

本文引用: 杨淑然, 艾 民, 吕森森, 杨毅敬, 肖 莉, 徐 剑, 彭清华. 滋阴明目丸通过 Nrf2/HO-1/GPX4 通路抑制视网膜色素变性小鼠铁死亡的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(2): 259-267.

滋阴明目丸通过 Nrf2/HO-1/GPX4 通路抑制视网膜色素变性小鼠铁死亡的机制研究

杨淑然¹, 艾 民¹, 吕森森¹, 杨毅敬¹, 肖 莉¹, 徐 剑², 彭清华^{1,3*}

1. 湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208; 2. 同济大学附属东方医院, 上海 200120

3. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

[摘要] **目的** 探讨滋阴明目丸对小鼠视网膜色素变性(RP)的改善作用及其可能机制。**方法** 选取 12 只 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组, 48 只视网膜变性 10 型(rd10)小鼠随机分为模型组、乐町组(0.13 g/kg)、滋阴明目丸低剂量组(5.20 g/kg)、滋阴明目丸高剂量组(10.40 g/kg), 每组 12 只, 每日灌胃 1 次, 连续干预 28 d。视网膜电图观测并记录 A 波与 B 波振幅; 光学相干断层成像(OCT)观察小鼠眼底形态改变, 以及观测眼底血流分布情况并检测视网膜的厚度; HE 染色观察视网膜病理形态, 测定外核层厚度; 用 Western blot 检测小鼠视网膜组织核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素氧合酶 1(HO-1)、谷胱甘肽过氧化酶 4(GPX4)蛋白表达; ELISA 检测视网膜组织中谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和亚铁离子(Fe²⁺)的水平。**结果** 与空白对照组比较, 模型组小鼠视网膜电图的 A 波与 B 波振幅均降低($P<0.01$); 眼底血管明显变细、萎缩, 视盘苍白; 血流灌注显著减少; 视网膜厚度降低($P<0.01$); 视网膜结构模糊, 损伤明显, 外核层厚度降低($P<0.01$); 视网膜组织中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平下降($P<0.05$, $P<0.01$); 视网膜组织中 Fe²⁺、MDA 水平升高($P<0.01$), SOD、GSH 水平降低($P<0.01$)。与模型组相比, 滋阴明目丸低、高剂量组和乐町组小鼠视网膜电图的 A 波与 B 波振幅均升高($P<0.01$); 眼底血管较为清晰, 血管充盈, 眼底血流量增加; 视网膜厚度增加($P<0.01$); 视网膜形态改善较明显; 外核层厚度增加($P<0.01$); 视网膜组织中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平升高($P<0.01$); 视网膜组织中 Fe²⁺、MDA 水平降低($P<0.01$), SOD、GSH 水平升高($P<0.01$)。与滋阴明目丸低剂量组相比, 滋阴明目丸高剂量组及乐町组小鼠视网膜电图的 A 波与 B 波振幅均升高($P<0.01$); 眼底血管清晰, 血流灌注增多; 视网膜厚度增加($P<0.01$); 外核层厚度增加($P<0.01$); 滋阴明目丸高剂量组的 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平升高($P<0.01$), 乐町组的 GPX4 蛋白表达水平升高($P<0.05$); 滋阴明目丸高剂量组的 Fe²⁺、MDA 水平降低($P<0.01$), GSH 水平升高($P<0.05$), 乐町组的 Fe²⁺、MDA 水平降低($P<0.05$), GSH、SOD 水平升高($P<0.01$)。与滋阴明目丸高剂量组相比, 乐町组小鼠视网膜电图的 A 波与 B 波振幅均降低($P<0.01$); 眼底血管欠清晰, 血流灌注减少; 视网膜厚度降低($P<0.01$); 视网膜组织的 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$); 视网膜组织中 Fe²⁺、MDA 水平升高($P<0.01$), GSH、SOD 水平降低($P<0.01$)。**结论** 滋阴明目丸可能通过 Nrf2/HO-1/GPX4 途径抑制 RP 小鼠铁死亡, 改善视网膜结构和功能, 延缓 RP 的进展。

[关键词] 视网膜色素变性; 滋阴明目丸; 核因子 E2 相关因子 2; 血红素氧合酶 1; 谷胱甘肽过氧化酶 4; 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.2026.02.006

Mechanism of Ziyin Mingmu Pill in inhibiting ferroptosis in retinitis pigmentosa mice via the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway

YANG Shuran¹, AI Min¹, LYU Miaomiao¹, YANG Yijing¹, XIAO Li¹, XU Jian², PENG Qinghua^{1,3*}

1. School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The East

[收稿日期] 2025-11-06

[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; 国家自然科学基金青年科学基金项目(82405487, 82074196, 82405179, 82405490); 国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目(ZK1801YK015); 湖南省教育厅科学研究项目(23A0278)。

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

Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China; 3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] Objective To investigate the ameliorative effects of Ziyin Mingmu Pill (ZYMMP) on retinitis pigmentosa (RP) in mice and the potential mechanisms. **Methods** Twelve C57BL/6J mice were selected as the normal control group, while forty-eight retinal degeneration 10 (rd10) mice were randomly allocated into four groups (12 mice per group): the model group, the low-dose Ziyin Mingmu Pills group (5.20 g/kg), the high-dose Ziyin Mingmu Pills group (10.40 g/kg), and the Leding group (0.13 g/kg). All groups received intragastric administration once daily for 28 consecutive days. Electroretinogram (ERG) was used to observe and record the amplitudes of the A-wave and B-wave; Optical coherence tomography (OCT) was used to observe morphological changes in the mouse fundus, assess the distribution of fundus blood flow, and measure the retinal thickness; Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe retinal pathological morphology and measure the thickness of the outer nuclear layer (ONL); Western blot was used to detect the protein expression levels of Nrf2, HO-1, and GPX4 in mouse retinal tissue; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and ferrous ion (Fe^{2+}) in the retinal tissue. **Results** Compared with the blank control group, the amplitudes of both the A-wave and B-wave in the electroretinogram (ERG) were decreased in the model group ($P<0.01$); Markedly thinner and atrophic fundus vessels, a pale optic disc; Significantly decreased blood flow perfusion; A thinner average retinal thickness ($P<0.01$); Blurred retinal structure with obvious damage, a thinner ONL ($P<0.01$); Decreased protein expression levels of Nrf2, HO-1, and GPX4 in the retinal tissue ($P<0.05$, $P<0.01$), increased levels of Fe^{2+} and MDA in the retinal tissue ($P<0.01$), and decreased levels of SOD and GSH ($P<0.01$). Compared with the model group, the low-dose and high-dose Ziyin Mingmu Pills groups and the Leding group showed increased amplitudes of ERG A- and B-waves ($P<0.01$); Clearer and thicker fundus vessels, increased blood flow distribution; A increased full retinal thickness ($P<0.01$); Noticeably improved retinal morphology; A increased ONL thickness ($P<0.01$); Increased protein expression levels of Nrf2, HO-1, and GPX4 in the retinal tissue ($P<0.01$); Decreased levels of Fe^{2+} and MDA in the retinal tissue ($P<0.01$), and increased levels of SOD and GSH ($P<0.01$). Compared with the low-dose group of Ziyin Mingmu Pills, both the high-dose group of Ziyin Mingmu Pills and the Leding group showed increased amplitudes of the A-wave and B-waves in the mouse electroretinogram (ERG) ($P<0.01$); Clearer fundus vessels, increased blood flow perfusion; A increased retinal thickness ($P<0.01$); A increased ONL thickness ($P<0.01$); The high-dose Ziyin Mingmu Pills group showed increased protein expression levels of Nrf2, HO-1, and GPX4 ($P<0.01$), while the Leding group showed increased GPX4 protein expression ($P<0.05$); The high-dose Ziyin Mingmu Pills group showed decreased levels of Fe^{2+} and MDA ($P<0.01$) and increased GSH levels ($P<0.05$), the Leding group showed decreased levels of Fe^{2+} and MDA ($P<0.05$) and increased levels of GSH and SOD ($P<0.01$). Compared with the high-dose Ziyin Mingmu Pills group, the Leding group showed decreased amplitudes of ERG A- and B-waves ($P<0.01$); Less clear fundus vessels, decreased blood flow perfusion; A decreased retinal thickness ($P<0.01$); Decreased protein expression levels of Nrf2, HO-1, and GPX4 in the retinal tissue ($P<0.05$, $P<0.01$); The levels of Fe^{2+} and MDA in the retinal tissue were increased ($P<0.01$), and decreased levels of GSH and SOD ($P<0.01$). **Conclusion** Ziyin Mingmu Pills may inhibit ferroptosis and improve retinal structure and function in RP mice, potentially delaying the progression of RP, via the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway.

[Keywords] retinitis pigmentosa; Ziyin Mingmu Pill; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase 1; glutathione peroxidase 4; ferroptosis

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是以眼底视网膜色素上皮细胞和感光细胞功能障碍为特征的难治性眼病,其主要临床表现为暗处视物不清,双眼视野呈进行性缩窄,晚期呈管状视野,一旦罹患,致盲率极高。眼底异常通常包括主要位于周边或中部的骨细胞样色素沉着,视网膜血管的萎缩和视乳头的蜡样苍白^[1]。当前 RP 在全球的发病率为1/6 000

至1/3 000,国内的发病率为1/5 000至1/3 000,我国受累家庭的直系成员数量将近1 200万^[2]。RP发病机制复杂,现代医学仍缺乏有效治疗 RP 的方法。

RP 归属于中医学“高风内障”范畴,历代医家多认为本病由“肝虚血少”“肾精匮乏”“阴虚”等致病,精血不能濡养目窍,神光衰微,属于“瞳神疾患”。瞳神与肝肾密切相关,《仁斋直指方·眼目方论》亦谓:

“肝肾之气充,则精采光明,肝肾之气乏,则昏矇运眩。”彭清华教授结合临床实际指出,阴虚是本病的常见证候,以肝肾阴虚,阴虚无以济,阳气不能为用,阴亏血少,血行瘀滞,目失濡养为病^[3]。病变过程中多兼脉络瘀阻,后期常因脉道闭塞,气血失养而失明。故临证治疗 RP 多以“滋补肝肾,活血明目”为基本法则。大量临床实践证明了滋阴明目丸的确切疗效^[4-5]。滋阴明目丸是湖南中医药大学第一附属医院李传课教授从多年临床实践中总结的经验方,方中熟地黄、枸杞子为君药,有滋补肝肾、益精明目之效;黄精、山药、菟丝子、山茱萸、楮实子等为臣药,辅助君药发挥补益肝肾、明目除昏之功;丹参、三七、川芎、牛膝等为佐药,行养血活血化瘀之力;石菖蒲开窍通利目中玄府,羌活辛散宣通引药上行,共为使药。全方共奏滋补肝肾精血、活血通络之功,对 RP 患者疗效明确^[6]。

视网膜作为机体耗氧量最高的组织之一,极易受到氧化应激的影响,大量证据表明,氧化应激反应是 RP 发生的重要危险因素^[7]。在病变视网膜中,氧化应激的发生导致大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,脂质 ROS 的积累继而容易诱发铁死亡^[8]。铁死亡是以脂质过氧化和铁积累为特征的程序性细胞死亡^[9]。近年来,越来越多证据提示,铁死亡与 RP 之间密切关联^[10-11]。本团队在前期对视网膜变性 10 型(retinal degeneration 10, rd10)小鼠实验研究表明,枸杞子-丹参可通过激活 Nrf2/GPX4 信号通路降低 ROS 等的产生,抑制铁死亡,从而减轻 RP 中视网膜组织损伤^[12];枸杞子-丹参亦可通过溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)/GPX4 途径对 RP 小鼠光感受器铁死亡有抑制作用^[13]。

本研究通过观察滋阴明目丸对 RP 小鼠的疗效及对 Nrf2、HO-1 和 GPX4 表达的影响,旨在探究滋阴明目丸改善 RP 的可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

4 周龄 SPF 级 rd10 小鼠 48 只,购自美国 Jackson Laboratory 公司,合格证编号:1911A11353;4 周龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 12 只,购自湖北贝恩特生物科技有限公司,实验单位使用许可证编号:SYXK(湘)2024-0014,动物许可证号:SCXK(鄂)2021-0027,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 12 h 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,伦理批准号:HNUCM21-2507-22。

1.2 药品及主要试剂

滋阴明目丸为湖南中医药大学第一附属医院院内制剂(湘药制备字 Z202103630000,批号:20211213,规格:每瓶装 120 g),购于湖南中医药大学第一附属医院。该药为棕黄色水丸,由枸杞子、熟地黄、丹参、黄精、当归、山药、川芎、羌活、三七、牛膝、茯苓、菟丝子、石菖蒲、石决明、楮实子、牡丹皮、山茱萸组成;乐町软胶囊(国药准字:国食健字 G20041025,批号:GD00041885,规格:0.5g/粒)购于广州市范乐医药科技有限公司,0.5 g/粒;复方托吡卡胺滴眼液(国药准字 H20066782,批号:H20066782,规格 5 mL)购自津药永光制药有限公司;戊巴比妥钠(批号:2410116,购自西格玛奥德里琪公司);磷酸化蛋白酶抑制剂(批号:MB12707,购自Meilunbio);HRP 标记山羊抗兔(批号:111-035-003,购自美国 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.公司);HRP 标记山羊抗小鼠(批号 SA00001-1,购自武汉三鹰生物技术有限公司);RIPA 裂解液(批号:BF0003)、转膜缓冲液(批号:BER0001)、电泳缓冲液(批号:BER0002)、BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号:BF0026)均购自武汉博尔夫生物科技有限公司;1X PBS 缓冲液(批号:BL302A,北京兰杰柯科技有限公司);MDA 试剂盒(批号:A003-1)、SOD 试剂盒(批号:A001-3)、GSH 试剂盒(批号:A006-2)均购自南京建成生物工程研究所;亚铁离子试剂盒(批号:BC5415)、HE 染色试剂盒(批号:G1120)均购自索莱宝生物科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶试剂盒(批号:20241223)、天门冬氨酸氨基转移酶试剂盒(批号:20250214)、白蛋白试剂盒(批号:20241223)均购自雷杜生命科学股份有限公司;甲醇(批号:100141190)、中性树胶(批号:10004160)均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 主要仪器

视网膜电图仪(型号:RETI-port21 compact,德国罗兰公司);光学相干断层扫描仪(型号:20190028,视微影像科技有限公司);电子天平(型号:FA1004,上海浦春计量仪器有限公司);研磨仪(型号:KZ-II,武汉赛维尔生物科技有限公司);冷冻离心机(型号:CF1524R,美国 SCILOGEX 公司);酶标仪(型号:SPECTRA MAX190,美国 Molecular Devices 公司);

全自动生化分析仪(型号:Chemray 240,深圳雷杜生命科学股份有限公司);包埋机(型号:JB-L5,武汉俊杰电子有限公司);病理切片机(型号:RM2016,上海徠卡仪器有限公司);生物显微镜(型号:E100,日本 NIKON 公司)。

2 方法

2.1 药物制备

将滋阴明目丸置于研钵中研磨成粉,以沸水溶解,搅拌均匀,配制成浓度 0.52 g/mL(高剂量组)、0.26 g/mL(低剂量组)药液,于 4 °C 冷藏备用。乐叮软胶囊以少量市售花生油溶解,配制成 0.0065 g/mL 母液,4 °C 保存备用。

2.2 动物分组与给药

实验选用 12 只 4 周龄的 C57BL/6J 小鼠作为空白对照组,48 只 4 周龄的 rd10 小鼠随机分为模型组、乐叮(叶黄素软胶囊)组和滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组,每组 12 只,雌雄分笼饲养。小鼠适应性喂养 1 周后,开始给药。给药剂量按“人-动物体表面积等效剂量比值表”折算,折算公式:小鼠一天给药剂量=W×成人一天给药剂量(g/kg)×小鼠体质量(kg),W=9.1,其中成人一天给药剂量参照人体质量 70 kg,临床给药 20 g^[14],即滋阴明目丸低、高剂量组分别予以滋阴明目丸药液 5.20、10.40 g/kg 灌胃^[15]。阳性对照乐叮组选择乐叮软胶囊进行灌胃,成人一天给药剂量参照人体质量 70 kg,临床给药 1 g^[6],即阳性对照组用 0.13 g/kg 的乐叮软胶囊溶液灌胃。空白对照组和模型组给予等体积生理盐水灌胃。每日 1 次,连续 28 d。

2.3 视网膜电图检查视网膜功能

将待检测小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉,置于 37 °C 恒温台,复方托吡卡胺滴眼液滴眼扩瞳。地电极接于尾部,参比电极接入两耳间皮下,金属电极接于角膜中央。在自然光下,使用 ERG 分别对各组小鼠进行检查,记录 A 波与 B 波振幅。

2.4 光学相干断层成像观察小鼠眼底并检查视网膜厚度

腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉待检查小鼠,复方托吡卡胺滴眼液扩瞳,随后以 2.5%羟丙基甲基纤维素湿润小鼠角膜,运用眼前后节光学相干断层成像(optical coherence tomography, OCT)检测视网膜。将小鼠置于恒温架上,调整恒温架高度,使镜头与角膜接触,观察小鼠眼底,采集眼底照片及眼底血流图,并对小鼠视网膜进行扫描,测量视网膜厚度。

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,采用戊巴比妥钠将小鼠麻醉,使用 75%乙醇对小鼠眼睑周围消毒后摘取眼球并固定于 FAS 固定液中,将固定后的眼球置于包埋框后脱水浸蜡,包埋,石蜡切片机切片。切片脱蜡,按照 HE 染色试剂盒的说明进行染色、封片。显微镜下观察视网膜组织形态并拍照记录,再使用 ImageJ 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 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平

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 1:1 000),室温下孵育 1 h。显影后,将图像进行编号收纳存档,PhotoShop 整理调整,Alpha 软件分析目标带的光密度值。

2.7 ELISA 法检测视网膜组织中 Fe²⁺、GSH、MDA、SOD 水平

镊子夹取视网膜组织,置于 1.5 mL 的 EP 管中称量并记录其质量,随后按照视网膜组织质量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入已经预冷的 9 倍体积的生理盐水,离心,取上清液,置于-20 °C 冰箱储存。测量时,根据不同试剂盒中的说明书配比,加入相对应的标准工作液,随后将待测液与标准工作液的混合液涡旋震荡,随后加入至 96 孔板中,于酶标仪中进行测量读数。分别根据其不同的光密度值计算 Fe²⁺、GSH、MDA、SOD 的含量。

2.8 统计学分析

应用 SPSS 27.0 软件结合 Microsoft Excel、Graph-Pad Prism 9 软件进行数据处理分析。计量资料符合正态分布均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,先进行方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐则组间比较用 LSD 检验,方差不齐则采用 Games Howell 检验。以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠视网膜电图比较

与空白对照组比较,模型组、滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组和乐叮组的 A 波与 B 波振幅均降低(P<0.01);与模型组比较,滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组和乐叮组的 A

波与B波振幅均升高($P<0.01$);与滋阴明目丸低剂量组比较,滋阴明目丸高剂量组、乐叮组的A波与B波振幅均升高($P<0.01$);与滋阴明目丸高剂量组比较,乐叮组的A波与B波振幅均降低($P<0.01$)。详见图1、表1。

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

Table 1 Amplitudes of A-wave and B-wave in each group of mice ($\bar{x}\pm s, n=6, \mu V$)

组别	A波振幅	B波振幅
空白对照组	10.13±1.07	100.80±7.24
模型组	1.89±0.32**	6.15±0.41**
滋阴明目丸低剂量组	3.58±0.23** ^{##}	10.68±0.36** ^{##}
滋阴明目丸高剂量组	7.45±0.23** ^{##△△}	76.35±5.90** ^{##△△}
乐叮组	5.53±0.14** ^{##△△&&}	33.77±1.93** ^{##△△&&}

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与滋阴明目丸低剂量组比较,^{△△} $P<0.01$;与滋阴明目丸高剂量组比较,^{&&} $P<0.01$ 。

3.2 各组小鼠的眼底情况

空白对照组小鼠视盘圆润,眼底血管清晰,密度正常,无色素沉着,眼底血流量丰富;模型组小鼠视盘苍白,血管变细、萎缩、色素上皮萎缩,眼底血流量明显减少;与模型组相比,滋阴明目丸低剂量组小鼠眼底血管较为清晰,视野下血流灌注状态改善;滋阴明目丸高剂量组和乐叮组小鼠眼底血管清晰可见,血管明显充盈,无视盘苍白表现,眼底血流量明显增加。详见图2、图3。

3.3 各组小鼠视网膜厚度比较

与空白对照组比较,模型组、滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组和乐叮组的视网膜厚度均降低($P<0.01$);与模型组比较,滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组和乐叮组的视网膜厚度均升高($P<0.01$);与滋阴明目丸低剂量组比较,滋阴明目丸高剂量组、乐叮组的视网膜厚度均升高

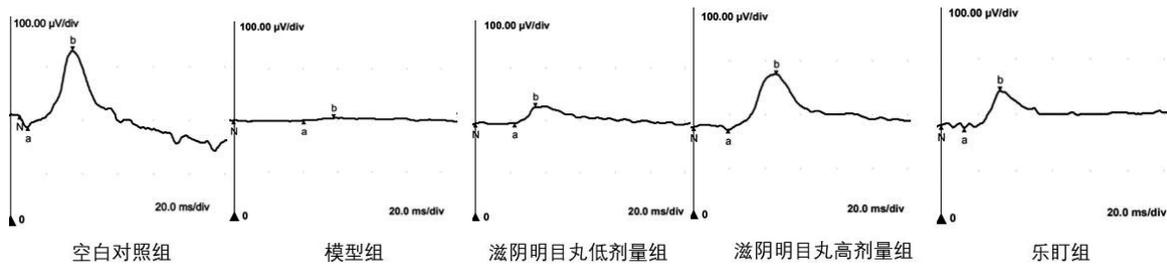


图1 各组小鼠的视网膜电图

Fig.1 Electroretinograms in each group of mice

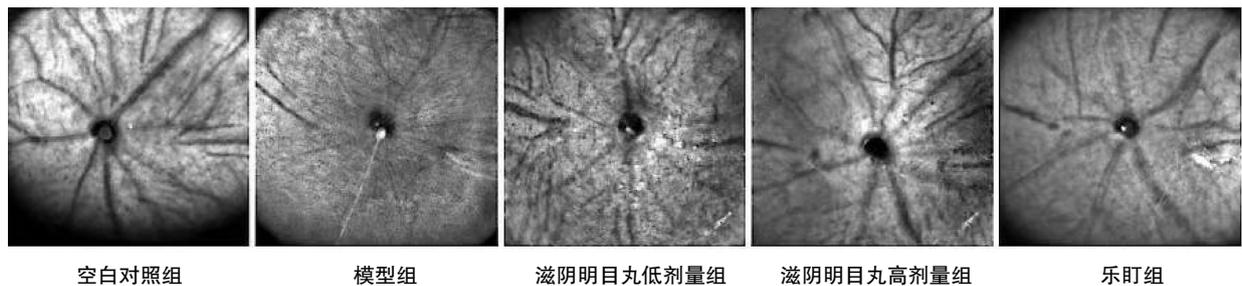


图2 各组小鼠的眼底情况

Fig.2 Fundus conditions in each group of mice

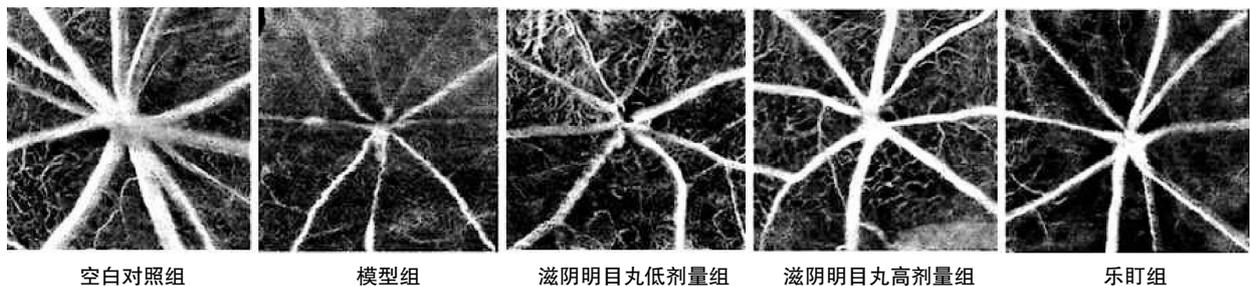


图3 各组小鼠的眼底血流图

Fig.3 Fundus blood flow map in each group of mice

($P<0.01$);与滋阴明目丸高剂量组比较,乐叮组的视网膜厚度显著降低($P<0.01$)。详见表 2。

表 2 各组小鼠的视网膜厚度比较($\bar{x}\pm s, n=6, \mu\text{m}$)

Table 2 Comparison of retinal thickness among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=6, \mu\text{m}$)

组别	视网膜厚度
空白对照组	253.50±7.26
模型组	155.00±7.16**
滋阴明目丸低剂量组	174.30±6.98** [#]
滋阴明目丸高剂量组	215.30±4.59** [#] ^{△△}
乐叮组	199.70±4.63** [#] ^{△△} ^{△△}

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与滋阴明目丸低剂量组比较,^{△△} $P<0.01$;与滋阴明目丸高剂量组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

3.4 各组小鼠视网膜组织病理及外核层厚度比较

空白对照组小鼠视网膜组织形态正常,细胞形态规则,排列紧密,分界清晰;模型组小鼠视网膜结构模糊,细胞排列紊乱,明显损伤,外核层,外丛状层厚度显著变薄甚至消失;滋阴明目丸低剂量组小鼠视网膜结构稍清晰,滋阴明目丸高剂量组及乐叮组小鼠视网膜形态明显改善,各层结构较为清晰,细胞排列相对整齐。详见图 4。

与空白对照组相比,模型组、乐叮组、滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组和乐叮组视网膜外核层厚度降低($P<0.01$);与模型组相比,滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组和乐叮组视网膜外核层厚度增加($P<0.01$);与滋阴明目丸低剂量组相比,滋阴明目丸高剂量组和乐叮组视网膜外核层厚度增加($P<0.01$)。详见表 3。

3.5 各组小鼠视网膜组织 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平比较

与空白对照组比较,模型组、滋阴明目丸低、高剂量组和乐叮组的 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组和乐叮组的 Nrf2、

表 3 各组小鼠视网膜的外核层厚度比较($\bar{x}\pm s, n=6, \mu\text{m}$)

Table 3 Outer nuclear layer thickness in each group of mice ($\bar{x}\pm s, n=6, \mu\text{m}$)

组别	外核层厚度
空白对照组	50.68±2.46
模型组	12.93±1.64**
滋阴明目丸低剂量组	27.69±1.16** [#]
滋阴明目丸高剂量组	34.65±2.39** [#] ^{△△}
乐叮组	32.31±1.16** [#] ^{△△}

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与滋阴明目丸低剂量组比较,^{△△} $P<0.01$ 。

HO-1、GPX4 蛋白表达水平均升高($P<0.01$);与滋阴明目丸低剂量组比较,滋阴明目丸高剂量组的 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平升高($P<0.01$),乐叮组的 GPX4 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与滋阴明目丸高剂量组比较,乐叮组 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平均降低($P<0.05, P<0.01$)。详见图 5、表 4。

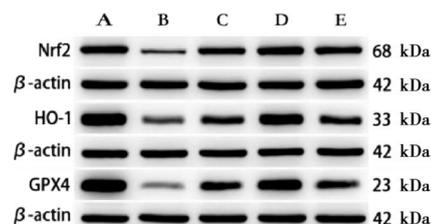


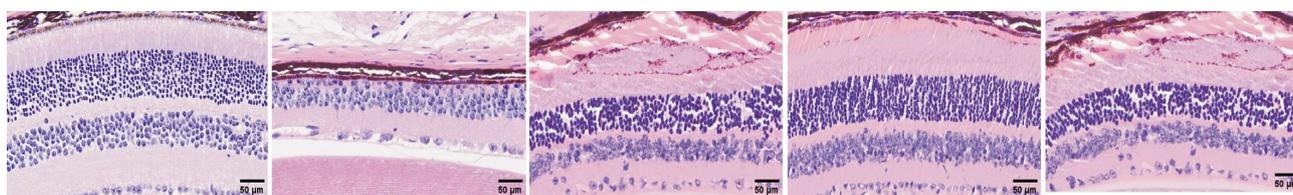
图 5 各组小鼠视网膜组织中的 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白电泳图

Fig.5 Protein electrophoresis images of Nrf2, HO-1, and GPX4 in retinal tissue of each group of mice

注:A.空白对照组;B.模型组;C.滋阴明目丸低剂量组;D.滋阴明目丸高剂量组;E.乐叮组。

3.6 各组小鼠视网膜组织中 Fe^{2+} 、GSH、MDA、SOD 水平变化

与空白对照组相比,模型组、滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组和乐叮组的 Fe^{2+} 、MDA 水平升高($P<0.01$),GSH、SOD 水平降低($P<0.01$);与模型组比较,滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组和乐叮组的 Fe^{2+} 、MDA 水平降低($P<0.01$),GSH、SOD 水平升高($P<0.01$);与滋阴明目丸



空白对照组

模型组

滋阴明目丸低剂量组

滋阴明目丸高剂量组

乐叮组

图 4 各组小鼠视网膜组织形态(HE 染色, $\times 400$)

Fig.4 Retinal tissue morphology in each group of mice (HE staining, $\times 400$)

表4 各组小鼠视网膜组织的 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Protein expression levels of Nrf2, HO-1, and GPX4 in retinal tissue of each group of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Nrf2	HO-1	GPX4
空白对照组	0.95±0.09	1.58±0.04	1.48±0.19
模型组	0.14±0.03**	0.19±0.02**	0.06±0.03**
滋阴明目丸低剂量组	0.44±0.05*** [#]	0.69±0.01*** [#]	0.54±0.07*** [#]
滋阴明目丸高剂量组	0.71±0.08*** ^{#△△}	1.36±0.10*** ^{#△△}	1.10±0.04*** ^{#△△}
乐叮组	0.51±0.06*** ^{#&}	0.81±0.10*** ^{#&}	0.68±0.04*** ^{#△&}

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

低剂量组比较,滋阴明目丸高剂量组的 Fe^{2+} 、MDA 水平降低($P<0.01$),GSH 水平升高($P<0.05$),乐叮组的 Fe^{2+} 、MDA 水平降低($P<0.05$),GSH、SOD 水平升高($P<0.01$);与滋阴明目丸高剂量组比较,乐叮组 Fe^{2+} 、MDA 水平升高($P<0.01$),GSH、SOD 水平明显降低($P<0.01$)。详见表5。

4 讨论

RP 是临床具有高度遗传性和异质性的眼底疾病,致盲率极高。本病发病机制复杂,现代医学亦缺乏确切的根治方法^[16-17],对患者视力和视野的改善有限。运用中医综合方法,可有效保护患者视力和视野,提高生活质量^[18]。RP 属于中医“高风内障”范畴,与先天禀赋密切相关,属“瞳神疾患”,瞳神与肝肾密切相关,肝血丰盈,髓海丰满,则目视精明。临证治疗 RP 多以“滋补肝肾,活血明目”为基本法则,大量实践证实了滋阴明目丸的确切疗效^[19-20]。滋阴明目丸是湖南中医药大学第一附属医院李传课教授从多年临床实践中总结的经验方,全方共奏滋补肝肾、养血通络之效,在减轻疾病症状、提高视力、改善视野方面取得了较好的疗效。枸杞子-丹参为滋阴

明目丸的核心药对之一,研究表明,RP 小鼠视网膜组织发生氧化应激,枸杞子-丹参提取物如枸杞多糖、丹参酮等,可使 Nrf2 与 Keap1 复合物解离,Nrf2 与抗氧化反应元件结合,诱导 HO-1 的表达,防止氧化应激诱发铁死亡所致的视网膜细胞损伤^[21]。在 RP 进展中,ROS 的累积会触发肿瘤蛋白 p53 的上调,p53 可抑制 SLC7A11 表达而减少胱氨酸摄取,增加组织细胞对铁沉淀的敏感性,枸杞子与丹参主要成分可协同下调 p53,上调 SLC7A11 的表达来维持 GPX4 的脂质氧化还原稳态,对 RP 小鼠光感受器铁死亡有抑制作用^[23]。

rd10 小鼠是一种常染色体隐性 RP 小鼠模型,一般在出生 4 周后视网膜开始退行性改变,到 8 周左右形成成熟的 RP 动物模型^[21],与 RP 患者的发病过程非常相似,因此,本研究采用 rd10 小鼠探究滋阴明目丸干预 RP 的效果。本研究以乐叮软胶囊作为阳性对照药,其主要成分为叶黄素、维生素 A 等。叶黄素作为视网膜中广泛存在的天然抗氧化剂,可中和自由基,猝灭过量 ROS 以及减少脂褐素沉淀,从而减少氧化应激对视网膜细胞的损伤^[22]。有研究报道,叶黄素可激活锰暴露大鼠颅脑神经的 Nrf2-HO-1 通路,减轻氧化应激,抑制大脑皮质细胞死亡^[23]。维生素 A 作为视黄醛的原料,常被作为营养补充剂以延缓 RP 进展^[24]。

铁死亡与 RP 之间密切相关^[25-26]。视网膜是人体耗氧最多、最具代谢活性的组织之一,极易受到氧化应激的影响,在病变视网膜中,氧化与抗氧化系统的不平衡导致大量 ROS 的产生,包括超氧化物、过氧化氢等,这些物质可直接损伤细胞,而脂质 ROS 的积累继而容易诱发铁死亡^[23]。RP 小鼠视网膜组织中脂质过氧化标志物 4-羟基壬烯醛的表达水平显著增加^[11],用铁螯合剂(去铁胺)处理可观察到,伴随着视网膜铁蛋白和脂质过氧化水平的降低,铁参与

表5 各组小鼠视网膜组织中 Fe^{2+} 、GSH、MDA、SOD 含量($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 5 Content of Fe^{2+} , GSH, MDA, and SOD in retinal tissue of each group of mice ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	Fe^{2+} ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)	GSH($\mu\text{mol}/\text{g prot}$)	MDA($\text{nmol}/\text{mg prot}$)	SOD(U/ mg prot)
空白对照组	0.0 031±0.0 008	18.54±0.72	1.38±0.19	10.25±0.58
模型组	0.0 287±0.0 018**	3.39±0.56**	13.53±0.83**	1.18±0.24**
滋阴明目丸低剂量组	0.0 093±0.0 010*** [#]	14.33±0.45*** [#]	6.09±0.34*** [#]	7.84±0.35*** [#]
滋阴明目丸高剂量组	0.0 051±0.0 004*** ^{#△△}	15.57±0.70*** ^{#△△}	2.55±0.26*** ^{#△△}	8.41±0.36*** [#]
乐叮组	0.0 121±0.0 010*** ^{#&△△&&}	9.33±0.75*** ^{#△△&&}	7.27±0.58*** ^{#△△&&}	5.59±0.29*** ^{#△△&&}

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

的氧化应激反应和光感受器变性也随之减轻^[27]。采用碘酸钠诱导 RPE 细胞建立的 RP 细胞模型进一步证明了 RP 与铁死亡的相关性, RPE 细胞死亡过程伴随着 Fe^{2+} 、ROS、脂质过氧化物水平的显著增加, 采用铁死亡抑制剂能抑制碘酸钠诱导的细胞死亡^[28]。以上研究均提示, 铁死亡在 RP 发病过程中发挥重要作用, 通过干预铁代谢和脂质过氧化物的产生或可成为治疗 RP 小鼠铁死亡的潜在靶点。

视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 是检测视网膜功能的常用方法, A 波振幅变化反映感光细胞层的功能改变, B 波振幅变化主要反映双极细胞对视觉脉冲的传输功能。当 A、B 波大幅降低时, 说明感光细胞和双极细胞受损严重, 视功能可能严重下降^[20]。本研究结果显示, 模型组小鼠视网膜功能降低, 表现为 A、B 波振幅均变小。予以滋阴明目丸治疗后, 病变小鼠的 A、B 波振幅均升高, 提示滋阴明目丸可提高 RP 模型小鼠的视网膜功能。小鼠眼底情况显示, 模型组小鼠视盘苍白, 血管变细、萎缩, 眼底血流量明显减少; 经滋阴明目丸治疗后, 血管萎缩情况明显改善, 眼底血流量明显增多, 提示滋阴明目丸可改善视网膜微循环障碍, 增加眼底血流供应, 为视力和视野的改善提供了保障。值得注意的是, 与乐町组小鼠眼底情况比较, 滋阴明目丸高剂量能维持正常血流灌注的血管密度更高, 说明其在改善视网膜血供方面有一定优势。OCT 可对活体内部形态进行非侵入性、无损伤检测, 获取组织内部的横断面图像^[29]。本研究使用 OCT 检测显示, 与正常对照组比较, 模型组小鼠视网膜厚度降低, 予滋阴明目丸治疗后, 病变小鼠的视网膜厚度增加; 且滋阴明目丸高剂量组小鼠视网膜厚度高于乐町组, 说明滋阴明目丸在改善视网膜结构方面更具优势。视网膜病理学检测结果显示, 模型组小鼠视网膜结构模糊, 细胞排列紊乱, 明显损伤, 外核层显著变薄; 经滋阴明目丸治疗后, 治疗组视网膜结构较模型组更清晰, 外核层厚度增加。以上结果均说明, 滋阴明目丸对维持 RP 小鼠视网膜的正常结构和功能具有重要意义。

Nrf2 通路可保护视网膜光感受器细胞免受氧化应激的影响^[30]。上调 HO-1 基因的表达对人类视网膜色素上皮细胞有保护作用^[31]。Western blot 结果提示, 滋阴明目丸能使 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白在 RP 模型的视网膜中高表达。在氧化应激条件下, Nrf2 被激活, 可促进 HO-1 的表达, HO-1 表达的上调可调节抗氧化酶 (如 SOD、GSH-Px 等)^[32]。铁死亡

过程虽受多种信号通路调节, 但绝大多数上游通路主要是通过影响 GPX4 的合成及活性, 进而影响脂质过氧化物的生成而调控铁死亡^[33]。滋阴明目丸能够增强 Nrf2 的表达, 进一步上调 HO-1 的表达, 使 GPX4 合成增多来抑制病变小鼠视网膜的铁死亡。

RP 小鼠模型中存在铁代谢功能障碍及其导致的铁过载现象^[11], 向小鼠玻璃体内注射 Fe^{2+} 不仅可诱导光感受器细胞死亡, 且可诱导其中超氧自由基的产生和脂质过氧化^[10]。SOD、GSH 是抗氧化机制的主要组成部分, 而 MDA 是机体脂质氧化的最终产物之一, 这些指标都可间接反应机体的抗氧化防御和细胞损伤程度^[22]。ELISA 结果显示, 与空白对照组相比, 模型组视网膜组织中 Fe^{2+} 、MDA 水平升高, GSH、SOD 水平降低; 滋阴明目丸给药后, 病变视网膜中的 Fe^{2+} 、MDA 水平降低, 同时 GSH、SOD 水平升高, 且在高剂量组中更为明显。这说明在病变 RP 小鼠视网膜中发生了铁死亡, 且滋阴明目丸能够增加抗氧化物质, 减轻氧化应激反应, 抑制铁死亡, 从而改善视觉功能。

综上所述, 滋阴明目丸可以保护 RP 小鼠视网膜组织的结构和功能, 维持视网膜外核层厚度, 其保护作用的发挥可能是通过激活 Nrf2/HO-1/GPX4 通路, 上调 SOD、GSH 等抗氧化物质水平, 降低 MDA 等脂质过氧化物和 Fe^{2+} 水平, 减轻氧化应激反应, 抑制铁死亡而实现的。但本研究存在局限性, 没有设立铁死亡抑制剂组, 或许不能完全排除其他损伤机制途径的干扰, 需进一步深入研究。下一步实验设计将会以此为切入点, 以期阐明滋阴明目丸干预 RP 的更深层机制。

参考文献

- [1] VERBAKEL S K, VAN HUET R, BOON C, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2018, 66: 157-186.
- [2] CHAUMET-RIFFAUD A E, CHAUMET-RIFFAUD P, CARIOU A, et al. Impact of retinitis pigmentosa on quality of life, mental health, and employment among young adults [J]. *American Journal of Ophthalmology*, 2017, 177: 169-174.
- [3] 钟 缘, 蒋鹏飞, 彭 俊, 等. 彭清华教授运用补虚活血法治疗视网膜色素变性经验[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(10): 1762-1766.
- [4] 李传课, 李 波, 彭清华, 等. 滋阴明目丸治疗肝肾阴虚视网膜色素变性老年黄斑变性的临床观察[J]. *湖南中医学院学报*, 2001, 21(3): 38-40.
- [5] 姚 震, 彭 俊, 王 英, 等. 滋阴明目丸治疗视网膜色素变性

- 临床研究[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(4): 105-107.
- [6] 曾梅艳, 熊 萌, 仇婧玥, 等. 滋阴明目丸干预视网膜色素变性小鼠效应及机制研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(7): 88-93.
- [7] LIU W Q, LIU S S, LI P, et al. Retinitis pigmentosa: Progress in molecular pathology and biotherapeutic strategies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 4883.
- [8] 田溪雯, 秦 波, 刘身文. 铁死亡在眼科疾病中的应用研究进展[J]. 眼科新进展, 2021, 41(2): 182-188.
- [9] 王巧云, 解来青. 铁死亡机制在视网膜色素上皮细胞损伤相关眼病中的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2023, 23(1): 75-78.
- [10] ROGERS B S, SYMONS R C A, KOMEIMA K, et al. Differential sensitivity of cones to iron-mediated oxidative damage[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2007, 48(1): 438.
- [11] DELEON E, LEDERMAN M, BERENSTEIN E, et al. Alteration in iron metabolism during retinal degeneration in rd10 mouse[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2009, 50(3): 1360-1365.
- [12] XIONG M, OU C, YU C, et al. Qi-Shen-Tang alleviates retinitis pigmentosa by inhibiting ferroptotic features via the NRF2/GPX4 signaling pathway[J]. *Heliyon*, 2023, 9(11): e22443.
- [13] YANG Y J, WANG Y, DENG Y, et al. Fructus Lycii and Salvia miltiorrhiza Bunge extract attenuate oxidative stress-induced photoreceptor ferroptosis in retinitis pigmentosa[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 167: 115547.
- [14] ZHOU J, PAN J, XIANG Z, et al. Data on the optimization of the formula of xiaokeyinshui extract combination treating diabetes mellitus using uniform experimental design in mice[J]. *Data in Brief*, 2020, 32: 106134.
- [15] 熊 萌, 枸杞子-丹参调控 NRF2/GPX4 信号通路抑制铁死亡治疗视网膜色素变性虚中夹瘀证的机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2025.
- [16] YANG P, MUSTAFI D, PEPPLER K L. Immunology of retinitis pigmentosa and gene therapy-associated uveitis[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2024, 14(1): a041305.
- [17] JIN B Y, LI J, YANG Q D, et al. Genetic characteristics of suspected retinitis pigmentosa in a cohort of Chinese patients[J]. *Gene*, 2023, 853: 147087.
- [18] 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, 后插 2.
- [19] 胡敏娜, 罗 萍, 颜家朝, 等. 滋阴明目丸对大鼠视网膜光损伤后细胞凋亡的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2016, 26(4): 211-214.
- [20] 艾 民, 李丹阳, 周 派, 等. 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.
- [21] BISWAS S, HASELIER C, MATARUGA A, et al. Pharmacological analysis of intrinsic neuronal oscillations in rd10 retina[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99075.
- [22] 张俊臣, 张会平, 宋志刚, 等. 叶黄素联合雷珠单抗治疗渗出性老年性黄斑变性的效果分析与机制探究[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2025, 31(7): 1267-1269.
- [23] 丁查文, 乔 红. 基于 Nrf2-HO-1 通路探讨叶黄素对锰暴露大鼠颅脑神经损伤的保护作用[J]. 职业与健康, 2025, 41(9): 1180-1186.
- [24] 武晓煜, 梁丽娜, 李 娜. 视网膜色素变性中西医治疗进展[J]. 中国中医眼科杂志, 2024, 34(9): 888-891, 900.
- [25] PENG J J, SONG W T, YAO F, et al. Involvement of regulated necrosis in blinding diseases: Focus on necroptosis and ferroptosis[J]. *Experimental Eye Research*, 2020, 191: 107922.
- [26] SCIMONE C, DONATO L, ALIBRANDI S, et al. N-retinylidene-N-retinylethanolamine adduct induces expression of chronic inflammation cytokines in retinal pigment epithelium cells[J]. *Experimental Eye Research*, 2021, 209: 108641.
- [27] OBOLENSKY A, BERENSHTEIN E, LEDERMAN M, et al. Zinc-desferrioxamine attenuates retinal degeneration in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 51(8): 1482-1491.
- [28] LIU B H, WANG W Y, SHAH A, et al. Sodium iodate induces ferroptosis in human retinal pigment epithelium ARPE-19 cells[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(3): 230.
- [29] KASHANI A H, CHEN C L, GAHM J K, et al. Optical coherence tomography angiography: A comprehensive review of current methods and clinical applications[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2017, 60: 66-100.
- [30] NAGAR S, NOVERAL S M, TRUDLER D, et al. MEF2D haploinsufficiency downregulates the NRF2 pathway and renders photoreceptors susceptible to light-induced oxidative stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(20): E4048-E4056.
- [31] HONG Y, LIANG Y P, CHEN W Q, et al. Protective effects of upregulated HO-1 gene against the apoptosis of human retinal pigment epithelial cells in vitro[J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2021, 14(5): 649-655.
- [32] LOBODA A, DAMULEWICZ M, PYZA E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [33] BERTRAND R L. Iron accumulation, glutathione depletion, and lipid peroxidation must occur simultaneously during ferroptosis and are mutually amplifying events[J]. *Medical Hypotheses*, 2017, 101: 69-74.

(本文编辑 苏 维)