

本文引用:王 英,彭 俊,刘家琪,徐 剑,谭涵宇,彭清华.滋阴明目丸对 RCS 大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 表达的影响[J].湖南中医药大学学报, 2018,38(7):732-737.

滋阴明目丸对 RCS 大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 表达的影响

王 英^{1,2}, 彭 俊³, 刘家琪^{1,4}, 徐 剑^{1,5}, 谭涵宇¹, 彭清华^{1,3*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学高等专科学校附属第一医院,湖南株洲 412008;
3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;4.海南省眼科医院中山大学中山眼科中心,海南海口 570000;
5.宁波博视眼科医院,浙江宁波 315000)

[摘要] **目的** 观察滋阴明目丸对皇家外科学院(royal college surgeons,RCS)大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 表达的影响。**方法** 实验对象分3组,分别为:空白组、模型组、滋阴明目丸组(每组雌雄各4只共8只)。空白组:RCS(rdy+/+,p+/+)大鼠,灌胃生理盐水;模型组:RCS(rdy-/-,p-/-)大鼠,灌胃生理盐水;滋阴明目丸组:RCS(rdy-/-,p-/-)大鼠,灌胃滋阴明目丸混悬液。灌胃30 d后,免疫组化检测各组大鼠视网膜组织中 Bax 及 Caspase-3 表达,RT-qPCR 法及 Western Blot 法分别测定各组视网膜组织中 Bax 及 Caspase-3 mRNA 及蛋白相对表达水平。**结果** Bax、Caspase-3 蛋白在滋阴明目丸组视网膜中的阳性表达显著低于模型组,但高于空白组。与空白组比较,模型组 Bax、Caspase-3 平均光密度值均增加,滋阴明目丸组 Bax 平均光密度值增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,滋阴明目丸组 Bax、Caspase-3 平均光密度值均显著减少($P<0.01$)。与空白组比较,模型组 Bax、Caspase-3 mRNA、蛋白表达均增加,滋阴明目丸组 Bax mRNA、蛋白表达均增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,滋阴明目丸组 Bax、Caspase-3 mRNA、蛋白表达均显著减少($P<0.01$)。**结论** (1)滋阴明目丸 RCS(rdy-/-,p-/-)大鼠视网膜的超微结构具有保护作用;(2)滋阴明目丸能抑制 RCS(rdy-/-,p-/-)大鼠视网膜上 Bax 及 Caspase-3 的表达;(3)滋阴明目丸可能是通过下调视网膜上 Bax 及 Caspase-3 的表达,从而减轻视网膜感光细胞的凋亡,达到保护视细胞的目的。

[关键词] 滋阴明目丸;RCS 大鼠;Bax;Caspase-3;细胞凋亡

[中图分类号] R289.5;R276.7

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.07.004

Effect of Ziyin Mingmu Pill on the Expression of Bax and Caspase-3 in the Retina in Royal College Surgeons Rats

WANG Ying^{1,2}, PENG Jun³, LIU Jiaqi^{1,4}, XU Jian^{1,5}, TAN Hanyu¹, PENG Qinghua^{1,3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou, Hunan 412008, China; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 4. Hainan Eye Hospital & Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-Sen University, Haikou, Hainan 570000, China; 5. Ningbo Boshi Eye Hospital, Ningbo, Zhejiang 315000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Ziyin Mingmu Pill on the expression of Bax and Caspase-3 in the retina in Royal College Surgeons (RCS) rats. **Methods** RCS rats were divided into blank group, model group, and Ziyin Mingmu Pill group, with 8 rats (4 male and 4 female rats) in each group. The RCS (rdy+/+, p+/+) rats in the blank group were treated with normal saline by gavage; the RCS (rdy-/-, p-/-) rats in the model group were given normal saline by gavage; the RCS (rdy-/-, p-/-) rats in the Ziyin Mingmu Pill group were given the suspension of Ziyin Mingmu Pill by gavage. After 30 days of intragastric administration, immunohistochemistry was used to measure the expression of Bax and Caspase-3 in the retina, and RT-qPCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of Bax and Caspase-3 in the retina. **Results** The Ziyin

[收稿日期] 2018-03-12

[基金项目] 湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科开放基金优先资助项目(2015ZYD02);湖南省教育厅创新平台开放基金项目(16K065);湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目;国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目;湖南省中医五官科学重点学科建设项目。

[作者简介] 王 英,女,硕士,研究方向:中西医结合治疗眼底病及干眼症。

[通讯作者] * 彭清华,男,教授,博士研究生导师,E-mail:pqh410007@126.com。

Mingmu Pill group had significantly lower expression of Bax and Caspase-3 in the retina than the model group and significantly higher expression of Bax and Caspase-3 than the blank group. Compared with the blank group, the model group had significant increases in the mean optical density of Bax and caspase-3, and the Ziyin Mingmu Pill group had a significant increase in the mean optical density of Bax ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with the model group, the Ziyin Mingmu Pill group had significant reductions in the mean optical density of Bax and Caspase-3 ($P<0.01$). Compared with the blank group, the model group had significant increases in the mRNA and protein expression of Bax and Caspase-3, and the Ziyin Mingmu Pill group had significant increases in the mRNA and protein expression of Bax ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with the model group, the Ziyin Mingmu Pill group had significant reductions in the mRNA and protein expression of Bax and Caspase-3 ($P<0.01$). **Conclusion** Ziyin Mingmu Pill has a protective effect on the ultrastructure of the retina in RCS (rdy-/-, p-/-) rats and can inhibit the expression of Bax and Caspase-3 in the retina. Ziyin Mingmu Pill protects the visual cells by downregulating the expression of Bax and Caspase-3 in the retina and reducing the apoptosis of photoreceptor cells in the retina.

[**Keywords**] Ziyin Mingmu Pill; Royal College Surgeons rat; Bax; Caspase-3; cell apoptosis

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一组以进行性感光细胞及色素上皮功能丧失为共同表现的遗传性视网膜疾病,它的主要临床特征为夜盲、进行性视野缺损、眼底的特征性改变以及视网膜电图(electroretinogram, ERG)异常^[1]。视网膜色素变性在世界各国的发病率在 1/5 000~1/3 000 之间,是最常见的遗传性致盲眼病之一。目前 RP 的发病机制尚不明确,大部分研究认为感光细胞的变性凋亡可能是引起视觉功能异常的主要原因^[2]。中医学将视网膜色素变性归为“高风内障”的范畴,除先天禀赋不足、肾阳虚亏、肝肾两亏、阴阳不济、脾胃虚弱、气血不足等是视网膜色素变性发生的主要原因外,历代医家多从虚着手,从脾肝肾来治疗视网膜色素变性,收效尚可。本团队在前期大量 RP 病例的收集与实验研究发现:本虚标实,虚中夹瘀,且血瘀贯穿于 RP 的始终是该病的主要发病机制^[3-4]。李传课教授也基于此病机根据滋补肝肾、活血明目的治疗法则创立了治疗 RP 的纯中药制剂—滋阴明目丸,并且从上世纪九十年代开始运用于临床,通过几代人的努力,在治疗虚中夹瘀型的 RP 上取得了一定的疗效,并且做了大量的临床观察及实验研究^[5-11]。此前导师彭清华教授的科研团队已通过相关实验证实:RCS(rdy-/-, p-/-)大鼠为 RDS 基因突变引起的视网膜色素变性经典模型鼠,具有“虚中夹瘀”证候^[12],本实验则以该种遗传性 RCS 大鼠作为研究对象,通过给予滋阴明目丸混悬液灌胃,探讨滋阴明目丸对 RP 大鼠视网膜中 Bax 及 Caspase-3 表达的影响,以期进一步为滋阴明目丸治疗 RP 的效用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物^[12]

皇家外科学院(royal college surgeons, RCS)大鼠

(购自苏州昭衍新药研究中心有限公司,质量合格证号:NO.201614068),SPF级,其中16只RCS(rdy-/-, p-/-)大鼠,雌雄各半,体质量75~130 g,平均鼠龄1.5月龄;8只RCS(rdy+/+, p+/+)大鼠,雌雄各半,体质量75~130 g,平均鼠龄1.5月龄。所有RCS大鼠均饲养在湖南中医药大学实验楼动物实验中心SPF级实验房,湿度50%~55%,室温(23±2)℃,给予大鼠自由进食饮水,每3~4 d更换一次垫料。

1.2 药物、试剂和仪器

滋阴明目丸(湖南中医药大学第一附属医院药剂科);0.9%生理盐水(湖南科伦制药有限公司);水合氯醛、伊红、Harris 苏木素、4%多聚甲醛、3%过氧乙酸、PV9000型二抗试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司);无水乙醇、异丙醇、氯仿(上海化学试剂公司);Bax抗体、Caspase抗体(博士德);Trizol(BIOMIGA);逆转录试剂盒、2×PCR mix (GeneCopoeia);DNA Marker、彩色预染蛋白 marker (Fermentas);引物、Gold View 核酸染料、琼脂糖粉(上海生工生物工程股份有限公司);RIPA蛋白裂解液、超敏化学发光试剂盒、Bradford蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天);5X SDS-PAGE loading buffer、羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗(vazyme)、医用X射线光片、X线胶片显影定影液、压片夹(Koda);脱脂奶粉(伊利);电泳仪、垂直板电泳槽、水平摇床(北京六一仪器厂);恒温摇床(金坛 THZ-82A);轮转石蜡切片机(徕卡 RM2235);数码医学图像分析系统(深圳市深沅恒科技有限公司 Motic 6.0);立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备 YXQ-LS-S II);低温台式高速离心机(Thermo);紫外可见分光光度计(上海 Spectrum 公司 SP-752);超微量分光光度计(美国 Nanodrop);-80°超低温冰箱(中科美菱 DW-HL538);PCR仪(德国 Biometra);扫描仪(日本 Canon9000F Mark II)等。

1.3 动物分组

将雌性和雄性 RCS(rdy^{-/-},p^{-/-})大鼠随机分为2组:模型组(8只)和滋阴明目丸组(8只),每组雌雄各半。空白组:RCS(rdy^{+/+},p^{+/+})大鼠雌雄各半,共8只。

1.4 给药方法

大鼠购回后予适应性饲养1周后进行灌胃,灌胃时间为30d。灌胃药物由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供的按现代工艺制成的浓缩丸:滋阴明目丸(湘药制字Z20080745)。按照“人-动物体表面积等效剂量比值表”折算实验动物的给药剂量,折算公式:W*成人用量(g)/动物体质量(kg),折算系数W=0.018,每组灌胃药物详情如下:(1)模型组和空白组的灌胃药物为0.9%生理盐水,其剂量按照12 mL/(kg·d)计算;(2)滋阴明目丸组的灌胃药物为滋阴明目丸混悬液,灌胃剂量按7.8 g/kg的混悬液(0.156 g/mL)计算。滋阴明目丸混悬液配制方法:将相当于7.8 g的滋阴明目丸粉末与50 mL灭菌蒸馏水混合,室温摇匀即成。

1.5 取材

于灌胃第30天结束后1天,将大鼠用10%水合氯醛3.5 mL/kg腹腔注射麻醉,大鼠麻醉成功后,迅速摘取两只眼球送检,断颈处死所有大鼠。

1.6 指标检测

1.6.1 大鼠视网膜组织形态检查 HE染色后在光学显微镜下观察标本视网膜各层结构的形态学变化。

1.6.2 免疫组化法检测大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 蛋白表达情况 常规脱蜡、复水组织切片;根据所应用的一抗的特殊要求,对组织切片进行预处理;3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min,用来阻断内源性过氧化物酶;PBS 冲洗 2 min×3 次;滴加 Bax、Caspase-3、Fas 及 FasL 单克隆抗体,室温或 37 °C 孵育 1~2 h 或 4 °C 过夜,PBS 冲洗 2 min×3 次;滴加试剂 Polymer Helper,室温或 37 °C 孵育 20 min,PBS 冲洗 2 min×3 次;滴加试剂 polymeroxidase-anti-mouse/rabbit IgG,室温或 37 °C 孵育 20 min,PBS 冲洗 2 min×3 次;应用 DAB 溶液显色;自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片;光学显微镜下观察。

1.6.3 RT-qPCR 检测大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 mRNA 表达情况 下载基因序列,进行引物设计,具体引物序列:Bax-F:ACGCATCCACCAAGAAGC;Bax-R:GCCACACGGAAGAAGACC;Caspase-3-F:T

TAATAAAGGTATCCATGGA;Caspase-3-R:TTAGT-GATAAAAATAGAGTT;β-actin-F:CCCATCTATGAGGGTTACGC;β-actin-R:TTTAATGTCACGCACGATTTTC。提取总 RNA(处理实验器皿:浸泡、高温高压灭菌;总 RNA 的提取:匀浆、离心、去上清液、晾干、入 DEPC 水溶解 RNA;等到 RNA 沉淀完全溶解后,用凝胶电泳进行检测,放在-20 °C 的环境中保存);测 RNA 浓度与纯度;逆转录 cDNA;再行 PCR 检测。

1.6.4 Western blot 法检测大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 蛋白表达情况 先制备 Bax 及 Caspase-3 蛋白样品(组织块称量,剪碎;碾碎组织;裂解,4 °C 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,-20 °C 保存);Bradford 法测定 Bax 及 Caspase-3 蛋白质含量(按 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒使用说明操作,测定蛋白浓度);SDS-PAGE 凝胶电泳(清洗并晾干玻璃板;配分离胶,加 TEMED 摇匀灌胶,加水液封,胶凝后吸干水,配浓缩胶,加 TEMED 摇匀灌胶,水冲洗浓缩胶后置于电泳槽内,计算上样量,上样,电泳);转膜(平衡电转移缓冲液,10 min,垫滤纸,铺凝胶,去气泡,加电转移缓冲液,胶面朝阴极,膜面朝阳极,4 °C 下,380 mA 转移 1.5 h);抗体孵育和显色(滤膜置于杂交袋,加封闭液,密封,室温孵育 4 h/4 °C 过夜,去封闭液,加一抗,25 °C 孵育 1 h/4 °C 过夜,去一抗,TBST 漂洗 10min,3 次,滤膜置于新的杂交袋,加入二抗,稀释,37 °C 孵育 1 h,去二抗,TBST 漂洗 10 min,3 次,ECL 检测液显色、X 光胶片显影定影,曝光:1 min,3 min,5 min,然后显影,定影,晾干)。扫描胶片,图像分析软件 IPP 6.0 对图像进行灰度分析。

1.7 统计学方法

实验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。统计学分析采用 SPSS 17.0 进行各组间方差分析,方差齐时采用 LSD 法,方差不齐时采用 Tamhane's T2 法,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 RCS 大鼠视网膜组织形态观察

空白组:RCS(rdy^{+/+},p^{+/+})大鼠视网膜各层结构清晰正常。模型组:RCS(rdy^{-/-},p^{-/-})大鼠视网膜的厚度显著薄于空白组 RCS(rdy^{+/+},p^{+/+})大鼠。视网膜色素上皮细胞大部分损失,视网膜外层较薄,

部分感光细胞形态欠规则,细胞核数量减少,大部分区域无感光器核染色,一小部分区域可见聚集成团的细胞核染色,并有少量的点状黑色素颗粒散在分布于视网膜内层。滋阴明目丸组:RCS(*rdy*^{-/-},*p*^{-/-})大鼠感光细胞核的数量大于模型组的数量,外丛状层、外核层、视杆视锥层的结构厚于模型组,并且结构更清晰。见图1。

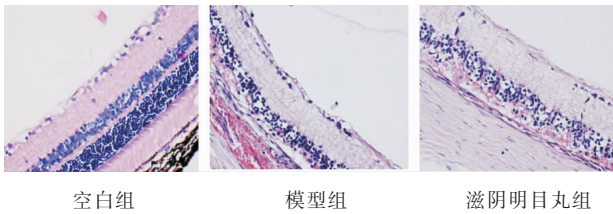


图1 各组 RCS 大鼠视网膜组织形态光镜图(HE,×400)

2.2 各组 RCS 大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 免疫组化检测结果

免疫组化检测结果见图2-3、表1。空白组:RCS(*rdy*^{+/+},*p*^{+/+})大鼠视网膜各层结构形态规则,排列整齐,在视网膜外层可见少量 Bax、Caspase-3 蛋白分散表达。模型组:RCS(*rdy*^{-/-},*p*^{-/-})大鼠视网膜各层结构紊乱萎缩变薄,病灶集中在外层视网膜,视细胞萎缩变性,视网膜外层明显可见大量 Bax、Caspase-3 蛋白表达,其余视网膜各层也可见部分表达。滋阴明目丸组:RCS(*rdy*^{-/-},*p*^{-/-})大鼠视网膜厚度明显高于模型组且视网膜色素上皮部分可见,光感受器细胞核数量多于模型组。说明 Bax、Caspase-3 蛋白在滋阴明目丸组视网膜中的阳性表达显著低于模型组,但高于空白组。与空白组比较,模型组 Bax、Caspase-3 平均光密度值均增加,滋阴明目丸组 Bax 平均光密度值增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,滋阴明目丸组 Bax、Caspase-3 平均光密度值均显著减少($P<0.01$)。

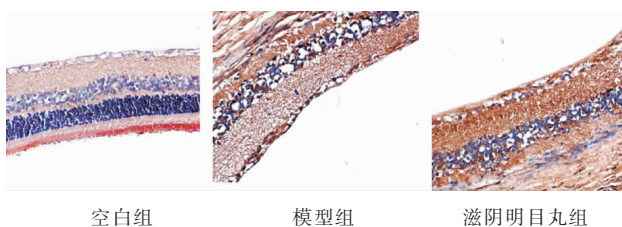


图2 各组 RCS 大鼠视网膜 Bax 蛋白表达情况(IHC,×400)

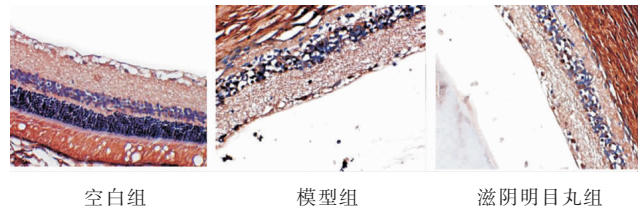


图3 各组 RCS 大鼠视网膜 Caspase-3 蛋白表达情况(IHC,×400)

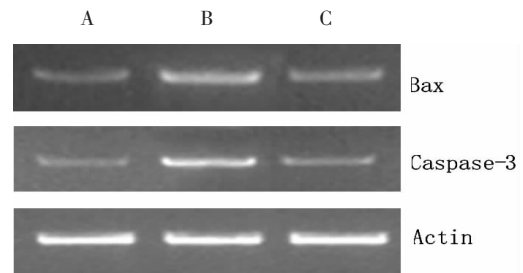
表1 各组 RCS 大鼠视网膜各细胞层 Bax 及 Caspase-3 的平均光密度值比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	Bax	Caspase-3
空白组	0.096±0.026	0.053±0.020
模型组	0.211±0.036 ^{▲▲}	0.119±0.027 ^{▲▲}
滋阴明目丸组	0.133±0.030 ^{▲△△}	0.069±0.024 ^{△△}

注:与空白组比较:▲ $P<0.05$;▲▲ $P<0.01$;与模型组比较:△ $P<0.01$ 。

2.3 各组 RCS 大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 RT-qPCR 检测结果

RT-qPCR 检测结果见图4、表2。与空白组比较,模型组 Bax、Caspase-3 mRNA 的表达均增加,滋阴明目丸组 Bax mRNA 的表达增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,滋阴明目丸组 Bax、Caspase-3 mRNA 的表达均显著减少($P<0.01$)。



注:A.空白组;B.模型组;C.滋阴明目丸组。

图4 各组 RCS 大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 RT-qPCR 电泳图

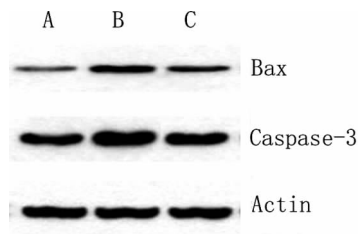
表2 各组 RCS 大鼠视网膜 Bax、Caspase-3 mRNA 的表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	Bax	Caspase-3
空白组	0.241±0.028	0.225±0.072
模型组	0.593±0.038 ^{▲▲}	0.669±0.115 ^{▲▲}
滋阴明目丸组	0.292±0.052 ^{▲△△}	0.325±0.219 ^{△△}

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$;▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.01$ 。

2.4 各组 RCS 大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 Western blot 检测结果

Western blot 检测结果见图5、表3。与空白组比较,模型组 Bax、Caspase-3 蛋白表达均增加,滋阴明目丸组 Bax 蛋白表达增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,滋阴明目丸组 Bax、Caspase-3 蛋白表达均显著减少($P<0.01$)。



注:A.空白组;B.模型组;C.滋阴明目丸组。

图5 各组 RCS 大鼠视网膜 Bax 及 Caspase-3 蛋白表达电泳图

表3 各组 RCS 大鼠视网膜 Bax、Caspase-3 蛋白表达

组别	比较	
	Bax	Caspase-3
空白组	0.257±0.090	0.583±0.037
模型组	0.768±0.061 ^{▲▲}	0.802±0.074 ^{▲▲}
滋阴明目丸组	0.374±0.051 ^{▲▲△}	0.629±0.045 ^{▲△}

注:与空白组比较:▲ $P<0.05$;▲▲ $P<0.01$;与模型组比较:△ $P<0.01$ 。

3 讨论

感光细胞能将视觉信号转换为光能信号,是传递视觉信息的第一级神经元,在视觉形成中占据着举足轻重的地位^[13]。细胞凋亡(apoptosis)是细胞自主有序死亡的过程,它由基因控制,并分为起始、效应器、凋亡执行三个阶段,各个阶段的完成也受到相关基因的激活、表达以及调控^[14]。视网膜中的感光细胞很脆弱,随着光学技术的日新月异,人造光源的污染以及来自外界环境的刺激都极易引起感光细胞损伤,而感光细胞一旦受损,便无法再生^[15]。感光细胞的凋亡是 RP 病程的最终结局,所以通过有效的方法延缓或者抑制视网膜感光细胞的凋亡是治疗 RP 的关键所在。Bax 属于 Bcl-2 家族众多成员之一,当外界刺激诱导凋亡时,Bax 在受到死亡信号的刺激后被激活,从细胞质中转移到线粒体膜上与膜结合,并快速形成同源二聚体,促进细胞凋亡^[16]。Caspase 是存在于细胞质中的蛋白酶,它参与细胞的生长、分化与凋亡调节各个环节,并且与真核细胞的凋亡有着密不可分的关系。多年以来,Caspase-3 的这一促凋亡作用已被国内外多项研究证实^[17-19]。

中医学定义视网膜色素变性为“高风内障”,是以夜盲和视野缩窄为主症的眼病,其记载以《太平圣惠方》为早,该病见于《证治准绳·杂病·七窍门》,又名高风雀目、高风障症、阴风障等。《日经大成·阴风障》记载:“大道行不去,可知世界窄,未晚草堂

昏,几疑天地黑。”在《秘传眼科龙木论·高风雀目内障》中记载“惟见顶上物”。《原机启微》中对其并发症也有一定的认识,如“多年瞳子如金色”;《杂病源流犀烛·目病源流》谓本病“亦有生成如此,并由父母遗体”,认为该病的发生主要是由于先天禀赋不足所致。与此同时《日经大成》中还记录了该病的预后和病因:“至晚不见,晓则复明,盖元阳不足之病。”视网膜色素变性发展到晚期还可并发白内障和视神经萎缩导致患者完全失明,如《日经大成》中记载:“不则,变内障者有之,变青盲者有之”。中医学认为先天禀赋不足是视网膜色素变性发生的主要原因,另外也可以由肾阳亏虚,命门火衰;肝肾两亏,精血不足,阴阳不济,阳气不能为用;脾胃虚弱,清阳不升,浊阴上盛,阳不彰明等引起。因此研究多从脾肝肾来治疗视网膜色素变性^[20-22]。

滋阴明目丸选用熟地黄、黄精、枸杞、菟丝子、山茱萸、淮山药、茯苓、楮实子、牡丹皮、三七、丹参、牛膝、当归、石决明、川芎、羌活、石菖蒲等药,按现代工艺制成浓缩丸。方中熟地黄补肝肾、益真阴、生精血、填骨髓、抗衰老、除目昏为君药;枸杞子益精明目、黄精补气养阴、山茱萸补益肝肾、淮山药益气养阴、茯苓利水渗湿、楮实子补肾清肝明目、菟丝子养肝明目助君药补益肝肾、明目除昏为臣;佐以牡丹皮、丹参、当归止血养血、三七活血化瘀止血、川芎活血行气等;石决明、牛膝平肝潜阳引火下行;羌活辛散防滞,又能引药上行;使以石菖蒲开窍宣通,疏利目中玄府。诸药合之,共奏滋补肝肾、平肝潜阳、活血化瘀之功。由于药切病机,故滋阴明目丸治疗视网膜色素变性可较好的减轻或延缓症状。前期研究表明^[5-11]:滋阴明目丸能通过影响 Bcl-2、p53 等凋亡相关基因从而抑制视细胞凋亡;能清除对眼组织有损伤作用的醛类化合物丙二醛(MDA);可改善视网膜超微结构,清除氧自由基;能上调老龄小鼠眼组织中过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性;能调节 NO/ET 的比值和一氧化氮(NO)含量,扩张血管;能在某种程度上降低视网膜细胞凋亡的 AI 指数等。

本研究结果显示滋阴明目丸组大鼠视网膜厚度较模型组明显增厚;免疫组化结果显示滋阴明目丸组 Bax 及 Caspase-3 平均光密度均较模型组减少

($P<0.01$);滋阴明目丸组 Bax、Caspase-3 mRNA、蛋白相对表达量明显低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$)。因此可得出结论:滋阴明目丸能抑制视网膜 Bax 及 Caspase-3 的表达,从而减少视网膜感光及神经细胞凋亡,达到恢复和保护视功能的目的。

综上所述,滋阴明目丸治疗“虚中夹瘀”证视网膜色素变性疾病的价值被进一步肯定,值得临床上更为广泛的推广及应用,但中药复合制剂成分多样,药理机制尚不明确,值得进一步深入完善。

参考文献:

- [1] 周朋义,彭广华.视网膜色素变性治疗的研究进展[J].眼科新进展,2012,32(5):493-496.
- [2] DAIGER S P, SULLIVAN L S, BOWNE S J. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa[J]. Clin Genet,2013,84(2):132-141.
- [3] 彭清华,李传课.视网膜色素变性虚中夹瘀的机理研究小结[J].中国医药学报,1993,8(6):7-10,61.
- [4] 彭清华,罗萍,江晓芬,等.视网膜色素变性血淤机理的初步研究[J].国医论坛,1993(1):37-40.
- [5] 李波,邝国平,李传课,等.滋阴明目丸治疗肝肾阴虚萎缩型老年性黄斑变性的临床和实验研究[J].中国中医眼科杂志,2001,11(4):206-210.
- [6] 朱惠安,李传课,罗耀红.滋阴明目丸对大鼠光损伤模型视网膜 p53、Bcl-2 及细胞凋亡的影响[J].中国中医眼科杂志,2006,16(2):96-98.
- [7] 朱惠安.滋阴明目丸对视网膜光损伤大鼠及年龄相关性黄斑变性治疗作用及其机理的研究[D].长沙:湖南中医学院,2003.
- [8] 朱惠安,李传课,罗耀红.滋阴明目丸对大鼠光损伤模型视网膜超微结构的影响[J].中国中医药信息杂志,2007,14(1):32-33.
- [9] 朱惠安,李传课,罗耀红.滋阴明目丸对大鼠光损伤模型视网膜超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、丙二醛的影响[J].新中医,2006,38(11):87-88.
- [10] 邝国平,李传课,曾红艳.滋阴明目丸抗氧化作用及对一氧化氮、内皮素影响的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2002,22(1):23-24.
- [11] 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):211-214.
- [12] 徐剑.基于 RHO、XBP1、Caspase12 表达探讨枸杞、丹参对虚中夹瘀证 RP 模型大鼠的干预研究[D].长沙:湖南中医药大学,2016.
- [13] 管怀进,龚启荣.现代基础眼科学[M].北京:人民军医出版社,1998.
- [14] MEIER P, RENCH A, EVAN G. Apoptosis in development.[J]. Nature, 2000, 407(6805):796-801.
- [15] 马瑞玲,吴根诚,张仁.针刺对视网膜变性大鼠感光细胞形态学变化的影响[J].中国针灸,2015,35(11):1149-1153.
- [16] 张建锋,庄晓萍,罗玮.Bcl-2 和 Bax 在子宫内膜癌细胞中的表达及临床意义[J].实用预防医学,2014,21(6):709-711.
- [17] JIANG H, ZHAO P J, SU D, et al. Paris saponin I induces apoptosis via increasing the Bax/Bcl-2 ratio and Caspase-3 expression in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer in vitro and in vivo [J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 9(6): 2265-2272.
- [18] 李灵芝,韦薇,龚海英,等.蕨麻正丁醇部位抑制缺氧损伤心肌细胞凋亡及 Caspase 3/9 表达[J].中华中医药学刊,2013,31(8):1573-1575,1823-1824.
- [19] PRADEEP A R, SUKE D K, PRASAD M V, et al. Expression of key executioner of apoptosis Caspase-3 in periodontal health and disease[J]. Journal of Investigative & Clinical Dentistry, 2014, 7(2):174-179.
- [20] 邓婷婷,窦仁慧,潘琳,等.温阳益气活血方对遗传性视网膜色素变性小鼠感光细胞凋亡的影响及机制研究[J].中国中西医结合杂志,2013,33(8):1122-1128.
- [21] 李雪丽,唐由之,范吉平,等.补肾益精方对 RCS 大鼠视网膜变性损伤的保护作用研究[J].中国中医眼科杂志,2016,26(3):144-149.
- [22] 刘映,张元钟,章青.银杏明目方治疗原发性视网膜色素变性[J].长春中医药大学学报,2017,33(1):115-117.

(本文编辑 李杰)