

本文引用: 艾 民, 李丹阳, 周 派, 彭 俊, 杨毅敬, 彭清华. 滋阴明目方通过 Akt/FoxO1/FasL 通路抑制感光细胞凋亡治疗视网膜色素变性的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 206–212.

滋阴明目方通过 Akt/FoxO1/FasL 通路抑制感光细胞凋亡 治疗视网膜色素变性的机制研究

艾 民¹, 李丹阳¹, 周 派¹, 彭 俊^{1,2}, 杨毅敬¹, 彭清华^{1,2*}

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 观察滋阴明目方对视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)小鼠视网膜组织中磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)、叉头框蛋白 1(forkhead box transcription factor O1, FoxO1)以及凋亡相关因子配体(Fas ligand, FasL)表达的影响,探讨滋阴明目方抑制感光细胞凋亡的机制。方法 将 60 只 rd10 小鼠随机分为模型组、滋阴明目方低剂量组[10 g/(kg·d)]、滋阴明目方中剂量组[20 g/(kg·d)]、滋阴明目方高剂量组[40 g/(kg·d)]、维生素 A 组[5 g/(kg·d)],每组 12 只;选取 12 只 C57 小鼠作为空白对照组(等量生理盐水),每组连续干预 28 d。通过眼底照相观察小鼠眼底形态改变;进行视网膜电图检查并记录 A 波和 B 波振幅;HE 染色观察病理形态学变化并测定外核层厚度;Western blot 法检测小鼠视网膜组织 p-Akt, FoxO1, FasL, 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白(cysteine aspartate-specific protease, Caspase)-3 和 Caspase-8 蛋白表达。结果 与空白对照组比较,模型组小鼠视盘苍白、变形,血管萎缩,视网膜电图的 A 波与 B 波振幅均降低($P<0.01$),视网膜结构模糊,各层界限不清,感光细胞大量丧失,外核层明显变薄($P<0.01$),视网膜组织中 p-Akt 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$), FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,滋阴明目方中、高剂量组及维生素 A 组小鼠眼底血管较清晰,无视盘苍白表现;视网膜各层结构清晰,细胞排列相对整齐。与模型组、滋阴明目方低剂量组比较,滋阴明目方中、高剂量组的 A 波与 B 波振幅、视网膜外核层厚度均明显升高($P<0.01$),维生素 A 组的 B 波振幅、视网膜外核层厚度明显升高($P<0.01$);与滋阴明目方中剂量组比较,滋阴明目方高剂量组的 A 波与 B 波振幅、视网膜外核层厚度均明显升高($P<0.01$),维生素 A 组的 A 波与 B 波振幅均明显降低($P<0.01$);与滋阴明目方高剂量组比较,维生素 A 组的 A 波与 B 波振幅、视网膜外核层厚度均明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,滋阴明目方低、中、高剂量组和维生素 A 组 p-Akt 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$), FoxO1、FasL 和 Caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.05, P<0.01$), 滋阴明目方中、高剂量组 Caspase-8 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。与滋阴明目方低剂量组比较,滋阴明目方高剂量组和维生素 A 组 p-Akt 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$), 滋阴明目方中、高剂量组 FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。与滋阴明目方中剂量组比较,滋阴明目方高剂量组和维生素 A 组 p-Akt 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$), 滋阴明目方高剂量组 FoxO1、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$), 维生素 A 组 FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。与滋阴明目方高剂量组比较,维生素 A 组 p-Akt 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$), FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。结论 滋阴明目方可能通过调控 Akt/FoxO1/FasL 通路,增强 p-Akt 表达,抑制 FoxO1 及下游基因 FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 的蛋白表达,从而减少 rd10 小鼠视网膜细胞的凋亡,保护视网膜结构和功能,延缓 RP 的进展。

[关键词] 视网膜色素变性;滋阴明目方;磷酸化蛋白激酶 B;叉头框蛋白 1;凋亡相关因子配体;感光细胞;细胞凋亡

[中图分类号] R276.7

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.005

Mechanism of Ziyin Mingmu Formula in treating retinitis pigmentosa by inhibiting photoreceptor apoptosis through Akt/FoxO1/FasL pathway

AI Min¹, LI Danyang¹, ZHOU Pai¹, PENG Jun^{1,2}, YANG Yijing¹, PENG Qinghua^{1,2*}

[收稿日期] 2023-10-31

[基金项目] 国家中医药管理局国家中医药领军人才支持计划——“岐黄学者”计划项目;国家自然科学基金面上项目(81574031);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目(ZK1801YK015);“刘良院士工作站”指导项目(21YS002);湖南省教育厅科研基金重点项目(21A0238);湖南省研究生科研创新项目(2023CX84)。

[通信作者] * 彭清华,男,二级教授,主任医师,博士研究生导师, E-mail: pqh410007@126.com。

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 observe the effects of Ziyin Mingmu Fomula (ZYMMF) on the expressions of phosphorylated protein kinase B (p-Akt), forkhead box transcription factor O1 (FoxO1), and Fas ligand (FasL) in the retinal tissue of mice with retinitis pigmentosa (RP), so as to explore the mechanism of ZYMMF in inhibiting photoreceptor apoptosis. **Methods** A total of 60 rd10 mice were randomized into model group, low-, medium-, and high-dose ZYMMF groups [10 g/(kg·d), 20 g/(kg·d), and 40 g/(kg·d), respectively], and vitamin A group [5 g/(kg·d)], with 12 mice in each group. Additionally, twelve C57 mice were used as blank control group (equal amount of normal saline). Each group was continuously intervened for 28 d. Fundus photography was used to observe the morphological changes of the fundus of mice, and electroretinography was performed to record a- and b-wave amplitudes. HE staining was used to observe the pathological changes in the retinal tissue of mice and determine the thickness of the outer nuclear layer, and Western blot was used to check the protein expressions of p-Akt, FoxO1, FasL, cysteine aspartate-specific protease (Caspase)-3, and Caspase-8 in the retinal tissue. **Results** Compared with blank control group, the retina in model group showed pale and deformed optic disc, vascular atrophy, reduced amplitudes of both a- and b-waves in the electroretinogram ($P < 0.01$), blurred retinal structure, unclear boundaries of each layer, massive loss of photoreceptor cells, significant thinning of the outer nuclear layer ($P < 0.01$), significantly lower p-Akt protein expression level ($P < 0.01$), and markedly higher protein expression levels of FoxO1, FasL, Caspase-3, and Caspase-8 ($P < 0.01$). Compared with model group, the fundus blood vessels in medium- and high-dose ZYMMF groups and vitamin A group were clearer, the optic disc showed no paleness, each layer of the retina was structured clearly, and the cells were arranged relatively neatly. Compared with model and low-dose ZYMMF groups, medium- and high-dose ZYMMF groups showed significantly increased a- and b-wave amplitudes and thicker outer nuclear layer of retina ($P < 0.01$), and vitamin A group showed significantly increased b-wave amplitude and also obviously thicker outer nuclear layer of retina ($P < 0.01$). Compared with medium-dose ZYMMF group, high-dose ZYMMF group showed significantly elevated a- and b-wave amplitudes and thicker outer nuclear layer of retina ($P < 0.01$), while vitamin A group showed significantly decreased a- and b-wave amplitudes ($P < 0.01$). Compared with high-dose ZYMMF group, vitamin A group showed obviously decreased a- and b-wave amplitudes and thinner outer nuclear layer of retina ($P < 0.01$). Compared with model group, the protein expression level of p-Akt in low-, medium-, and high-dose ZYMMF groups and vitamin A group was significantly higher ($P < 0.01$), while those of FoxO1, FasL, and Caspase-3 were lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the Caspase-8 protein expression level in medium- and high-dose ZYMMF groups was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with low-dose ZYMMF group, the p-Akt protein expression level in high-dose ZYMMF and vitamin A groups was obviously elevated ($P < 0.01$), and the protein expression levels of FoxO1, FasL, Caspase-3, and Caspase-8 in medium- and high-dose ZYMMF groups were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with medium-dose ZYMMF group, the p-Akt protein expression level in high-dose ZYMMF and vitamin A groups was significantly higher ($P < 0.01$), the protein expression levels of FoxO1, Caspase-3, and Caspase-8 in high-dose ZYMMF group were significantly lower ($P < 0.01$), and those of FoxO1, FasL, Caspase-3, and Caspase-8 in vitamin A group were significantly higher ($P < 0.01$). Compared with high-dose ZYMMF group, vitamin A group showed obviously lower p-Akt protein expression level ($P < 0.01$) but significantly higher protein expression levels of FoxO1, FasL, Caspase-3, and Caspase-8 ($P < 0.01$). **Conclusion** ZYMMF may enhance p-Akt expression and inhibit protein expressions of FoxO1 and its downstream genes such as FasL, Caspase-3, and Caspase-8 by regulating Akt/FoxO1/FasL pathway, thereby reducing the retinal apoptosis in rd10 mice, protecting the retinal structure and function, and delaying the progression of RP.

[Keywords] retinitis pigmentosa; Ziyin Mingmu Fomula; phosphorylated protein kinase B; forkhead box transcription factor O1; Fas ligand; photoreceptor cell; apoptosis

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一组以感光细胞持续性死亡为主要特征的视网膜神经退行性疾病,具有高度的遗传异质性。RP的主要临床表现为进行性夜盲、向心性视野缩窄、双眼特征性眼底改变等,晚期致盲率较高。目前,全球的RP患者约有250万,我国患病率为1/4 016~1/3 467,RP已成为导致不可逆失明的重要原因之一^[1]。临床上,通常使用维生素A缓解RP伴发的夜盲症状,部分临床试验证明维生素A可以改善RP患者的视力丢失,但目前仍然没有完全治愈RP的方法^[2-3]。

RP在中医学中属于“高风内障”“高风雀目”范

畴。《诸病源候论·雀目候》记载“人有昼而精明,至瞑则不见物,世谓之雀目,言其如雀鸟,瞑便无所见也”,认识到夜盲是该病的临床表现之一。关于RP的病因病机,历代医家均有论述。《杂病源流犀烛·目病源流》曰:“雀目者,日落即不见物也,此由肝虚血少。”黄庭镜在《目经大成·阴风障血十六》中写道:“人而阳不胜阴,则气必下陷,阳气下陷则阴气上腾,纵有不光月色,终不能睹。”《眼科金镜》记载该病是由于“阳光不足,肾阴虚损所致”所致^[4]。总体而言,医者多认为本病多由“肝虚血少”“阳不胜阴”“阴虚”等致病。彭清华教授结合临床实际,认为RP患者除

有“虚证”的表现外,还存在“血瘀”的病理现象,治疗上采用“补虚活血法”疗效较好^[5]。

目前研究认为,RP导致的视力下降,甚至失明,主要是由感光细胞的死亡引起^[6]。细胞的程序性死亡是细胞受某信号或刺激影响时,为了维持内环境稳定而发生的一种主动性消亡过程,而凋亡属于其主要形式之一。课题组使用皇家外科学院(Royal College Surgeon,RCS)大鼠进行RP的相关研究中,发现枸杞子-丹参能降低促凋亡蛋白的表达,减少RCS大鼠视网膜细胞的凋亡^[7]。本研究通过观察滋阴明目方对RP小鼠的疗效及对磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B,p-Akt)、叉头框蛋白1(forkhead box transcription factor O1,FoxO1)以及凋亡相关因子配体(Fas ligand,FasL)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(cysteine aspartate-specific protease,Caspase)-3和Caspase-8蛋白表达的影响,进一步探讨滋阴明目方治疗RP的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4周龄SPF级rd10小鼠60只,购自美国Jackson Laboratory公司,证书编号:1911A11353,rd10小鼠是常染色体隐性RP的动物模型。4周龄SPF级C57小鼠12只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号:SYXK(湘)2019-0004,动物质量合格证号:430727231102059373。雌雄各半,饲养于湖南中医药大学实验动物中心,温度23~25℃、湿度50%~55%,环境12h明暗循环,自由摄食、饮水。本研究经湖南中医药大学实验动物中心伦理委员会批准,伦理审批号:LL2021042605。

1.2 药品及主要试剂

滋阴明目方是湖南中医药大学彭清华教授在滋阴明目丸的基础上根据具体情况化裁而成。滋阴明目方组成:当归10g,丹参10g,山药10g,川芎10g,茯苓15g,川牛膝5g,牡丹皮10g,羌活10g,枸杞子15g,山茱萸10g,酒黄精10g,菟丝子10g,石菖蒲10g,熟地黄15g,楮实子10g,三七粉5g。以上中药饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院门诊药房,批号分别是:TH23042502、HH23041001、NG23031303、GW23040301、NG23042401、GW23941-202、HH23040302、NG23041703、YY23042701、HY23-032902、2023030102、2023032905、221201、2302173、2208051、81221201,均符合《中华人民共和国药典(2020年版)》规范^[8]。维生素A胶囊[国药控股星鲨制药(厦门)有限公司,国药准字H35020246,25000IU/粒]。

苏木精和伊红染色试剂盒(北京太阳生物生命科学有限公司,批号:G1315);p-Akt、FoxO1、FasL、Casp-

ase-3、Caspase-8抗体(澳大利亚Affinity Biosciences生物科技公司,批号分别是AF0016、AF6416、AF0157、AF6311、AF6442);山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG(美国ImmunoWay生物技术公司,批号分别是RS23710、RS23920)。

1.3 主要仪器

眼底照相机、视网膜电图仪(美国Phoenix Research Labs公司,型号分别为:Phoenix Micron IV、Granzfeld ERG);JB-P5包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);RM2016病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);成像系统(日本尼康公司,型号:DS-U3);荧光成像(美国LICOR公司,型号:Odyssey CLX);电泳电源[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,型号:Universal500V-2.5A-500W];SpectraMax酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司,型号:SpectraMax M5E];微量分光光度计(美国NanoDrop公司,型号:NanoDrop 2000)。

2 方法

2.1 药物制备

将中药饮片倒入煎药锅内,加入10倍量蒸馏水,浸泡30min,煮至沸腾后转小火再煮30min,过滤出药液。随后,再加入2倍量蒸馏水,煮至沸腾后续煮30min,将2次煎煮的药液混合后过滤。使用旋转蒸发仪将药液浓缩成浓度为4g/mL的200mL混悬液。灭菌后放入4℃冰箱冷藏备用。维生素A先溶于DMSO溶剂中,随后配制成1g/mL溶液备用。

2.2 动物分组与给药

rd10小鼠是由野生型C57小鼠杂交形成的遗传性纯合子基因突变(Pde6b^{-/-},P^{-/-})模型,是经典的RP动物模型。rd10小鼠一般在出生后3~4周开始出现视网膜变性改变、色素上皮排列紊乱及功能障碍^[9]。随机选取4周龄rd10小鼠进行眼底照相和视网膜电图检测进行模型评估,若出现视网膜色素沉积及视网膜电图异常,可初步判断模型制备成功^[9]。

实验选用60只4周龄rd10小鼠,将其随机分为模型组、滋阴明目方低、中、高剂量组和维生素A组,每组均为12只;选用12只4周龄C57小鼠作为空白对照组,雌雄分笼饲养。小鼠适应性喂养1周后,空白对照组每天予以生理盐水0.1mL/10g灌胃。滋阴明目方临床用药1~2g/d,按照人体和动物体表面积比换算^[10]将成人每天1.1g的剂量等效换算为滋阴明目方低剂量10g/(kg·d),滋阴明目方中、高剂量组按低剂量的2倍、4倍设置,即中药组分别予以滋阴明目方10、20、40g/(kg·d)灌胃。维生素A组予以维生素A溶液5g/(kg·d)灌胃,每组连续干预28d。

2.3 眼底照相

1%戊巴比妥钠腹腔注射 0.2 mL 麻醉小鼠,随后用复方托比卡胺滴眼液进行散瞳。自然光线下,使用 Phoenix Micron IV 眼底照相机分别对各组小鼠进行眼底拍摄。

2.4 视网膜电图

将待检测的小鼠放入暗室中适应 8 h 以上,使用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,用复方托比卡胺滴眼液扩瞳。在红光下,使用 Granzfeld 视网膜电图分别对各组小鼠进行检查并记录 A 波和 B 波振幅。

2.5 视网膜病理学检测及外核层厚度测量

活体检测完成后,脱颈处死小鼠。用眼科镊将小鼠眼球摘下,放进眼球固定液中。将眼球组织依次脱水、浸蜡、包埋、切片。切片脱蜡,按照 HE 染色试剂盒的说明进行染色,中性树胶封片。显微镜镜检后进行图像采集,再使用 Image J 软件进行外核层厚度的测量与分析。

2.6 Western blot 法检测小鼠视网膜组织 p-Akt、FoxO1、FasL、Caspase-3 及 Caspase-8 蛋白表达

小鼠脱颈处死后,摘取双侧眼球,镜下冰上剥离视网膜组织,-80 °C 保存。取适量视网膜组织,加入 RIPA 裂解液后在冰上充分研磨,提取组织总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,电泳、转膜、封闭。加入一抗(稀释比例 1:1 000),4 °C 孵育过夜;加入二抗(稀释比例 1:10 000)室温下孵育 1 h,显影后,使用图像处理软件分析结果。

2.7 统计学分析

使用 SPSS 27.0 进行统计分析,计量资料符合正态性分布的数据均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐者采用 LSD 检验,方差不齐则采用 GamesHowell 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠视网膜眼底形态比较

眼底照相显示,空白对照组小鼠视网膜血管形态、密度正常,视盘较圆、边缘清晰,眼底无色素沉积。模型组小鼠视盘苍白、变形,血管变细、萎缩,色

素上皮萎缩。与模型组相比,滋阴明目方低剂量组小鼠眼底情况无明显差别;滋阴明目方中、高剂量组小鼠眼底血管清晰可见,视野下所有血管均充盈且颜色红润,亦无视盘苍白表现;维生素 A 组小鼠眼底血管较清晰,仍有保持正常灌流的血管。详见图 1。

3.2 各组小鼠视网膜电图比较

与空白对照组比较,模型组,滋阴明目方低、中、高剂量组和维生素 A 组的 A 波与 B 波振幅均降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组、滋阴明目方低剂量组比较,滋阴明目方中、高剂量组的 A 波与 B 波振幅均明显升高($P<0.01$),维生素 A 组的 B 波振幅明显升高($P<0.01$);与滋阴明目方中剂量组比较,滋阴明目方高剂量组的 A 波与 B 波振幅均明显升高($P<0.01$),维生素 A 组的 A 波与 B 波振幅均明显降低($P<0.01$);与滋阴明目方高剂量组比较,维生素 A 组的 A 波与 B 波振幅均明显降低($P<0.01$)。详见表 1,图 2。

表 1 各组小鼠视网膜 A 波与 B 波振幅($\bar{x}\pm s, n=6, \mu V$)

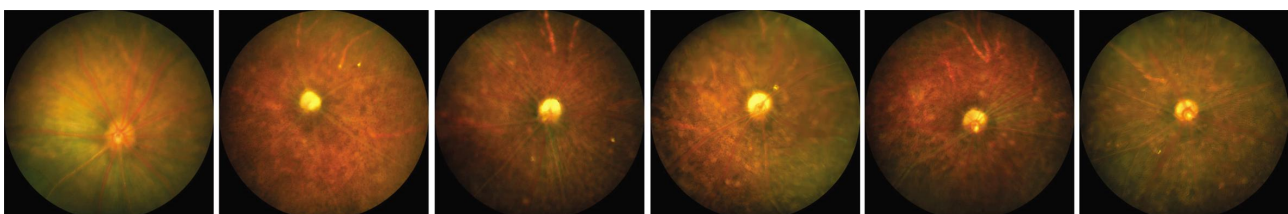
组别	A 波振幅	B 波振幅
空白对照组	42.00±4.00	165±9.03
模型组	4.00±2.83**	7.33±3.01**
滋阴明目方低剂量组	4.67±3.50**	8.17±3.82**
滋阴明目方中剂量组	19.00±5.44** ^{##} △△	48.33±2.42** ^{##} △△
滋阴明目方高剂量组	35.17±2.79** ^{##} △△□□	78.50±1.87** ^{##} △△□□
维生素 A 组	6.00±1.41**□□&&	24.83±5.78** ^{##} △△□□&&

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与滋阴明目方低剂量组比较,^{△△} $P<0.01$;与滋阴明目方中剂量组比较,^{□□} $P<0.01$;与滋阴明目方高剂量组比较,^{&&} $P<0.01$ 。

3.3 各组小鼠视网膜组织病理及外核层厚度比较

视网膜组织病理结果显示,空白对照组小鼠视网膜组织形态正常,各层结构清晰,染色均匀,细胞形态正常且排列整齐;模型组小鼠视网膜结构模糊,各层界限不清,色素上皮层、外核层明显变薄,细胞排列紊乱、感光细胞大量丧失;滋阴明目方低剂量组小鼠视网膜结构欠清晰,各层分界不清;滋阴明目方中、高剂量组及维生素 A 组小鼠视网膜厚度较模型组明显增加,视网膜各层结构清晰,细胞排列相对整齐。

与空白对照组比较,模型组,滋阴明目方低、中、高剂量组和维生素 A 组视网膜外核层厚度明显降低($P<0.01$);与模型组、滋阴明目方低剂量组比较,



空白对照组

模型组

滋阴明目方低剂量组

滋阴明目方中剂量组

滋阴明目方高剂量组

维生素 A 组

图 1 各组小鼠眼底图像($\times 50$)

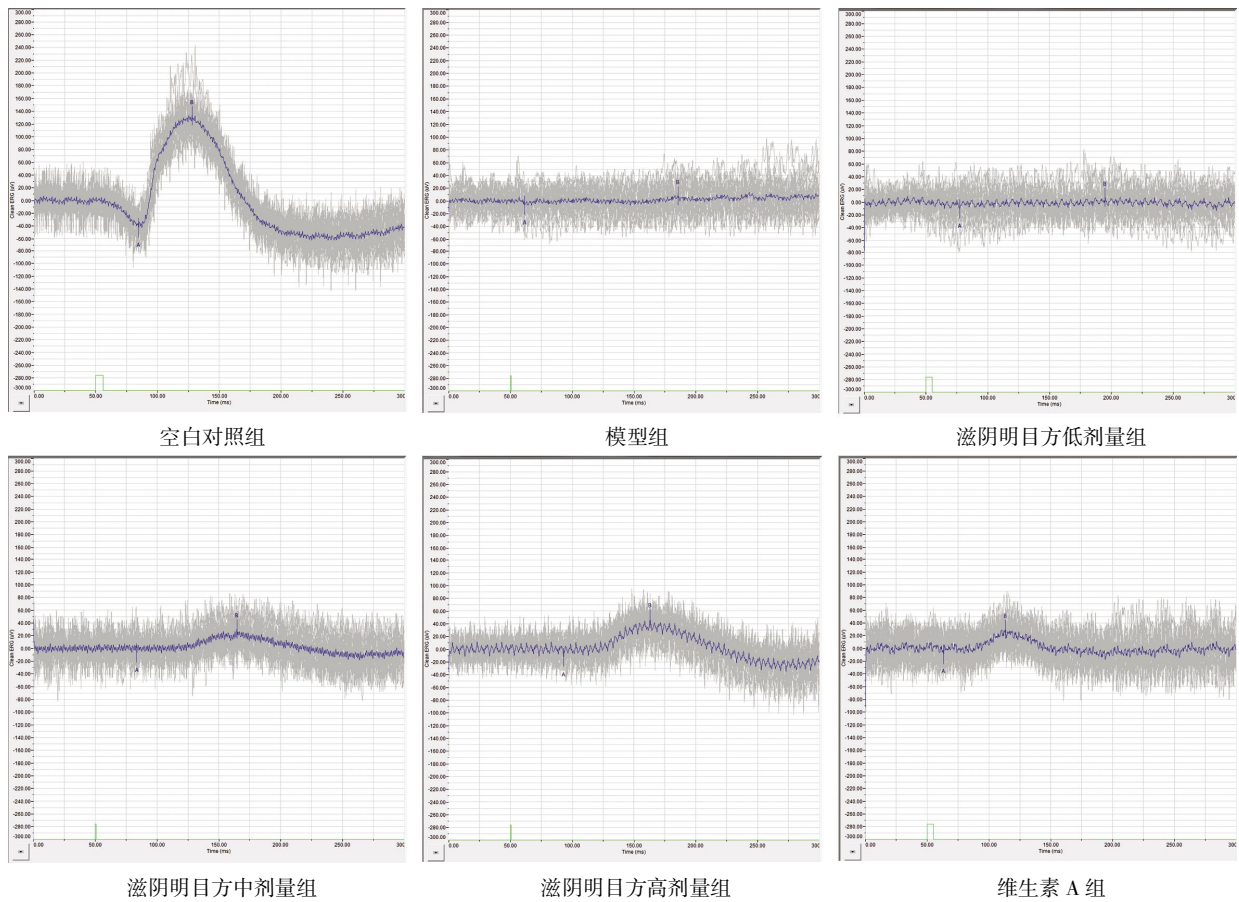


图 2 各组小鼠视网膜电图

滋阴明目方中、高剂量组和维生素 A 组视网膜外核层厚度明显升高($P<0.01$);与滋阴明目方中剂量组比较,滋阴明目方高剂量组视网膜外核层厚度明显升高($P<0.01$);与滋阴明目方高剂量组比较,维生素 A 组视网膜外核层厚度明显降低($P<0.01$)。详见表 2、图 3。

表 2 各组小鼠视网膜外核层厚度($\bar{x}\pm s, n=6, \mu\text{m}$)

组别	外核层厚度
空白对照组	52.25±1.27
模型组	5.40±0.72**
滋阴明目方低剂量组	5.85±0.51**
滋阴明目方中剂量组	16.88±1.65** ^{##} $\Delta\Delta$
滋阴明目方高剂量组	25.85±2.76** ^{##} $\Delta\Delta\Box$
维生素 A 组	14.55±1.92** ^{##} $\Delta\Delta\&$

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与滋阴明目方低剂量组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与滋阴明目方中剂量组比较, $\Box P<0.01$;与滋阴明目方高剂量组比较, $\& P<0.01$ 。

3.4 各组小鼠视网膜组织 p-Akt、FoxO1、FasL、Caspase-3 及 Caspase-8 蛋白表达水平比较

与空白对照组比较,模型组,滋阴明目方低、中、高剂量组和维生素 A 组 p-Akt 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,滋阴明目方低、中、高剂量组和维生素 A 组 p-Akt 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),FoxO1 和 FasL 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),滋阴明目方低、中、高剂量组 Caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.05, P<0.01$),滋阴明目方中、高剂量组 Caspase-8 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。与滋阴明目方低剂量组比较,滋阴明目方高剂量组和维生素 A 组 p-Akt 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),滋阴明目方中、高剂量组 FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平

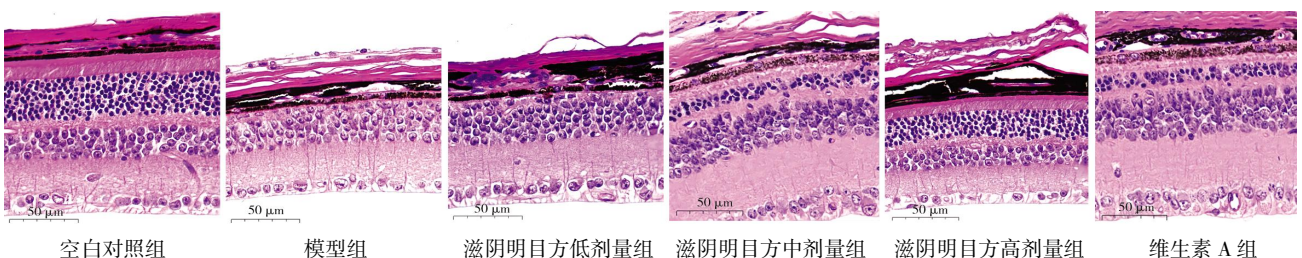


图 3 各组小鼠视网膜组织形态(HE,×400)

表3 各组小鼠视网膜组织 p-Akt、FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	p-Akt	FoxO1	FasL	Caspase-3	Caspase-8
空白对照组	0.90±0.04	0.63±0.03	0.66±0.02	0.78±0.04	0.68±0.04
模型组	0.39±0.02**	2.01±0.41**	1.99±0.09**	1.76±0.11**	1.67±0.10**
滋阴明目方低剂量组	0.52±0.01***	1.68±0.02***	1.72±0.15***	1.52±0.13**#	1.57±0.04**
滋阴明目方中剂量组	0.53±0.03***	1.41±0.11*** $\Delta\Delta$	1.29±0.10*** $\Delta\Delta$	1.32±0.07*** $\Delta\Delta$	1.18±0.05*** $\Delta\Delta$
滋阴明目方高剂量组	0.73±0.03*** $\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.08±0.08*** $\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.13±0.08*** $\Delta\Delta$	1.08±0.02*** $\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.98±0.03*** $\Delta\Delta\Delta\Delta$
维生素A组	0.60±0.04*** $\Delta\Delta\Delta\Delta\&\&$	1.77±0.04*** $\Delta\Delta\Delta\Delta\&\&$	1.64±0.06*** $\Delta\Delta\Delta\Delta\&\&$	1.64±0.01*** $\Delta\Delta\Delta\Delta\&\&$	1.65±0.07*** $\Delta\Delta\Delta\Delta\&\&$

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与滋阴明目方低剂量组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与滋阴明目方中剂量组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与滋阴明目方高剂量组比较, $\Delta\Delta\Delta P<0.01$ 。

明显降低($P<0.01$)。与滋阴明目方中剂量组比较,滋阴明目方高剂量组和维生素A组 p-Akt 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),滋阴明目方高剂量组 FoxO1、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$);维生素A组 FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。与滋阴明目方高剂量组比较,维生素A组 p-Akt 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。详见表3、图4。

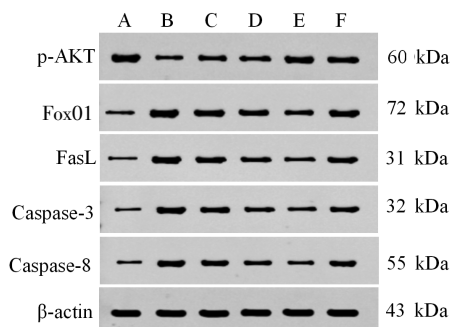


图4 各组 p-Akt、FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平比较

注:A.空白对照组;B.模型组;C.滋阴明目方低剂量组;D.滋阴明目方中剂量组;E.滋阴明目方高剂量组;F.维生素A组。

4 讨论

视网膜色素变性在中医学中属于“高风内障”“高风雀目”范畴,主要表现为夜盲和视野进行性缩窄。该病的病因以“虚”为主;或肾阳虚亏、命门火衰、阳虚而不制阴,或肝肾两亏、精血不足、阴阳不济,或脾胃虚弱、清阳不升、浊阴上行,或气血不足、气虚无以摄血等。课题组经过大量的临床和实验研究证实,RP 虽以虚为本,但以实为标,血瘀的病理表现贯穿 RP 发病的全过程^[1]。滋阴明目方以滋补肝肾、活血明目立法,方中熟地黄为君药,滋补肝肾、益精填髓;枸杞子、菟丝子、山药、茯苓、楮实子、酒黄精、山茱萸

为臣,共奏滋补肝肾之阴、益气明目之效;佐以丹参、三七粉、牡丹皮、川牛膝、当归养血活血、行血化瘀,川芎、羌活辛散防瘀,又可引药上行;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、活血化瘀之功。该方直切病机,在临床上可减轻或延缓 RP 症状。团队前期实验研究表明,补虚活血中药能抑制凋亡因子 Caspase-12 前体、Caspase-2 成熟体的表达,保护视网膜感光细胞^[12-13];枸杞子和丹参通过抗氧化、抗衰老、抗凋亡途径,对视网膜结构有一定保护作用^[14-17]。在青光眼的基础研究中,发现补虚活血中药可以减少感光细胞凋亡,通过上调视网膜磷脂酰肌醇(phosphoinositide 3-Kinase, PI3K)/Akt 信号通路中 MDM2 和 p-Akt 的表达,达到保护视功能的目的^[18]。

小鼠眼底照相结果显示,滋阴明目方中、高剂量组小鼠的眼底情况优于模型组,血管萎缩情况明显改善。尤其值得注意的是,与维生素A组小鼠眼底形态对比发现,滋阴明目方中、高剂量组中能维持正常血流灌注的血管密度更高,说明其在减少视网膜血管萎缩、改善视网膜组织缺血方面上有一定优势。视网膜电图检查主要是用仪器记录小鼠视网膜受到光刺激后产生的动作电位。A 波起源于视网膜的感光细胞层,其振幅变化反映感光细胞层的功能改变;而 B 波源自双极细胞,其振幅变化主要反映双极细胞对视觉脉冲的传输功能。视网膜电图检测的 A、B 波表现为“熄灭型”波时,说明感光细胞和双极细胞遭受严重损伤,视功能可能严重下降。经滋阴明目方治疗的小鼠 A、B 波的振幅均明显升高^[19]。在视网膜病理学检测中发现,滋阴明目方中、高剂量组小鼠视网膜结构较模型组更清晰、排列整齐,且外核层较厚。视网膜外核层主要由视杆细胞和视锥细胞组成,胞体和细胞核排列密集,其厚度在一定程度上代表了视网膜功能。以上结果均说明,滋阴明目方对维持 RP 小鼠视网膜正常结构与功能及保护视功能有非常重要的意义。

Akt 在维持细胞增殖、凋亡等方面有着尤为重要

的作用, p-Akt 参与细胞增殖、凋亡和转移等相关过程的调控^[20-21]。FoxO 转录因子是 PI3K/Akt 信号转导通路的主要下游介质之一^[22-23], 在调节细胞稳态中发挥重要作用。Western blot 结果提示, 在一定剂量的滋阴明目方的作用下, p-Akt 在 rd10 小鼠视网膜组织中高表达, 而 FoxO1、FasL、Caspase-3 和 Caspase-8 表达下降。p-Akt 可以激活 FoxO 亚族转录因子 FoxO1^[24], 而 FoxO1 的入核能够诱导相关促凋亡基因 FasL 的表达, 进而诱导细胞凋亡^[25-26], 而 Caspase-3 和 Caspase-8 作为凋亡相关因子其表达量将升高。滋阴明目方通过增强 p-Akt 的表达, 诱导 FoxO1 从细胞核到细胞质的转移, 使其蛋白活性降低, 抑制了促凋亡基因 FasL 的表达, 进而降低 Caspase-8 及 Caspase-3 的蛋白表达, 从而达到减少感光细胞凋亡的作用。

综上所述, 滋阴明目方可以减少 RP 小鼠视网膜感光细胞的凋亡, 维持视网膜外核层厚度, 保护视网膜组织结构及功能。该方对视网膜保护作用的发挥可能是通过激活 Akt/FoxO1/FasL 通路, 上调 p-Akt, 下调 FoxO1、FasL 的基因表达水平, 进而抑制 Caspase-8 及 Caspase-3 的表达实现的。本研究证实, 滋阴明目方可能是通过调控 Akt/FoxO1/FasL 信号通路减少视网膜细胞的凋亡, 从而延缓 RP 的进展, 其更深层次的机制仍有待阐明。

参考文献

- [1] 祁玉麟, 贾茜钰, 叶河江. 针刺治疗视网膜色素变性的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4): 2148-2151.
- [2] WU K Y, KULBAY M, TOAMEH D, et al. Retinitis pigmentosa: Novel therapeutic targets and drug development[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(2): 685.
- [3] BRUNINX R, LEPIÈCE G. Retinitis pigmentosa[J]. *Revue Medicale De Liege*, 2020, 75(2): 73-74.
- [4] 刘耀先. 眼科金镜[M]. 韦企平, 郑金生, 整理. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 70.
- [5] 彭俊, 杨毅敬, 李波, 等. 中医综合治疗视网膜色素变性患者 973 例疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(5): 95-97, 222.
- [6] 王烽, 赖江峰, 曹玲英, 等. TRPV4 在眼科疾病中的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2023, 23(1): 48-52.
- [7] 彭俊, 王英, 蒋鹏飞, 等. 枸杞丹参对 RCS 大鼠视网膜组织中 Bel-2、Bid 表达的影响[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2020, 22(4): 1166-1175.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 22-179.
- [9] JAE S A, AHN K N, KIM J Y, et al. Electrophysiological and histologic evaluation of the time course of retinal degeneration in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa[J]. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2013, 17(3): 229-235.
- [10] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [11] 彭清华, 李传课. 视网膜色素变性中夹瘀的机理研究小结[J]. 中国医药学报, 1993, 8(6): 7-10, 61.
- [12] 蒋鹏飞, 欧晨, 彭俊, 等. 补虚活血法对 rd10 小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 成熟体表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1): 174-177.
- [13] 彭俊, 蒋鹏飞, 王英, 等. 枸杞子加丹参对 RCS(rdy^{-/-}, p^{-/-}) 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.
- [14] 欧晨, 彭俊, 蒋鹏飞, 等. 枸杞丹参对 rd10 小鼠感光细胞凋亡及氧化应激的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(11): 2580-2582.
- [15] 欧晨, 宋厚盼, 杨毅敬, 等. 基于网络药理学探讨枸杞子治疗视网膜色素变性的作用机制[J]. 世界中医药, 2021, 16(8): 1192-1197.
- [16] 蒋鹏飞, 欧晨, 彭俊, 等. 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.
- [17] 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.
- [18] 赵新. 基于视网膜血管及血氧技术的补肾活血中药保护原发性开角型青光眼视功能临床研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- [19] WANG J, XIAO H Y, BARWICK S, et al. Optimal timing for activation of sigma 1 receptor in the Pde6brd10/J (rd10) mouse model of retinitis pigmentosa[J]. *Experimental Eye Research*, 2021, 202: 108397.
- [20] 朱宝安, 郑建新, 张印坡. PTPRJ 通过 Src/PI3K/Akt 信号通路促进前列腺癌细胞的黏附、迁移和侵袭[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(13): 2437-2442.
- [21] MA Z, LAN Y H, LIU Z W, et al. MiR-19a suppress apoptosis of myocardial cells in rats with myocardial ischemia/reperfusion through PTEN/Akt/P-Akt signaling pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(6): 3322-3330.
- [22] ZHU Y Y, WU F, HU J N, et al. LDHA deficiency inhibits trophoblast proliferation via the PI3K/AKT/FOXO1/CyclinD1 signaling pathway in unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *FASEB Journal*, 2023, 37(2): e22744.
- [23] XIANG M, LIU T T, TIAN C, et al. Kinsenoside attenuates liver fibro-inflammation by suppressing dendritic cells via the PI3K-AKT-FoxO1 pathway[J]. *Pharmacological Research*, 2022, 177: 106092.
- [24] 莫莉莉, 邹常超, 徐启丽, 等. 碘甲状腺原氨酸的受体、通路及药理学效应研究进展[J]. 中国药房, 2022, 33(2): 244-250.
- [25] 赵天夺. 假基因 RPS4XP1 通过 miR-223/FOXO1 轴调控奶牛乳腺上皮细胞功能的作用机制研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023.
- [26] LIU Y, GUO W, HONG S L. Aerobic exercise mitigates hippocampal neuronal apoptosis by regulating DAPK1/CDKN2A/REDD1/FoxO1/FasL signaling pathway in D-galactose-induced aging mice[J]. *FASEB Journal*, 2023, 37(10): e23205.