

本文引用: 刘溪源, 喻京生. 祛风明目丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 NLRP3、ASC、IL-1 β 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1779-1785.

祛风明目丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 NLRP3、ASC、IL-1 β 表达的影响

刘溪源¹, 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】目的 探讨祛风明目丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)大鼠房水及视网膜组织中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、接头蛋白凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis related spot like protein, ASC)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)表达的影响。**方法** 将 70 只 SPF 级雄性 Lewis 大鼠按随机数字表法取 19 只为空白组, 其余为造模组, 进行主动免疫, 建立 EAU 大鼠模型, 连续造模 7 d 后分别从造模组及空白组随机抽取 3 只大鼠取眼球行 HE 染色, 进行组织病理学检查; 将造模成功的 EAU 大鼠随机分为模型组、祛风明目丸低剂量组(简称低剂量组)和祛风明目丸正常剂量组(简称正常剂量组), 每组 16 只。空白组、模型组予以蒸馏水灌胃, 低剂量组和正常剂量组予以不同剂量的祛风明目丸药液灌胃, 均干预 14 d。自造模开始, 每天于裂隙灯下观察眼前节变化, 并采用 Caspi 临床分级标准评分; 自灌胃起 14 d 后, ELISA 检测房水中 NLRP3、IL-1 β 水平, Western blot 检测视网膜组织中 ASC、NLRP3 蛋白水平。**结果** Caspi 临床分级评分结果显示, 自造模第 3 天起造模组评分均明显高于空白组($P < 0.01$), 说明 EAU 模型制备成功。ELISA 结果显示, 与空白组相比, 模型组房水中 NLRP3、IL-1 β 水平升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 正常剂量组及低剂量组两者含量均降低($P < 0.05$); 正常剂量组与低剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。Western blot 结果显示, 与空白组相比, 模型组视网膜组织中 ASC、NLRP3 蛋白表达水平升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 正常剂量组及低剂量组视网膜组织中 ASC、NLRP3 蛋白表达含量均下降($P < 0.05$); 与正常剂量组相比, 低剂量组视网膜组织 ASC、NLRP3 蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。**结论** 祛风明目丸可能通过降低 NLRP3 炎症小体及下游炎症因子的表达对 EAU 大鼠发挥一定的治疗作用。

【关键词】 实验性自身免疫性葡萄膜炎; 祛风明目丸; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; 接头蛋白凋亡相关斑点样蛋白; 白细胞介素-1 β

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.10.005

Effects of Qufeng Mingmu Pill on NLRP3, ASC, and IL-1 β expressions in rats with experimental autoimmune uveitis

LIU Xiyuan¹, YU Jingsheng^{2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of Qufeng Mingmu Pill on the expressions of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), apoptosis related spot like protein (ASC), and interleukin-1 β (IL-1 β) in aqueous

【收稿日期】2023-01-16

【基金项目】长沙市自然科学基金项目(kq2202449)。

【第一作者】刘溪源, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治眼病。

【通信作者】* 喻京生, 男, 二级教授, 博士研究生导师, E-mail: yujingsheng-mike@163.com。

humor and retinal tissues of rats with experimental autoimmune uveitis (EAU). **Methods** Nineteen of the 70 SPF-level male Lewis rats were selected as blank group according to the random number table method, the rest were made modal group for active immunization. EAU rat models were established, and 3 rats were randomly selected from the model group and the blank group after 7 days of continuous modeling to take eyeballs for HE staining and histopathological examination. The successfully modeled EAU rats were randomly divided into model group, low-dose group of Qufeng Mingmu Pill and normal-dose group of Qufeng Mingmu Pill (hereinafter referred to as the low-dose group and the normal dose group), with 16 rats in each group. The blank group and the model group were given distilled water by gavage, and the low-dose group and the normal dose group were given different doses of Qufeng Mingmu Pill liquid by gavage for 14 days. Since the beginning of molding, the changes of the anterior segment of the eye were observed under the slit lamp every day, and the Caspi clinical grading standard was used to score. After 14 days of gavage, NLRP3 and IL-1 β levels in aqueous humor were checked by ELISA, and ASC and NLRP3 protein levels in retinal tissue were tested by Western blot. **Results** The results of Caspi clinical grading showed that the scores of the model group were significantly higher than those of the blank group since the third day of modeling ($P < 0.01$), indicating that the EAU model was successfully prepared. The results of ELISA showed that compared with the blank group, the NLRP3 and IL-1 β levels of the model group increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the content of both normal dose group and low-dose group decreased ($P < 0.05$). The difference between normal dose group and low-dose group was not statistically significant ($P > 0.05$). The results of Western blot showed that compared with the blank group, the expression levels of ASC and NLRP3 proteins in the retinal tissues of the model group increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression content of ASC and NLRP3 protein in retinal tissues decreased in both normal and low-dose groups ($P < 0.05$). Compared with the normal dose group, the expression levels of ASC and NLRP3 protein in retinal tissue in the low-dose group were higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Qufeng Mingmu Pill may play a therapeutic role in EAU rats by reducing the expression of NLRP3 inflammasome and downstream inflammatory factors.

[**Keywords**] experimental autoimmune uveitis; Qufeng Mingmu Pill; NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; apoptosis related spot like protein; interleukin-1 β

全球范围内常见的一类高致盲眼病——葡萄膜炎,发病率为 17/10 万~52/10 万,致盲率较高,发病率逐年上升^[1]。常见病因包括感染与非感染因素,其中,非感染因素包括自身免疫反应、创伤及理化、氧化损伤、炎症因子释放、遗传因素等,临床大多以自身免疫反应多见^[2-5]。葡萄膜炎的治则主要为散大瞳孔防止粘连、抗炎及消除致病因素,目前,临床常采用中西医结合疗法防治葡萄膜炎,具有较好疗效。中医药虽有确切疗效,但对具体的治疗机制缺乏详细阐述。本研究团队的前期研究发现,祛风明目丸能够通过多种途径调节机体自身免疫机制,减轻实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)大鼠的炎症反应^[6-9];有研究证实,祛风明目丸治疗 EAU 大鼠是通过上调视网膜组织中 Bcl-2 的表达,并抑制 Bax、Caspase-3,调节细胞凋亡途径而发挥疗效^[10]。本研究拟通过观察 EAU 动物模型中房水及视网膜组织中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、蛋白凋亡相关

斑点样蛋白(apoptosis related spot like protein, ASC)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的动态变化情况,从细胞凋亡途径,深入研究祛风明目丸治疗 EAU 的效果与机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 70 只纯系健康雄性 Lewis 大鼠(SPF 级),4~6 周龄,大鼠体质量 180~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006]。实验开始前,对 70 只大鼠双眼进行常规检查以排除眼部病变及全身疾病,剔除患鼠,后进行为期 1 周的喂养使其适应环境。实验室为 SPF 级,实验室环境保障:维持室温(24 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度 50%~60%、通风情况良好。所有大鼠均予以常规饲料及动物饮用水喂养。本实验研究方案及过程均严格遵守湖南省实验动物管理办法,并按相关伦理要求执行(湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会审批号:ZYFY20211104-05)。

1.1.2 实验药物 祛风明目丸由熟地黄、当归、川芎、柴胡、鱼腥草、黄芩、菊花、防风、车前子、白芍、丹参构成,每瓶 120 g,于湖南中医药大学第一附属医院(批号:20220304)购进。需要时用粉碎机将药丸打粉,用蒸馏水溶散成质量分数为 100 mg/mL 的悬浊液。

1.1.3 主要试剂 光感受器间维生素 A 结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP 1177-1191)、结核菌素(tuberculin, TB)(上海生工生物工程股份有限公司,批号:P25801-22070401、24761);完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)(美国 Sigma 公司,批号:SLCJ4384);PBS 缓冲液(普诺赛公司,批号:WH0021A061);ASC 抗体、NLRP3 抗体、 β -actin 抗体、羊抗兔 IgG-HRP(Affinity 公司,批号:DF6034、DF7438、T0021、BL003A);大鼠隐热蛋白 3(NLRP3)ELISA 检测试剂盒、大鼠白细胞介素 1 β (IL-1 β)ELISA 检测试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司,批号:YD-34924、YD-30206)。

1.1.4 主要实验仪器 酶标分析仪(美国 Rayto 公司,型号:RaytoRT-6100);电泳仪(北京百晶生物技术有限公司,型号:BG-subMIDI);电热恒温水浴槽(上海一恒恒温设备厂,型号:HWS-24);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,型号:ISEQ00010);低温离心机(德国 Sigma 公司,型号:3-30k);脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造公司,型号:TS-100);凝胶成像系统(美国 UVP 公司,型号:GelDoc-It310);化学发光成像系统(中国 CLINX 勤翔,型号:chemiScope6100);全自动洗板机(雷杜生命科技有限公司,型号:RT-3100C);酶标检测仪(Bio TeK,型号:Epoch);台式高速冷冻离心机(大龙兴创实验仪器有限公司,型号:D3024R)。

1.2 造模方法

1.2.1 试剂准备 根据造模需求,对 IRBP1177-1191 和 TB 分别进行精确称量:100 μ g/只;将 CFA(150 μ L/只)和 PBS 缓冲液(150 μ L/只)准确地加入并充分混合到 5 mL EP 管中,直至乳糜状(滴入水中成团状不散开)。

1.2.2 造模 根据随机数字表法取 19 只 Lewis 大鼠为空白组,剩余 51 只为造模组,参照文献方法^[11-13]:在造模组大鼠后腿内两足底皮下注射混合好的乳糜液,每只 100 μ L,建立大鼠 EAU 模型;空白组大鼠注射等量不含 IRBP 的乳糜液于相同部位。连续 4 d 每天重复以上操作 1 次,共对 51 只大鼠进行动物模型制作。

1.2.3 模型验证 每天同时段,使用便携式手持裂

隙灯,观察各组大鼠眼部表现变化,当 Lewis 大鼠出现睫状血管充血明显,角结膜水肿,前房渗出,虹膜血管扩张、纹理消失,对光反射迟钝或消失、瞳孔粘连或膜闭等眼前节炎症表现,则说明 EAU 模型成功建立。参照表 1 Caspi 0~4 分标准^[13],对大鼠眼前节表现进行炎症评分。造模后第 7 天,从空白组和造模组大鼠中各随机抽取 3 只处死,取眼球组织制作病理切片,HE 染色后进行组织病理学检查并进行炎症评分。

表 1 Caspi 临床分级评分标准表

评分/分	表现
0	无炎症反应,眼底红光反射正常
0.5	虹膜血管轻度充血、扩张
1	虹膜血管中度充血,瞳孔缩小
2	房水可见轻度混浊,眼底的红光反射减弱
3	房水可见中度混浊,眼底的红光反射明显减弱
4	前房积脓,瞳孔膜闭,眼底红光反射消失

1.3 实验分组及干预

HE 染色后,依照随机数字表法,将造模成功的 48 只大鼠分为 3 组:模型组、祛风明目丸正常剂量组(简称正常剂量组)和祛风明目丸低剂量组(简称低剂量组),每组 16 只,未注射 IRBP 乳糜液的 16 只为空白组。

于造模后第 7 天开始灌胃。将提纯的药物按照人-动物体表面积等效剂量比值表^[14]计算得出的结果给药。根据计算得出正常剂量组及低剂量组分别予以祛风明目丸药液 4、2 g/(kg·d)灌胃,使用大鼠专用灌胃针头,连续 14 d 灌胃给药;另两组均予以等容量蒸馏水,每天 1 次灌胃处理。干预 14 d 后,在显微镜下取眼球、房水及视网膜组织,进行指标检测。

1.4 观察指标和方法

1.4.1 EAU 大鼠眼前节改变观察 自造模开始后每天于同时段,采用 Caspi 临床分级评分标准,使用便携式手持裂隙灯显微镜观察各组大鼠的眼前节体征变化,进行评分并记录。

1.4.2 组织病理学检查 自造模后第 7 天随机抽取 6 只大鼠处死(空白组和造模组大鼠中各 3 只),腹腔注射麻醉后,静待大鼠逃避等运动反射消失,将大鼠眼球摘除,放入 1.5 mL 离心管中,浸泡于 4%多聚甲醛中性缓冲液中固定 24 h 后去除多余组织,脱水浸蜡,包埋,予以 HE 染色。显微镜下进行观察并拍照,对病理切片进行组织病理学检查。

1.4.3 ELISA 检测房水中 NLRP3、IL-1 β 水平 给

药 14 d 后,大鼠予以 10%水合氯醛经腹腔麻醉,在手术显微镜下将针头轻轻刺入前房,房水自动吸入毛细管中,收集房水于无菌 EP 管中,立即转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱冷冻保存。参照 ELISA 试剂盒说明书的要求,对获得的房水标本,进行规范操作,利用酶标仪检测各组大鼠房水中 NLRP3、IL-1 β 表达水平。

1.4.4 Western blot 检测视网膜组织中 ASC、NLRP3 蛋白水平 大鼠取出房水后,随即充分暴露大鼠眼球,将周围结缔组织分离后剪断视神经,取出眼球。参考 MCMENAMIN 的方法^[5],在显微镜下使用显微剪沿角巩膜缘剪开,并仔细分离其他组织。将剥离的视网膜组织小心地放入 1.5 mL 离心管中,并立即存放至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。检验时,加入适量液氮与 PBS 后离心提取蛋白质,制备 BCA 工作液,测定蛋白质浓度,加入相应体积的总蛋白样品与 5 \times 蛋白质凝胶电泳上样缓冲液混合,进行 SDS-PAGE 电泳,后在 PVDF 膜上转印;依次加入兔抗鼠 NLRP3(1:500)、ASC(1:500)、 β -actin(1:1 000)一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜孵育,洗膜后将羊抗兔 IgG-HRP 二抗用 1 \times TBST 稀释 1 500 倍,室温、避光环境中缓慢摇动 60 min 后洗膜,按 1:1(V/V)混合 ECL 试剂盒中两种液体后,均匀铺在 PVDF 膜表面 4 min,随后抖除膜上液体,放入化学发光成像系统中成像,对蛋白条带行灰度分析,蛋白相对表达量用目的蛋白与 β -actin 灰度值比值表示。

1.5 统计学方法

收集实验数据,计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,应用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行统计分析,符合正态分布且方差齐的计量资料,多组之间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验;不符合正态分布或方差不齐的计量资料采用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EAU 大鼠眼前节变化

造模后连续使用手持裂隙灯观察大鼠眼前节变化,造模第 1 天:大鼠眼前节无明显炎症反应,眼部情况基本如图 1A;造模第 3 天:观察到炎症反应,睫状充血,虹膜血管轻度扩张,48 只大鼠如图 1B,2 只大鼠如图 1A,1 只出现图 1C;造模第 5 天:观察到葡萄膜炎反应,多数大鼠睫状充血明显,虹膜血管中度扩张、迂曲,部分出现前房轻度混浊,瞳孔欠圆,对

光反射稍迟钝,眼底红光反射减弱,29 只大鼠如图 1C,22 只如图 1B;造模第 7 天:多数体征同前,部分大鼠出现前房积脓、瞳孔膜闭,视网膜红光反射减弱或消失,46 只大鼠如图 1C,4 只如图 1D。

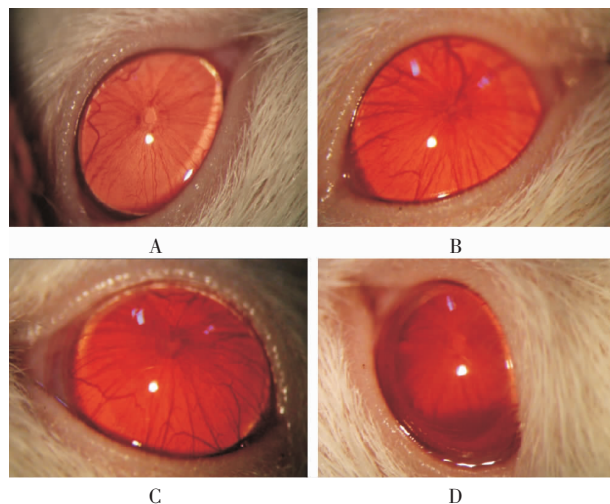


图 1 造模后不同时间大鼠眼前节表现对比

自造模第 3 天起,造模组评分均明显高于空白组 ($P<0.01$),说明 EAU 大鼠模型制备成功。详见表 2。

表 2 造模后不同时间 Caspi 临床分级评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	n	第 3 天	第 5 天	第 7 天
空白组	19	0.01 \pm 0.11	0.05 \pm 0.16	0.10 \pm 0.20
造模组	51	0.74 \pm 0.34*	1.54 \pm 0.71*	2.71 \pm 0.64*

注:与空白组相比,* $P<0.01$ 。

2.2 组织病理学检查

造模后第 7 天,空白组可见视网膜各层组织结构清晰完整;造模组可见视网膜的视细胞层、双极细胞层等有炎症细胞的浸润,血管扩张,且组织结构较空白组欠清晰。详见图 2。

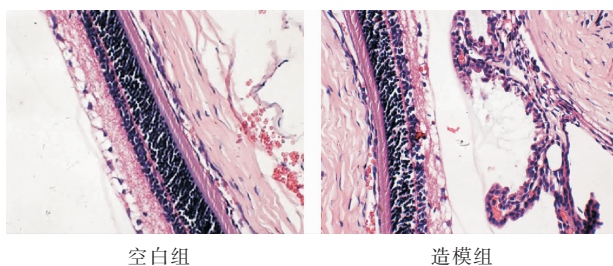


图 2 造模后第 7 天空白组与造模组组织病理学检查(HE, $\times 400$)

造模第 7 天,裂隙灯显微镜下观察大鼠眼前节改变,可见大部分大鼠房水中度混浊,少数大鼠前房重度混浊,瞳孔膜闭,视网膜红光反射消失。炎症评分为(2.71 \pm 0.64)分,HE 染色显示,免疫后第 7 天造模组大鼠视网膜多层出现不同程度的炎症细胞

浸润。以上表明,免疫后第7天,EAU大鼠模型建立成功。

2.3 祛风明目丸对房水中 NLRP3、IL-1 β 水平的影响

与空白组对比,模型组房水中 NLRP3 及 IL-1 β 水平均明显升高($P<0.05$);与模型组相比,给药 14 d 后,正常剂量组及低剂量组房水中 NLRP3 与 IL-1 β 含量均降低($P<0.05$);正常剂量组与低剂量组差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠给药后 14 d 房水中 NLRP3、IL-1 β 水平比较($\bar{x}\pm s$, ng/mL)

组别	n	NLRP3	IL-1 β
空白组	16	10.34 \pm 1.51	13.31 \pm 3.12
模型组	16	17.86 \pm 2.30*	27.66 \pm 3.56*
正常剂量组	16	14.13 \pm 2.07 [#]	20.90 \pm 3.48 [#]
低剂量组	16	13.93 \pm 1.38 [#]	22.28 \pm 3.60 [#]

注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$ 。

2.4 祛风明目丸对视网膜组织中 ASC、NLRP3 蛋白水平的影响

与空白组相比,模型组视网膜组织中 ASC、NLRP3 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与模型组相比,给药 14 d 后,正常剂量组及低剂量组视网膜组织中 ASC、NLRP3 蛋白表达含量均下降($P<0.05$);与正常剂量组相比,低剂量组视网膜组织 ASC、NLRP3 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。见表 4、图 3。

表 4 各组大鼠给药后 14 d 视网膜中 ASC、NLRP3 蛋白水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ASC	NLRP3
空白组	16	0.32 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01
模型组	16	0.68 \pm 0.02*	0.69 \pm 0.01*
正常剂量组	16	0.53 \pm 0.01 [#]	0.53 \pm 0.01 [#]
低剂量组	16	0.61 \pm 0.01 ^{#*}	0.63 \pm 0.01 ^{#*}

注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与正常剂量组相比,^{*} $P<0.05$

3 讨论

葡萄膜炎在临床上的治疗较为棘手,近几年针对葡萄膜炎的中西医结合治疗手段较多。临床研究表明,配合中医治疗能减轻治疗药物带来的毒副作用,临床疗效良好,运用中医药辨证施治及多靶点整体调节的特点既能保证疗效,又能降低疾病复发率^[16-18],但是具体的治疗机制缺乏详细阐述。葡萄膜炎属于中医学“瞳神紧小”范畴,历代医家多将其发病归于肝胆的风热、湿热^[19]。祛风明目丸是喻京生教授根据“除风益损汤”加减所制的中成药,临床中多因风热上扰,气血受损导致本病,治以祛风清热、养血活血,常用熟地黄、当归、柴胡、菊花、防风、鱼腥草等中药。叶天士言:“目盲无所见,在肝经之风也。”柴胡、当归、菊花等药物均入肝经,上连目系,肝气通于目,柴胡退六经邪热往来,与黄芩一升一降,防风治风通用、除上焦风邪,入肝,甘温发散;配合菊花、鱼腥草祛风清热。瞳神之处脉络较多,虚火上炎

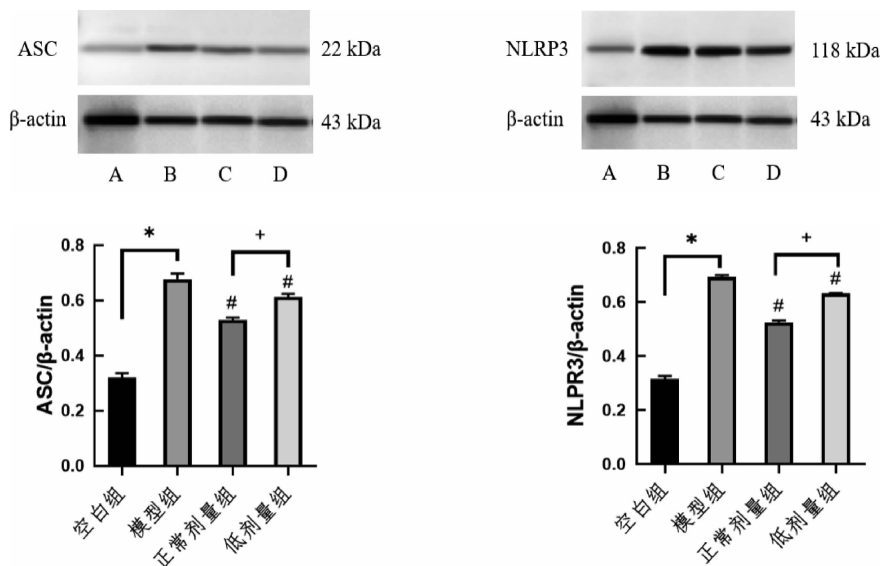


图 3 祛风明目丸对视网膜中 ASC、NLRP3 蛋白水平影响($\bar{x}\pm s$, n=16)

注:A.空白组;B.模型组;C.正常剂量组;D.低剂量组。与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与正常剂量组相比,^{*} $P<0.05$ 。

损伤脉络,故配伍熟地黄、当归、白芍等药养血活血。现代药理研究表明,柴胡、菊花、黄芩具有解热、镇痛、抗炎、抗菌作用,熟地黄、川芎、鱼腥草此类中药还具有双向免疫调节功效^[20-21]。

大部分 EAU 与自身免疫性应答关系密切^[22-23],其发病与体内免疫系统的激活及多种细胞因子及信号通路的异常表达致细胞凋亡关系密切^[24-26]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生与清除平衡维持着机体正常的生理功能,且作为信号分子参与调节细胞内多种信号通路和免疫应答^[27]。ROS-NLRP3 通路作为诱导和调节细胞凋亡的一条重要通路,当 ROS 水平升高时,与硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP)发生反应,NLRP3 炎症小体被激活^[28]。在 ROS 的诱导下, TXNIP 与核心蛋白 NLRP3 结合,结合后可引起内皮细胞炎症小体受激活,再激活 Toll 样受体通道,引起一系列炎症反应发生。

NLRP3 炎症小体是一种多蛋白复合体,具有高度保守性,包括核心蛋白 NLRP3、效应蛋白 pro-Caspase-1 以及接头蛋白 ASC,是固有免疫系统的一大重要组成部分,属于模式识别受体,IL-1 β 、IL-18 为其下游炎症小体^[29-30]。核心蛋白 NLRP3 响应微生物感染和细胞损伤后,介导 Caspase-1 的激活及促炎因子 IL-1 β 、IL-18 的分泌。有研究表明,免疫性葡萄膜炎(autoimmune uveitis, AU)的发生发展与 NLRP3 炎症小体密不可分,部分 AU 患者的外周静脉血有 NLRP3 的表达^[31]。另外,研究发现使小鼠体内的 NLRP3 基因突变后,小鼠自身炎症反应明显减弱^[32]。上述研究均证实,ROS-NLRP3 通路可引发一系列炎症反应。

目前,公认的研究人类 AU 发病机制及药物治疗的动物模型为使用视网膜蛋白 IRBP 诱导 Lewis 大鼠 EAU 模型^[33]。本实验通过构建 EAU 大鼠模型发现,造模第 7 天,结合裂隙灯观察到的大鼠眼部体征与眼球 HE 染色结果,提示造模成功。模型组大鼠房水中 IL-1 β 与 NLRP3、视网膜组织中 NLRP3 与 ASC 的表达均较空白组大鼠增加,经祛风明目丸治疗后,通过手持裂隙灯观察大鼠眼前节炎症变化,以及检测房水和视网膜中 ROS 通路相关蛋白的表达量,均证实祛风明目丸的治疗发挥了一定疗

效。本病的消退与 IL-1 β 及 NLRP3 两者的表达相关,通过影响 IL-1 β 及 NLRP3 的平衡,使促炎因子与抑炎因子两者之间的平衡失调。与空白组相比,模型组 NLRP3、ASC、IL-1 β 表达增加($P<0.05$),正常剂量组与低剂量组同模型组相比,表达均减少($P<0.05$)。正常剂量组及低剂量组均可有效减轻 EAU 大鼠葡萄膜炎的炎症表现。

综上,本研究结果显示,祛风明目丸可通过多种途径在 EAU 的治疗中发挥免疫调节作用。经祛风明目丸干预后,EAU 大鼠房水中 NLRP3、IL-1 β 水平及视网膜组织中 ASC、NLRP3 蛋白水平降低,这表明祛风明目丸可能是通过下调 ROS、ASC 的表达,抑制 NLRP3 炎症小体的激活,然后抑制炎症因子如 IL-1 β 的分泌,进而发挥治疗葡萄膜炎的作用。但是本研究仅证实祛风明目丸对 EAU 大鼠 ROS 信号通路相关蛋白的影响,但 ROS 信号通路相关蛋白复杂多样,且实验设计中未加入任何一种蛋白的有关抑制剂或激动剂,不能完全证实祛风明目丸是完全针对 ROS 信号通路而发挥具体的作用,且 ROS/NLRP3 通路还涉及如细胞焦亡、线粒体自噬等多个机制,还需进行更深层次的研究,为本项目组开展进一步实验提供思路。

参考文献

- [1] ALI SHAHAB M, MIR T A, ZAFAR S. Optimising drug therapy for non-infectious uveitis[J]. *International Ophthalmology*, 2019, 39(7): 1633-1650.
- [2] 陈杰,刘峰,孙卫民,等. FasL 基因转染树突状细胞在抑制实验性自身免疫性葡萄膜炎中的作用[J]. *感染、炎症、修复*, 2012, 13(2): 87-92.
- [3] HORAI R, ZÁRATE-BLADÉS C R, DILLENBURG-PILLA P, et al. Microbiota-dependent activation of an autoreactive T cell receptor provokes autoimmunity in an immunologically privileged site[J]. *Immunity*, 2015, 43(2): 343-353.
- [4] 李剑冰,徐国兴. 葡萄膜炎及其模型中相关细胞因子的研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2015, 15(7): 1172-1175.
- [5] 杨培增,邢琳. 我国近五年葡萄膜炎临床与基础研究进展[J]. *中华眼科杂志*, 2005(8): 743-747.
- [6] 王颖筱,喻京生,秦汉,等. 祛风活血丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠血清 IL-15、IFN- γ 表达的影响[J]. *新中医*, 2019, 51(11): 1-5.
- [7] 贺莉,喻京生,秦汉,等. 祛风活血丸对实验性自身免疫性

- 葡萄膜炎大鼠血清 IL-35 和 IL-10 表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2018, 32(3): 62-66.
- [8] 秦汉, 喻京生, 贺莉, 等. 祛风活血丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 JAK2 mRNA 和 STAT3 mRNA 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(3): 245-249.
- [9] 喻京生, 肖霞, 李维, 等. 祛风活血丸对 EAU 大鼠模型 TGF- β 2 表达的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2017, 27(3): 146-150.
- [10] 高健. 祛风活血丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠视网膜 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [11] TIAN Q M, BI H S, CUI Y, et al. Qingkailing injection alleviates experimental autoimmune uveitis in rats via inhibiting Th1 and Th17 effector cells[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(11): 1991-1996.
- [12] CUI Y, SHAO H, SUN D M, et al. Regulation of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)-specific Th1 and Th17 cells in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID)[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2009, 50(12): 5811-5817.
- [13] CASPI R R. Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse[J]. *Current Protocols in Immunology*, 2003, Supplement (15): 15.6.1-15.6.20.
- [14] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1261-1263.
- [15] MCMENAMIN P G. Optimal methods for preparation and immunostaining of iris, ciliary body, and choroidal wholemounts[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2000, 41(10): 3043-3048.
- [16] 荣立洋, 郭大东, 李佳, 等. 葡萄膜炎中医病因病机分析与中西医结合治疗研究[J]. 中医药导报, 2017, 23(4): 75-77.
- [17] 林柳燕, 郝小波, 赵建英, 等. 中西医结合治疗 Behcet 综合征葡萄膜炎的临床观察[J]. 中国中医眼科杂志, 2017, 27(1): 33-36.
- [18] 肖霞, 喻京生, 李维, 等. 中西医结合治疗葡萄膜炎 123 例疗效观察[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(3): 74-76.
- [19] 彭清华. 中医眼科学[M]. 4版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 143-147.
- [20] 王珊珊, 唐晓婷, 李雪婷. 治疗葡萄膜炎的中药及其作用机制研究进展[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(11): 213-216.
- [21] 余嘉珍, 莫亚. 临床常用中药提取物在葡萄膜炎治疗中的新进展[J]. 中医耳鼻咽喉杂志, 2021, 11(2): 93-97.
- [22] SONODA K H, HASEGAWA E, NAMBA K, et al. Epidemiology of uveitis in Japan: A 2016 retrospective nationwide survey[J]. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 2021, 65(2): 184-190.
- [23] FANG C B, ZHOU D X, ZHAN S X, et al. Amelioration of experimental autoimmune uveitis by leflunomide in Lewis rats[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62071.
- [24] 喻京生, 赵黎明. 祛风活血汤对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 Bcl-2 蛋白表达水平的影响[C].//中华中医药学会.全国中医眼科名家学术研讨会论文集.长沙: [出版者不详], 2014: 279-287.
- [25] 魏慧霞, 殷学伟, 毕宏生, 等. 非编码 RNA 在葡萄膜炎发生发展过程中的调控作用研究进展[J]. 眼科新进展, 2020, 40(1): 86-89.
- [26] 钱丽丽, 徐亚茹, 胡芳, 等. Th1、Th17 细胞相关因子在实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠中的表达及作用[J]. 眼科新进展, 2015, 35(10): 918-920.
- [27] 刘飞跃. 缺血鼠脑中活性氧的在体电化学分析[D].上海: 华东师范大学, 2019.
- [28] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, et al. The NLRP3 Inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13): 3328.
- [29] 丁杨, 胡容. NLRP3 炎症小体激活及调节机制的研究进展[J]. 药学进展, 2018, 42(4): 294-302.
- [30] TEN BERGE J C, SCHREURS M W, VAN ROSMALEN J, et al. Autoantibody profiling in intraocular fluid of patients with uveitis[J]. *Experimental Eye Research*, 2018, 176: 141-146.
- [31] 荆锋, 宋志红. NLRP3 炎症小体与葡萄膜炎的关系[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(5): 690-693.
- [32] 王俞方, 肖启国, 王智, 等. ROS 信号通路调控 NLRP3 炎症小体在自身免疫性葡萄膜炎发生中的作用[J]. 眼科新进展, 2020, 40(6): 527-532.
- [33] 满辉, 黄旭东, 黄静. 内毒素诱导的葡萄膜炎大鼠眼内 DR5 的表达研究[J]. 眼科新进展, 2017, 37(7): 627-630.

(本文编辑 苏维)