

学校编码：10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号：24520120153971

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

苯扎氯铵对角膜上皮屏障功能以及角膜内  
皮间隙连接细胞通讯的影响及机制研究

Effect of Benzalkonium Chloride on Corneal Epithelial  
Barrier Function and Possible Mechanisms of Benzalkonium  
Chloride Inhibiting Corneal Endothelial Gap Junction  
Intercellular Communication

张振豪

指导教师姓名：刘祖国 教授 陈文生 副教授

专业名称：生理学

论文提交日期：2015年04月

论文答辩时间：2015年05月

学位授予日期：

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评 阅 人：\_\_\_\_\_

2015年 04月

厦门大学博硕士论文摘要库

苯扎氯铵对角膜上皮屏障功能以及角膜内皮间隙连接细胞通讯的影响及机制研究

张振豪

指导教师

刘祖国  
教授

陈文生  
副教授

厦门大学

## 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

### 第一部分：局部应用前列腺素类药物对兔角膜上皮细胞屏障功能的影响

**目的：**苯扎氯铵（BAK）是滴眼液中最常用的防腐剂之一，大量的临床研究发现，局部长期使用含 BAK 的眼部制剂会出现很多眼部不适症状。含 BAK 的前列腺素类药物是治疗开角性青光眼的一线药物，临床上患者往往需要长期使用，易导致眼睛干涩，结膜充血等等，然而其作用机制还不是非常清楚。紧密连接与粘着连接等构成了角膜上皮抵御外界病原微生物入侵的第一道生理屏障，对角膜正常生理功能的维持具有非常重要的作用。本研究拟探讨局部应用前列腺素类药物对角膜上皮细胞屏障功能的影响及其作用机制。

**方法：**新西兰大白兔被随机的分成 4 组，每组 12 只，右眼为药物处理组，分别给以贝美前列腺素（0.005% BAK），曲伏前列腺素（0.015% BAK），拉坦前列腺素（0.02% BAK），以及 0.02% BAK，每日一次，持续 30 天给药，对侧未处理眼作为空白对照。Schimer 实验用以评估用药后泪液分泌的变化，裂隙灯显微镜下观察角膜荧光染色、玫瑰红染色以及 BUT。运用活体共聚焦显微镜（IVCM）和苏木素伊红（HE）染色观察角膜上皮细胞层、基质层和内皮细胞层的形态变化。跨膜上皮细胞电阻（TER）评估角膜上皮屏障功能，免疫荧光染色观察紧密连接标志物 ZO-1、occludin，粘着连接标志物  $\beta$ -catenin 以及细胞增殖标志物 ki67 在角膜上皮细胞中的定位和表达。TNUEL 凋亡试剂盒评估局部用药后的角膜上皮细胞凋亡情况。

**结果：**药物处理 30d 后，贝美前列腺素与曲伏前列腺素实验组的泪液分泌，BUT，角膜荧光素与玫瑰红染色与空白对照组相比无显著差异，而在 0.02% BAK 与拉坦前列腺素实验组中，泪液分泌减少，BUT 缩短，角膜荧光素与玫瑰红染色评分增加。HE 染色检测发现，药物处理后，角膜形态无显著变化。IVCM 检查证实，与空白对照组相比，不同前列腺素类药物实验组以及 BAK 处理组，角膜上皮浅表层细胞形态发生明显的变化，细胞体积变大，形态变得不规则，基底层细胞无显著变化。在角膜基质层，与对照组相比，前列腺素实验组与 BAK 处理组的桥样结构显著增多。与对照组相比，所有实验组的角膜内皮细胞的形态与

结构均没有明显改变。在前列腺素类药物实验组，用药 5d 后，TER 呈现 BAK 浓度依赖性的下降，0.02% BAK 处理组下降最为显著。药物处理 5d 后，ZO-1 和 occludin 在细胞膜上的分布破坏，而  $\beta$ -catenin 的分布无明显变化，用药 30d 后，ZO-1 和 occludin 以及  $\beta$ -catenin 的形态与结构均发生了明显的破坏。ki67 在对照组和实验组无明显变化，TUNEL 试剂盒检测发现，局部应用前列腺素类药物和 BAK 后，凋亡的上皮细胞数目明显增多。

**结论：**局部应用含 BAK 前列腺素类药物会破坏角膜上皮细胞的屏障功能，进一步揭示了防腐剂 BAK 诱导眼表毒性的相关机制，为后续防腐剂的相关眼表毒性研究提供了很好的理论依据。

**关键词：**前列腺素类药物；角膜上皮屏障功能；眼表毒性

## 第二部分：防腐剂苯扎氯铵对兔角膜内皮细胞间隙连接细胞通讯的影响及机制研究

**目的：**在正常生理状态下，角膜内皮间隙连接形成的通道，可让小分子营养物质，信号分子和代谢产物通过，在维持角膜内皮的内环境稳态和新陈代谢中发挥着重要作用，同时角膜内皮形成的屏障可有效阻止房水通过旁细胞通路进入角膜基质，维持基质的相对脱水状态，因而间隙连接与内皮屏障共同维持了角膜的透明和内环境的稳定。BAK 是眼科最长用的防腐剂之一，长期使用含有 BAK 的滴眼液会出现很多眼部不适症状，如干眼，结膜鳞状化生，细胞凋亡等。本研究主要探索局部应用 BAK 对角膜内皮间隙连接细胞通讯的影响，并对相关机制进行探索。

**方法：**36 只新西兰大白兔被随机的分成三组，右眼为药物处理组，分别给以 0.01% BAK、0.05% BAK 以及 0.1% BAK，每日 2 次，持续给药 7d，对侧未处理眼作为空白对照。活体共聚焦（IVCM）显微镜检测角膜内皮的形态变化，免疫荧光技术检测间隙连接标志物 Cx43 在细胞中的定位和分布。TUNEL 实验检测角膜内皮细胞凋亡情况。Western blot 和 RT-PCR 技术检测 Cx43 和紧密连接标志物 ZO-1 的蛋白和基因表达水平。免疫沉淀技术和免疫荧光双染色技术评估 Cx43 与 ZO-1 的相互作用。Scrape loading and dye transfer（SLDT）技术分析 BAK 对间隙连接细胞通讯活性的影响。

**结果：**局部使用0.05% BAK和0.1% BAK，破坏了间隙连接蛋白Cx43以及紧密连接标志物ZO-1在角膜内皮细胞中的分布，同时下调了Cx43的蛋白表达水平。高浓度的BAK诱导Cx43发生磷酸化。免疫荧光共染色和免疫沉淀结果发现，BAK处理7d后，与对照组相比，Cx43与ZO-1的结合发生了破坏，相互作用显著减弱。SLDT实验发现，BAK处理后，间隙连接细胞通讯的活性（GJIC activity）显著受到抑制。

**结论：**BAK通过磷酸化Cx43，破坏Cx43与ZO-1的相互作用，下调Cx43的蛋白表达水平，从而破坏角膜内皮细胞的间隙连接细胞通讯。本研究第一次探讨了BAK对角膜内皮细胞间隙连接细胞通讯的影响，为眼科临床如何合理用药提供了一定的理论依据。

**关键词：**BAK；角膜内皮细胞；间隙连接细胞通讯



## Abstract

### **Part1 Effect of Topical Application of Commercial Prostaglandin (PG) Analogs on Rabbit Corneal Epithelial Barrier Function**

**Purpose:** BAK is one of the most common preservative in eye preparations, Prostaglandin (PG) analogs, including latanoprost, travoprost, and bimatoprost, are currently the most commonly used topical ocular hypotensive medications. The purpose of this study was to investigate the alterations of corneal barrier function in rabbits following exposure to commercial solution of latanoprost, travoprost and bimatoprost.

**Methods:** Commercial latanoprost, travoprost, bimatoprost or 0.02% benzalkonium chloride (BAK) was applied once daily to one eye each of rabbits for 30 days, the contralateral untreated eyes used as controls. Schirmer test, tear break-up time (BUT), rose Bengal and fluorescein staining were performed on days 5, 10, 20, and 30. Central corneal changes were analyzed by in vivo confocal microscopy and HE staining, and the corneal barrier function was evaluated by measurement of corneal transepithelial electrical resistance on day 5. Whole mount corneas were analyzed by using fluorescence confocal microscopy for the presence of tight-junction (ZO-1, occludin) and adherens-junction ( $\beta$ -catenin) proteins, actin cytoskeleton, proliferative marker Ki67 and cell apoptosis in the epithelium.

**Results:** Topical application of commercial PG analogs resulted in significant corneal epithelial and stromal defects while no significant changes in aqueous tear production, BUT, rose bengal and fluorescein staining scores on day 5. Commercial PG analogs induced dislocation of ZO-1 and occludin from their normal locus, disorganization of cortical actin cytoskeleton at the superficial layer, and disruption of epithelial barrier function. The eyes treated with 0.02% BAK and latanoprost exhibited significantly reduced Schirmer scores, BUT, and increased fluorescein staining scores on days 10 and 30, respectively.

**Conclusions:** Topical application of commercial PG analogs can quickly impair the corneal epithelium and stroma without tear deficiency. Commercial PG analogs break down the barrier integrity of corneal epithelium, concomitant with the disruption of cell junction and actin cytoskeleton between superficial cells in the corneal epithelium in vivo.

**Key words:** Prostaglandin (PG) analogs; corneal epithelial barrier function; ocular surface toxicity

## Abstract

### Part2 Topical Application of Benzalkonium Chloride Induced the Alteration of Gap Junction Intercellular Communication in Rabbit Corneal Endothelium

**Purpose:** Gap junction intercellular communication (GJIC) plays a critical role in the maintenance of corneal endothelium homeostasis. We determined if benzalkonium chloride (BAK) alters GJIC activity in the rabbit corneal endothelium since it is commonly used as a drug preservative in ocular eyedrop preparations even though it can have cytotoxic effects.

**Methods:** Thirty-six adult New Zealand albino rabbits were randomly divided into three groups. BAK at 0.01%, 0.05%, and 0.1% was applied twice daily to one eye of each of the rabbits in one of the three groups for seven days. The contralateral untreated eyes were used as controls. Corneal endothelial morphological features were observed by in vivo confocal microscopy (IVCM). Immunofluorescent staining resolved changes in gap junction integrity and localization. TUNEL assay was used to evaluate the apoptosis of rabbit corneal endothelium. Western blot analysis and RT-PCR evaluated changes in levels of connexin43 (Cx43) and tight junction zonula occludens-1 (ZO-1) gene and protein expression, respectively. Cx43 and ZO-1 physical interaction was detected by immunoprecipitation (IP). Primary rabbit corneal endothelial cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

containing BAK for 24 hours. The scrape-loading dye transfer technique (SLDT) was used to assess GJIC activity.

**Results:** Topical administration of BAK (0.05%, 0.1%) dose dependently disrupted corneal endothelial cell morphology, altered Cx43 and ZO-1 distribution and reduced Cx43 expression. BAK also markedly induced increases in Cx43 phosphorylation status concomitant with decreases in the Cx43-ZO-1 protein-protein interaction. These changes were associated with marked declines in GJIC activity.

**Conclusions:** The dose dependent declines in rabbit corneal endothelial GJIC activity induced by BAK are associated with less Cx43-ZO-1 interaction possibly arising from increases in Cx43 phosphorylation and declines in its protein expression. These novel changes provide additional evidence that BAK containing eyedrop preparations should be used with caution to avoid declines in corneal transparency resulting from losses in GJIC activity and endothelial function.

**Key words:** BAK; corneal endothelium; gap junction intercellular communication

# 目 录

摘 要 .....	I
ABSTRACT .....	IV
第一部分：局部应用前列腺素类药物对兔角膜上皮细胞屏障功能的 影响 .....	1
第一章 前言 .....	1
1.1 角膜的组织结构和相关功能 .....	1
1.1.1 角膜的组织结构 .....	1
1.1.2 角膜的生理功能 .....	2
1.2 角膜上皮屏障的组成结构和生理功能 .....	2
1.3 角膜上皮屏障功能研究进展 .....	4
1.3.1 低氧环境破坏角膜上皮屏障功能 .....	4
1.3.2 炎症因子对角膜上皮屏障功能的影响 .....	5
1.3.3 BAK 对角膜上皮屏障功能的影响 .....	6
1.3.4 其他因素对角膜上皮屏障功能的影响 .....	6
1.4 防腐剂 BAK 的优缺点 .....	6
1.5 防腐剂 BAK 的药代动力学研究 .....	8
1.6 防腐剂 BAK 的替代物 .....	8
1.7 前列腺素类药物的相关实验研究 .....	10
第二章 实验材料与amp;方法 .....	11
2.1 实验动物 .....	11
2.2 常用试剂的配置方法 .....	11
2.3 试剂与耗材 .....	13
2.3.1 化学试剂 .....	13
2.3.2 常用抗体 .....	14

2.3.3 实验仪器设备 .....	14
<b>2.4 实验方法 .....</b>	<b>15</b>
2.4.1 实验动物分组和用药 .....	15
2.4.2 实验过程 .....	16
2.4.3 临床指标检测 .....	16
2.4.4 冰冻切片的制备 .....	17
2.4.5 苏木素-伊红染色 (HE 染色) .....	18
2.4.6 组织切片免疫荧光 .....	18
2.4.7 Whole mount 免疫荧光 .....	19
2.4.8 跨膜上皮细胞电阻 TER .....	19
2.4.9 Western Blot 免疫印迹分析 .....	20
2.4.10 TUNEL 凋亡试剂盒 .....	21
2.4.11 RT-PCR (反转录 PCR) .....	22
<b>2.5 统计学分析 .....</b>	<b>24</b>
<b>第三章 实验结果 .....</b>	<b>25</b>
3.1 临床指标检测 .....	25
3.2 苏木素伊红 (HE) 染色 .....	26
3.3 活体共聚焦显微镜 (IVCM) 观察 .....	27
3.4 角膜结构以及 TER 统计学分析 .....	28
3.5 前列腺素类药物和 BAK 对角膜上皮屏障功能的影响 .....	29
3.6 前列腺素类药物对角膜上皮肌动蛋白细胞骨架的影响 .....	30
3.7 前列腺素类药物对角膜上皮细胞增殖和凋亡的影响 .....	30
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>32</b>
4.1 防腐剂 BAK 的眼表毒性研究 .....	32
4.1.1 细胞模型 BAK 毒性研究 .....	32
4.1.2 在体动物模型 BAK 毒性研究 .....	33
4.1.3 临床观察与相关研究 .....	35
4.1.4 前列腺素类药物对眼表组织结构的影响 .....	35
4.2 BAK 的争议性研究 .....	36

4.2.1 泪液分泌和泪膜稳定性争议	37
4.2.2 结膜形态学争议性研究	37
4.2.3 角膜形态学争议性研究	37
4.3 防腐剂 BAK 与角膜上皮屏障功能	38
<b>第五章 结论</b>	<b>39</b>
参考文献	41
<b>第二部分 防腐剂苯扎氯铵对兔角膜内皮间隙连接细胞通讯的影响及机制研究</b>	<b>52</b>
<b>第一章 前言</b>	<b>52</b>
1.1 角膜内皮细胞的结构和生理功能	52
1.2 角膜内皮病变	53
1.2.1 原发性角膜内皮病变	53
1.2.2 继发性角膜内皮病变	53
1.3 角膜内皮细胞屏障功能概述	54
1.4 间隙连接的组成和生理功能	55
1.5 间隙连接功能异常与相关疾病	56
1.6 间隙连接的调控因素	57
1.7 间隙连接在角膜内皮细胞中的作用	58
1.8 活体共聚焦扫描显微镜 (IVCM) 的临床应用	59
<b>第二章 实验材料与方法</b>	<b>61</b>
2.1 实验材料	61
2.1.1 实验动物	61
2.1.2 化学试剂与耗材	61
2.1.3 常用抗体	63
2.1.4 常用仪器设备	63
2.2 实验方法	65
2.2.1 实验动物分组	65
2.2.2 动物实验操作	65

2.2.3 活体共聚焦显微镜 (IVCM) .....	65
2.2.4 Whole mount 免疫荧光 .....	66
2.2.5 Western Blot 免疫印迹分析 .....	66
2.2.6 TUNEL 凋亡试剂盒 .....	68
2.2.7 RT-PCR (反转录 PCR) .....	68
2.2.8 原代兔角膜内皮细胞培养 .....	70
2.2.9 间隙连接细胞通讯活性检测 (GJIC activity) .....	70
2.2.10 免疫沉淀技术 .....	71
2.2.11 Triton X-100 溶解实验 .....	72
2.3 统计学分析 .....	72
<b>第三章 实验结果</b> .....	<b>73</b>
3.1 BAK 对兔角膜内皮细胞形态学的影响 .....	73
3.2 BAK 对兔角膜内皮细胞凋亡的影响 .....	74
3.3 BAK 对兔角膜内皮细胞间隙连接蛋白 CX43 分布的影响 .....	75
3.4 BAK 对兔角膜内皮细胞 CX43 和 ZO-1 表达的影响 .....	76
3.5 BAK 对兔角膜内皮细胞 CX43 与 ZO-1 相互作用的影响 .....	78
3.6 BAK 对兔角膜内皮细胞 CX43 磷酸化的影响 .....	79
3.7 BAK 对培养的兔角膜内皮细胞间隙连接细胞通讯活性的影响 .....	80
<b>第四章 讨论</b> .....	<b>82</b>
4.1 磷酸化调控间隙连接的组装和相关功能 .....	82
4.2 CX43 相关连接蛋白在调控通道活性中的作用 .....	85
4.3 间隙连接在眼角膜中的研究进展 .....	86
<b>第五章 结论</b> .....	<b>88</b>
<b>附录 博士期间相关科研工作</b> .....	<b>90</b>
<b>参 考 文 献</b> .....	<b>92</b>
<b>致 谢</b> .....	<b>103</b>

## Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>IV</b>
<b>Part 1 Effect of prostaglandin (PG) analogs on corneal epithelial barrier function</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 corneal structure and physiological function</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Corneal structure .....	1
1.1.2 Corneal physiological function .....	2
<b>1.2 Component of corneal epithelial barrier function and function</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 The research progress of corneal epithelial barrier function</b> .....	<b>4</b>
1.3.1 Hypoxia disrupted epithelial barrier function .....	4
1.3.2 Effect of inflammatory cytokines on corneal epithelial barrier function .....	5
1.3.3 Effect of BAK on corneal epithelial barrier function .....	6
1.3.4 Effect of other factors on epithelial barrier function .....	6
<b>1.4 The advantages and disadvantages of BAK</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 Pharmacokinetic study of BAK</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6 Substitutes of BAK</b> .....	<b>8</b>
<b>1.7 The related experimental research of prostaglandin analogs</b> .....	<b>10</b>
<b>Chapter 2 experimental materials and methods</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Experimental animals</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Methods of preparation of reagents</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3 Reagents and consumables</b> .....	<b>13</b>
2.3.1 Chemical reagents .....	13



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.