

• 实验研究 •

本文引用: 彭俊, 彭清华, 吕怡, 熊晨, 陈向东, 罗琪. 基于 Keap1/Nrf2/HO-1 通路探讨青光安 II 号方对青光眼小鼠铁死亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(7): 1303–1311.

基于 Keap1/Nrf2/HO-1 通路探讨青光安 II 号方对 青光眼小鼠铁死亡的影响

彭俊^{1,2}, 彭清华^{1,2}, 吕怡^{1,2}, 熊晨¹, 陈向东^{2*}, 罗琪^{1*}

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 探讨青光安 II 号方通过 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Keap1)/核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1) 通路对青光眼小鼠铁死亡的影响及作用机制。方法 选取 8 只 C57BL/6J 小鼠作为空白组, 40 只自发性慢性高血压 DBA/2J 青光眼小鼠随机分为模型组、青光安 II 号方低剂量组、青光安 II 号方中剂量组、青光安 II 号方高剂量组、阳性药组, 每组 8 只。空白组、模型组用等量蒸馏水灌胃, 青光安 II 号方低(9.75 g/kg)、中(19.5 g/kg)、高(39 g/kg)剂量组用青光安 II 号方水煎液灌胃, 阳性药组以 30 μg/kg 注射用鼠神经生长因子肌内注射, 均连续干预 28 d。监测小鼠眼压; HE 染色观察视网膜组织形态及视网膜神经节细胞(RGCs)数量; Western blot 检测 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平; DHE 染色检测活性氧(ROS)含量; ELISA 检测丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量; 亚铁离子(Fe^{2+})测定试剂盒检测 Fe^{2+} 含量。结果 与空白组比较, 模型组小鼠 Keap1 蛋白表达水平、ROS 平均荧光强度、MDA 及 Fe^{2+} 含量升高($P<0.05$), RGCs 数量、SOD 含量、Nrf2、HO-1 的蛋白与 mRNA 表达水平下降($P<0.05$)。与模型组比较, 各给药组小鼠 RGCs 数量、Nrf2 及 HO-1 mRNA 表达水平升高($P<0.05$); 青光安 II 号方中、高剂量组 Keap1 蛋白表达水平、ROS 平均荧光强度、MDA 及 Fe^{2+} 含量下降($P<0.05$), SOD 含量、Nrf2 蛋白表达水平升高($P<0.05$); 青光安 II 号方高剂量组 HO-1 蛋白表达水平升高($P<0.05$); 阳性药组 Keap1 蛋白表达水平、ROS 平均荧光强度、MDA 及 Fe^{2+} 含量下降($P<0.05$), HO-1、Nrf2 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与青光安 II 号方低剂量组比较, 青光安 II 号方中剂量组 RGCs 数量及 Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平升高($P<0.05$); 青光安 II 号方高剂量组、阳性药组 Keap1 蛋白表达水平、ROS 平均荧光强度、 Fe^{2+} 含量下降($P<0.05$), RGCs 数量、Nrf2 蛋白与 mRNA 表达水平、HO-1 mRNA 表达水平升高($P<0.05$); 阳性药组 MDA 含量下降($P<0.05$)。与青光安 II 号方中剂量组比较, 青光安 II 号方高剂量组 ROS 平均荧光强度、 Fe^{2+} 含量下降($P<0.05$), Nrf2 mRNA 表达水平升高($P<0.05$); 阳性药组 ROS 平均荧光强度下降($P<0.05$), Nrf2 及 HO-1 mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。与青光安 II 号方高剂量组比较, 阳性药组 ROS 平均荧光强度上升($P<0.05$), Nrf2 及 HO-1 mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。结论 青光安 II 号方可能通过抑制 Keap1、激活 Nrf2/HO-1 通路, 减轻小鼠视网膜组织氧化应激、抑制铁死亡, 保护视神经, 且呈一定的剂量依赖性, 以青光安 II 号方高剂量组效果最优。

〔关键词〕 青光眼; 青光安 II 号方; Kelch 样 ECH 关联蛋白 1; 核因子 E2 相关因子 2; 血红素氧合酶-1; 铁死亡

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.07.001

Effects of Qingguang'an II Formula on ferroptosis in glaucoma mice based on the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway

PENG Jun^{1,2}, PENG Qinghua^{1,2}, LYU Yi^{1,2}, XIONG Chen¹, CHEN Xiangdong^{2*}, LUO Qi^{1*}

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

〔收稿日期〕 2026-06-03

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(82274588, 82575150); 湖南省自然科学基金高校联合基金重点项目(2025JJ90004); 2025 年湖南省医学学科 B 类建设项目(湘卫医发[2025]7 号); 湖南中医药大学科研基金“揭榜挂帅”项目(2022XJJB003); 湖南中医药大学研究生科研创新项目(2025CX050)。

〔通信作者〕 * 罗琪, 女, 硕士研究生, E-mail: 2487309713@qq.com; 陈向东, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 564259166@qq.com。

[Abstract] Objective To explore the effects and mechanism of action of Qingguang'an II Formula on ferroptosis in glaucoma mice through the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) pathway. **Methods** Eight C57BL/6J mice were selected as the blank group, and 40 spontaneous chronic ocular hypertensive DBA/2J glaucoma mice were randomly divided into model group, the Qingguang'an II Formula low-, medium-, and high-dose groups, and positive drug group, with 8 mice in each group. The blank and model groups received equal volumes of distilled water by gavage; the Qingguang'an II Formula low- (9.75 g/kg), medium- (19.5 g/kg), and high-dose (39 g/kg) groups received Qingguang'an II Formula decoction by gavage; the positive drug group received mouse nerve growth factor for injection intramuscularly at 30 μ g/kg. All interventions lasted for 28 consecutive days. Intraocular pressure of mice was monitored; retinal histomorphology and retinal ganglion cell (RGC) counts were observed by HE staining; Keap1, Nrf2, and HO-1 protein expression levels were determined by Western blot; reactive oxygen species (ROS) content was measured by DHE staining; malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) levels were measured by ELISA; ferrous ion (Fe^{2+}) content was determined using Fe^{2+} assay kit. **Results** Compared with the blank group, the model group showed increased Keap1 protein expression, mean ROS fluorescence intensity, MDA and Fe^{2+} levels ($P<0.05$), and decreased RGC counts, SOD levels, as well as Nrf2 and HO-1 protein and mRNA expression levels ($P<0.05$). Compared with the model group, all treatment groups showed increased RGC counts, Nrf2, and HO-1 mRNA expression levels ($P<0.05$); the Qingguang'an II Formula medium- and high-dose groups showed decreased Keap1 protein expression levels, mean ROS fluorescence intensity, MDA and Fe^{2+} levels ($P<0.05$), and increased SOD levels and Nrf2 protein expression levels ($P<0.05$); the Qingguang'an II Formula high-dose group showed increased HO-1 protein expression levels ($P<0.05$); the positive drug group showed decreased Keap1 protein expression levels, mean ROS fluorescence intensity, MDA and Fe^{2+} levels ($P<0.05$), and increased HO-1 and Nrf2 protein expression levels ($P<0.05$). Compared with the Qingguang'an II Formula low-dose group, the medium-dose group showed increased RGC counts, Nrf2 and HO-1 mRNA expression levels ($P<0.05$); the high-dose group and positive drug group showed decreased Keap1 protein expression levels, mean ROS fluorescence intensity, and Fe^{2+} levels ($P<0.05$), and increased RGC counts, Nrf2 protein and mRNA expression levels, and HO-1 mRNA expression levels ($P<0.05$); the positive drug group showed decreased MDA levels ($P<0.05$). Compared with the Qingguang'an II Formula medium-dose group, the high-dose group showed decreased mean ROS fluorescence intensity and Fe^{2+} levels ($P<0.05$) and increased Nrf2 mRNA expression levels ($P<0.05$); the positive drug group showed decreased mean ROS fluorescence intensity ($P<0.05$) and increased Nrf2 and HO-1 mRNA expression levels ($P<0.05$). Compared with the Qingguang'an II Formula high-dose group, the positive drug group showed increased mean ROS fluorescence intensity ($P<0.05$) and increased Nrf2 and HO-1 mRNA expression levels ($P<0.05$). **Conclusion** Qingguang'an II Formula may attenuate oxidative stress, inhibit ferroptosis, and protect the optic nerve in mouse retinal tissues by suppressing Keap1 and activating the Nrf2/HO-1 pathway. These effects show a certain dose-dependency, with the high-dose Qingguang'an II group demonstrating the optimal efficacy.

[Keywords] glaucoma; Qingguang'an II Formula; Kelch-like ECH-associated protein 1; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase-1; ferroptosis

青光眼是一种以视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 死亡、进行性视神经退变为核心病理特征的不可逆性致盲眼病^[1]。目前, 青光眼的研究重点围绕 RGCs 死亡的分子机制展开, 包括 RGCs 程序性死亡、氧化应激损伤等^[2], 以探索修复 RGCs、保护视神经的治疗靶点。铁死亡是一种新型程序性细胞死亡形式, 以铁依赖、毒性脂质过氧化物累积及氧化应激损伤为主要特征^[3], 已被多项研究证实与青光眼 RGCs 损伤密切相关^[4-5]。阐明 RGCs 铁死亡的分子机制, 有望为视神经保护治疗提供新靶点。

青光安 II 号方具有滋补肝肾、益气活血的功效, 旨在治疗青光眼中晚期的视神经损伤^[6]。本课题组前期大量研究表明, 青光安 II 号方通过沉默信息调节因子 1/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α /B 淋巴细胞瘤-2/B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白/胱天蛋白酶-3 等多种途径提升 RGCs 的抗氧化应激及抗损伤能力, 提高其存活率^[7-8]。但青光安 II 号方是否能影响 RGCs 铁死亡尚未明确。Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor ery-

throid 2-related factor 2, Nrf2)/血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)通路是调控机体抗氧化应激和铁代谢的关键信号通路^[9],能通过多种途径抑制铁死亡,也可在特定条件下促进铁死亡进程^[10]。本研究以自发性高血压 DBA/2J 青光眼小鼠模型为研究对象,探究青光安Ⅱ号方是否可通过 Keap1/Nrf2/HO-1 通路抑制青光眼小鼠铁死亡,阐释青光安Ⅱ号方通过抗氧化应激、抑制铁死亡发挥视神经保护作用的分子机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

40只10周龄健康 SPF 级雌性 DBA/2J 小鼠,体质量 18~22 g,由上海斯莱克实验动物技术有限公司提供,质量合格证编号:ZS-202412120004。8只周龄、体质量相同的健康 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠,由湖南中医药大学实验动物中心代购,质量合格证编号:ZS-202505270026。动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室,饲养环境条件为温度(22±2)℃、湿度 40%±20%,12 h 昼夜交替灯光使动物有正常昼夜节律。小鼠饲养在独立通风笼具内,每笼饲养 3~5 只(依据小鼠周龄调整密度)。灭菌玉米芯垫料每周更换 1 次,小鼠饲喂标准化颗粒饲料,自由进食、饮水。实验经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准(编号:HNUCM21-2412-24)。

1.2 药品及主要试剂

青光安Ⅱ号方组成:枸杞子 15 g(宁夏中卫,批号:GD25041001),女贞子 15 g(江苏南京,批号:2411273),黄芪 15 g(甘肃陇西,批号:QC25042501),灯盏细辛 10 g(云南,批号:2407027),川芎 10 g(四川彭州,批号:XH25040105),怀牛膝 10 g(河南焦作,批号:QC25040202),饮片均购于湖南中医药大学第一附属医院;注射用鼠神经生长因子[舒泰神(北京)生物制药股份有限公司,国药准字 S20060023,规格:30 μg/瓶]。丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒、亚铁离子(Fe²⁺)测定试剂盒(比色法)、DHE 超氧化物阴离子荧光探针、HE 染液试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:MPC2601075、MPC2601082、MPC2601008、MPC2604045、2509E-045);Keap1 抗体、Nrf2 抗体、HO-1 抗体、兔来源 GAPDH 抗体(武汉

赛维尔生物科技有限公司,批号:AC250321041、AC250601024、AC250624003、AC251026015)。

1.3 主要仪器

回弹式眼压计(芬兰 Icare Finland Oy 公司,型号:Tonolab);荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司,型号:CFX Connect);台式高速冷冻型微量离心机、PCR 仪、抗体孵育盒、化学发光仪、垂直电泳仪、转印电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:SLX-1024F、ST-9600、G9055-4、SCG-W3000、SVE-2、SVT-2);超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司,型号:JY92-11N);-80℃冰箱(长虹美菱股份有限公司,型号:DW-HL530)。

2 方法

2.1 青光眼小鼠模型建立及分组

选用 DBA/2J 小鼠制备青光眼小鼠模型,DBA/2J 小鼠是自发性慢性高眼压动物,将其喂养至 38 周龄可以自动成模^[11]。监测小鼠眼压,同时观察小鼠视网膜形态结构,若小鼠眼压升高、RGCs 大量丢失,提示模型构建成功^[12]。将 8 只 C57BL/6J 小鼠设为空白组;待青光眼小鼠模型构建成功后,将 40 只 DBA/2J 小鼠随机分为模型组、青光安Ⅱ号方低剂量组、青光安Ⅱ号方中剂量组、青光安Ⅱ号方高剂量组、阳性药组,每组 8 只。

2.2 药物制备及给药

2.2.1 青光安Ⅱ号方中药液 各中药饮片按配伍比例称取;给药剂量取成人临床标准日剂量,低、中、高剂量分别为成人标准剂量的 1 倍、2 倍、4 倍^[13]。青光安Ⅱ号方低、中、高剂量的中药饮片分别加入蒸馏水 1 000 mL 浸泡 30 min,浸泡后煎煮 2 次,每次 60 min,滤药渣取药液,混匀 2 次药液获得青光安Ⅱ号方药液。使用旋转蒸发仪将水煎液浓缩,-20℃冰箱冷冻保存备用。按小鼠给药剂量和给药体积进行配制,水浴加热后使用。小鼠给药剂量按人与小鼠体表面积折算出等效剂量,小鼠取平均体质量(约 20 g),折算系数 $W=0.002\ 6$,折算公式:动物剂量(g/kg)= $W\times$ 成人用量(g)/动物体质量(kg)^[13]。计算得青光安Ⅱ号方低、中、高剂量组给药剂量分别为 9.75、19.5、39 g/kg,每日灌胃 1 次,给药 28 d。

2.2.2 鼠神经生长因子注射液 临用前加入灭菌注射用水配制成浓度为 3 μg/mL 的药液,密封后 4℃

避光保存。阳性药组小鼠取平均体质量(约 20 g), 给药剂量 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 单次给药量 0.6 μg , 单次给药容积 0.2 mL。于小鼠后肢大腿外侧股四头肌肌内注射, 每日 1 次, 给药 28 d。

2.3 取材方法

连续给药 28 d 后, 对各组小鼠实施颈椎脱臼处死, 快速摘取双侧眼球, 保留约 1 mm 的视神经。每组随机选取 3 只小鼠的左侧眼球, 经无菌 PBS 漂洗去除表面血污后, 放入 4% 多聚甲醛溶液中固定, 用于 HE 染色组织病理学检测。剩余眼球置于冰上体视显微镜下, 沿角膜缘环形剪开眼球壁, 剔除眼内容物, 完整剥离视网膜。样本按检测目的进行分类处理: 每组另取 3 份视网膜制备冰冻切片, 进行 DHE 荧光染色检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量; 其余视网膜分装于无菌冻存管并编号, 液氮速冻后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱长期保存, 用于 Western blot、qPCR 及 ELISA 检测。为避免样本偏倚, 检测采用随机数字表法分配标本, 同一只小鼠左右眼视网膜不用于同一项检测。

2.4 指标检测

2.4.1 监测小鼠眼压 使用回弹式眼压计测量各组小鼠造模前(34 周龄)、造模 2 周(36 周龄)及造模 4 周(38 周龄)的眼压; 小鼠清醒状态下, 于固定时间段测量右眼眼压, 连续测量 3 次后取平均值作为该眼的眼压值。

2.4.2 HE 染色观察小鼠视网膜组织形态 将固定后的眼球组织经常规脱水、石蜡包埋处理后, 制作连续视网膜切片。切片依次经二甲苯、梯度乙醇脱蜡, 最后经自来水冲洗完成脱蜡。随后将切片放入苏木素染液中染色 5 min, 水洗返蓝, 置于伊红染液中染色 5 min, 无水乙醇、二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下采集图像, 观察视网膜组织病理改变、RGCs 数量。

2.4.3 Western blot 检测小鼠视网膜组织 Keap1、Nrf2、HO-1 的蛋白表达水平 取小鼠视网膜组织, 用 RIPA 裂解液冰上匀浆、裂解, 离心取上清液, BCA 定量。蛋白变性后经电泳、转膜、封闭, 一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜(Keap1、Nrf2、HO-1 抗体稀释浓度均为 1:1 000)。TBST 洗涤后二抗室温孵育 30 min, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。ECL 试剂 A 液和 B 液按照 1:1 比例混合发光显影, 曝光完成后保存原始图像。使用 ImageJ 软件进行目标蛋白及内参蛋白的灰度值分析, 用 Excel 软件进行归一化处理。

2.4.4 qPCR 检测小鼠视网膜组织 Keap1、Nrf2、HO-1 的 mRNA 表达水平 取各组小鼠视网膜组织, 用 RNA 提取液研磨、离心、氯仿替代物抽提、异丙醇沉淀、75%乙醇洗涤, 溶解后测定 RNA 浓度并稀释至 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。按试剂盒说明书反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增。扩增条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s 预变性; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 s 变性, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s 退火/延伸, 40 个循环。60~ $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 熔解曲线, 每 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 采集 1 次荧光。以 GAPDH 为内参基因, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 相对表达量。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成。详见表 1。

2.4.5 DHE 染色检测小鼠视网膜组织 ROS 含量 对视网膜冰冻切片进行通透、封闭处理后滴加 DHE 溶液避光孵育, PBS 漂洗并封片, 利用荧光显微镜采集图像, 再通过 ImageJ 软件框选目标区域检测平均荧光强度, 评估各组视网膜组织内 ROS 含量。

2.4.6 ELISA 检测 MDA、SOD 含量 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 采用酶标仪测 OD 值, 计算视网膜组织中 MDA、SOD 含量。

2.4.7 Fe^{2+} 测定试剂盒检测小鼠视网膜组织中的 Fe^{2+} 含量 取视网膜组织制备匀浆, 3 500 r/min 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 15 min(离心半径 10 cm), 采集上清液, 采用比色法对视网膜组织中的 Fe^{2+} 含量进行检测。

表 1 基因引物序列

Table 1 Gene primer sequences

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	长度/bp
Keap1	TGAACGAGCTTCGCCTGAG	CGTGTAGGCGAACTCAATAAGC	227
Nrf2	TGTCTTAATACCGAAAACAAGCAGC	GACCACAGTTGCCCACTTCTTTT	139
HO-1	AGCTGCTGATGGCTTCCTTGATC	CTCCTCAGGGAAGTAGAGTGCG	104
GAPDH	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	TGAGTCAATGAAGGGGTCT	133

2.5 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件进行统计学分析,数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。进行正态性和方差齐性检验,若数据呈正态分布,且方差齐,则进行单因素方差分析;若分析结果显示各组间存在差异,则采用 *Tukey* 法进行多组比较。若数据呈正态分布但方差不齐,采用校正单因素方差分析;若分析结果显示各组间存在差异,则采用 *Games-Howell* 检验进行多组比较。若不满足正态性要求,则采用非参数检验。

3 结果

3.1 各组小鼠造模前后眼压变化

空白组小鼠 34、36、38 周龄时的眼压波动差异无统计学意义($P>0.05$)。34、36、38 周龄时,与空白组比较,其余各组小鼠眼压均升高($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 各组小鼠眼压比较($\bar{x}\pm s, n=8, \text{mmHg}$)
Table 2 Comparison of intraocular pressure among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=8, \text{mmHg}$)

组别	34 周龄	36 周龄	38 周龄
空白组	14.13±2.59	15.75±4.46	15.63±5.66
模型组	21.88±1.81*	24.75±1.39*	28.50±1.77*
青光安Ⅱ号方低剂量组	21.75±2.82*	25.38±1.69*	26.75±1.49*
青光安Ⅱ号方中剂量组	21.63±2.61*	25.25±2.32*	27.25±1.91*
青光安Ⅱ号方高剂量组	23.38±1.77*	26.50±1.69*	29.63±2.83*
阳性药组	22.38±2.70*	25.50±2.07*	29.25±2.55*

注:与空白组比较,* $P<0.05$ 。

3.2 青光安Ⅱ号方对小鼠视网膜形态结构的影响

空白组小鼠视网膜各层组织结构完整、边界清晰,RGCs 数量充足,排列紧密有序,形态规整。模型组小鼠视网膜各层结构排列紊乱、疏松,边界不清,可见大量细胞空泡变性、核固缩,RGCs 数量大幅减少,视网膜各层厚度变薄。与模型组比较,各给药组小鼠视网膜有不同程度的改善,表现为 RGCs 数量增多、细胞空泡减少、视网膜各层厚度增加;其中,青光安Ⅱ号方中、高剂量组与阳性药组较青光安Ⅱ号方低剂量组改善更为明显,视网膜各层厚度增加、结构完整,RGCs 数量明显增多,且形态饱满、排列规整。详见图 1。

3.3 青光安Ⅱ号方对小鼠视网膜 RGCs 数量的影响

与空白组比较,模型组小鼠视网膜 RGCs 数量减少($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组 RGCs 数量增多($P<0.05$)。与青光安Ⅱ号方低剂量组比较,青光安Ⅱ号方中、高剂量组及阳性药组 RGCs 数量增多($P<0.05$)。详见表 3。

3.4 青光安Ⅱ号方对小鼠视网膜组织 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平的影响

与空白组比较,模型组小鼠 Keap1 蛋白表达水平升高($P<0.05$),Nrf2 及 HO-1 蛋白表达水平下降($P<0.05$)。与模型组比较,青光安Ⅱ号方中剂量组 Keap1 蛋白表达水平下降、Nrf2 蛋白表达水平升高

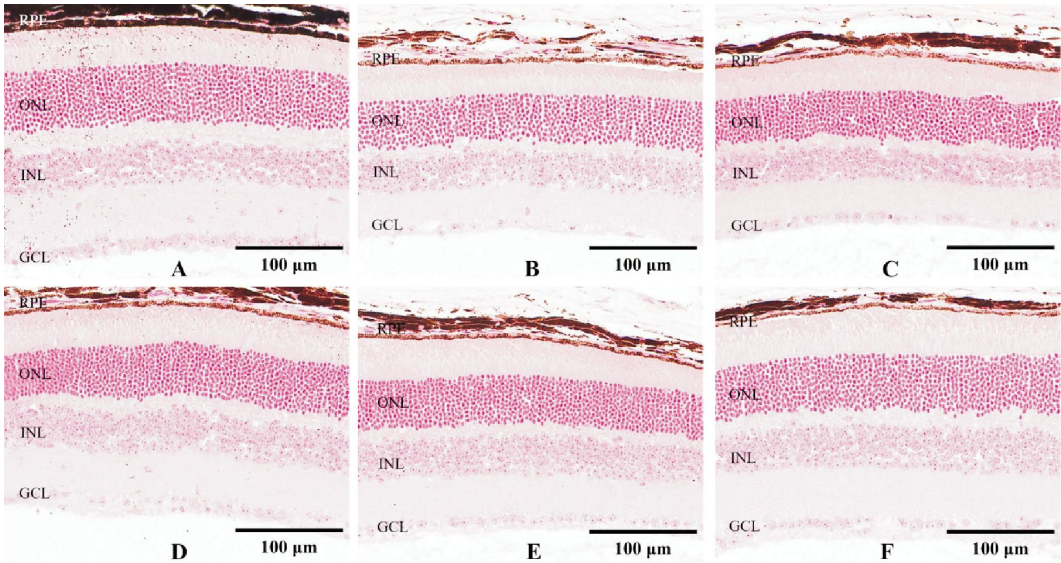


图 1 各组小鼠视网膜形态结构比较(HE,×80,n=3)

Fig.1 Comparison of retinal morphology and structure among different groups of mice (HE, ×80, n=3)
注:A.空白组;B.模型组;C.青光安Ⅱ号方低剂量组;D.青光安Ⅱ号方中剂量组;E.青光安Ⅱ号方高剂量组;F.阳性药组。RPE.视网膜色素上皮层;ONL.外核层;INL.内核层;GCL.神经节细胞层。

表 3 各组小鼠视网膜 RGCs 数量比较($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Comparison of retinal RGC counts among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	RGCs 数量/个
空白组	35.89±3.56
模型组	9.78±1.01*
青光安Ⅱ号方低剂量组	19.33±0.33*#
青光安Ⅱ号方中剂量组	29.11±4.03*#△
青光安Ⅱ号方高剂量组	27.67±3.06*#△
阳性药组	28.11±3.42*#△

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与青光安Ⅱ号方低剂量组比较,△ $P<0.05$ 。

($P<0.05$);青光安Ⅱ号方高剂量组和阳性药组Keap1蛋白表达水平下降($P<0.05$),Nrf2及HO-1蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与青光安Ⅱ号方低剂量组比较,青光安Ⅱ号方高剂量组和阳性药组Keap1蛋白表达水平下降($P<0.05$),Nrf2蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见图2。

3.5 青光安Ⅱ号方对小鼠视网膜组织 Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平的影响

与空白组比较,模型组Nrf2、HO-1 mRNA表达水平下降($P<0.05$);Keap1 mRNA表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,各给药组Nrf2、HO-1 mRNA表达水平升高($P<0.05$)。与青光安Ⅱ号方低剂量组比较,青光安Ⅱ号方中、高剂量组及阳性药组Nrf2、HO-1 mRNA表达水平升高($P<0.05$)。与青光安Ⅱ号方中剂量组比较,青光安Ⅱ号方高剂量组Nrf2 mRNA表达水平升高($P<0.05$);阳性药组Nrf2、HO-1 mRNA表达水平升高($P<0.05$)。与青光安Ⅱ号方高剂量组比较,阳性药组Nrf2、HO-1 mRNA表达水平升高($P<0.05$)。详见表4。

3.6 青光安Ⅱ号方对小鼠视网膜组织 ROS 平均荧光强度及 MDA、SOD 含量的影响

与空白组比较,模型组小鼠ROS平均荧光强

表 4 各组小鼠视网膜组织 Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Comparison of Nrf2 and HO-1 mRNA expression levels in retinal tissues among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Keap1	Nrf2	HO-1
空白组	1.01±0.18	1.00±0.10	1.00±0.07
模型组	0.14±0.01	0.11±0.02*	0.13±0.01*
青光安Ⅱ号方低剂量组	0.24±0.15	0.23±0.08*#	0.25±0.0*#
青光安Ⅱ号方中剂量组	0.49±0.27	0.36±0.08*#△	0.50±0.05*#△
青光安Ⅱ号方高剂量组	0.58±0.01	0.53±0.22*#△▲	0.57±0.03*#△
阳性药组	0.74±0.12	0.86±0.52*#△□	0.77±0.07*#△▲□

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与青光安Ⅱ号方低剂量组比较,△ $P<0.05$;与青光安Ⅱ号方中剂量组比较,▲ $P<0.05$;与青光安Ⅱ号方高剂量组比较,□ $P<0.05$ 。

度、MDA含量升高($P<0.05$),SOD含量下降($P<0.05$)。与模型组比较,青光安Ⅱ号方中、高剂量组ROS平均荧光强度、MDA含量下降($P<0.05$),SOD含量升高($P<0.05$);阳性药组ROS平均荧光强度、MDA含量下降($P<0.05$)。与青光安Ⅱ号方低剂量组比较,青光安Ⅱ号方高剂量组ROS平均荧光强度下降($P<0.05$);阳性药组ROS平均荧光强度、MDA含量下降($P<0.05$)。与青光安Ⅱ号方中剂量组比较,青光安Ⅱ号方高剂量组、阳性药组ROS平均荧光强度下降($P<0.05$)。与青光安Ⅱ号方高剂量组相比,阳性药组ROS平均荧光强度上升($P<0.05$)。详见图3—4。

3.7 青光安Ⅱ号方对小鼠视网膜组织 Fe²⁺含量的影响

与空白组比较,模型组Fe²⁺含量升高($P<0.05$)。与模型组比较,青光安Ⅱ号方中、高剂量组及阳性药组Fe²⁺含量降低($P<0.05$)。与青光安Ⅱ号方低剂量组比较,青光安Ⅱ号方高剂量组、阳性药组Fe²⁺含量降低($P<0.05$)。与青光安Ⅱ号方中剂量组比较,青光安Ⅱ号方高剂量组Fe²⁺含量降低($P<0.05$)。详见图4。

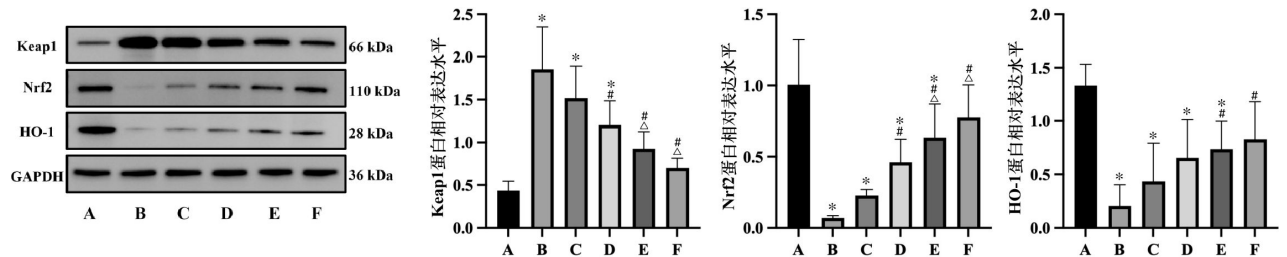


图 2 各组小鼠视网膜组织 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 2 Comparison of Keap1, Nrf2, and HO-1 protein expression in retinal tissues among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)
注:A.空白组;B.模型组;C.青光安Ⅱ号方低剂量组;D.青光安Ⅱ号方中剂量组;E.青光安Ⅱ号方高剂量组;F.阳性药组。与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与青光安Ⅱ号方低剂量组比较,△ $P<0.05$ 。

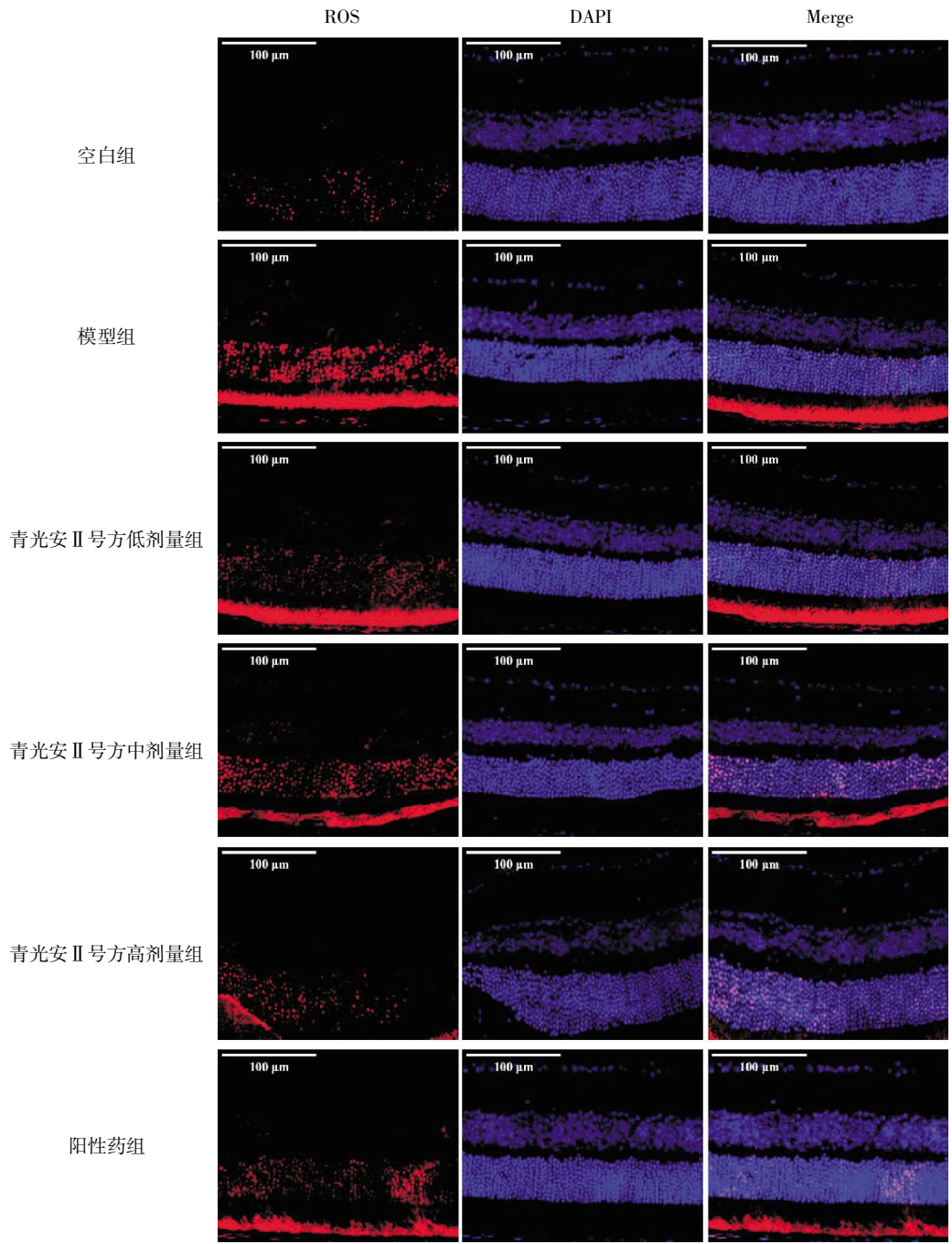


图3 各组小鼠视网膜组织 ROS 荧光强度比较(DHE, $\times 100$, $n=3$)

Fig.3 Comparison of ROS fluorescence intensity in retinal tissues among different groups of mice (DHE, $\times 100$, $n=3$)

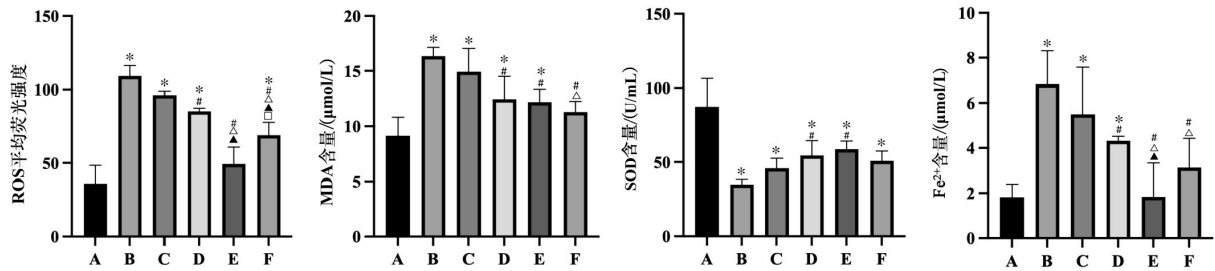


图4 各组小鼠视网膜组织 ROS、MDA、SOD、 Fe^{2+} 含量比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.4 Comparison of ROS, MDA, SOD, and Fe^{2+} levels in retinal tissues among different groups of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

注:A.空白组;B.模型组;C.青光安II号方低剂量组;D.青光安II号方中剂量组;E.青光安II号方高剂量组;F.阳性药组。与空白组比较, $*P<0.05$;与模型组比较, $\#P<0.05$;与青光安II号方低剂量组比较, $\Delta P<0.05$;与青光安II号方中剂量组比较, $\triangle P<0.05$;与青光安II号方高剂量组比较, $\square P<0.05$ 。

4 讨论

青光眼属中医学“五风内障”范畴,其发病与肝、脾、肾等脏腑气血功能失调密切相关,本病发展至中晚期多表现为肝肾阴虚、气虚血瘀之证,由此彭清华教授创制了具有滋补肝肾、益气活血之功的青光安Ⅱ号方^[14]。青光安Ⅱ号方由枸杞子、女贞子、灯盏细辛、川芎、黄芪、怀牛膝组成。方中枸杞子、女贞子味甘,归肝、肾经,合用以滋补肝肾、益精明目,其抗氧化成分能清除 ROS、MDA,减轻氧化应激损伤^[15-16];川芎辛散温通,有“血中气药”之称,灯盏细辛有活血通络之效,其中川芎嗪、灯盏花乙素等活性成分有改善微循环、保护 RGCs 的作用^[17-18];黄芪补气生津养血,可抗氧化应激、抑制细胞程序性死亡^[19];怀牛膝补益肝肾且引导诸药直达眼部病所。鼠神经生长因子有修复神经细胞的作用,是临床上治疗青光眼视神经损伤的主要药物之一,其疗程长、价格高,会加重患者的经济负担^[20]。与鼠神经生长因子相比,中药具有简便廉验的优势。因此,本研究将鼠神经生长因子设为阳性对照药,将其与青光安Ⅱ号方低、中、高剂量进行对比观察,明确两药在青光眼小鼠视神经保护作用上的差异,为中药替代昂贵药物、在临床更广泛地推广应用提供实验依据。

DBA/2J 小鼠是目前国际公认、广泛使用的自发性慢性青光眼模型;该模型 9 月龄时出现 RGCs 凋亡、视神经退变,且眼压达峰值,形成稳定的青光眼模型,这与青光眼发病的年龄相关性类似^[21-22]。因此,本研究选用 DBA/2J 小鼠作为青光眼动物模型,用于探讨青光安Ⅱ号方的视神经保护作用及分子机制。

在生理状态下,Keap1 与 Nrf2 结合并抑制其活性^[23];在青光眼模型中,视神经细胞微环境紊乱,Keap1-Nrf2 构象改变,Nrf2 释放入核,激活下游 HO-1 等抗氧化因子表达^[24]。HO-1 具有双向调节作用:适度表达时,可诱导合成胆红素等抗氧化应激分子,通过抗氧化应激、抑制炎症反应,调控细胞代谢、减轻细胞损伤;过度表达时,可导致脂质过氧化产物累积、Fe²⁺代谢紊乱,诱导 RGCs 铁死亡^[25-26]。本研究发现,与模型组比较,各给药组小鼠 RGCs 数量、Nrf2 及 HO-1 mRNA 表达水平升高;青光安Ⅱ号方中、高剂量及阳性药组 Keap1 蛋白表达水平、ROS 平均荧光强度、MDA 及 Fe²⁺含量下降,Nrf2 蛋白表达水平升高;青

光安Ⅱ号方高剂量组 SOD 含量、HO-1 蛋白表达水平升高。与青光安Ⅱ号方低剂量组相比,青光安Ⅱ号方高剂量组 Keap1 蛋白水平表达、ROS 平均荧光强度、Fe²⁺含量下降,RGCs 数量、Nrf2 蛋白表达水平、Nrf2 及 HO-1 mRNA 表达水平升高;与青光安Ⅱ号方中剂量组比较,青光安Ⅱ号方高剂量组 ROS 平均荧光强度、Fe²⁺含量下降,Nrf2 mRNA 表达水平升高。与青光安Ⅱ号方高剂量组比较,阳性药组 ROS 平均荧光强度上升,Nrf2 及 HO-1 mRNA 表达水平升高;青光安Ⅱ号方高剂量组与阳性药组 RGCs 数量、SOD、MDA、Fe²⁺含量及 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平比较,差异均无统计学意义。由此可知,鼠神经生长因子对小鼠视网膜组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平的调控作用优于青光安Ⅱ号方;高剂量的青光安Ⅱ号方对小鼠视网膜组织中 ROS、Fe²⁺的清除作用优于鼠神经生长因子。在青光安Ⅱ号方的干预下,Keap1 蛋白表达水平降低,Nrf2、HO-1 蛋白与 mRNA 表达水平升高,SOD 含量上升,ROS、MDA、Fe²⁺含量下降。青光安Ⅱ号方保护 RGCs 的机制可能与调控 Keap1/Nrf2/HO-1 通路有关,通过下调 Keap1 蛋白,释放 Nrf2 蛋白,促进 HO-1 抗氧化应激通路激活,清除脂质过氧化产物,改善 Fe²⁺代谢。且青光安Ⅱ号方对 Keap1/Nrf2/HO-1 通路的调控作用呈现出一定的剂量依赖性,以高剂量效果最优,与鼠神经生长因子呈现出相当的视神经保护效果。

综上所述,青光安Ⅱ号方可以保护青光眼小鼠视网膜组织的形态结构、提高 RGCs 的存活率,其可能通过抑制 Keap1,激活 Nrf2/HO-1 通路,清除 ROS、MDA 与 Fe²⁺,提高 SOD 抗氧化物质水平,减轻视网膜组织氧化应激,抑制铁死亡。

参考文献

- [1] 彭清华, 吴权龙. 青光眼的中西医诊治[M]. 北京: 化学工业出版社, 2021: 8-16, 53-60.
- [2] Firoz M, Shome N, Wong N, et al. Retinal ganglion cell degeneration in glaucoma: Systematic review[J]. Bioengineering, 2026, 13(5): 509.
- [3] 徐飞扬, 徐帆. 铁死亡在青光眼中的作用机制及研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2025, 25(10): 1592-1597.
- [4] 杨稀瑞, 王继雪, 王思琦, 等. 通窍明目汤调控 p53/SLC7A11 介导的氧化损伤及铁死亡改善青光眼 RGC 损伤的作用机制[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(22): 1717-1726.

- [5] Yao F, Peng J J, Zhang E D, et al. Pathologically high intraocular pressure disturbs normal iron homeostasis and leads to retinal ganglion cell ferroptosis in glaucoma[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2023, 30(1): 69–81.
- [6] 李银鑫, 欧晨, 周亚莎, 等. 彭清华教授采用青光安Ⅱ号方治疗青光眼中晚期视神经损害[J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(12): 113–116.
- [7] 吕怡, 蒋鹏飞, 彭俊, 等. 基于网络药理学和 SIRT1/PGC-1 α 信号通路探究青光安Ⅱ号方的视神经保护作用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(8): 1438–1447.
- [8] 李文娟, 谭涵宇, 时健, 等. 青光安Ⅱ号方通过 Bm-3b 调控 Bax/Bcl-2/Caspase-3 抑制青光眼 RGCs 凋亡的机制研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2025, 45(3): 330–336.
- [9] 梁韡斌, 张高炼, 郭建辉, 等. Keap1/Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路阻断癫痫大鼠海马神经元铁死亡机制及草果知母汤的干预效应[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022, 20(18): 3323–3329.
- [10] Nan W, Zhou W M, Zi J L, et al. Ferroptosis and bone metabolic diseases: The dual regulatory role of the Nrf2/HO-1 signaling axis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2025, 5(13): 1615197.
- [11] 时健, 彭俊, 姚小磊, 等. 青光安Ⅱ号方对 DBA/2J 小鼠视网膜中 Rho/ROCK 相关因子的影响[J]. *海南医学院学报*, 2022, 28(13): 976–981.
- [12] 杨帆, 吴玲玲, 郭秀娟, 等. 青光眼动物模型 DBA/2J 小鼠的眼部特征及组织学观察[J]. *眼科研究*, 2010, 28(2): 103–108.
- [13] 黄雨, 夏鑫, 李丹阳, 等. 青光安Ⅱ号方调节 Caspase-11/GSDMD 通路抑制慢性高血压小鼠视网膜神经节细胞焦亡[J/OL]. *中国中西医结合杂志*, 2026–04–02. <https://link.cnki.net/urlid/11.2787.r.20260401.1051.002>.
- [14] 黄雨, 李丹阳, 周亚莎, 等. 岐黄学者彭清华辨治青光眼视神经损伤的经验[J]. *湖南中医药大学学报*, 2025, 45(7): 1310–1314.
- [15] 吕振宇, 孟姣, 孙传鑫, 等. 枸杞对秀丽隐杆线虫寿命和产卵的影响及其抗氧化作用[J]. *食品科学*, 2019, 40(5): 183–188.
- [16] 杨芬, 谭一虎, 肖鸣. 女贞子提取物对帕金森病大鼠的神经炎症及 AMPK/ERK 信号通路的影响[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(3): 443–449.
- [17] 伍紫炫, 彭俊, 江冰, 等. 灯盏细辛防治青光眼的研究进展[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(9): 1708–1714.
- [18] 周剑. 中医药视神经保护研究进展[J]. *中国中医眼科杂志*, 2018, 28(6): 351–355.
- [19] 尚孟秋, 梁丽娜, 周维, 等. 黄芩甲苷治疗眼科疾病药理作用的研究进展[J]. *中国中医眼科杂志*, 2024, 34(11): 1077–1080, 1100.
- [20] 刘志敏, 彭清华, 陈向东, 等. 逍遥散加减联合注射用鼠神经生长因子治疗原发性开角型青光眼的临床观察[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(8): 1365–1370.
- [21] 熊亚妮, 孟永, 钱仪敏, 等. 青光眼动物模型与人体发病机制的相关性研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(3): 231–236.
- [22] Shan S Y, Wu J, Cao J, et al. Global incidence and risk factors for glaucoma: A systematic review and meta-analysis of prospective studies[J]. *Journal of Global Health*, 2024, 14: 04252.
- [23] Yamamoto M, Kensler T W, Motohashi H. The KEAP1–NRF2 system: A thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis[J]. *Physiological Reviews*, 2018, 98(3): 1169–1203.
- [24] 何理焯, 张海江. 鼠尾草酸调控 Keap1–Nrf2 通路对青光眼大鼠视神经损伤的影响[J]. *中国细胞生物学学报*, 2025, 47(10): 2549–2557.
- [25] 李昭伦, 孙文静, 刘晓明, 等. 茯苓酸通过 Keap1–Nrf2/HO-1 途径抑制铁死亡缓解脂多糖诱导的肺损伤[J]. *临床肺科杂志*, 2024, 29(6): 888–893, 900.
- [26] 段航, 曾凡, 王林华, 等. 桃红四物汤调控 Nrf2/Keap1/HO-1 信号通路介导的铁死亡在膝关节关节炎中的作用机制[J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(7): 10–15.

(本文编辑 周旦)