

本文引用:蒋鹏飞,欧晨,彭俊,姚震,田野,杨毅敬,宋厚盼,徐剑,彭清华.枸杞子-丹参对小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2021,41(4):504-511.

枸杞子-丹参对小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 表达的影响

蒋鹏飞^{1,2}, 欧晨^{1,2}, 彭俊^{2,3*}, 姚震¹, 田野¹, 杨毅敬^{1,2}, 宋厚盼¹, 徐剑⁴, 彭清华^{1,2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南省中医药防治眼耳鼻喉疾病与视功能保护工程技术研究中心,湖南长沙 410208;3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;4.上海市东方医院,上海 200120)

〔摘要〕目的 观察枸杞子-丹参对 rd10 小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 表达的影响。方法 将 40 只 rd10 小鼠随机分为 5 组,空白组灌胃生理盐水;对照组灌胃维生素 A 溶剂;枸杞组灌胃枸杞子中药超微配方颗粒溶液;丹参组灌胃丹参中药超微配方颗粒溶液;枸杞加丹参组(杞参组)灌胃枸杞子加丹参中药超微配方颗粒溶液;8 只 C57 小鼠为野生组,灌胃生理盐水。给药 28 d 后,RT-qPCR 检测小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 表达情况,免疫组化、免疫荧光法检测小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白表达情况。结果 RT-qPCR 检测显示:除杞参组外,各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 相对表达量高于野生组,差异有统计学意义($P<0.05$);杞参组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 相对表达量低于空白组、对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。免疫组化检测显示:各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 平均光密度高于野生组,差异均有统计学意义($P<0.05$);杞参组 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均光密度低于空白组、对照组、枸杞组、丹参组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。免疫荧光检测显示:各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均荧光强度高于野生组,差异均有统计学意义($P<0.05$);杞参组 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均荧光强度低于空白组、对照组、枸杞组、丹参组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 枸杞子-丹参可以抑制 rd10 小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 和蛋白的表达,从而抑制感光细胞的凋亡,维持视网膜正常功能结构,保护视功能。

〔关键词〕 视网膜色素变性;细胞凋亡;枸杞子;丹参 Caspase-2;Caspase-12 前体

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.04.003

Effect of Gouqizi (Lycii Fructus) and Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) on the Expression of Caspase-12 Precursor and Caspase-2 in Retinal of rd10 Mice

JIANG Pengfei^{1,2}, OU Chen^{1,2}, PENG Jun^{2,3*}, YAO Zhen¹, TIAN Ye¹, YANG Yijing^{1,2}, SONG Houpan¹,
XU Jian⁴, PENG Qinghua^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Engineering Technology Research Center for the Prevention and Treatment of Otorhinolaryngologic Diseases and Protection of Visual Function with Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 4. Shanghai Dongfang Hospital, Shanghai 200120, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effect of Gouqizi (Lycii Fructus) and Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) on the expression of Caspase-12 precursor and Caspase-2 in rd10 mice. **Methods** 40 rd10 mice were randomly divided into 5 groups. The blank group was given distilled water; the control group was given intragastric vitamin A solvent; the Gouqizi (Lycii

〔收稿日期〕 2021-01-10

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81804150,82074196);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目(ZK1801YK015);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科;中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);湖南省自然科学基金资助项目(2019JJ40226);湖南省研究生科研创新项目(CX2018B497);湖南中医药大学研究生创新课题(2018CX40)。

〔作者简介〕 蒋鹏飞,男,在读博士研究生,研究方向:中医药防治眼底病。

〔通讯作者〕 *彭俊,男,助理研究员,E-mail:1544511101@qq.com;彭清华,男,教授,博士研究生导师,E-mail:pqh410007@126.com。

Fructus) group was given intragastric Gouqizi (Lycii Fructus) Chinese medicine ultrafine granular solution; the Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) group was given intragastric Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) Chinese medicine ultrafine formula granule solution; Gouqizi (Lycii Fructus) plus Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) group (QiShen group) was given intragastric Gouqizi (Lycii Fructus) plus Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) Chinese medicine superfine granule solution; 8 C57 mice as the wild group, was given intragastric distilled water. 28 days after the administration, RT-qPCR was used to detect the expression of Caspase-12 precursor and Caspase-2 mRNA in the retina of rd10 mice, and the expression of Caspase-12 precursor and Caspase-2 proteins in the retina was detected by immunohistochemistry and immunofluorescence. **Results** The RT-qPCR test showed that except for the QiShen group, the relative expression levels of Caspase-12 precursor and Caspase-2 mRNA in the retina of each group were higher than that of the wild group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); the relative expression levels of Caspase-12 precursor and Caspase-2 mRNA in the retina of the QiShen group were lower than that of the blank group and the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Immunohistochemical detection showed that the average optical density of Caspase-12 precursor and Caspase-2 in the retina of mice in each group was higher than that of the wild group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); the average optical density of Caspase-12 precursor and Caspase-2 of the QiShen group was lower than that of the blank group, control group, Gouqizi (Lycii Fructus) group, and Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Immunofluorescence detection showed that the average fluorescence intensity of Caspase-12 precursor and Caspase-2 in the retina of mice in each group was higher than that in the wild group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); Caspase-12 precursor and Caspase-2 average fluorescence intensity of QiShen group was lower than that of the blank group, control group, Gouqizi (Lycii Fructus) group and Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Gouqizi (Lycii Fructus) and Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma) can inhibit the expression of rd10 mice Caspase-12 precursors, Caspase-2, thereby inhibiting the apoptosis of photoreceptor cells, maintaining normal functional structure of retina, protecting view function.

[**Keywords**] retinitis pigmentosa; apoptosis; Gouqizi (Lycii Fructus); Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma); Caspase-2; Caspase-12 precursor

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是临床常见的视网膜疾病,以视网膜色素变化为特征,病至后期,可对视力、视野造成严重影响^[1]。我国人群发病率约为 1/4 000,男女比例约 3:2^[2]。多数学者认为 RP 视力损失的主要原因是视网膜感光细胞的凋亡^[3-5],凋亡是细胞程序化死亡方式的一种,本研究以视网膜色素变性小鼠 rd10 小鼠为研究对象,通过观察枸杞子-丹参对 rd10 小鼠视网膜感光细胞凋亡相关因子 Caspase-12 前体和 Caspase-2 的影响,探讨枸杞子丹参治疗 RP 的机制。

1 材料

1.1 实验动物

40 只 4 周龄 SPF 级 rd10 小鼠,雌雄各半,质量 18~20 g,购自美国 Jackson (JAX) 实验室,证书编号:191A11353;8 只 4 周龄 SPF 级 C57 小鼠,雌雄各半,质量 18~20 g,由湖南斯莱克景达公司提供,证书编号:43004700062254。实验动物均饲养于湖南斯莱克景达公司动物实验中心 SPF 房,室温(22±2)℃,湿度 50%~55%,定期更换垫料,自由饮食。

rd10 小鼠出生时携带 PED6 基因,在出生 8 周时大部分感光细胞完全丧失,是典型的 RP 动物模型。

1.2 实验药物与试剂

灌胃中药:枸杞子中药配方颗粒,每袋装 3.0 g(相当于临床使用量饮片 10 g),丹参中药配方颗粒,每袋装 1.8 g(相当于临床使用量饮片 10 g)。Caspase-2(美国 PROTEINTECH 公司,货号:24777-1-AP,稀释比例 1:50);Caspase-12 前体(英国 abcam 公司,货号:ab8117,稀释比例 1:100);CoraLite488-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (SA000013-1)、CoraLite488-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (SA000013-2)均由 Proteintech 中国公司提供;mRNA 逆转录试剂盒(批号: CW2569)、miRNA 逆转录试剂盒(批号: CW2141)、UltraSYBR Mixture(批号: CW2601)均由中国北京康为世纪生物科技有限公司提供;EDTA(中国大连美伦生物技术有限公司,批号: MB2514);Tris(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号: V900483);Trizol(美国 Thermo 公司,批号: 15596026);核酸染料(中国北京

普利莱基因技术有限公司,批号:PB11141)。

1.3 实验仪器

台式冷冻离心机(中国湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R);荧光定量 RCP 仪(型号:PIKOREAL96)、荧光 PCR 板(型号:SPL0960)均购自美国 Thermo 公司;电泳仪(型号:DYY-2C)、水平琼脂糖电泳槽(型号:DYCP-31DN)均购自中国北京六一生物科技有限公司;旋涡混合器(中国江苏其林贝尔仪器制造有限公司,型号:GL-88B);磁力搅拌器(中国上海仪电科学仪器股份有限公司,型号:JB-13);-80℃冰箱(中国长虹美菱股份有限公司,型号:DW-HW438);电磁炉(荷兰 Philips 公司,型号:HD4925);生物样品均质仪(中国杭州奥盛仪器有限公司,型号:BioPrep-24)。

2 方法

2.1 动物分组

采用随机数字表法将 40 只 SPF 级 rd10 小鼠随机平均分为 5 组,分别为:空白组、对照组、枸杞组、丹参组、杞参组,每组 8 只;8 只 SPF 级 C57 小鼠为野生组;每组雌雄分开饲养。

2.2 给药方法

所有小鼠适应性饲养 1 周后给予灌胃,野生组与空白组:灌胃生理盐水;对照组:灌胃维生素 A 溶剂(15 粒维生素 A 溶于 40 mL 10% DMSO 溶剂);枸杞组:灌胃枸杞子中药配方颗粒溶液(3 g 枸杞子颗粒溶于 40 mL 灭菌蒸馏水中);丹参组:灌胃丹参中药配方颗粒溶液(1.8 g 丹参颗粒溶于 40 mL 灭菌蒸馏水中);杞参组:灌胃枸杞子加丹参中药配方颗粒溶液(3 g 枸杞子颗粒+1.8 g 丹参颗粒溶于 40 mL 灭菌蒸馏水中)。每组小鼠给药剂量按“人-动物体表面积等效剂量比值表”折算,折算系数 $W=0.0025$ 。每组灌胃相应药物剂量为 20 mL/(kg·d),每天 1 次,连续 28 d。

2.3 取材方法

取材时相为灌胃第 28 天结束后 1 d。1%苯巴比妥钠 3.0 mL/kg 腹腔注射麻醉,麻醉满意后,75%酒精消毒小鼠双眼眼睑周围,眼科弯组织剪直接分离球周组织,剪断视神经后摘除眼球,每只小鼠选取 1 只眼球,立即放入 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋、切片,备行免疫组化、免疫荧光检测 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白表达。另外 1 只眼球保存于 -80℃冰箱中,备行 RT-qPCR 检测 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 表达。

2.4 观察指标及方法

2.4.1 RT-qPCR 检测小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 表达 视网膜组织充分研磨匀浆,在室温下裂解 5 min,在 4℃下以 12 000 r/min 离心 15 min,然后测定 RNA 浓度与纯度。140 V 恒压进行 RNA 的琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统下观察。以总 mRNA 为模板,逆转录 cDNA(反应体系见表 1)。在 NCBI 上搜索目的基因的序列,运用 primer5 软件设计引物,由上海生工合成引物,见表 2。实时定量 PCR:每个样本每个指标 3 个孔,共 30 μL 体系,每孔 9 μL,反应条件为:在 95℃中 10 min,在 95℃(15 s)和 60℃(30 s)中 40 进行个 PCR 循环。

表 1 20 μL 反应体系

试剂	体积/μL
dNTP Mix, 2.5 mM Each	4
Primer Mix	2
RNA Template	7
5×RT Buffer	4
DTT, 0.1 M	2
HiFiScript, 200 U/μL	1

2.4.2 免疫组化检测小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白表达 将切片浸入柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中,连续煮 24 min,切片冷却后 PBS 冲洗

表 2 凋亡基因序列

名称	正向引物	反向引物	蛋白长度/bp
Actin	ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	223
Caspase-2	CTGCCAAAGAGAGACCCCA	GCAGGACTCACACCCGAGA	174
Caspase-12	GATGAAGCCCCACCTACCAC	GCTCTCACAAATTTCAAGGCAT	201

3 min×3次,滴加稀释的一抗,PBS冲洗5 min×3次,滴加50~100 μL抗-小鼠IgG抗体37℃孵育30 min,PBS冲洗5 min×3次,苏木素复染10 min,蒸馏水冲洗,酒精逐级脱水,中性树胶封片、显微镜观察。

2.4.3 免疫荧光检测小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白表达 将切片置于硼氢化钠溶液中30 min,漂洗后置于苏丹黑染液中5 min,滴加适当稀释的一抗,滴加100 μL抗-兔-IgG标记荧光抗体,缓冲甘油封片,在荧光显微镜下观察。

2.5 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 23.0 分析实验数据,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组比较采用 ANOVA (LSD)分析(满足正态分布及方差齐性)或秩和检验(不满足正态分布及方差齐性)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 枸杞子-丹参对各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 表达的影响

3.1.1 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2

mRNA 熔解曲线 通过逐渐增加温度,荧光信号可产生熔解曲线,熔解曲线显示单峰,说明扩增产物特异性较好。见图1-2。

3.1.2 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 扩增曲线 在荧光信号指数扩增阶段,PCR产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系。见图3-4。

3.1.3 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 相对表达量 各组 rd10 小鼠视网膜中 Caspase-2 mRNA 相对表达量高于野生组,差异均有统计学意义($P<0.05$);除杞参组外,各组 rd10 小鼠视网膜中 Caspase-12 前体 mRNA 相对表达量高于野生组,差异均有统计学意义($P<0.05$);各药物干预组小鼠视网膜中 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 相对表达量低于空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$);杞参组小鼠视网膜中 Caspase-2 mRNA 相对表达量低于对照组、枸杞组,差异均有统计学意义($P<0.05$);杞参组小鼠视网膜中 Caspase-12 前体 mRNA 相对表达量低于对照组、枸杞组、丹参组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

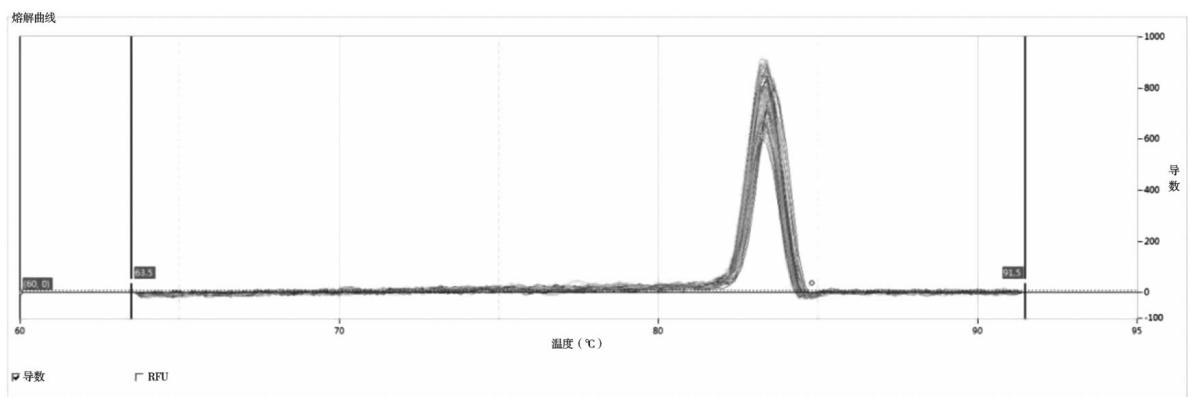


图1 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体 mRNA 熔解曲线

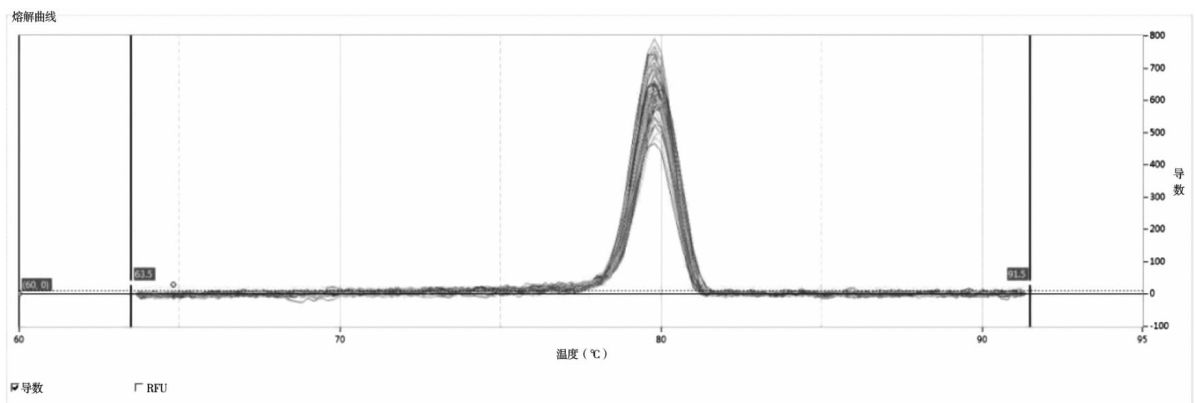


图2 各组小鼠视网膜 Caspase-2 mRNA 熔解曲线

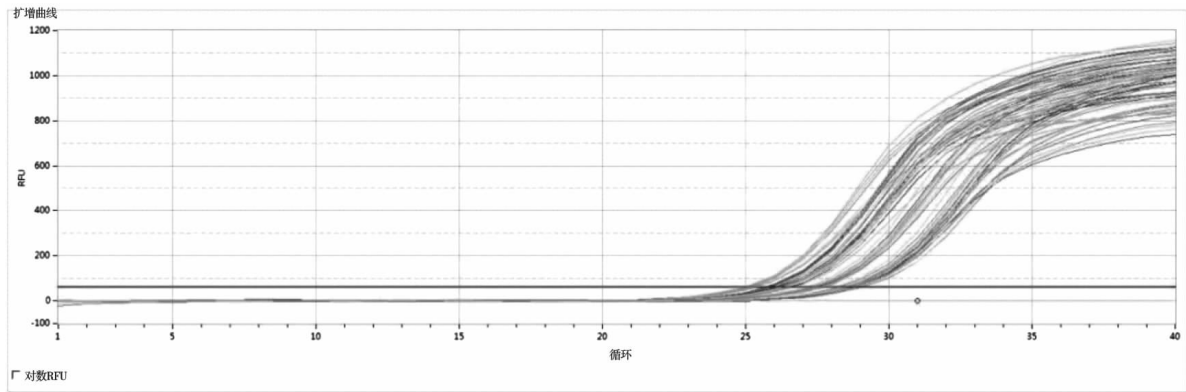


图 3 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体 mRNA 扩增曲线

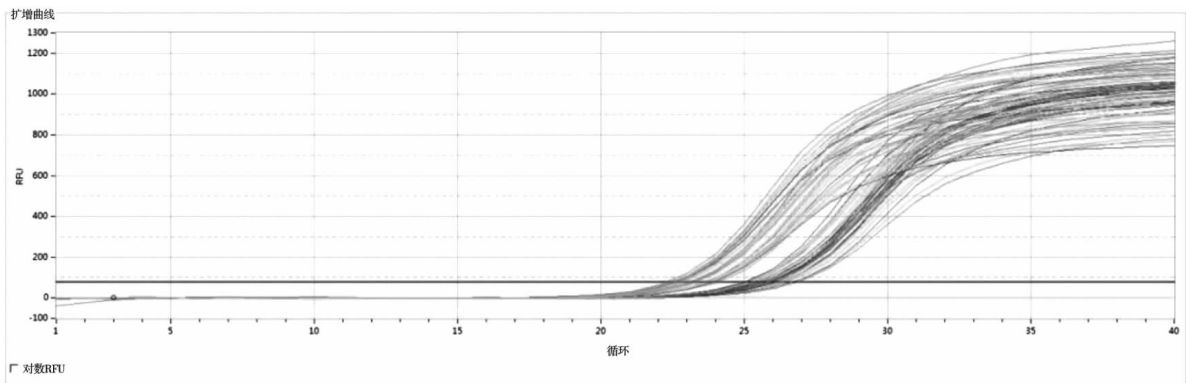


图 4 各组小鼠视网膜 Caspase-2 mRNA 扩增曲线

表 3 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 相对表达量 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-12 前体 mRNA	Caspase-2 mRNA
野生组	1.65±0.75	0.96±0.22
空白组	6.71±3.54*	7.38±2.64*
对照组	5.12±1.33*	4.85±2.26*#
枸杞组	4.38±1.52*	4.04±1.89*#
丹参组	4.01±1.78*	3.63±1.13*#
杞参组	1.93±0.68*#△○	2.50±1.15*#△△

注:与野生组相比,* $P<0.05$;与空白组相比,# $P<0.05$;与对照组相比,▲ $P<0.05$;与枸杞组相比,△ $P<0.05$;与丹参组相比,○ $P<0.05$

表 4 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均光密度 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-12 前体蛋白	Caspase-2 蛋白
野生组	7.50±0.61	5.77±1.33
空白组	37.40±1.75*	33.43±2.75*
对照组	34.47±3.19*	24.60±3.04*#
枸杞组	23.80±1.19*#▲	20.31±0.65*#
丹参组	25.74±2.68*#▲	20.59±0.79*#
杞参组	18.36±1.13*#▲△○	13.46±1.04*#▲△○

注:与野生组相比,* $P<0.05$;与空白组相比,# $P<0.05$;与对照组相比,▲ $P<0.05$;与枸杞组相比,△ $P<0.05$;与丹参组相比,○ $P<0.05$

3.2 枸杞子-丹参对各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白表达的影响

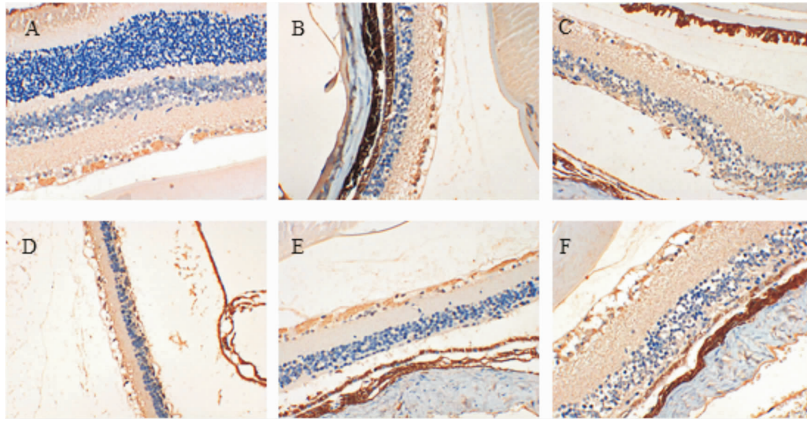
3.2.1 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白免疫组化检测结果 各组 rd10 小鼠视网膜中 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均光密度高于野生组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);枸杞组、丹参组、杞参组小鼠视网膜中 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均光密度低于空白组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);杞参组小鼠视网膜中 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均光密度低于对照组、枸杞组、丹参组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 4、图 5-6。

3.2.2 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2

蛋白免疫荧光检测结果 各组小鼠视网膜中 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均荧光强度高于野生组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);各药物干预组小鼠视网膜中 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均荧光强度低于空白组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);杞参组小鼠视网膜中 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均荧光强度低于对照组、枸杞组、丹参组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 5、图 7-8。

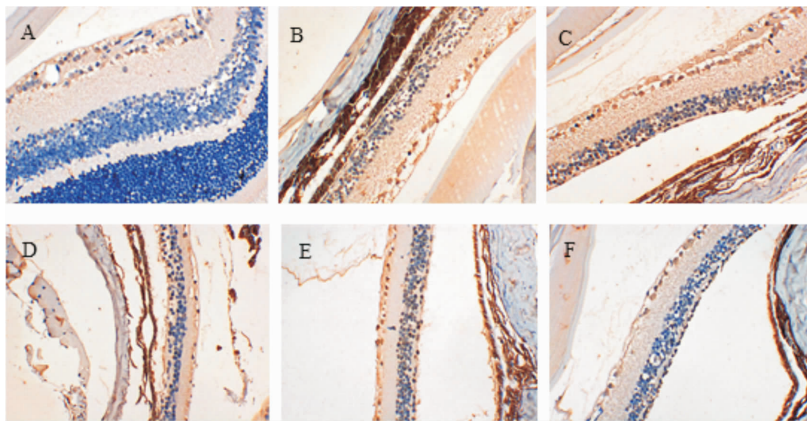
4 讨论

中医学将 RP 归为“高风内障”范畴,古代医家多认为 RP 病机为虚,如《原机启微》中认为本病乃



注:A-F 分别表示野生组、空白组、对照组、枸杞组、丹参组、杞参组

图5 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体蛋白表达情况(免疫组化,×400)



注:A-F 分别表示野生组、空白组、对照组、枸杞组、丹参组、杞参组

图6 各组小鼠视网膜 Caspase-2 蛋白表达情况(免疫组化,×400)

表5 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白平均荧光强度($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-12 前体蛋白	Caspase-2 蛋白
野生组	69.47±8.18	24.74±2.84
空白组	357.26±23.72*	125.44±11.09*
对照组	311.08±14.11**	94.55±4.21**
枸杞组	254.08±17.89**▲	77.06±4.31**▲
丹参组	262.26±10.77**▲	78.30±3.71**▲
杞参组	200.63±15.51**▲△○	45.04±13.99**▲△○

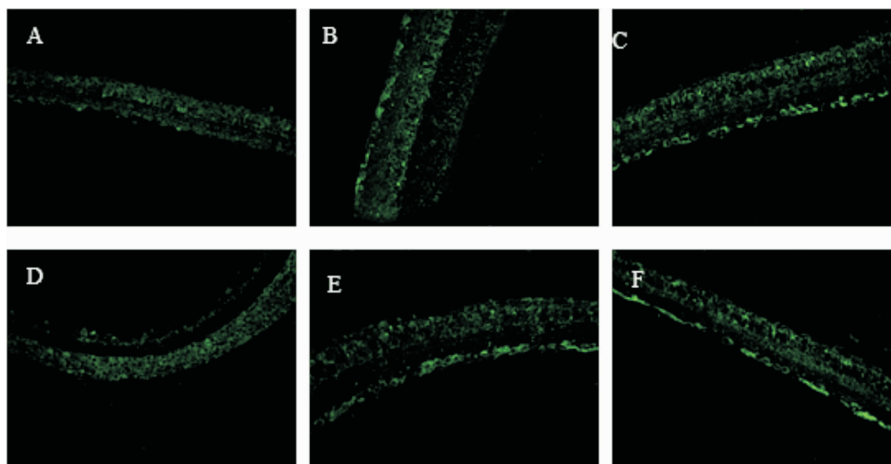
注:与野生组相比,* $P<0.05$;与空白组相比,** $P<0.05$;与对照组相比,▲ $P<0.05$;与枸杞组相比,△ $P<0.05$;与丹参组相比,○ $P<0.05$

阳衰不能抗阴所致,《目精大成·阴风障》中记载本病“至晚不见,晓则复明,盖元阳不足之病。”《杂病源流犀烛·目病源流》曰:“亦有生成如此,并由父母遗体。”明确指出本病乃遗传性疾病,并且在治疗中提及“不必治,治亦无效”,认为本病难以治愈^[6-7]。目前对 RP 的认识大多承袭古代医家的论述,认为 RP 以虚为主,或阴虚,或阳虚^[8-9]。彭清华教授经大

量的临床研究证实 RP 患者多为虚中夹瘀之证,提出补虚活血法治疗 RP,实验研究^[7]发现,补虚活血中药枸杞子-丹参对虚中夹瘀证 RP 模型大鼠有较好的治疗作用,可明显抑制 RP 模型大鼠视网膜感光细胞的凋亡,但其具体作用途径仍不清楚。

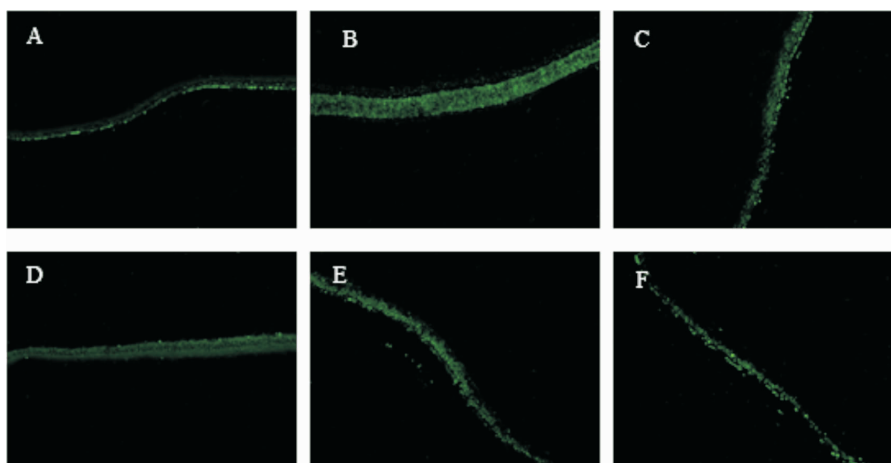
枸杞子味甘,性平,归入肝经与肾经,有补益肝肾的功效,丹参味苦,性微寒,归入心、肝经,有活血化瘀的功效。本研究选择了补虚活血法的代表性药物枸杞子和丹参作为干预药物,经 28 d 灌胃后,发现枸杞子丹参能降低视网膜中 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白及 mRNA 的表达,而 Caspase-12 前体与 Caspase-2 是内质网凋亡途径的关键靶点。

凋亡酶在内质网上的激活是内质网介导细胞凋亡的关键途径。在 RP 病变中,研究报道^[10]内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)诱导的凋亡与 RP 疾病进展有关。其中内质网介导的细胞凋亡



注:A-F 分别表示野生组、空白组、对照组、枸杞组、丹参组、杞参组

图 7 各组小鼠视网膜 Caspase-12 前体蛋白表达情况(免疫荧光,×400)



注:A-F 分别表示野生组、空白组、对照组、枸杞组、丹参组、杞参组

图 8 各组小鼠视网膜 Caspase-2 蛋白表达情况(免疫荧光,×400)

途径激活 Caspase-12 前体,而后激活 Caspase-12 成熟体,最终激活下游一系列凋亡信号,促使细胞凋亡的进程^[11]。Caspase-12 是 ERS 诱导凋亡中的关键分子^[12],大量报道^[13-14]显示 Caspase-12 是组织内稳态的关键调节器,Caspase-12 参与了 ERS 介导的细胞凋亡^[15]。研究^[16]表明在视网膜使用 KUS121,可以抑制内质网压力,从而很明显抑制细胞凋亡,保护光感受器细胞,尤其视锥细胞,这对维持晚期 RP 患者的中心视力有非常积极重要作用。在内质网凋亡途径中,Caspase-2 既是启动酶也是效应酶,Caspase-2 抑制剂可有效抑制细胞凋亡^[17-18]。

本研究检测了 rd10 小鼠视网膜中内质网凋亡相关因子 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白及 mRNA 的表达,PCR 结果发现 rd10 小鼠视网膜中 Caspase-12 前体、Caspase-2 mRNA 表达量明显高于正常小鼠,

经过枸杞子丹参灌胃 28 d 后,杞参组小鼠视网膜中 Caspase-12 前体 mRNA 表达量与正常小鼠相比,差异无统计学差异;与枸杞组、丹参组相比,枸杞子-丹参联合使用可更好地降低 Caspase-12 前体 mRNA 表达的作用。免疫组化与免疫荧光结果表明,枸杞子-丹参能降低视网膜中 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白的表达,枸杞子-丹参药物联用优于单用丹参或单用枸杞子,从动物实验角度论证了补虚活血法治疗 RP 的有效性。本研究通过对视网膜进行免疫组化染色、免疫荧光染色及 RT-qPCR 法检测视网膜组织中凋亡相关因子 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白及 mRNA 的表达,发现枸杞子-丹参对 rd10 小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 蛋白及 mRNA 的表达有抑制作用,从而抑制感光细胞的凋亡,具有较为广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 徐剑,周亚莎,彭俊,等.枸杞子加丹参对RCS(rdy-/-,p-/-)大鼠视网膜匀浆中cAMP、cGMP含量的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(7):784-787.
- [4] 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.
- [5] ANKITA, SAXENA S, NIM D K, et al. Retinal photoreceptor apoptosis is associated with impaired serum ionized calcium homeostasis in diabetic retinopathy: An in-vivo analysis[J]. Journal of Diabetes and its Complications, 2019, 33(3): 208-211.
- [6] 王英,蒋鹏飞,潘坤,等.滋阴明目丸对RCS大鼠视网膜Fas/FasL表达的影响[J].中国医药导报,2019,16(16):25-27,53,182.
- [7] 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.
- [8] 李翔,蒋鹏飞,艾慧,等.基于聚类分析和因子分析探讨中医治疗视网膜色素变性的用药规律[J].湖南中医药大学学报,2020,40(7):792-796.
- [9] 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.
- [10] LIN J H, LAVAIL M M. Misfolded proteins and retinal dystrophies[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2010, 664: 115-121.
- [11] JIANG H B, XIONG S Q, XIA X B. Retinitis pigmentosa-associated rhodopsin mutant T17M induces endoplasmic reticulum (ER) stress and sensitizes cells to ER stress-induced cell death[J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 9(5): 1737-1742.
- [12] WANG X, JIANG W H, DUAN N, et al. NOD1, RIP2 and Caspase12 are potentially novel biomarkers for oral squamous cell carcinoma development and progression [J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014, 7 (4): 1677-1686.
- [13] BIAN Z M, ELNER S G, ELNER V M. Regulated expression of caspase-12 gene in human retinal pigment epithelial cells suggests its immunomodulating role[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2008, 49(12): 5593-5601.
- [14] LEBLANC P M, YERETSSIAN G, RUTHERFORD N, et al. Caspase-12 modulates NOD signaling and regulates antimicrobial peptide production and mucosal immunity[J]. Cell Host & Microbe, 2008, 3(3): 146-157.
- [15] PAL S, GHOSH M, GHOSH S, et al. Atorvastatin induced hepatic oxidative stress and apoptotic damage via MAPKs, mitochondria, calpain and caspase12 dependent pathways[J]. Food and Chemical Toxicology, 2015, 83: 36-47.
- [16] HASEGAWA T, MURAOKA Y, IKEDA H O, et al. Neuroprotective efficacies by KUS121, a VCP modulator, on animal models of retinal degeneration[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31184.
- [17] DAWAR S, LIM Y, PUCCINI J, et al. Caspase-2-mediated cell death is required for deleting aneuploid cells[J]. Oncogene, 2017, 36(19): 2704-2714.
- [18] DORSTYN L, HACKETT-JONES E, NIKOLIC A, et al. Transcriptome profiling of caspase-2 deficient Eμ.Myc and Th-MYCN mouse tumors identifies distinct putative roles for caspase-2 in neuronal differentiation and immune signaling[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(2): 56.

(本文编辑 苏维)