

丹芪化瘀方对光诱导的视网膜损伤模型大鼠视网膜细胞凋亡的影响

贺莉¹, 颜家朝², 喻京生^{2*}

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学 第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

摘要 该研究旨在从细胞凋亡角度,探究丹芪化瘀方对光诱导的视网膜损伤(LIRD)模型大鼠的保护机制。选取 60 只雄性 SD 大鼠,随机分为正常组,模型组,滋阴明目丸组(7.8 g·kg⁻¹),丹芪化瘀方低(3.45 g·kg⁻¹)、中(10.35 g·kg⁻¹)、高(31.05 g·kg⁻¹)剂量组,每组 10 只。除正常组外,其余各组利用自制光损伤箱构建 LIRD 大鼠模型。造模 7 d 后,各组分别灌胃相应药物,正常组和模型组灌胃等体积蒸馏水,持续 14 d。采用视网膜电图(ERG)检测视网膜功能,苏木精-伊红(HE)染色观察视网膜形态并测量外核层(ONL)厚度,TUNEL 染色检测细胞凋亡,透射电镜观察视网膜超微结构变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)与实时荧光定量聚合酶链式反应法(RT-qPCR)分别检测视网膜细胞凋亡相关蛋白及 mRNA 表达水平。结果显示,与正常组相比,模型组大鼠 ERG a 波和 b 波振幅显著降低,视网膜 ONL 厚度变薄,细胞凋亡率上升,视网膜超微结构受损,抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)及 mRNA 表达降低,促凋亡蛋白 胱天蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-6、肿瘤抑制蛋白(p53)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)及相关 mRNA 表达增加;与模型组相比,滋阴明目丸组和丹芪化瘀方中、高剂量组大鼠 ERG a 波和 b 波振幅回升,视网膜 ONL 厚度增加,细胞凋亡率下降,超微结构改善,抗凋亡蛋白(Bcl-2)及 mRNA 表达上调,促凋亡蛋白(Caspase-3、Caspase-6、p53、Bax)及相关 mRNA 表达下调,且呈剂量相关性。综上,丹芪化瘀方通过调节细胞凋亡相关蛋白和基因表达,减少光诱导的视网膜细胞凋亡,从而对 LIRD 模型大鼠发挥保护作用。

关键词 丹芪化瘀方; 光诱导的视网膜损伤; 视网膜细胞; 凋亡; 胱天蛋白酶-6

Effects of Danqi Huayu Recipe on retinal cell apoptosis in rat model of light-induced retinal damage

HE Li¹, YAN Jia-chao², YU Jing-sheng^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] This study aims to explore the protective mechanism of Danqi Huayu Recipe against light-induced retinal damage (LIRD) in rats from the perspective of cell apoptosis. Sixty male SD rats were randomly allocated into six groups ($n=10$): normal group, model group, Ziyin Mingmu Pills group (7.8 g·kg⁻¹), and low-, medium-, and high-dose (3.45, 10.35, and 31.05 g·kg⁻¹, respectively) Danqi Huayu Recipe groups. A self-made light damage chamber was used for the modeling of LIRD in rats of other groups except normal group. Seven days after modeling, each group received corresponding agents by gavage. Normal group and model group were administrated with an equal volume of distilled water by gavage for 14 d. The retinal function was evaluated by electroretinography. Hematoxylin-eosin (HE) staining was employed to observe the retinal morphology and measure the thickness of the outer nuclear layer (ONL). The cell apoptosis was examined by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling. The ultrastructure of the

收稿日期 2025-05-19

基金项目 国家自然科学基金项目(8227150650);湖南省“十四五”第一批中医药领军人才和学科带头人培养项目(湘中医药[2021]10号);湖南省自然科学基金项目(2022JJ30460)

通信作者 * 喻京生,主任医师,教授,主要从事中医药防治眼病的研究,E-mail: yujingsheng-mike@163.com

作者简介 贺莉,博士研究生,E-mail: heli2000@aliyun.com

retina was observed by transmission electron microscopy. The protein and mRNA levels of factors related to retinal cell apoptosis were determined by Western blot and RT-qPCR, respectively. The results showed that compared with normal group, model group demonstrated significantly decreased amplitudes of ERG a-waves and b-waves, thinned ONL, increased cell apoptosis rate, damaged retinal ultrastructure, down-regulated protein and mRNA levels of the anti-apoptotic factor (Bcl-2), and up-regulated protein and mRNA levels of pro-apoptotic factors (Caspase-3, Caspase-6, p53, and Bax). Compared with model group, Ziyin Mingmu Pills group and medium- and high-dose Danqi Huayu Recipe group recovered the amplitudes of ERG a-waves and b-waves, increased the ONL thickness, decreased the cell apoptosis rate, and improved the retinal ultrastructure. Meanwhile, they up-regulated protein and mRNA levels of Bcl-2 and down-regulated protein and mRNA levels of pro-apoptotic factors in a dose-dependent manner. In conclusion, Danqi Huayu Recipe protects rats from LIRD by regulating the expression of proteins and genes related to cell apoptosis to reduce light-induced retinal cell apoptosis.

[Key words] Danqi Huayu Recipe; light-induced retinal damage; retinal cells; apoptosis; Caspase-6

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250829.501

视觉依赖于将光信号转换为大脑能接收的电信号,从而能够接收周围环境的信息。当暴露在过强或过久的光照下时,视网膜中的光感受器和其他类型的细胞可能会发生光诱导的细胞死亡,称为光诱导的视网膜损伤 (light-induced retinal damage, LIRD) ^[1]。长期的 LED 灯照射会引起并加重一系列视网膜变性眼病,如年龄相关性黄斑变性、视网膜色素变性等的进展,严重影响人类视功能,更甚者可导致视力丧失 ^[2-3]。然而,关于 LIRD 的发病机制目前仍未完全明确。有研究表明,视网膜光损伤的发生与视网膜内的氧化还原平衡、钙离子稳态的破坏、细胞自噬以及细胞凋亡等多种因素密切相关 ^[4],其中视网膜细胞凋亡是 LIRD 的主要成因之一 ^[5-7]。目前,LIRD 的治疗尚无特效药,课题组前期研究表明,一定剂量的中药复方可以明显抑制视网膜细胞的凋亡 ^[8-9],可能成为治疗 LIRD 的有效途径。

丹芪化瘀方由《眼科纂要》中大补参芪丸化裁而来。临床研究证实,丹芪化瘀方能够改善气阴两虚、瘀血阻络证患者的中医证候表现 ^[10]。体外实验验证显示,丹芪化瘀方能够抑制脉络膜新生血管形成,改善血-视网膜屏障功能,下调 NOX4/ROS 信号通路相关蛋白的表达,有效拮抗 LED 灯对视网膜色素上皮细胞的氧化损伤,发挥保护视网膜细胞的功能 ^[11-12]。但丹芪化瘀方能否通过抑制视网膜细胞凋亡改善 LIRD 尚不明确。因此,本研究构建 LIRD 大鼠模型,以不同浓度的丹芪化瘀方进行干预,基于细胞凋亡途径探讨其对 LIRD 模型大鼠的保护作用,阐明可能的作用机制,为中药复方干预 LIRD 的临床应用提供新的实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,6~8 周龄,体质量 150~180 g。选择雄性大鼠是为了排除雌性激素周期性波动对实验结果可能产生的干扰 ^[13]。大鼠由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供 [动物许可证号 SYXK(湘)2019-0009]。饲养条件为 12/12 h 光/暗循环,温度(23±2)℃,相对湿度 55%,动物自由摄食饮水,适应性喂养 7 d。动物实验方案经湖南中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号 HNUCM21-2311-11)。

1.2 药物和试剂 丹芪化瘀方由黄芪 15 g、党参 15 g、生地黄 10 g、葛根 10 g、麦冬 10 g、玄参 10 g、当归 10 g、熟地黄 10 g、丹参 10 g、三七 5 g、桃仁 10 g 组成,均使用超微颗粒剂(湖南新汇制药股份有限公司,批号依次为 C230201、C230502、C230501、C230201、C221201、C230201、C230601、C230601、C230701、C230301、C230301),由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。滋阴明目丸(批号 20241202)为湖南中医药大学第一附属医院院内制剂(湘药制备字 Z202103630000)。复方托吡卡胺滴眼液(国药准字 H20066782,批号 0042318)、阿托品眼用凝胶(国药准字 H20052295,批号 0240401)均购于湖南中医药大学第一附属医院药房。

无水乙醇、二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,货号分别为 100092683、10023418);苏木精-伊红(HE)染液、FAS 眼球固定液、电镜固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为 G1005、CR2209037、CR250105);TUNEL 试剂盒(瑞士 Hoffmann-La Roche 公司,货号 11684817910);DAPI(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号 C1006);超

纯 RNA 提取试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司,货号 CW0581S);戊巴比妥钠(德国默克公司,货号 2209116);兔源抗胱天蛋白酶(Caspase)-3 单克隆抗体、兔源抗 Caspase-6 单克隆抗体、兔源抗 β -actin 多克隆抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,货号分别为 ab184787、ab108335、ab8227];鼠源抗肿瘤抑制蛋白(p53)单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,货号 sc71820);兔源抗 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)多克隆抗体、兔源抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为 26593-1-AP、50599-2-Ig)。

1.3 仪器 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号 RM2016);光学显微镜(日本尼康公司,型号 Nikon Eclipse E100);电生理仪器(德国罗兰公司,型号 Ganzfeld Q450 SC);超微量分光光度计(美国 ThermoFisher Scientific 公司,型号 NanoDrop2000);高速台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司,型号 Eppendorf 5424R);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司,型号 PowerpacBasic);测序仪(美国 Illumina 公司,型号 Nextseq2000);分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司,型号 NanoDrop® ND-2000);MP 研磨仪(美国 MP Biomedicals 公司,型号 FastPrep-24 5G);荧光定量 PCR 仪器(美国 Applied Biosystems 公司,型号 ABI 7500);透射电镜(日本日立公司,型号 HITACHI HT7800);透射电镜成像系统(日本日立公司,型号 Hitachi TEM system)。

2 方法

2.1 药液制备 丹芪化瘀方(黄芪 15 g、党参 15 g、生地黄 10 g、葛根 10 g、麦冬 10 g、玄参 10 g、当归 10 g、熟地黄 10 g、丹参 10 g、三七 5 g、桃仁 10 g),共 115 g。将超微颗粒剂以 50~60 °C 蒸馏水溶散,于 80 °C 恒温水浴浓缩至生药量 1.15 g·mL⁻¹(高剂量),按照倍比稀释低、中剂量,4 °C 冰箱保存备用。

2.2 大鼠分组及造模 按随机数字表法将 60 只 SD 大鼠分为正常组、模型组、滋阴明目丸组、丹芪化瘀方低、中、高剂量组,每组 10 只。参照文献方法^[14-15],自制光损伤装置造模。光照箱内中心向各方向平均照度为(1 900±106.9) Lux,相当于大鼠正常活动时眼球水平的各箱壁的照度为 2 000 Lux,光照箱内平均温度控制在 22~24 °C。所有大鼠均在 12 h 光(20~50 Lux)以及 12 h 暗(0~12 Lux)循环环境下适应 7 d,再将其放入自制光损箱。除正常组

外,其余组大鼠建模前 30 min 用 1% 阿托品眼用凝胶双眼散瞳 1 次后置于箱内,每天早上 9:00 至下午 5:00 进行光刺激,光照后送回循环光中饲养。根据文献方法^[16-17]及预实验结果,利用照度计将光照调整为(2 000±500) Lux 持续照射 8 h,连续 7 d,光照期间正常进食、饮水。

2.3 给药 所有大鼠均造模成功。参照《中医科研设计与统计学》^[18]按人与大鼠等效剂量系数,分别以人等效剂量的 1/3、1、3 倍作为丹芪化瘀方低、中、高剂量组给药量。所有大鼠适应性喂养 7 d 后开始造模。光照后第 8 天开始给药,滋阴明目丸组灌胃 7.8 g·kg⁻¹ 滋阴明目丸溶液,丹芪化瘀方低、中、高剂量组分别灌胃 3.45、10.35、31.05 g·kg⁻¹ 丹芪化瘀方溶液,正常组与模型组灌胃 15 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 蒸馏水,每天 2 次,连续 14 d。

2.4 视网膜电图(ERG)检测大鼠视网膜细胞电生理功能 大鼠暗适应 12 h 后异氟烷吸入麻醉,流量 4 L·min⁻¹,待大鼠四肢无反应并脊背无弓起现象后用复方托吡卡胺滴眼液双眼扩瞳。大鼠固定在平台,参考电极连接到大鼠头部,环形角膜电极连接到眼球,接地电极连接到大鼠尾部。ERG 用于记录暗适应中 3.0、10.0 cd·s·m⁻² 闪光刺激后的 a 波和 b 波,实验过程在红光下进行。

2.5 HE 染色检测视网膜组织病理形态 采用 1% 戊巴比妥钠麻醉后处死大鼠,摘除眼球,用 FAS 眼球专用固定液固定,石蜡包埋,切成 4 μ m 切片。石蜡切片用 HE 染色,采用 ImageJ 软件测量视网膜外核层(ONL)厚度。

2.6 TUNEL 染色检测视网膜细胞凋亡 取大鼠视网膜组织进行石蜡切片,经脱蜡、水洗、蛋白酶 K 消化等处理,滴加 TUNEL 混合液及 DAPI 染核,封片后荧光显微镜下观察并拍照,采用 ImageJ 软件计算凋亡率。

2.7 透射电镜观察视网膜组织超微结构 取大鼠视网膜组织放入 2.5% 戊二醛中,4 °C 冰箱固定 2 h 后进行脱水、树脂包埋、超薄切片以及铅铀双染等,再使用透射电镜进行连续拍照采集图像,选取具有代表性及特征性的视野进行分析。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bcl-2、Bax 蛋白表达 提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,而后将蛋白电转至 PVDF 膜,经 3% BSA 封

闭后洗膜。再加入相应的一抗(Caspase-3 抗体 1:2 000 稀释、Caspase-6 抗体 1:5 000 稀释、p53 抗体 1:1 000 稀释、Bcl-2 抗体 1:1 500 稀释、Bax 抗体 1:8 000 稀释), 4 ℃ 孵育过夜, 次日洗膜并加入二抗, 室温反应 2 h。β-actin 为内源性对照。

2.9 实时荧光定量聚合酶链式反应法(RT-qPCR)检测视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bcl-2、Bax mRNA 表达 采用超纯 RNA 提取试剂盒常规提取总 RNA, 按 25 μL 体系 1 μg RNA 要求进行反转录。按说明书进行反应液配制, 使用 PCR 仪反转录合成 cDNA 备用。反应条件为预变性 95 ℃ 10 s, PCR 反应 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 共 40 个循环, 溶解曲线 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 60 s, 0.11 ℃·s⁻¹ 升温至 95 ℃ (连续采集荧光), 50 ℃ 30 s, 每组 3 个复孔, 以 β-actin 为内参, 数据采用 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	产物长度 /bp
Caspase-3	正向 GCGGTATTGAGACAGACAGTGGGA	205
	反向 ACCAGTGAGGATGTGCATGAATT	
Caspase-6	正向 TGACGGAGACAGATGGC	107
	反向 CTCGTGATTGAAGATTAGGG	
p53	正向 AGATGTTCCGAGAGCTGAATGAG	130
	反向 TTTTATTGCGGGACGCTAGA	
Bax	正向 GGTGGTTGCCCTTTTCTACTTTGC	113
	反向 GCTCCCGGAGGAAGTCCAGTG	
Bcl-2	正向 GGGCTACGAGTGGGATACTGGAG	101
	反向 CGGGCGTTCGGTTGCTCT	
β-actin	正向 CACCCCGGAGTACAACCTTC	207
	反向 CCCATACCCACCATCACACC	

2.10 统计分析 计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 使用 SPSS 27.0、Origin 2022 软件评估所有参数。多组数据比较时, 若方差齐, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著差值(LSD)法; 若方差不齐, 采用非参数检验, 并用 Wilcoxon 秩和检验进行两两比较。P<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

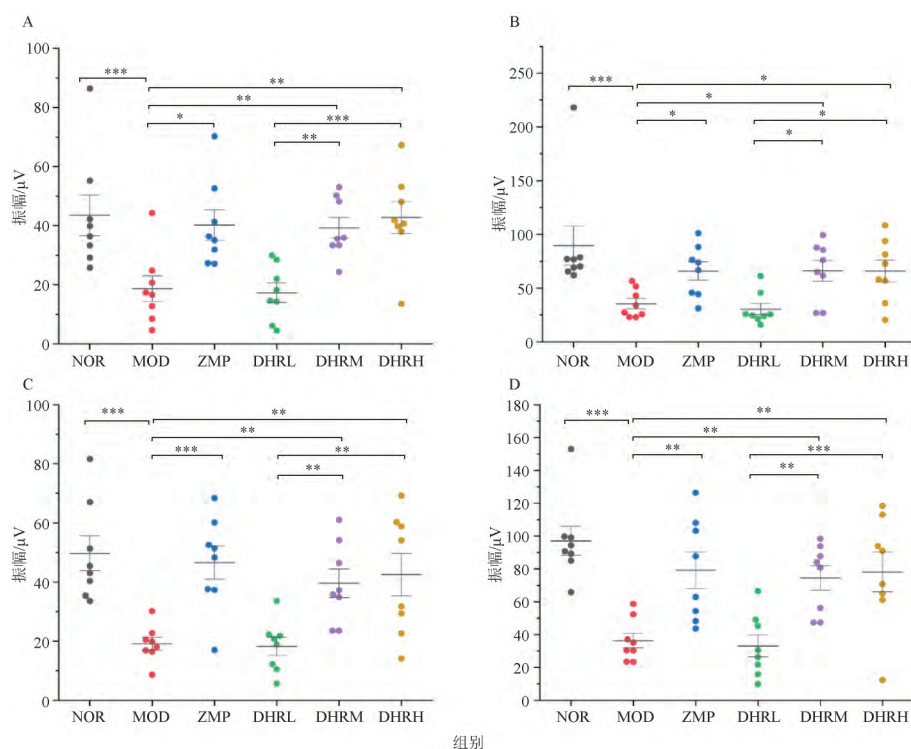
3.1 丹芪化癆方对 LIRD 大鼠视网膜功能的保护 ERG 检测显示, 与正常组相比, 模型组大鼠在暗

视反应中不同刺激强度(3.0、10.0 cd·s·m⁻²)诱发的 a 波和 b 波振幅均显著下降(P<0.001); 与模型组比, 滋阴明目丸组和丹芪化癆方中、高剂量组大鼠在暗视反应中不同刺激强度(3.0、10.0 cd·s·m⁻²)诱发的 a 波和 b 波振幅明显升高(P<0.05, P<0.01, P<0.001); 与丹芪化癆方低剂量组比较, 丹芪化癆方中、高剂量组大鼠在暗视反应中不同刺激强度(3.0、10.0 cd·s·m⁻²)诱发的 a 波和 b 波振幅明显升高(P<0.05, P<0.01, P<0.001), 见图 1。结果表明, 丹芪化癆方可能保护 LIRD 大鼠视网膜细胞电生理功能, 且与药物剂量有一定相关性。

3.2 丹芪化癆方对 LIRD 大鼠视网膜组织病理学的影响 HE 染色显示, 与正常组比较, 模型组大鼠视网膜 ONL 厚度变薄(P<0.001), 结构受损, 细胞核减少、固缩变小, 部分核染色变淡, 出现不规则或破碎细胞核, 光感受器外节(IS)与内节(OS)排列紊乱, 分界消失; 与模型组相比, 滋阴明目丸组与丹芪化癆方中、高剂量组大鼠视网膜结构显著改善, 视网膜 ONL 厚度增加(P<0.05, P<0.001), 细胞形变减少, IS/OS 排列较整齐, 分界线尚存, 见图 2。结果表明, 丹芪化癆方对 LIRD 模型大鼠视网膜结构有保护作用, 且与剂量有一定相关性。

TUNEL 染色显示, 与正常组相比, 模型组大鼠视网膜细胞凋亡率显著升高(P<0.001); 与模型组相比, 滋阴明目丸组与丹芪化癆方各剂量组大鼠视网膜细胞凋亡率明显降低(P<0.001), 见图 3。

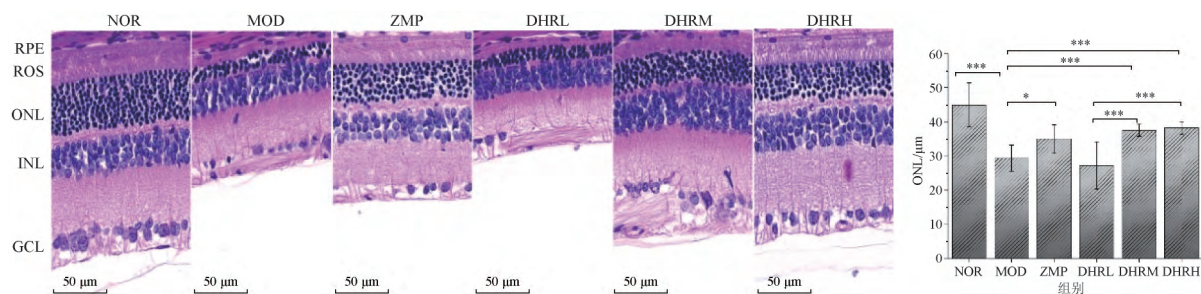
3.3 丹芪化癆方对 LIRD 大鼠视网膜超微结构的影响 透射电镜观察显示, 与正常组比较, 模型组与丹芪化癆方低剂量组大鼠视网膜光感受器 IS 膜盘排列紊乱疏松、间隙扩大, 伴断裂溶解; 外核层(ONL)细胞排列紊乱, 视细胞胞浆水肿呈空泡状, 膜盘紊乱、核间空隙可见, 并可见核染色质浓集、边集等细胞凋亡早期特征; 内核层(INL)细胞核周胞质肿胀空泡化, 核膜破损溶解, 细胞间隙明显; 神经节细胞层(GCL)中度水肿, 部分细胞器肿胀空泡化, 核不规则、染色质均匀, 核仁边移、核周缝局部增宽。与模型组比较, 滋阴明目丸组与丹芪化癆方中、高剂量组大鼠视细胞 IS 盘膜排列较整齐, 仅少量水肿、间隙仍大; ONL 细胞间隙缩小、排列整齐, 核仁形态多样; INL 细胞间质无水肿, 核浓缩减轻、核膜清晰, 少量线粒体空泡变; GCL 胞质无明显水肿, 部分细胞器肿胀空泡化, 核不规则、染色质均匀、核仁明显,



NOR.正常组; MOD.模型组; ZMP.滋阴明目丸组; DHRL.丹芪化瘀方低剂量组; DHRM.丹芪化瘀方中剂量组; DHRH.丹芪化瘀方高剂量组(图2~5、表2~3同)。A、B.3.0 cd·s·m⁻²刺激; C、D.10.0 cd·s·m⁻²刺激; A、C.a波; B、D.b波。2组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (图2、3同)。

图1 丹芪化瘀方对 LIRD 大鼠视网膜细胞电生理功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig.1 Effect of Danqi Huayu Recipe on electrophysiological function of retinal cells in LIRD rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)



RPE.视网膜色素上皮层; ROS.杆外段。ONL.外核层; INL.内核层; GCL.神经节细胞层(图4同)。

图2 丹芪化瘀方对 LIRD 大鼠视网膜组织病理的影响(HE染色, $\times 300$; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.2 Effect of Danqi Huayu Recipe on retinal histopathology in LIRD rats(HE staining, $\times 300$; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

核周隙轻微增宽、膜完整,见图4。

3.4 丹芪化瘀方对 LIRD 大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响
Western blot 检测显示,与正常组比较,模型组大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53 和 Bax 蛋白表达升

高($P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达降低($P < 0.05$);与模型组比较,滋阴明目丸组与丹芪化瘀方中、高剂量组大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bax 蛋白表达降低($P < 0.01, P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达升高($P < 0.001$),见图5、表2。

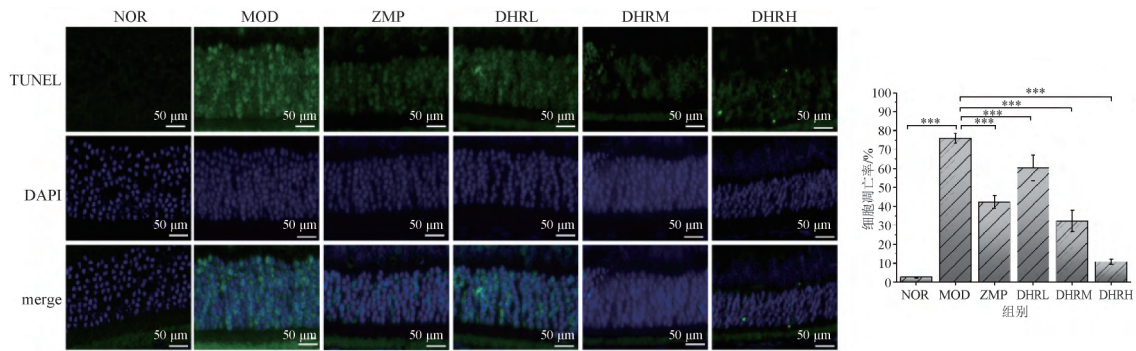
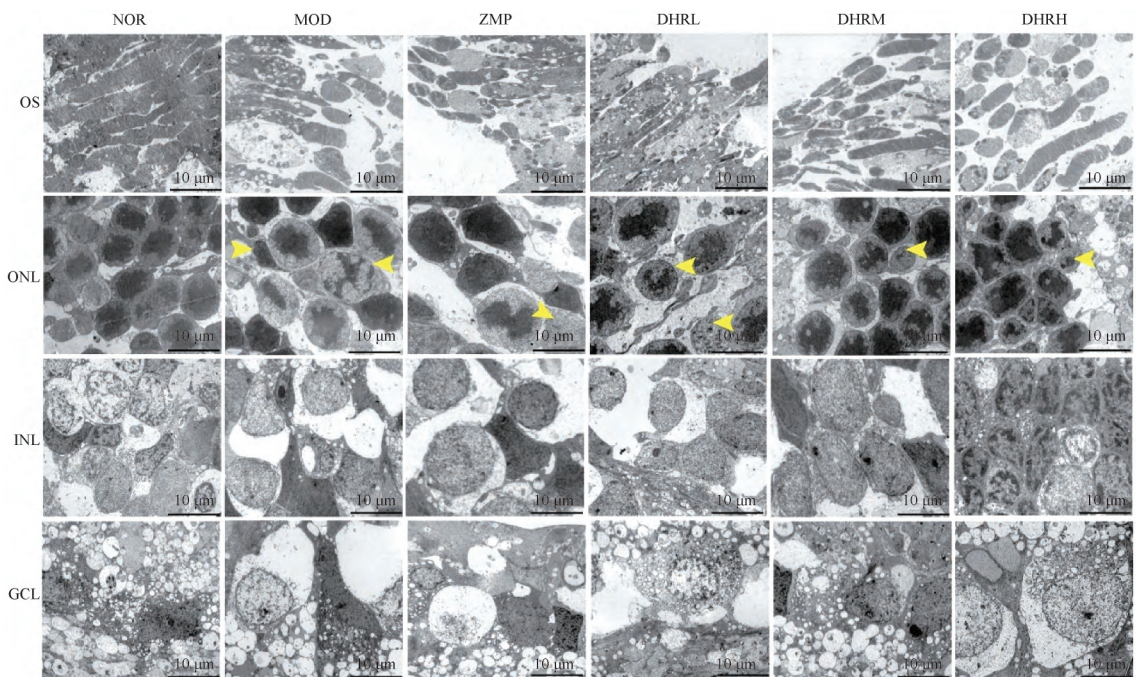


图 3 丹芪化瘀方对 LIRD 大鼠视网膜细胞凋亡的影响(TUNEL 染色, $\times 300$; $\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 Effect of Danqi Huayu Recipe on apoptosis of retinal cells in LIRD rats (TUNEL, $\times 300$; $\bar{x} \pm s, n=3$)



OS: 外节; 黄色箭头指示凋亡细胞(核固缩、染色质边集)。

图 4 丹芪化瘀方对 LIRD 大鼠视网膜超微结构的影响(透射电镜, $\times 1000$)

Fig.4 Effect of Danqi Huayu Recipe on retinal ultrastructure in LIRD rats(transmission electron microscope, $\times 1000$)

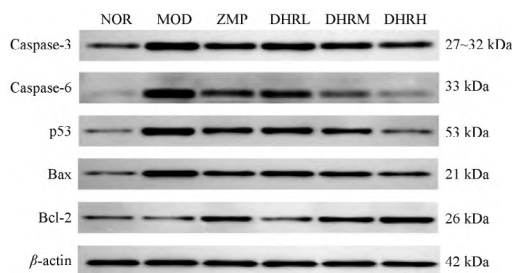


图 5 大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达条带

Fig.5 Bands of retinal proteins expression of Caspase-3, Caspase-6, p53, Bax, and Bcl-2 in rats

3.5 丹芪化瘀方对 LIRD 大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响

RT-qPCR 检测显示,与正常组比较,模型组大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bax mRNA 表达明显升高,Bcl-2 mRNA 表达明显降低($P<0.001$);与模型组比较,滋阴明目丸组与丹芪化瘀方各剂量组大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bax mRNA 表达降低,Bcl-2 表达升高($P<0.01, P<0.001$);与丹芪化瘀方低剂量组比较,丹芪化瘀方中、高剂量组大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bax mRNA 表达降

表 2 丹芪化瘀方对 LIRD 大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Danqi Huayu Recipe on retinal proteins expression of Caspase-3, Caspase-6, p53, Bax, and Bcl-2 in LIRD rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Caspase-3	Caspase-6	p53	Bax	Bcl-2
NOR	—	1.04±0.02	1.00±0	1.00±0.01	0.83±0.19	0.96±0.14
MOD	—	2.81±0.14 ²⁾	4.55±0.37 ²⁾	5.59±0.81 ²⁾	4.05±0.87 ²⁾	0.40±0.09 ¹⁾
ZMP	7.8	1.94±0.09 ^{4,5)}	2.81±0.80 ³⁾	3.23±0.17 ⁴⁾	2.37±0.26 ⁴⁾	2.03±0.41 ^{4,6)}
DHRL	3.45	2.29±0.12 ⁴⁾	3.87±0.88	4.05±0.59 ³⁾	2.74±0.21 ³⁾	0.99±0.03
DHRM	10.35	1.95±0.17 ^{4,5)}	2.40±0.39 ^{4,5)}	3.23±0.21 ^{4,5)}	2.37±0.32 ⁴⁾	1.73±0.20 ^{4,5)}
DHRH	31.05	1.37±0.14 ^{4,6)}	1.63±0.42 ^{4,6)}	1.66±0.13 ^{4,6)}	1.51±0.31 ^{4,5)}	2.16±0.47 ^{4,6)}
F	—	83.04	17.16	45.02	18.68	19.59

注:—,无数据;与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.001$;与模型组比较³⁾ $P<0.01$,⁴⁾ $P<0.001$;与丹芪化瘀方低剂量组比较⁵⁾ $P<0.01$,⁶⁾ $P<0.001$ (表 3 同)。

低,Bcl-2 表达升高($P<0.01, P<0.001$),见表 3。结果表明,丹芪化瘀方能够调节视网膜凋亡相关基因

的表达,对视网膜细胞具有保护作用,且其调节作用与药物剂量相关。

表 3 丹芪化瘀方对 LIRD 大鼠视网膜 Caspase-3、Caspase-6、p53、Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Danqi Huayu Recipe on retinal mRNA expression of Caspase-3, Caspase-6, p53, Bax, and Bcl-2 in LIRD rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Caspase-3	Caspase-6	p53	Bax	Bcl-2
NOR	—	1.03±0.05	0.95±0.05	1.03±0.03	1.03±0.04	1.05±0.04
MOD	—	10.53±1.10 ²⁾	6.92±0.45 ²⁾	5.92±0.20 ²⁾	9.69±0.70 ²⁾	0.48±0.03 ²⁾
ZMP	7.8	3.83±0.35 ^{4,5)}	4.18±0.33 ^{4,6)}	3.43±0.14 ^{4,6)}	3.12±0.54 ^{4,5)}	1.67±0.09 ^{4,6)}
DHRL	3.45	5.57±0.16 ⁴⁾	5.93±0.25 ³⁾	5.05±0.44 ³⁾	4.33±0.38 ⁴⁾	0.98±0.13 ⁴⁾
DHRM	10.35	4.07±0.22 ^{4,5)}	3.87±0.25 ^{4,6)}	3.85±0.17 ^{4,6)}	3.16±0.25 ^{4,5)}	1.73±0.15 ^{4,6)}
DHRH	31.05	2.35±0.23 ^{4,6)}	2.74±0.10 ^{4,6)}	2.23±0.31 ^{4,6)}	2.18±0.17 ^{4,6)}	2.95±0.14 ^{4,6)}
F	—	136.23	185.03	154.72	163.21	186.80

4 讨论

LIRD 相关性眼病表现为眼外观端好而视力逐渐下降、视物不清,根据临床表现属于中医学“视瞻昏渺”范畴,归属于瞳神疾病。古籍中多有描述,如《审视瑶函·杂病·七窍门》^[19]谓此证“目内外无证候,但自视昏渺蒙昧不清也。有神劳,有血少,有元气弱,有元精亏。而昏渺者,若人年五十以外而昏者,虽治不复光明”。《景岳全书·卷二十九》云“凡病目者,非火有余而阴不足耳”。古人强调眼乃上窍,蕴含阴液、神膏神水,且光照属阳邪,易袭上窍,耗液伤阴,加之眼底脉络微细,易于因虚而瘀血内阻,形成气阴两虚、脉络瘀滞之证。古人治疗眼病,行血为治目之纲,故本课题组认为视网膜光损伤的治疗宜用益气滋阴活血之法,方用丹芪化瘀方。丹芪化瘀方来源于《眼科纂要》的大补参芪丸化裁,古人常用此丸治疗视网膜色素变性等视网膜退行性疾病^[20]。方中以黄芪、党参补中益气为君;生地黄、葛根、麦冬、玄参滋阴除燥生津为臣;当归、熟地黄补血

养血明目为使;丹参、三七、桃仁活血化瘀,全方攻补相容,方证相应,标本兼治,共奏益气滋阴、化瘀通络的功效。

结果显示,模型组大鼠在不同刺激强度下 ERG a 波和 b 波振幅均显著下降,视网膜 ONL 明显变薄,结构紊乱,说明 LIRD 大鼠建模成功。而丹芪化瘀方干预 LIRD 模型大鼠后,ERG a 波和 b 波振幅明显增加,视网膜 ONL 增厚,网膜结构得到一定修复,表明丹芪化瘀方可改善过度光照对视网膜细胞功能的损伤,利于保护视网膜结构,且这种调节作用与药物剂量有相关性。

细胞凋亡是一种普遍保守的细胞死亡机制,对于选择活细胞和维持正常细胞发育过程的稳态至关重要。该过程由 Bcl-2 蛋白家族调节,包括促凋亡和促存活成员,如 Bcl-2、B 细胞淋巴瘤 X 蛋白异构体(Bcl-XL)、Bcl-W、MCL1 和其他抑制凋亡的蛋白^[21]。相反,Bax、BIM、BID、BAD、BAK 和 HRK 等蛋白可促进视网膜细胞凋亡^[22]。Bax 表达升高通

过打开线粒体通透性转换孔和刺激半胱天冬酶活性,促进视网膜细胞凋亡,而 Bcl-2 表达增加则阻碍视网膜细胞凋亡^[23]。研究表明,在光诱导损伤模型中,抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-XL 在光感受器和 RPE 细胞下调。相反,促凋亡蛋白(如 Bax)、促炎蛋白(TNF- α 、Caspase-3、Caspase-9)随着长时间的光暴露而上调。同时,细胞核坏死降低了视网膜总厚度,并观察到光感受器萎缩,表明蓝光通过调节 Bcl-2 和 Bax 表达,促进线粒体内源性凋亡途径,导致视网膜光损伤^[9]。在大鼠的光损伤模型中,蓝光暴露增加视网膜神经节细胞 Bax 和 Caspase-9 表达,同时降低 Bcl-2 和 Bcl-XL 表达。虽然没有检测到 Caspase-3 和 Bak,但这些发现暗示 RGC 凋亡的机制是由于 Bax 表达增加改变了线粒体通透性,随后将大量细胞色素 c 释放到细胞质中,并激活 Caspase-9^[24]。p53 是最重要的肿瘤抑制因子,可诱导细胞凋亡和衰老^[25]。此外,p53 可通过激活 Bax,诱导线粒体途径的凋亡^[24]。而 Caspase-3 与 Caspase-6 作为重要的执行半胱天冬酶,在细胞凋亡过程中发挥重要作用^[24]。这些研究共同证实了在视网膜光损伤模型中,尤其是涉及视网膜细胞线粒体凋亡途径时,半胱天冬酶依赖性凋亡途径是十分重要的。本研究通过透射电镜观察发现,模型组大鼠视网膜各层细胞数量减少、核固缩、形态异常、排列紊乱;TUNEL 染色发现,模型组视网膜细胞凋亡率显著增加;Western blot 检测显示,模型组大鼠促凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-6、p53 和 Bax 表达增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低;且 RT-qPCR 检测显示,模型组大鼠促凋亡基因 Caspase-3、Caspase-6、p53 和 Bax 表达增加,而抗凋亡基因 Bcl-2 表达降低。各给药组干预后,大鼠视网膜各层细胞排列较为整齐、形态尚完整,TUNEL 染色检测凋亡率均下降,RT-qPCR 检测提示 Caspase-3、Caspase-6、p53 和 Bax 基因表达降低,Bcl-2 基因表达增加。表明丹芪化瘀方可能通过调节视网膜细胞凋亡,降低视网膜组织光损伤,缓解 LIRD 模型大鼠的视网膜光损伤进程。

综上所述,丹芪化瘀方可以保护视网膜细胞电生理功能,缓解视网膜组织病理损伤,改善视网膜超微结构形态;降低促凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-6、p53 和 Bax 蛋白及 mRNA 表达,提高抗凋亡蛋白(Bcl-2)及 mRNA 表达,从而调控凋亡通路,减轻视网膜细胞凋亡,缓解过度光照后视网膜损伤的进展。

该研究为深入探索益气滋阴活血法的中药复方防治 LIRD 的效应机制提供了新的证据。

参考文献

- [1] ZHAO Y, SHEN Y. Light-induced retinal ganglion cell damage and the relevant mechanisms [J]. Cell Mol Neurobiol, 2020,40(8):1243.
- [2] JAADANE I, BOULENGUEZ P, CHAHORY S, et al. Retinal damage induced by commercial light emitting diodes (LEDs) [J]. Free Radic Biol Med, 2015,84:373.
- [3] KRIGEL A, BERDUGO M, PICARD E, et al. Light-induced retinal damage using different light sources, protocols and rat strains reveals LED phototoxicity [J]. Neuroscience, 2016,339:296.
- [4] ZHANG Z, SHAN X, LI S, et al. Retinal light damage: from mechanisms to protective strategies [J]. Surv Ophthalmol, 2024,69(6):905.
- [5] CHUDHARY M, ZHANG C, SONG S, et al. Ginkgo biloba delays light-induced photoreceptor degeneration through antioxidant and antiapoptotic properties [J]. Exp Ther Med, 2021,21(6):576.
- [6] LIN C H, WU M R, LI C H, et al. Editor's highlight: periodic exposure to smartphone-mimic low-luminance blue light induces retina damage through Bcl-2/Bax-dependent apoptosis [J]. Toxicol Sci, 2017,157(1):196.
- [7] KIM J, JIN H L, JANG D S, et al. Quercetin-3-O- α -L-arabinopyranoside protects against retinal cell death via blue light-induced damage in human RPE cells and Balb-c mice [J]. Food Funct, 2018,9(4):2171.
- [8] 胡敏娜,罗萍,颜家朝,等. 滋阴明目丸对大鼠视网膜光损伤后细胞凋亡的影响 [J]. 中国中医眼科杂志,2016,26(4):211.
- [9] 颜家朝,李传课,李波,等. 滋阴明目丸含药血清对视网膜色素上皮细胞光损伤模型细胞凋亡率及 Caspase-1、Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 中医杂志,2018,59(24):2133.
- [10] 颜家朝. 丹芪化瘀方治疗单纯型糖尿病视网膜病变气阴两虚瘀血阻络证的临床观察 [J]. 长沙:湖南中医药大学,2012.
- [11] 周媛,颜家朝,秦裕辉,等. 丹芪化瘀方含药血清对光损伤人视网膜色素上皮细胞保护机制研究 [J]. 陕西中医,2025,46(1):13.
- [12] 周媛,喻京生,颜家朝,等. 丹芪化瘀方对光诱导的人视网膜色素上皮细胞氧化应激的影响 [J]. 中国中医眼科杂志,2025,35(2):108.
- [13] POP R M, GHERMAN L M, JIANU E M, et al. Inflammation and oxidative stress processes in induced precocious puberty in rats [J]. Heliyon, 2024,10(24):e40962.
- [14] SYKES S M, ROBISON W G, WAXLER M, et al. Damage to the monkey retina by broad-spectrum fluorescent light [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1981,20(4):425.
- [15] HANSSON H A. A histochemical study of oxidative enzymes in rat retina damaged by visible light [J]. Exp Eye Res, 1970,9

- (2): 285.
- [16] POLOSA A, LV S, AIT IGRINE W, et al. Evidences suggesting that distinct immunological and cellular responses to light damage distinguishes juvenile and adult rat retinas [J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(11): 2744.
- [17] WANG J, YU T, SHENG L, et al. Lotus seedpod proanthocyanidins protect against light-induced retinal damage via antioxidative stress, anti-apoptosis, and neuroprotective effects [J]. *Med Sci Monit*, 2021,27: e935000.
- [18] 贺石林,王键,王净净.中医科研设计与统计学 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社,2003.
- [19] 傅仁宇.审视瑶函 [M]. 上海: 上海卫生出版社, 1958.
- [20] 黄岩. 眼科纂要 [M]. 王明杰,和中浚,江花等校注.北京: 中国中医药出版社, 2015.
- [21] 宋森豫,朱翠玲,李一卓,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤通过 $I_{K}B\alpha$ / $NF-\kappa B$ 通路调控心肌梗死后心力衰竭大鼠细胞凋亡的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2025, 50 (8): 2184.
- [22] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of Bcl-2 family proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019,20(3): 175.
- [23] RAVI R, SUBRAMANIAM R B. Paraoxonase 2 protects against the CML mediated mitochondrial dysfunction through modulating JNK pathway in human retinal cells [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2022,1866(1): 130043.
- [24] SANCHEZ-RAMOS C, BONNIN-ARIAS C, BLÁZQUEZ-SÁNCHEZ V, et al. Retinal protection from LED-backlit screen lights by short wavelength absorption filters [J]. *Cells*, 2021,10 (11): 3248.
- [25] LIU Y, SU Z, TAVANA O, et al. Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(6): 946.
- [26] SAHOO G, SAMAL D, KHANDAYATARAY P, et al. A review on caspases: key regulators of biological activities and apoptosis [J]. *Mol Neurobiol*, 2023,60(10): 5805.

责任编辑 张燕