

油脂营养

饲喂鱼油对小鼠干眼症的治疗及缓解作用

石蕊¹, 陈卓², 谭李玉², 毕群杰²

(1. 陕西省人民医院, 西安 710068; 2. 西安医学院药学院, 西安 710021)

摘要: 研究饲喂鱼油对小鼠干眼症的治疗及缓解作用。采用苯扎氯铵诱导小鼠发生干眼症, 并将其随机分为对照组(棕榈油替代鱼油)及鱼油饲喂组, 饲喂 14 d 前后分别检测两组小鼠的泪液分泌量及泪膜破裂时间; 14 d 后处死小鼠, 取眼周腺体, 气相色谱法检测其 DHA 含量。结果表明: 与饲喂前比较, 鱼油饲喂组泪液分泌量增加、泪膜破裂时间明显延长 ($P < 0.05$), 对照组各指标变化不明显 ($P > 0.05$); 饲喂 14 d 后组间比较, 鱼油饲喂组泪液分泌量增加、泪膜破裂时间明显延长 ($P < 0.05$); 饲喂 14 d 后, 鱼油饲喂组眼周腺体中 DHA 含量极显著高于对照组 ($P < 0.01$); 高 DHA 膳食可减轻苯扎氯铵诱导的干眼症小鼠的干眼症状, 可能与眼部腺体中 DHA 的供应有关。

关键词: 鱼油; 干眼症; DHA

中图分类号: R77; TS201

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)01-0067-03

Treatment and relief effect of fish oil diet on dry eye disease in miceSHI Rui¹, CHEN Zhuo², TAN Liyu², BI Qunjie²

(1. Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China;

2. Pharmacy College, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Abstract: The treatment and relief effect of fish oil diet on dry eye disease in mice was studied. BALB/c mice with dry eye disease induced by benzalkonium chloride were randomly divided into control group (palm oil instead of fish oil) and fish oil dietary group, and the tear secretion and tear film rupture time of these two groups of mice were measured before and after feeding for 14 d. The mice were executed after 14 d, glands on the peripheral eye was taken, and DHA content was examined by GC. The results showed that compared with mice before feeding, tear secretion increased and tear film rupture time prolonged ($P < 0.05$) in fish oil dietary group, and these changes in control group were not obvious ($P > 0.05$). Compared with control group, tear secretion of fish oil dietary group increased and tear film rupture time prolonged ($P < 0.05$) after feeding for 14 d. And the DHA content in the periocular glands of fish oil dietary group was significantly higher than that of control group ($P < 0.01$). High DHA dietary could relieve dry eye disease symptom of mice induced by benzalkonium chloride, and it may be related to the supply of DHA in periocular gland.

Key words: fish oil; dry eye disease; DHA

干眼症(Dry eye disease, DED)是一种常见的眼表疾病,在中老年人群中尤为常见^[1-3]。干眼症作为一种慢性疾病,长期的视物模糊伴随眼睛不适严重影响患者的生活质量及工作能力。目前的研究表

明,眼表组织的炎症反应是干眼症中泪液分泌量减少的主要诱因^[4]。

海洋鱼油富含多不饱和脂肪酸(PUFAs),具有众多优良的生理功能^[5-7]。其中,DHA(二十二碳六烯酸)是一种 $n-3$ 类的 PUFAs。DHA 主要累积和分布在大脑和视网膜等神经系统中^[8]。动物研究表明,DHA 在学习、记忆中起着重要的作用^[9-12]。

研究表明,PUFAs 及其体内衍生物可以抑制眼周炎症的发生。PUFAs 的重要组成部分 DHA 在体

收稿日期:2017-04-14;修回日期:2017-11-11

基金项目:西安医学院校级科研项目(2016PT14)

作者简介:石蕊(1980),女,副主任医师,硕士,研究方向为眼科诊治与研究(E-mail)vivianlio@163.com。

内可以衍生化为神经保护素 D1 (Neuroprotectin D1), 神经保护素 D1 可保护视网膜色素上皮细胞 (RPE) 免受氧化应激诱导的凋亡^[13-14]。因此, 可以合理推测 DHA 对干眼症的预防和治疗起着重要的作用, 但目前尚未见 DHA 等 PUFAs 对于干眼症治疗及其相应机制的研究。

本文通过研究饲喂鱼油对苯扎氯铵诱导的干眼症小鼠的泪液分泌量及泪膜破裂时间的影响, 阐述了饲喂鱼油对于干眼症的治疗及缓解作用, 并对小鼠眼周腺体中 DHA 含量进行测定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康雄性 BALB/c 小鼠 70 只, 8 周龄, 体重 (18 ± 3) g, 由西安交通大学医学部实验动物中心提供。

动物自由摄食及饮水, 分笼 (3 或 4 只/笼) 饲养于 SPF 级饲养环境, 室温 (20 ± 2) °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 每日明暗室各 12 h。每周称量动物的体重。动物实验依据西安交通大学实验室动物准则实施。

小鼠基础饲料为颗粒型日粮维持饲料 (河南天驰实验动物饲料厂), 精炼棕榈油为食品级 (新加坡益海嘉里粮油有限公司), 精炼鱼油为食品级 (陕西森弗天然制品有限公司), 顺-4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸甲酯 (DHA 甲酯) 为分析标准品 (Sigma - Aldrich); 苯扎氯铵为药用级 (Sigma - Aldrich); 甲醇、正己烷为色谱纯 (安耐吉化学); 2, 6-二叔丁基对甲酚 (BHT) 为化学纯 (安耐吉化学); 泪液检测酚红棉线 (天津晶明新技术开发有限公司); 针式过滤器为有机相过滤头孔径 0.22 μm (日本岛津)。

7890A 型气相色谱仪 (美国安捷伦公司); YZ5X 型裂隙灯显微镜; TDL-80-2B 型离心机。

1.2 实验方法

1.2.1 实验膳食的制备

对照组 (LD 组) 及鱼油饲喂组 (HD 组) 小鼠的实验膳食均依据 AIN-93G 对啮齿动物的推荐饮水量自行配制。配制方法: 将小鼠基础饲料 (粗脂肪含量 4%) 润湿后碾碎, 混匀后等分为两份, 分别拌合棕榈油及鱼油, 使两组膳食的脂肪含量均达到 7%, 其中 LD 组采用单一棕榈油作为拌入油脂, HD 组采用鱼油与棕榈油 1:1 的调和油作为拌入油脂。拌合均匀后捏制成鼠粮形状, 烘箱烘干即得实验膳食。HD 组与 LD 组小鼠的膳食油脂中饱和脂肪酸含量分别为 10.4%、50.1%, $n=3$ 多不饱和脂

肪酸含量分别为 51.1%、0.2%, DHA 含量分别为 13.0%、0%。

1.2.2 干眼模型制备

健康雄性 BALB/c 小鼠 70 只, 8 周龄, 体重 (18 ± 3) g, 经适应性喂养 1 周后, 测定泪液分泌量及泪膜破裂时间。造模时, 给予 0.2% 苯扎氯铵水溶液 5 μL 滴眼, 每日给药 2 次。连续给药 14 d 后再测定泪液分泌量及泪膜破裂时间, 取最接近均数的 60 只小鼠即为干眼症模型小鼠, 用于动物实验。

1.2.3 动物实验

将制备干眼模型成功的小鼠随机分为 2 组: 对照组 (LD 组) 及鱼油饲喂组 (HD 组)。两组小鼠记录泪液分泌量及泪膜破裂时间后, 连续 14 d 分别饲喂实验膳食, 每日精确称量投喂及剩余饲料, 观察摄食情况。经测定, 两组小鼠日均采食量为 2.92 g, 以此中位数计算可知, HD 组日均摄取 DHA 约为 13.2 mg, LD 组难以摄取到 DHA。14 d 后, 两组小鼠再次测量泪液分泌量及泪膜破裂时间。15 d, 处死小鼠, 并采集其睑板腺与泪腺, 于 -80 °C 冻存。

1.2.4 泪液分泌量及泪膜破裂时间的测定

泪液分泌量采用酚红棉线浸渍法, 即将酚红浸渍棉线置于小鼠下睑内 1/330 s, 棉线接触泪液润湿后颜色变红, 测量红色棉线的长度 (以毫米为单位) 作为泪液分泌量的测量结果。

泪膜破裂时间采用荧光法, 小鼠结膜囊 0.125% 荧光素钠染色 1 μL, 手动瞬目 3 次后以钴蓝光照射, 裂隙灯显微镜观察。以瞬目完毕到小鼠泪膜出现黑色或线状缺损作为泪膜破裂时间 (以秒为单位)。

1.2.5 眼周腺体中 DHA 含量的测定

将眼部周围的腺体 (约为睑板腺 15 mg, 泪腺 50 mg) 加入 20 mL 离心管中, 并加入内标溶液 100 μL (含 20 μg DHA 甲酯), 加入添加了 50 μg/mL BHT 的甲醇-正己烷 (体积比 4:1) 混合液 2 mL, 以免脂质在实验过程中被氧化。样品移至冰浴中加入 6% K₂CO₃ 溶液 5 mL 中和。2 200 g 下离心 15 min, 消除乳化液。待混合物分液后, 以注射器吸取正己烷层, 经针式过滤器过滤后, 进样气相色谱仪^[15]。

气相色谱条件为: FID 检测器, DB-FFAP 型色谱柱 (15 m × 0.10 mm × 0.10 μm), 氮气为载气; 检测器温度和进样器温度 250 °C, 升温程序为初始温度 150 °C, 35 °C/min 升至 200 °C, 8 °C/min 升至 225 °C, 维持 3.2 min, 最后以 80 °C/min 升至 248 °C, 维持 14.7 min。以内标法定量样品中的 DHA 甲酯

含量,并折算为眼周腺体中DHA含量。

2 结果与讨论

2.1 饲喂鱼油对干眼症小鼠的泪液分泌量及泪膜破裂时间的影响(见表1)

表1 小鼠泪液分泌量及泪膜破裂时间的测定结果

动物分组	泪液分泌量/mm			泪膜破裂时间/s		
	干眼造模前	干眼造模后	饲喂14 d后	干眼造模前	干眼造模后	饲喂14 d后
LD组	9.15 ± 0.56	5.11 ± 0.62	5.67 ± 0.97	4.28 ± 0.74	1.87 ± 0.94	2.07 ± 0.88
HD组	9.15 ± 0.56	5.11 ± 0.62	7.71 ± 0.89	4.28 ± 0.74	1.87 ± 0.94	3.98 ± 0.61

从表1可以看出,在分组喂食鱼油前小鼠的泪液分泌量为(5.11 ± 0.62)mm,显著少于同批小鼠造模前(9.15 ± 0.56)mm($P < 0.05$)。说明干眼模型造模成功。经1.2.3方法饲喂小鼠14 d后,HD组小鼠的泪液分泌量为(7.71 ± 0.89)mm,与LD组((5.67 ± 0.97)mm)相比显著增加($P < 0.05$),与饲喂前相比显著增加($P < 0.05$);LD组小鼠的泪液分泌情况与饲喂前相比基本未发生改善($P > 0.05$)。泪膜破裂时间具有相同的变化趋势。可见,鱼油对小鼠干眼症具有一定的治疗及缓解作用。

2.2 干眼症小鼠的眼周腺体中DHA含量的测定

实验发现,饲喂14 d后,LD组小鼠眼周腺体中DHA含量为(1.79 ± 0.15) μg/mg(湿重),HD组为(10.06 ± 0.61) μg/mg,两组之间存在极显著差异($P < 0.01$)。这与前期推测一致。

3 结论

采用苯扎氯氨诱导小鼠发生干眼症后,饲喂鱼油组小鼠相对于对照组的小鼠,泪液分泌量显著增加、泪膜破裂时间显著延长($P < 0.05$);鱼油饲喂组小鼠与饲喂前相比,泪液分泌量增加,泪膜破裂时间明显延长($P < 0.05$),对照组各指标变化不显著($P > 0.05$);且饲喂14 d后,鱼油饲喂组小鼠眼周腺体中DHA含量极显著高于对照组($P < 0.01$)。因此,饲喂鱼油可减轻苯扎氯氨诱导的干眼症小鼠的干眼症状,可能与增加眼部腺体中DHA的供应有关。

参考文献:

[1] 杨永明,马林昆.干眼的流行病学研究进展[J].国际眼科杂志,2010,10(10):1944-1946.
 [2] 刘泽源,李才锐.睑板腺功能障碍所致干眼的治疗[J].国际眼科杂志,2014,14(2):270-272.
 [3] 周米露,钟森全,赵佐芳,等.干眼诊断和治疗的研究进展[J].川北医学院学报,2014,29(6):631-634.
 [4] VEHOFF J, SILLEVIS S N, NIBOURG S A, et al. Predic-

tors of discordance between symptoms and signs in dry eye disease [J]. *Ophthalmology*, 2017, 124(3):280-286.

- [5] 马永钧,杨博.世界海洋鱼油资源利用现状与发展趋势[J].中国油脂,2010,35(11):1-3.
 [6] 张云竹,柏杨,刘小琴,等.海洋鱼油资源开发和应用研究进展[J].安徽农业科学,2012,40(28):14005-14007.
 [7] 潘志杰.海洋鱼油的精炼加工技术研究[J].农业机械,2013(17):38-41.
 [8] SALEM N, LITAMAN B, KIM H Y, et al. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system [J]. *Lipids*, 2001, 36(9):945-959.
 [9] FEDOROVA I, HUSSEIN N, DIMARTINO C, et al. An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes circular maze [J]. *Fatty Acids*, 2007, 77(5/6):269-277.
 [10] 郭艳芬,王丽梅,肖娜,等.发育期补充DHA对大鼠空间学习记忆能力的影响[J].中国油脂,2011,36(9):43-47.
 [11] 李翔宇,田勇,陆姝欢,等.响应面法优化藻类来源磷脂型DHA的提取工艺[J].中国油脂,2017,42(4):118-122.
 [12] 陈殊贤,郑晓辉.微藻油和鱼油中DHA的特性及应用研究进展[J].食品科学,2013,34(21):439-444.
 [13] MUKHERJEE P K, MARCHESELLI V L, SERHAN C N, et al. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101:8491-8496.
 [14] LI N, HE J, SCHWARTZ C E, et al. Resolvin E1 improves tear production and decreases inflammation in a dry eye mouse model [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2010, 26(5):431-439.
 [15] LEPAGE G, ROY C C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction [J]. *J Lipid Res*, 1986, 27(1):114-120.