	3
1.1.4.1 临床前研究.....	3
1.1.4.2 临床研究.....	4
1.1.5 结膜下组织纤维化.....	4
1.1.5.1 组织纤维化.....	4
1.1.5.2 滴眼液中的苯扎氯铵与结膜下组织纤维化.....	5
<b>1.2 TGF-<math>\beta</math> 信号通路与结膜下组织纤维化.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 TGF- $\beta$ 及其受体.....	6
1.2.2 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路.....	7
1.2.3 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路与器官纤维化的关系.....	7
1.2.4 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路与眼部纤维化的关系.....	8
<b>1.3 环氧合酶-2 与结膜下组织纤维化 .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 环氧合酶的简介.....	9
1.3.2 COX-2 参与多种疾病的病理过程.....	9
1.3.3 COX-2 与器官组织的纤维化.....	10
1.3.4 COX-2 与 TGF- $\beta$ 在纤维化过程中的作用.....	11
<b>1.4 本论文研究的意义.....</b>	<b>11</b>
<b>第二章 实验材料与方 法 .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 实验材料和实验试剂.....</b>	<b>12</b>



2.1.1	实验动物、细胞株.....	12
2.1.2	主要化学试剂和耗材.....	12
2.1.3	抗体.....	13
2.1.4	细胞培养试剂.....	13
2.1.5	主要仪器.....	13
2.1.6	主要溶液的配制.....	15
2.1.6.1	组织染色相关溶液.....	15
2.1.6.2	细胞培养相关溶液.....	15
2.1.6.3	蛋白质抽提及电泳相关溶液.....	16
2.1.6.4	其他溶液.....	17
<b>2.2</b>	<b>实验方法.....</b>	<b>17</b>
2.2.1	动物实验.....	17
2.2.1.1	动物处理.....	17
2.2.1.2	球结膜组织蛋白的提取.....	17
2.2.1.3	球结膜组织 RNA 的提取.....	17
2.2.1.4	石蜡切片的制备.....	18
2.2.2	细胞实验.....	19
2.2.2.1	原代大鼠球结膜下成纤维细胞 (CFs) 的培养.....	19
2.2.2.2	细胞计数.....	19
2.2.2.3	细胞处理.....	19
2.2.2.4	细胞的存活率测定 (CCK-8 检测).....	20
2.2.2.5	细胞蛋白的提取.....	20
2.2.2.6	细胞 RNA 的提取.....	20
2.2.3	Western Blot 免疫印迹分析.....	21
2.2.3.1	BCA 法测定蛋白浓度.....	21
2.2.3.2	Western Blot 步骤.....	21
2.2.4	QRT-PCR 反应.....	22
2.2.4.1	逆转录.....	22
2.2.4.2	RT-PCR 反应.....	22
2.2.4.3	QPCR 反应.....	23
2.2.5	组织学和免疫组织化学染色.....	24
2.2.5.1	H&E 染色.....	24

2.2.5.2 PAS 染色.....	24
2.2.5.3 苦味酸-酸性品红染色.....	25
2.2.5.4 PMN 及 ED1 抗体的免疫组织化学染色.....	25
<b>第三章 结 果 .....</b>	<b>26</b>
3.1 0.01% BAC 诱导大鼠结膜下组织纤维化 .....	26
3.2 0.01% BAC 促进大鼠球结膜组织细胞外基质的表达 .....	30
3.3 0.01% BAC 激活大鼠球结膜组织 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路.....	31
3.4 低浓度 BAC 对结膜下成纤维细胞 (CFs) 无毒性影响 .....	33
3.5 低浓度 BAC 刺激 CFs 细胞外基质和 TGF- $\beta$ 1 /Smad3 信号通路相关分子的表达.....	34
3.6 低浓度 BAC 通过 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路刺激 CFs 表达细胞外基质.....	35
3.7 BAC 上调球结膜组织和 CFs COX-2 的表达 .....	37
3.8 低浓度 BAC 通过上调 COX-2 表达激活 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路.....	38
<b>第四章 讨 论 .....</b>	<b>40</b>
<b>第五章 结 论 .....</b>	<b>43</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>44</b>
<b>附录一 在学期间发表论文 .....</b>	<b>53</b>
<b>附录二 会议摘要 .....</b>	<b>54</b>
<b>附录三 综 述 .....</b>	<b>55</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>59</b>

## CATALOGUE

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>III</b>
<b>Chapter I Forewords</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Benzalkonium chloride and subconjunctival fibrosis</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Benzalkonium chloride and its structure .....	1
1.1.2 Bactericidal effect of benzalkonium chloride .....	2
1.1.3 Benzalkonium chloride is the most common preservative in ophthalmic preparations .....	2
1.1.4 Toxicity research of benzalkonium chloride on ocular surface .....	3
1.1.4.1 Preclinical research .....	3
1.1.4.2 Clinical research .....	4
1.1.5 Subconjunctival fibrosis .....	4
1.1.5.1 Tissue fibrosis .....	4
1.1.5.1 Benzalkonium chloride and subconjunctival fibrosis .....	5
<b>1.2 TGF-<math>\beta</math> signaling pathway and subconjunctival fibrosis</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 TGF- $\beta$ and its receptor .....	6
1.2.2 TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway .....	7
1.2.3 TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway and organ fibrosis .....	7
1.2.4 TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway and eye fibrosis .....	8
<b>1.3 Cyclooxygenase-2 and subconjunctival fibrosis</b> .....	<b>9</b>
1.3.1 Introduction of cyclooxygenase 2 .....	9
1.3.2 Cyclooxygenase 2 involves in the process of many diseases .....	9
1.3.3 Cyclooxygenase 2 and organ fibrosis .....	10
1.3.4 Cyclooxygenase 2 and TGF- $\beta$ signaling pathway in fibrosis .....	11
<b>1.4 Significance</b> .....	<b>11</b>
<b>Chapter II Materials and methods</b> .....	<b>12</b>

<b>2.1</b>	<b>Materials</b>	<b>12</b>
2.1.1	Animals and cell line	12
2.1.2	Major chemical reagents	12
2.1.3	Antibodies	13
2.1.4	Reagents for cell culture	13
2.1.5	Major equipments	13
2.1.6	Major buffers	15
2.1.6.1	Tissue staining buffers	15
2.1.6.2	Cell culture buffers	15
2.1.6.3	Protein extract and electrophoresis buffers	16
2.1.6.4	Other buffers	17
<b>2.2</b>	<b>Methods</b>	<b>17</b>
2.2.1	Animal experiment	17
2.2.1.1	Animal treatment	17
2.2.1.2	Extraction of bulbar conjunctival tissue protein	17
2.2.1.3	Extraction of bulbar conjunctival RNA	17
2.2.1.4	Preparation of paraffin section	18
2.2.2	Cell culture	19
2.2.2.1	Culture of primary CFs	19
2.2.2.2	Cell counting	19
2.2.2.3	Cell treatment	19
2.2.2.4	Cell survival assay(CCK-8 assay)	20
2.2.2.5	Extraction of CFs protein	20
2.2.2.6	Extraction of CFs RNA	20
2.2.3	Western Blot analysis	21
2.2.3.1	Protein concentration analysis by BCA assay	21
2.2.3.2	Western Blot analysis	21
2.2.4	QRT-PCR	22
2.2.4.1	Reverse transcriptase	22
2.2.4.2	RT-PCR	22

2.2.4.3	QRT-PCR .....	23
2.2.5	Histological staining .....	24
2.2.5.1	H&E staining .....	24
2.2.5.2	PAS staining .....	24
2.2.5.3	Van Gieson's staining .....	25
2.2.5.4	Immunohistochemistry staining .....	25
<b>Chapter III</b>	<b>Results .....</b>	<b>26</b>
3.1	Chronic application of 0.01% BAC induces rat bulbar subconjunctival fibrosis .....	26
3.2	Chronic application of 0.01% BAC promotes extracellular matrix expression in bulbar conjunctiva tissues .....	30
3.3	Chronic application of 0.01% BAC activates TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway in bulbar conjunctiva tissues .....	31
3.4	Low concentrations of BAC do not show toxicity to CFs .....	33
3.5	Low concentrations of BAC promote extracellular matrix and TGF- $\beta$ 1 /Smad3 signaling pathway related molecules expression in primary CFs .....	34
3.6	Low concentrations of BAC stimulate CFs to express ECM through TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway .....	35
3.7	BAC up-regulates the expression of COX-2 in bulbar conjunctiva tissues and CFs .....	37
3.8	Low concentrations of BAC activate TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway through COX-2 in CFs .....	38
<b>Chapter IV</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>40</b>
<b>Chapter V</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>43</b>
<b>References</b>	<b>.....</b>	<b>44</b>
<b>Appendix I</b>	<b>Publications .....</b>	<b>53</b>
<b>Appendix II</b>	<b>Meeting Abstract .....</b>	<b>54</b>

**Appendix III Review** .....55

**Acknowledgement** .....59

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 前言

苯扎氯铵 (benzalkonium chloride, BAC) 是滴眼液中最常用的防腐剂<sup>[1]</sup>。大量研究证实, BAC 不仅能杀灭病原微生物, 还会引起眼局部组织损伤, 主要表现在泪膜不稳定、新生血管生成、角膜神经损伤、角膜屏障功能破坏、结膜下组织纤维化等<sup>[2-6]</sup>。

结膜下组织纤维化在临床上十分常见, 主要表现为患者结膜下组织的成纤维细胞密度显著增加, 细胞外基质大量沉积<sup>[2]</sup>。有研究报道, 长期使用含 BAC 抗青光眼滴眼液的患者结膜活检标本含大量胶原纤维, 且患者滤过性手术常由于滤过通道瘢痕的形成而失败<sup>[7-10]</sup>。但目前临床上缺乏令人满意的治疗手段, 这主要是由于其发生机制尚不清楚。因此, 探讨其发生机制及解决此问题的有效途径, 将具有重要的临床意义。

先前大量研究表明 COX-2 和 TGF- $\beta$  信号通路在机体纤维化的病理过程发挥重要作用, 但在 BAC 诱导的结膜下组织纤维化过程中的作用尚无相关报道, 本论文将主要围绕这两个途径, 重点探讨 BAC 引起结膜下组织纤维化的可能发生机制。

### 1.1 苯扎氯铵与结膜下组织纤维化

#### 1.1.1 苯扎氯铵及其结构

苯扎氯铵 (BAC) 属于季铵盐类, 是一种双极性化合物, 分子式:  $C_{21}H_{38}NCl$ , 结构式如下图 1 所示。BAC 为十二烷基二甲基苄基氯化铵, 具有高度的水溶性, 在水溶液中离解成阳离子活性基团 (十二烷基二甲基苄基) 表现为强大的表面活性, 可改变细菌胞膜的通透性, 使菌体胞浆内的物质外渗, 阻碍其代谢而起灭菌作用<sup>[11]</sup>, 因而常作为抗菌剂。滴眼液中 BAC 的浓度一般控制在 0.004 - 0.02% 之间<sup>[12]</sup>。

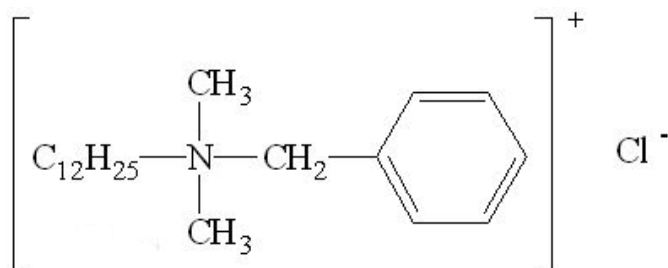


图1. 苯扎氯铵结构式

### 1.1.2 苯扎氯铵的杀菌作用

BAC 是一种具有阳离子表面活性的广谱杀菌剂，具有较强的杀菌作用，即使很低的浓度也能抗革兰氏阳性菌（金黄色葡萄球菌），当其与 0.1% EDTA 联合使用时，对革兰氏阴性菌（铜绿假单胞菌）的抗性会明显增强<sup>[2]</sup>。Charnock 观察了苯扎氯铵/乙二胺四乙酸（benzalkonium chloride/EDTA）、羟苯甲酸酯（parabens）、三氯丁醇（chlorobutanol）、氯化银复合物（silver chloride complex）和纯氧氯复合物（Purite-stabilized oxychloro complex）五种防腐剂的杀菌性，发现只有含 BAC/EDTA 的人工泪液能够有效抑制所有测试的微生物<sup>[13]</sup>。此外，BAC 还具有极好的抗真菌性，Day 等比较了阿莫西林、头孢唑林、氯霉素、莫西沙星、妥布霉素和 BAC 六种抗菌剂对从角膜炎患者中分离培养的镰刀菌和曲霉菌的抗性，结果显示与其他五种相比，BAC 对两种真菌的最小抑菌浓度（MIC）值均最小<sup>[14]</sup>。因此滴眼液中加入 BAC 后能有效维持药物的无菌状态，保证滴眼液多次使用的安全性。

### 1.1.3 苯扎氯铵是滴眼液中最常用的防腐剂

滴眼液中通常会加入防腐剂用于抑制病原微生物生长和增加药物的稳定性。BAC 杀菌作用强大，而且具有低过敏性，与早期用于眼科制剂的防腐剂，如汞制剂和葡萄糖酸氯己定相比，短期内使用含 BAC 的滴眼液引起相对较少的过敏反应，临床上显示出较好的安全性<sup>[2]</sup>。自 20 世纪 50 年代至今，BAC 一直作为最常用的防腐剂用于滴眼液，几乎所用的青光眼滴眼液中都含有 BAC。有研究报道 BAC 还可以增强药物的渗透性，提高活性成分的浓度，使药物更好地刺激或抑制靶受体，从而发挥更有效的作用。早在 1975 年，Tonjum 等就发现 BAC 可以增强兔角膜的渗透性<sup>[15]</sup>。临床研究也显示，当 BAC 存在时，阿昔洛韦和环孢



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫