

本文引用:彭俊,蒋鹏飞,王英,刘家琪,潘坤,周亚莎,徐剑,彭清华.枸杞子加丹参对RCS(*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠视网膜组织形态及感光细胞凋亡的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(9):1086-1089.

## 枸杞子加丹参对RCS(*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠视网膜组织形态及感光细胞凋亡的影响

彭俊<sup>1,2</sup>,蒋鹏飞<sup>2,3</sup>,王英<sup>2,3</sup>,刘家琪<sup>2,3</sup>,潘坤<sup>2,3</sup>,周亚莎<sup>2,3</sup>,徐剑<sup>2,3\*</sup>,彭清华<sup>1,2,3\*</sup>

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007;2.中医药防治耳鼻咽喉疾病湖南省重点实验室,湖南长沙410208;  
3.湖南中医药大学,湖南长沙410208)

**〔摘要〕**目的 观察枸杞子加丹参对皇家外科学院(royal college surgeons, RCS)(*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠视网膜组织形态及感光细胞凋亡的影响。**方法** 40只RCS大鼠随机平均分为空白组、模型组、枸杞组、丹参组、杞参组,空白组及模型组灌胃蒸馏水,枸杞组灌胃枸杞子中药配方颗粒水溶液,丹参组灌胃丹参中药配方颗粒水溶液,杞参组灌胃枸杞子加丹参中药配方颗粒水溶液。灌胃28d后,HE染色观察各组RCS大鼠视网膜组织形态,TUNEL法检测视网膜感光细胞凋亡情况,并计算细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)。**结果** HE染色显示:空白组大鼠视网膜各层结构排列有序,形态规则;模型组大鼠视网膜各层结构紊乱,视网膜变薄;枸杞组与丹参组视网膜各层组织结构同模型组大鼠结构类似;杞参组视网膜外层萎缩现象较模型组减轻。TUNEL染色显示:空白组大鼠视网膜未见明显感光细胞凋亡;模型组大鼠视网膜各层见大量感光细胞凋亡;枸杞组与丹参组大鼠视网膜见大量感光细胞凋亡;杞参组大鼠视网膜见少量感光细胞凋亡。视网膜感光细胞AI:杞参组(14.13±5.64)%明显低于模型组(24.38±9.62)%、枸杞组(21.25±10.21)%、丹参组(19.25±7.98)%,差异有统计学意义(*P*<0.05)。**结论** 枸杞子加丹参可以减轻RCS大鼠视网膜感光细胞凋亡,从而保护视功能。

**〔关键词〕** 视网膜色素变性;RCS大鼠;细胞凋亡;枸杞子;丹参

**〔中图分类号〕** R285.5;R276.7

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.09.008

### Effects of *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* on Retinal Tissue Morphology and Photoreceptor Apoptosis of RCS (*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>) Rats

PENG Jun<sup>1,2</sup>, JIANG Pengfei<sup>2,3</sup>, WANG Ying<sup>2,3</sup>, LIU Jiaqi<sup>2,3</sup>, PAN Kun<sup>2,3</sup>, ZHOU Yasha<sup>2,3</sup>, XU Jian<sup>2,3\*</sup>, PENG Qinghua<sup>1,2,3\*</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Eye, Ear, Nose and Throat Diseases in Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**〔Abstract〕 Objective** To observe the effects of *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* on retinal tissue morphology and photoreceptor cell apoptosis in royal college surgeons (RCS) (*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>) rats. **Methods** A total of 40 RCS rats were randomly and equally divided into a blank group, a model group, a *Fructus Lycii* group, a *Radix Salviae Miltiorrhizae* group, and a *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* group. The blank group and the model group were given distilled water by gavage. The *Fructus Lycii* group was given *Fructus Lycii* Chinese medicine formula granule water solution by gavage. The *Radix Salviae Miltiorrhizae* group was given *Radix Salviae Miltiorrhizae* Chinese medicine formula granule water solution by gavage. The *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* group was given *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* Chinese medicine formula granule water solution by gavage. In 28 days after gavage, the retinal tissue morphology of RCS rats in each group was

**〔收稿日期〕** 2019-01-20

**〔基金项目〕** 国家自然科学基金项目(81804150);湖南省自然科学基金面上项目(2019JJ40226);湖南省教育厅创新平台开放基金项目(16K065);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);中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目(ZK1801YK015);湖南省中医五官科学重点学科建设项目。

**〔作者简介〕** 彭俊,男,硕士,医师,研究方向:中西医结合眼科研究。

**〔通讯作者〕** \*彭清华,男,二级教授,主任医师,博士研究生导师,E-mail:pqh410007@126.com;徐剑,女,博士,主任医师,E-mail:jg\_mao@sina.com。

observed by HE staining. Apoptosis of retinal photoreceptor cells was detected by TUNEL method, and apoptosis index (AI) was calculated. **Results** HE staining showed that the layers of the retina in the blank group were arranged in an orderly and regular morphology; the structures of the layers of the retina in the model group were disordered and the retina was thin; the structure of each layer of retina in the *Fructus Lycii* group and the *Radix Salviae Miltiorrhizae* group was similar to that of the model group; outer retinal atrophy in the *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* group was less than that in model group. TUNEL staining showed that there were no obvious photoreceptor apoptotic cells in the retina of the blank group; a large number of photoreceptor apoptotic cells were seen in each layer of the retina of the model group; a large number of photoreceptor apoptotic cells were seen in the retina of the *Fructus Lycii* group and the *Radix Salviae Miltiorrhizae* group; few photoreceptor apoptotic cells were seen in the retina of rats in the *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* group. For retinal photoreceptor cell AI comparison, (14.13±5.64)% of the *Fructus Lycii* group and the *Radix Salviae Miltiorrhizae* group was significantly lower than the model group (24.38±9.62%), the *Fructus Lycii* group (21.25±10.21)% and the *Radix Salviae Miltiorrhizae* group (19.25±7.98)%, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** *Fructus Lycii* and *Radix Salviae Miltiorrhizae* can alleviate the apoptosis of retinal photoreceptor cells of RCS rats, thus protecting visual function.

[**Keywords**] retinitis pigmentosa; RCS rats; apoptosis; *Fructus Lycii*; *Radix Salviae Miltiorrhizae*

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一种遗传性视网膜病,临床特征是双眼发病,慢性进行性视力损害并伴有眼底色素变化<sup>[1]</sup>。这种遗传病理生理学的多样性使得治疗极具挑战性。我国 RP 患病率约为 1/4 000,全球约有 150 万 RP 患者<sup>[2]</sup>。虽然已经使用各种药理学试剂(神经营养因子,抗氧化剂和抗凋亡剂)进行了治疗尝试,但大多数并未针对 RP 的根本原因,并且其临床疗效尚未得到明确证实。皇家外科学院(royal college surgeons, RCS)(*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠是较好的 RP 动物模型,本研究以 RCS (*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠为研究对象,从分子生物角度探讨了枸杞子加丹参对 RCS(*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠的干预效果。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级 RCS 大鼠 40 只,其中 RCS(*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠 32 只, RCS(*rdy*<sup>+/+</sup>, *p*<sup>+/+</sup>)大鼠 8 只,均雌雄各半。

### 1.2 药品及试剂

枸杞子中药配方颗粒(3.0 g 每袋,批号:5103761)、丹参中药配方颗粒(1.8 g 每袋,批号:5100631),均由广东一方制药有限公司提供。Harris 苏木素(上海如吉科技发展有限公司,批号:71020784)、二抗试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司,批号:zb-5301)、SDS(武汉默沙克生物有限公司,批号:kt40244)。

### 1.3 器材

轮转石蜡切片机(徕卡,型号 RM2235)、电泳仪(北京六一仪器厂,型号 DYY-6C)、图像分析系统(深圳市沅恒科技有限公司,型号:Motic 6.0)、台式冷冻离心机(赫西仪器装备有限公司,型号 HR/T 16M)。

## 2 方法

### 2.1 分组

将 40 只 RCS 大鼠分为 5 组,其中 8 只 RCS (*rdy*<sup>+/+</sup>, *p*<sup>+/+</sup>)大鼠为空白组,另 32 只 RCS(*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠按照随机数字表法分为模型组、枸杞组、丹参组、杞参组,每组 8 只。

### 2.2 给药方法

实验动物适应性饲养 1 周后给予灌胃,空白组、模型组大鼠以蒸馏水 12 mL/kg 灌胃;枸杞组将 10 g 枸杞子中药配方颗粒溶于 50 mL 灭菌蒸馏水中(浓度为 0.2 g/mL),最终以 1.08 g/(kg·d)灌胃;丹参组将 10 g 丹参中药配方颗粒溶于 40 mL 灭菌蒸馏水中(浓度为 0.25 g/mL),最终以 1.35 g/(kg·d)灌胃;杞参组将 10 g 枸杞子及 10 g 丹参溶于 40 mL 灭菌蒸馏水中(浓度为 0.5 g/mL),最终以 2.43 g/(kg·d)灌胃。均灌胃 28 d。

### 2.3 取材方法

灌胃结束 1 d 后取材,麻醉动物后,仔细分离大鼠眼球周围组织,彻底分离眼球周围组织后,暴露眼球后方视神经及筋膜组织,剪断后取出眼球,放入 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋、切片,备行 HE 染色与 TUNNEL 染色。

### 2.4 指标检测

2.4.1 HE 染色 经二甲苯溶液脱蜡、无水乙醇洗蜡、乙醇浸泡、自来水洗、苏木素染色、乙醇盐酸分色、伊红染色、乙醇分色脱水、二甲苯溶液透明、中性树胶封片等步骤后,在光学显微镜下观察各组大鼠视网膜组织结构的形态学变化。

2.4.2 TUNEL 染色 经烤片、脱蜡、蒸馏水浸洗、PBS 冲洗、染核等步骤后,90%甘油封片,在显微镜

下观察各组大鼠视网膜感光细胞凋亡情况,选取5个TUNEL切片阳性细胞数最多的高倍视野( $\times 400$ ),计算阳性细胞所占的百分比,即凋亡指数(apoptosis index, AI)。

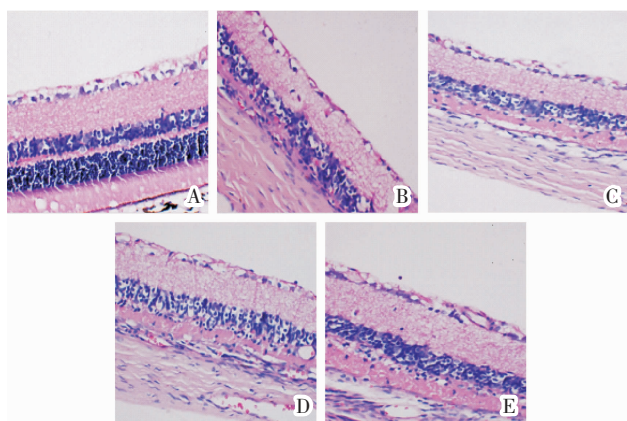
### 2.5 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 23.0 分析实验数据,各组数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组比较用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 HE 染色结果

空白组:大鼠视网膜各层结构排列有序,形态规则。模型组:大鼠视网膜各层结构紊乱,视网膜厚度变薄。枸杞组与丹参组:大鼠视网膜各层组织结构紊乱,视网膜厚度变薄。杞参组:视网膜厚度较模型组厚,感光细胞核数目较模型组多。见图1。



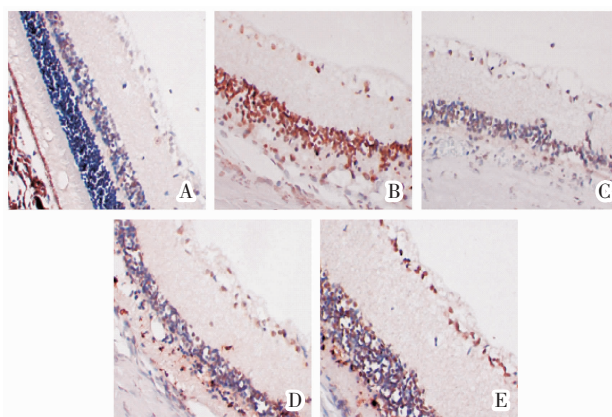
注:A-E 分别表示空白组、模型组、枸杞组、丹参组、杞参组

图1 各组视网膜组织 HE 染色结果( $\times 400$ )

### 3.2 TUNEL 染色结果

3.2.1 各组视网膜组织 TUNEL 染色图片观察 空白组:视网膜各层结构规则,未见明显感光细胞凋亡。模型组:视网膜各层结构紊乱,视网膜见大量感光细胞凋亡。枸杞组与丹参组:视网膜结构紊乱,视网膜见大量感光细胞凋亡。杞参组:视网膜各层结构较规则,视网膜见少量感光细胞凋亡。见图2。

3.2.2 各组视网膜组织 TUNEL 检测感光细胞 AI 比较 各组灌胃后视网膜组织感光细胞 AI 值比较:空白组低于模型组、枸杞组、丹参组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),空白组与杞参组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );模型组与枸杞组、丹参组相比,差



注:A-E 分别表示空白组、模型组、枸杞组、丹参组、杞参组

图2 各组视网膜组织 TUNEL 染色结果( $\times 400$ )

异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),模型组高于杞参组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );枸杞组与丹参组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),枸杞组及丹参组均高于杞参组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果见表1、图3。

表1 各组视网膜组织 TUNEL 检测感光细胞 AI 值比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | n | AI/%  |
|-----|---|---|
| 空白组 | 8 | 11.39 $\pm$ 4.69                                |
| 模型组 | 8 | 24.38 $\pm$ 9.62 $\blacklozenge$                |
| 枸杞组 | 8 | 21.25 $\pm$ 10.21 $\blacklozenge$               |
| 丹参组 | 8 | 19.25 $\pm$ 7.98 $\blacklozenge$                |
| 杞参组 | 8 | 14.13 $\pm$ 5.64 $\blacklozenge$ $\blacksquare$ |

注:与空白组比较, $\blacklozenge P < 0.05$ ;与模型组比较, $\blacklozenge P < 0.05$ ;与枸杞组比较, $\blacksquare P < 0.05$ ;与丹参组比较, $\blacksquare P < 0.05$

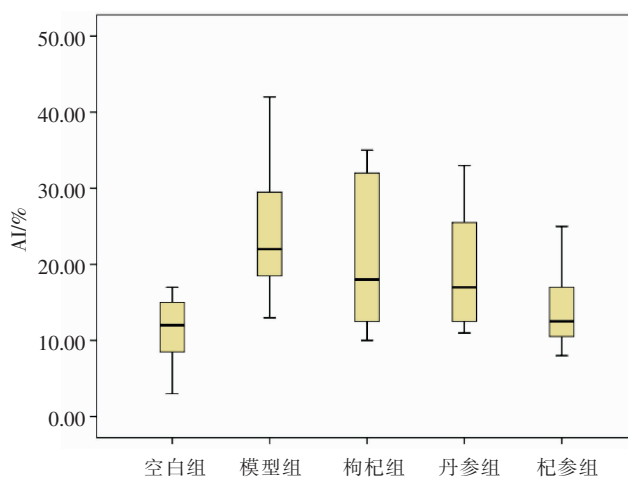


图3 灌胃后各组大鼠视网膜 TUNEL 检测感光细胞 AI 值比较箱图

## 4 讨论

大多数 RP 患者在青少年发病,视网膜病变通常从中周部开始,逐渐向后极部黄斑区进展,病情逐

步进展,最终导致失明,严重影响生活和工作。视网膜感光细胞死亡是 RP 失明的原因,研究表明,视网膜感光细胞是通过细胞凋亡的方式死亡的<sup>[3-4]</sup>。

前期研究证实本虚标实、虚中夹瘀是 RP 的基本病机,血瘀贯穿 RP 病程始终<sup>[5-7]</sup>。RP 患者临床多见虚中夹瘀证型,有阴虚夹瘀证,也有阳虚夹瘀证<sup>[8-10]</sup>。基于 RP 的基本病机,彭清华教授提出了“补虚活血”法治疗 RP,药用枸杞子、丹参<sup>[11]</sup>。《本草纲目》记载枸杞子滋肾、润肺、明目<sup>[12]</sup>。枸杞子常用于肝肾虚弱所致各类眼科疾病,如黄斑变性、老年性白内障等。《本草通玄》解释了枸杞子治疗眼病的机制:枸杞子补肾益精,水旺则骨强,而消渴、目昏、腰膝酸痛无不愈矣<sup>[13]</sup>。枸杞子主要成分枸杞多糖,有抗氧化、免疫调节等作用,还能促进视网膜损伤的修复<sup>[14-15]</sup>。丹参常用于血瘀性眼病或其他眼病兼有血瘀者,也用于头昏失眠、视瞻昏渺者<sup>[16]</sup>,网络药理学研究发现丹参中的隐丹参酮、木犀草素、丹参酮 II<sub>A</sub> 等化学成分可调节 RP 发生发展中的关键靶点蛋白,从而抑制 RP 进程<sup>[17]</sup>。枸杞子与丹参合用,共奏补虚活血之功<sup>[18]</sup>。

本研究采用 RP 经典动物模型 RCS(*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠为主要研究对象,以枸杞子加丹参灌胃治疗。从检测视网膜细胞凋亡指数为切入点,在抗细胞凋亡层面上,发现枸杞子加丹参能减轻 RP 病变时有害因素导致的视网膜细胞凋亡的发生,保护视功能。

综上所述,以枸杞子加丹参为代表药的“补虚活血”法治疗原发性 RP 的分子生物学机制,可能与减轻 RP 经典动物模型 RCS(*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠视网膜感光及神经细胞凋亡有关,从而起到保护视功能作用。

## 参考文献

- [1] 彭清华. 中西医结合眼底病学[M]. 北京:人民军医出版社,2011: 172-178.
- [2] IKEDA H O, SASAOKA N, KOIKE M, et al. Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 5970.
- [3] SHINDE V, KOTLA P, STRANG C, et al. Unfolded protein response-induced dysregulation of calcium homeostasis promotes retinal degeneration in rat models of autosomal dominant retinitis pigmentosa[J]. Cell Death & Disease, 2016, 7: e2085.
- [4] BOGÉA T H, WEN R H, MORITZ O L. Light induces ultrastructural changes in rod outer and inner segments, including autophagy, in a transgenic *Xenopus laevis* P23H rhodopsin model of retinitis pigmentosa[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2015, 56(13): 7947-7955.
- [5] 彭清华. 眼科活血利水法的研究[M]. 北京:中国中医药出版社,2018: 13.
- [6] 徐剑,周亚莎,彭俊,等. RCS(*rdy*<sup>-/-</sup>, *p*<sup>-/-</sup>)大鼠虚中夹瘀证实验评价[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志,2018,20(9):519-524.
- [7] 彭俊,杨毅敬,李波,等. 中医综合疗法治疗日本籍视网膜色素变性 297 例回顾性分析[J]. 湖南中医药大学学报,2020,40(7):788-791.
- [8] 蒋鹏飞,王英,潘坤,等. 益气明目丸对视网膜色素变性大鼠视网膜 Fas, FasL 蛋白表达的影响[J]. 中医杂志,2019,60(4):327-332.
- [9] 王英,蒋鹏飞,潘坤,等. 益气明目丸对视网膜色素变性大鼠视网膜 Bax, Caspase-3 表达的影响[J]. 眼科新进展,2018,38(11):1019-1023.
- [10] 蒋鹏飞,王英,潘坤,等. 益气明目丸对视网膜色素变性大鼠视网膜 Bax mRNA, Caspase-3 mRNA 表达的影响[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2018,20(10):1834-1839.
- [11] 刘家琪,王英,蒋鹏飞,等. 枸杞丹参对视网膜色素变性大鼠视网膜组织形态学及 CRYAB mRNA 的影响[J]. 中国医药导报,2019, 16(14):13-15,22.
- [12] 李时珍. 新编本草纲目[M]. 御史,编译. 北京:北京科学技术出版社, 2009:336.
- [13] 李中梓. 本草通玄[M]. 付先军等,校注. 北京:中国中医药出版社, 2015:67.
- [14] 邓自辉,牛阳,王荣,等. 枸杞多糖药理作用的研究现状[J]. 临床合理用药杂志,2011,4(24):164-165.
- [15] 陈艳丽,文峰,孙祖华. 枸杞多糖对大鼠视网膜光损伤的形态及功能的影响[J]. 眼科,2009,18(4):229-233.
- [16] 艾慧,夏飞,李波,等. 视网膜色素变性的中医综合治疗及用药规律分析[J]. 湖南中医药大学学报,2020,40(2):165-169.
- [17] 宋厚盼,曾梅艳,彭俊,等. 丹参对视网膜色素变性病理过程 Müller 细胞特征性基因变化及关键蛋白表达的影响[J]. 中草药, 2019,50(8):1863-1872.
- [18] 宋厚盼,曾梅艳,彭俊,等. 枸杞子-丹参药对治疗视网膜色素变性的分子机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(14):199-206.

(本文编辑 匡静之)