

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.18.012

实验研究

基于 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路探讨通窍明目 IV 号方含药血清对 L-谷氨酸诱导 R28 细胞损伤的影响高青^{1,2}, 孙河³✉, 王丽媛³, 庞庆宝³

1. 浙江中医药大学生命科学学院, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053; 2. 黑龙江中医药大学; 3. 黑龙江中医药大学附属第一医院

[摘要] 目的 探究通窍明目 IV 号方对青光眼视神经损伤的可能保护机制。方法 将通窍明目 IV 号方拆方为疏肝方、明目方。30 只大鼠随机分为全方组、疏肝组、明目组、正常组、维生素 B₁₂ 组, 每组 6 只。全方组给予通窍明目 IV 号方 94.5 g/(kg·d) 灌胃, 疏肝组给予疏肝方 40.5 g/(kg·d) 灌胃, 明目组给予明目方 54.0 g/(kg·d) 灌胃, 正常组给予蒸馏水 18.9 ml/(kg·d) 灌胃, 维生素 B₁₂ 组给予维生素 B₁₂ 50 μ g/(kg·d) 灌胃。每日灌胃 1 次, 连续 7 天后腹主动脉采血, 分离血清。视网膜前体细胞系 R28 细胞分为空白组、模型组、正常血清组、全方血清组、疏肝血清组、明目血清组、维生素 B₁₂ 血清组, 每组 3 个复孔。除空白组外, 其余各组使用 L-谷氨酸诱导 R28 细胞损伤模型 (采用筛选出的诱导浓度和时间)。造模后空白组和模型组不予血清干预; 正常血清组去除培养基加入 10% 正常组血清; 全方血清组、疏肝血清组、明目血清组去除培养基加入 10% 相应中药组血清; 维生素 B₁₂ 血清组去除培养基加入 10% 维生素 B₁₂ 血清。各组细胞继续培养 48 h 后, 采用 CCK-8 法检测细胞活力 (包括细胞存活率、抑制率); PI/Hoechst 双染法检测细胞凋亡, 比较染色荧光强度平均值; 荧光探针法检测活性氧簇 (ROS) 含量; 免疫荧光法、Western Blot 法、qRT-PCR 法分别检测 NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3/含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶 1/白细胞介素 1 β (NLRP3/Caspase-1/IL-1 β) 信号通路相关蛋白及 mRNA 表达。结果 筛选出浓度 20 mmol/L 的 L-谷氨酸处理细胞 48 h 以诱导细胞损伤模型。与空白组比较, 模型组 R28 细胞存活率降低、细胞抑制率升高, PI/Hoechst 染色细胞荧光强度平均值升高, 细胞中 ROS 含量、NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 相关蛋白及其 mRNA 表达亦升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各药物血清干预组上述各指标均不同程度改善 ($P < 0.05$)。且全方血清组在降低抑制率、PI/Hoechst 染色荧光强度平均值、ROS 含量、NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 相关蛋白及其 mRNA 表达优于维生素 B₁₂ 血清组 ($P < 0.05$)。全方血清组、疏肝血清组 PI/Hoechst 染色荧光强度平均值低于明目血清组 ($P < 0.05$)。全方血清组 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、Caspase-1、IL-1 β mRNA 表达均低于疏肝血清组、明目血清组 ($P < 0.05$)。结论 通窍明目 IV 号方可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路, 减轻程序性细胞坏死, 从而有效缓解视网膜神经元凋亡, 达到视神经保护的作用。

[关键词] 原发性青光眼; 视神经; 通窍明目 IV 号方; 细胞凋亡; 活性氧簇; NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3; 含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶 1; 白细胞介素 1 β

原发性青光眼 (primary glaucoma, PGA) 是以视神经萎缩和视野缺损为特征的全球第二大致盲眼病, 严重影响患者工作、生活^[1]。青光眼可归属于中医学“青盲”范畴, 中医药治疗青光眼具有显著疗效^[2]。本团队根据多年临床经验认为, 过度忿

怒, 肝气上冲, 血随气逆于目, 可发为本病。前期研究发现, 肝郁气滞是 PGA 的核心病机, 90.96% 患者呈现肝经证候^[3]。通窍明目 IV 号方为本团队治疗青光眼的经验方, 临床应用 40 余年, 临床研究证实通窍明目 IV 号方可稳定 PGA 患者眼压、改善视野及视网膜神经纤维层厚度, 降低患者血清热休克蛋白 27 抗体^[4-6]。

基金项目: 国家自然科学基金 (82074497)

✉ 通讯作者: 1323177129@qq.com

现代研究^[7]显示, NOD样受体热蛋白结构域蛋白3/含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶1/白细胞介素1 β (NLRP3/Caspase-1/IL-1 β) 信号通路在青光眼的发展中起到关键作用, 由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和白细胞介素1 β 前体(pro-Caspase-1)组成的NLRP3炎性小体激活Caspase-1, 切割pro-IL-1 β /IL-1 β 产生促炎因子。视网膜神经元缺血/再灌注损伤后, NLRP3蛋白表达增加, 导致细胞凋亡、坏死^[8]。调控NLRP3的表达, 改善视网膜神经元的线粒体功能, 可有效控制视网膜前体细胞系R28细胞的凋亡^[9]。R28细胞与视网膜功能和特定疾病状态有关, 已被用于模拟青光眼对视网膜细胞的破坏性代谢影响^[10]。基于此, 本研究拟从NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路探究通窍明目IV号方治疗PGA视神经损伤的可能作用机制, 为其临床应用提供依据。本研究通过浙江中医药大学动物伦理委员会审批, 批件号: IACUC-20250421-06。

1 资料与方法

1.1 细胞及动物

视网膜前体细胞系R28细胞, 由中南大学基础医学院解剖学与神经生物学系、哈尔滨医科大学附属第二医院赠送。保存于高糖DMEM培养基(含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素), 37℃、5%CO₂培养。细胞密度达80%时用于试验。

雄性健康清洁级SD大鼠30只, 8~12周龄, 体重(200±20)g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK-(京)2021-0011。在黑龙江中医药大学动物实验室适应性饲养3天, 室温(21±3)℃, 湿度(60±10)%, 12h照明, 每笼5只。

1.2 药物

通窍明目IV号方: 北柴胡15g, 郁金15g, 川芎15g, 茯苓20g, 枸杞子20g, 生地黄20g。将全方拆方为疏肝方(北柴胡15g、郁金15g、川芎15g)和明目方(茯苓20g、枸杞子20g、生地黄20g)。中药由黑龙江中医药大学附属第一医院提供, 由制剂室加工成浓度为含生药5g/ml的混悬液, 高温灭菌, 4℃保存。维生素B₁₂片(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: V104142)。

1.3 主要试剂与仪器

L-谷氨酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: 62010036); 高糖DMEM/F12培养基

(Gibco公司, 批号: MA0213); 胎牛血清(FBS, Hyclone公司, 批号: 10091-148); 胰蛋白酶[龙沙(中国)投资有限公司, 批号: CC-5012]; Annexin V-FITC (Invitrogen公司, 批号: BMS500 FI-300); 碘化丙啶(PI, 批号: 17515)、Hoechst 33342染色液(批号: C0031), Solarbio公司; TritonX-100 (Sigma公司, 批号: X100PC); 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, 批号: R37606)、2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA, 批号: S0033S)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号: CHEM001), 上海碧云天生物技术有限公司; PowerUp SYBR Green Master Mix (批号: A25742)、逆转录试剂盒(批号: 4368813)、羊抗鼠IgG(H+L)二抗(批号: R37120), Thermo公司; 发光液(Millipore公司, 批号: WBKLS0500); NLRP3抗体(Novusbio公司, 批号: NBP2-12446); Caspase-1抗体(批号: A21085)、ASC抗体(批号: A22046), Abclonal公司; IL-1 β 抗体(Affinity公司, 批号: AF5103); RIPA细胞裂解液(Abcam公司, 批号: ab288006); Trizol (Invitrogen公司, 批号: 15596026CN); ECL显影剂[翌圣生物科技(上海)股份有限公司, 批号: 36208ES60]。

显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司, Motiic AE2000型); 多功能凝胶成像系统(美国GE公司, LAS500型); 酶标仪(美国Biotek公司, ELX808型); 稳压电泳仪(Bio-Rad公司, 041BR49837型); 旋涡混合器(Hm-kylin公司, AXH-B型); 流式细胞仪(Beckman Coulter公司, B73613型)。

1.4 中药含药血清的制备

30只大鼠顺序编号, 使用随机数生成器随机分为全方组、疏肝组、明目组、正常组、维生素B₁₂组, 每组6只。根据《药理实验方法学》^[11]和血清药理学研究方法^[12]确定给药剂量, 给药剂量=临床常用量×动物等效剂量系数(按体表面积)×培养基内稀释度, 本实验培养基内稀释度为10%, 故全方组给予通窍明目IV号方94.5g/(kg·d)灌胃, 疏肝组给予疏肝方40.5g/(kg·d)灌胃, 明目组给予明目方54.0g/(kg·d)灌胃。正常组给予蒸馏水18.9ml/(kg·d)灌胃, 维生素B₁₂组给予维生素B₁₂50μg/(kg·d)灌胃。每日灌胃1次, 连续7天后腹主动脉采血, 分离血清。

1.5 细胞损伤模型构建

将R28细胞接种于培养板中24h后, 按照每孔1×10⁵个细胞加入到6孔板中(高糖培养基), 分别

加入 0、5、10、15、20、25 mmol/L 的 L-谷氨酸^[13]，每个浓度设 5 个复孔。分别于培养 24 h 和 48 h（神经细胞 12 h 后开始贴壁，24 h 后分化生长呈梭形）后收集细胞检测凋亡率。将各组细胞 37 ℃、1000 g 离心 5 min，弃上清，195 μl 结合液中加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI，流式细胞仪检测（每组重复 3 次）。比较 L-谷氨酸同一浓度时 24 h 和 48 h 细胞凋亡率是否有显著差异，当 $P < 0.05$ 时最低浓度为构建模型为最佳浓度，否则浓度过高可能导致细胞死亡，从而筛选出最佳 L-谷氨酸浓度及时间进行模型构建及后续检测。

1.6 分组及干预方法

R28 细胞分为空白组、模型组、正常血清组、全方血清组、疏肝血清组、明目血清组、维生素 B₁₂ 血清组，每组 3 个复孔。调整细胞密度为 5×10^4 个/ml，按每孔 0.1 ml 细胞悬液加入 96 孔/6 孔板中。除空白组外，其余各组细胞均采用 L-谷氨酸诱导细胞损伤（采用筛选出的诱导浓度和时间）。造模后空白组和模型组不予血清干预；正常血清组去除培养基加入 10% 正常组血清；全方血清组、疏肝血清组、明目血清组去除培养基加入相应 10% 中药血清；维生素 B₁₂ 血清组去除培养基加入 10% 维生素 B₁₂ 血清，各组细胞继续培养 48 h。

1.7 观察指标及方法

1.7.1 CCK-8 法检测细胞活力 将各组细胞离心，去上清，加 1 ml 的完全培养基重悬细胞，每孔加入 10 μl CCK-8，37 ℃、5% CO₂ 的培养箱内培养 2 h。在酶标仪上测定其在 450 nm 处 OD 值，每组实验重复 3 次。细胞存活率 = $(OD_{\text{实验孔}} - OD_{\text{空白孔}}) / (OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。细胞抑制率 = $(OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{实验孔}}) / (OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.7.2 PI/Hoechst 双染法检测细胞凋亡 去除培养基，PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次；加 1 ml 细胞染色缓冲液重悬，加 5 μl 的 Hoechst 33342 染色液，再加 5 μl 的 PI 染色液，混匀；4 ℃ 孵育 30 min，PBS 洗涤 1 次，荧光显微镜下观察，蓝色荧光标记为细胞核（Hoechst 染色），红色荧光标记为受损细胞膜的细胞核染色（PI 染色），用 Image J 1.8.0 软件计算凋亡细胞数（每组不少于 1000 个）的荧光强度平均值。荧光强度平均值越高说明细胞凋亡越显著。

1.7.3 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞中活性氧簇（ROS）含量 0.25% 胰蛋白酶消化，吹打后收集细胞。37 ℃、1500 r/min 离心 5 min，离心半径 15 cm，

弃上清；加 1 ml PBS 缓冲液洗涤 1 次。离心弃上清，按 1 : 1000 无血清培养基稀释 DCFH-DA，终浓度为 10 μmol/L；将收集好的细胞悬浮于稀释的 DCFH-DA，调整细胞浓度为 1×10^6 /ml，37 ℃ 孵育 20 min，隔 5 min 摇匀，无血清培养基洗涤细胞 3 次，离心 5 min，充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA；流式细胞仪检测，重复 3 次。使用流式细胞仪分析软件 LightCycler® 96 SW 1.1 计算选定细胞群体的荧光强度值表示为 ROS 含量。

1.7.4 免疫荧光法检测细胞中 NLRP3、Caspase-1 表达 弃培养基，每孔加入 0.5 ml 的 4% 多聚甲醛固定，0.1% Triton X-100 透化。一抗（NLRP3 1 : 500，Caspase-1 1 : 500）孵育 2 h，二抗避光孵育 1 h，DAPI 复染，Image J 1.8.0 软件分析荧光强度。

1.7.5 Western Blot 法检测细胞中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β 蛋白水平 RIPA 裂解液（含蛋白酶抑制剂）冰上裂解 30 min，37 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，离心半径 15 cm，取上清。BCA 法检测 562 nm 吸光度。80 V/30 min → 120 V/60 min 电泳，200 mA 湿转 60 min。5% 脱脂牛奶封闭 1 h，一抗（NLRP3 1 : 500、ASC 1 : 2000、Caspase-1 1 : 1000、IL-1β 1 : 1000）4 ℃ 过夜，HRP 二抗（1 : 20000 抗兔/1 : 10 000 抗鼠）室温孵育 1 h，ECL 显影。pro-Caspase-1 是 Caspase-1 的前体形式，cleaved-Caspase-1 是活化形式，pro-IL-1β 是 IL-1β 前体，故本研究结果检测了 pro-Caspase-1、cleaved-Caspase-1、IL-1β、pro-IL-1β 水平。以 β-actin 为内参，以目的条带与内参条带之比表示各组目的蛋白水平。

1.7.6 qRT-PCR 法检测 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β mRNA 相对表达量 Trizol 法提取 RNA，逆转录试剂盒合成 cDNA。取 0.2 ml PCR 管，按照逆转录试剂盒说明书配制反应液，各反转录产物均配制 3 管，PCR 条件：95 ℃ 15 s → 60 ℃ 1 min，40 循环，2^{-ΔΔCt} 法分析。引物由黑龙江久丰生物工程有限公司合成，见表 1。

1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 处理数据，计量数据均满足正态分布用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组独立样本比较，方差齐性用独立样本 *t* 检验，方差不齐用 *t'* 检验，3 组及以上的组间比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*IL-1β* 基因引物序列

Table 1 *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, *IL-1β*

gene primer sequences

基因	引物序列 (5' to 3')	产物长度/bp
<i>NLRP3</i>	上游 GGAAGATGTGGACCTCAAGAAA	110
	下游 GATCCAAGTGATCTGCCTTCTC	
<i>ASC</i>	上游 TTGCTGGATGCTCTGTATGG	112
	下游 AGGCTGGAGCAAAGCTAAA	
<i>Caspase-1</i>	上游 GTACACGTCTTGCCCTCATTAT	99
	下游 GCAGCAGCAACTTCATTCTC	
<i>IL-1β</i>	上游 CAGTGAGGAGAATGACCTGTTC	125
	下游 CGAGATGCTGCTGTGAGATT	

注: *NLRP3*, NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3; *ASC*, 凋亡相关斑点样蛋白; *Caspase-1*, 含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶 1; *IL-1β*, 白细胞介素 1β。

2 结果

2.1 L-谷氨酸诱导 R28 细胞损伤干预浓度及干预时间筛选结果

表 2 示, 干预 24 h 时, 与 0 mmol/L 浓度同时间比较, 10、15、20、25 mmol/L 浓度干预后细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$); 与 5、10 mmol/L 浓度比较, 15、20、25 mmol/L 浓度干预后细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。干预 48 h 时, 与 0 mmol/L 浓度同时间比较, 其余各浓度干预后细胞凋亡率均显著升高 ($P<0.05$); 与 5、10、15 mmol/L 浓度比较, 20、25 mmol/L 浓度干预后细胞凋亡率均显著升高 ($P<0.05$); 与 20 mmol/L 浓度比较, 25 mmol/L 浓度干预后细胞凋亡率均显著升高 ($P<0.05$)。图 1 示, 20、25 mmol/L 干预 48 h 时的细胞凋亡率显著高于本浓度 24 h ($P<0.05$)。因此, 本试验选用浓度 20 mmol/L 的 L-谷氨酸处理细胞 48 h 为诱导细胞损伤模型条件。

2.2 各组 R28 细胞存活率及抑制率比较

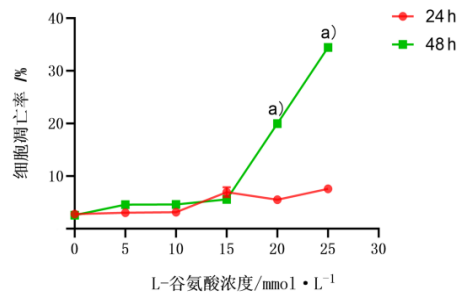
表 3 示, 与空白组比较, 模型组、正常血清组、维生素 B₁₂ 血清组细胞存活率降低, 模型组、正常血清组细胞抑制率升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 除正常血清组外, 其余各给药血清组细胞存活率均升高, 细胞抑制率均降低 ($P<0.05$)。与维生素 B₁₂ 血清组比较, 全方血清组、疏肝血清组和明目血清组细胞存活率比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 但细胞抑制率均降低 ($P<0.05$)。全方血清组、疏肝血清组和明目血清组细胞存活率、抑制率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 不同浓度 L-谷氨酸诱导 R28 细胞损伤 24 h、48 h 后细胞凋亡率比较

Table 2 Comparison of apoptosis rates in R28 cells after 24 h and 48 h of L-glutamic acid-induced injury at different concentrations (% , $\bar{x}\pm s$)

浓度	样本数	24 h 凋亡率	48 h 凋亡率
0 mmol/L	5	2.80±0.28	2.60±0.06
5 mmol/L	5	3.04±0.30	4.58±0.07 ^{a)}
10 mmol/L	5	3.16±0.16 ^{a)}	4.62±0.67 ^{a)}
15 mmol/L	5	6.97±0.94 ^{a) b) c)}	5.59±0.01 ^{a)}
20 mmol/L	5	5.53±0.37 ^{a) b) c)}	20.00±0.05 ^{a) b) c) d)}
25 mmol/L	5	7.58±0.69 ^{a) b) c)}	34.44±0.16 ^{a) b) c) d) e)}

注: a) 与 0 mmol/L 浓度比较, $P<0.05$; b) 与 5 mmol/L 浓度比较, $P<0.05$; c) 与 10 mmol/L 浓度比较, $P<0.05$; d) 与 15 mmol/L 浓度比较, $P<0.05$; e) 与 20 mmol/L 浓度比较, $P<0.05$ 。



注: a) 同一浓度与 24 h 比较, $P<0.05$ 。

图 1 不同浓度 L-谷氨酸诱导 R28 细胞损伤 24 h 和 48 h 细胞凋亡率比较

Figure 1 Comparison of apoptosis rates in R28 cells at 24 and 48 hours following induction by different concentrations of L-glutamic acid

表 3 各组 R28 细胞存活率及抑制率比较

Table 3 Comparison of R28 cell survival rates and inhibition rates in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	存活率	抑制率
空白组	3	100.00±1.41	3.03±0.10
模型组	3	71.00±2.96 ^{a)}	20.93±0.15 ^{a)}
正常血清组	3	69.04±3.11 ^{a)}	19.59±0.06 ^{a)}
维生素 B ₁₂ 血清组	3	86.87±5.39 ^{a) b)}	7.23±0.26 ^{b)}
全方血清组	3	92.93±3.16 ^{b)}	4.47±0.51 ^{b) c)}
疏肝血清组	3	92.99±0.19 ^{b)}	4.96±0.37 ^{b) c)}
明目血清组	3	93.17±1.44 ^{b)}	6.01±0.99 ^{b) c)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与维生素 B₁₂ 血清组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组 R28 细胞 PI/Hoechst 染色荧光强度平均值比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组和正常血清组细胞荧光强度平均值升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 全方血清组、疏肝血清组、明目血清组及维

生素 B₁₂ 血清组荧光强度平均值均降低 ($P<0.05$); 与维生素 B₁₂ 血清组比较, 全方血清组、疏肝血清组、明目血清组荧光强度平均值降低 ($P<0.05$); 全方血清组、疏肝血清组荧光强度平均值低于明目血清组 ($P<0.05$)。各组 R28 细胞 PI/hoechst 双染法荧光染色图见图 2。

表 4 各组 R28 细胞 PI/Hoechst 染色荧光强度平均值
Table 4 Average fluorescence intensity of PI/Hoechst staining in R28 cells in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	荧光强度平均值
空白组	3	135.26±0.14
模型组	3	296.13±0.33 ^{a)}
正常血清组	3	283.72±0.64 ^{a)}
维生素 B ₁₂ 血清组	3	278.64±7.61 ^{b)}
全方血清组	3	232.10±0.49 ^{b) c) d)}
疏肝血清组	3	234.57±0.71 ^{b) c) d)}
明目血清组	3	246.17±3.64 ^{b) c)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与维生素 B₁₂ 血清组比较, $P<0.05$; d) 与明目血清组比较, $P<0.05$ 。

2.4 各组 R28 细胞中 ROS 及 NLRP3、Caspase-1 荧光强度比较

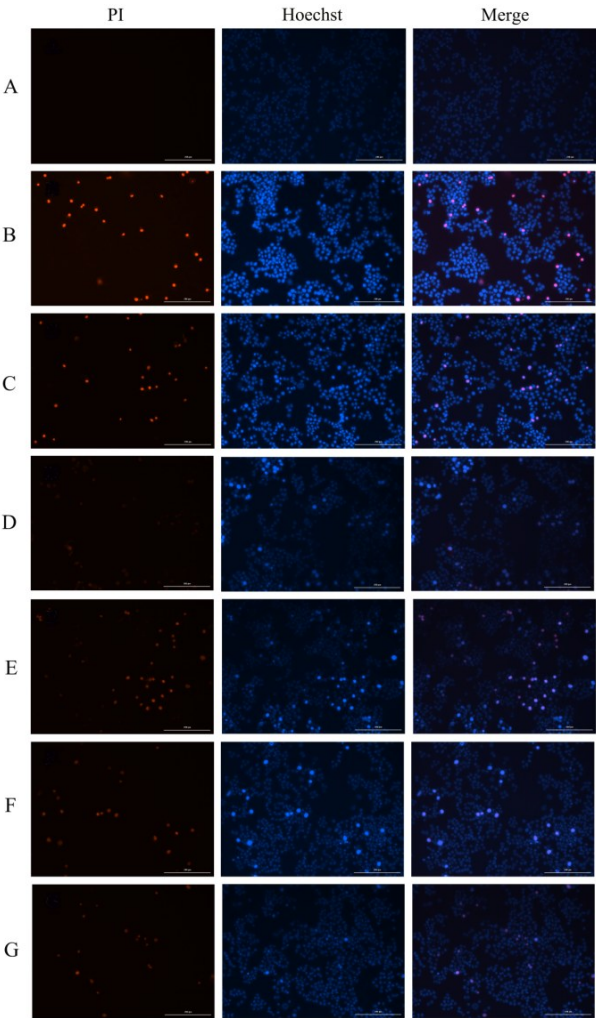
表 5 示, 与空白组比较, 模型组和正常血清组细胞中 ROS 及 NLRP3、Caspase-1 荧光强度均升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 其余各血清组细胞中 ROS 及 NLRP3、Caspase-1 荧光强度均降低 ($P<0.05$)。与维生素 B₁₂ 血清组比较, 全方血清组细胞中 ROS 及 NLRP3、Caspase-1 荧光强度均降低, 疏肝血清组和明目血清组细胞中 NLRP3、Caspase-1 荧光强度亦降低 ($P<0.05$)。全方血清组、疏肝血清组、明目血清组组间 ROS 及 NLRP3、Caspase-1 荧光强度差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 5 各组 R28 细胞中 ROS、NLRP3、Caspase-1 荧光强度比较
Table 5 Comparison of ROS, NLRP3, and Caspase-1 fluorescence intensities in R28 cells among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	ROS	NLRP3	Caspase-1
空白组	3	1085.50±248.76	92.58±0.71	106.59±0.71
模型组	3	190 117.50±6641.71 ^{a)}	142.73±0.71 ^{a)}	155.61±1.48 ^{a)}
正常血清组	3	23 275.10±536.69 ^{a) b)}	137.77±1.41 ^{a) b)}	139.01±0.78 ^{a) b)}
维生素 B ₁₂ 血清组	3	15 507.75±1372.57 ^{b)}	129.15±0.71 ^{b)}	124.63±0.14 ^{b)}
全方血清组	3	8471.45±402.70 ^{b) c)}	111.45±0.71 ^{b) c)}	116.90±0.42 ^{b) c)}
疏肝血清组	3	14 112.90±850.37 ^{b)}	110.41±1.41 ^{b) c)}	117.08±0.78 ^{b) c)}
明目血清组	3	14 826.70±1616.73 ^{b)}	110.68±1.41 ^{b) c)}	116.95±0.57 ^{b) c)}

注: ROS, 活性氧簇; NLRP3, NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3; Caspase-1, 含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶 1。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与维生素 B₁₂ 血清组比较, $P<0.05$ 。



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 正常血清组; D, 全方血清组; E, 疏肝血清组; F, 明目血清组; G, 维生素 B₁₂ 血清组; 蓝色荧光标记为细胞核 (Hoechst 染色); 红色荧光标记为受损细胞膜的细胞核染色 (PI 染色); Merge 为 Hoechst 和 PI 的合图。

图 2 各组 R28 细胞 PI/hoechst 双染法荧光染色图 (×50)
Figure 2 Fluorescent double staining images of R28 cells using PI/Hoechst in each group (×50)

2.5 各组 R28 细胞中 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*IL-1 β* mRNA 表达比较

表 6 示, 与空白组比较, 模型组和正常血清组细胞中 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*IL-1 β* mRNA 表达均升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 其余各血清组 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*IL-1 β* mRNA 表达均下调 ($P<0.05$)。与维生素 B₁₂ 血清组比较, 全方血清组、疏肝血清组、明目血清 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*IL-1 β* mRNA 表达均下调 ($P<0.05$)。全方血清组 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*IL-1 β* mRNA 表达均低于疏肝血清组、明目血清组 ($P<0.05$)。疏肝血清组 *NLRP3*、*Caspase-1* mRNA 表达高于明目血清组, *ASC*、*IL-1 β* mRNA 低于明目血清组 ($P<0.05$)。

2.6 各组 R28 细胞中 *NLRP3*、*ASC*、pro-*Caspase-1*、cleaved-*Caspase-1*、*IL-1 β* 、pro-*IL-1 β* 蛋白水平比较

表 7 示, 与空白组比较, 模型组和正常血清组 *NLRP3*、*ASC*、pro-*Caspase-1*、cleaved-*Caspase-1*、*IL-1 β* 、pro-*IL-1 β* 蛋白水平均升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 全方血清组、疏肝血清组、明目血清组及维生素 B₁₂ 血清组 *NLRP3*、*ASC*、pro-*Caspase-1*、cleaved-*Caspase-1*、*IL-1 β* 、pro-*IL-1 β* 蛋白水平均降低 ($P<0.05$)。与维生素 B₁₂ 血清组比较, 全方血清组各指标蛋白水平均降低, 疏肝血清组 *ASC*、pro-*Caspase-1*、cleaved-*Caspase-1*、pro-*IL-1 β* 蛋白水平降低, 明目血清组仅 pro-*IL-1 β* 蛋白水平降低 ($P<0.05$)。与明目血清组比较, 全方血清组 *ASC*、

表 6 各组 R28 细胞中 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*IL-1 β* mRNA 表达比较

Table 6 Comparison of *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, and *IL-1 β* mRNA expression in R28 cells among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	<i>NLRP3</i>	<i>ASC</i>	<i>Caspase-1</i>	<i>IL-1β</i>
空白组	3	1.00±0.01	1.00±0.01	1.01±0.01	0.99±0.01
模型组	3	87.97±0.01 ^{a)}	98.44±0.04 ^{a)}	109.06±0.03 ^{a)}	43.45±0.05 ^{a)}
正常血清组	3	86.88±0.01 ^{a) b)}	82.02±0.03 ^{a) b)}	99.66±0.04 ^{a) b)}	44.02±0.03 ^{a) b)}
维生素 B ₁₂ 血清组	3	23.33±0.01 ^{b)}	27.36±0.08 ^{b)}	20.76±0.05 ^{b)}	12.03±0.03 ^{b)}
全方血清组	3	2.96±0.01 ^{b) c) d) e)}	3.08±0.02 ^{b) c) d) e)}	2.86±0.03 ^{b) c) d) e)}	2.65±0.04 ^{b) c) d) e)}
疏肝血清组	3	9.35±0.02 ^{b) c) d)}	9.75±0.03 ^{b) c) d)}	10.82±0.01 ^{b) c) d)}	6.85±0.03 ^{b) c) d)}
明目血清组	3	8.75±0.002 ^{b) c)}	10.52±0.02 ^{b) c)}	8.85±0.01 ^{b) c)}	8.31±0.01 ^{b) c)}

注: *NLRP3*, NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3; *ASC*, 凋亡相关斑点样蛋白; *Caspase-1*, 含胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶 1; *IL-1 β* , 白细胞介素 1 β 。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与维生素 B₁₂ 血清组比较, $P<0.05$; d) 与明目血清组比较, $P<0.05$; e) 与疏肝血清组比较, $P<0.05$ 。

表 7 各组 R28 细胞中 *NLRP3*、*ASC*、pro-*Caspase-1*、cleaved-*Caspase-1*、*IL-1 β* 、pro-*IL-1 β* 蛋白水平比较

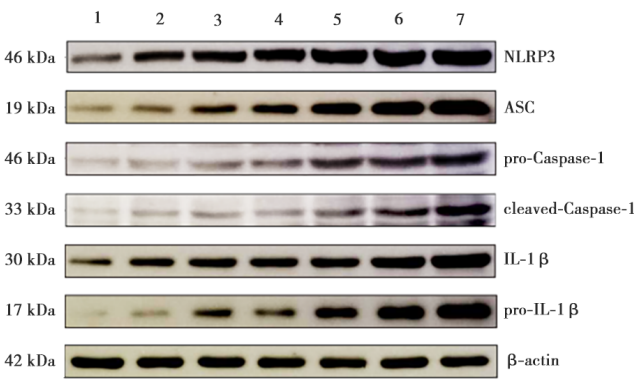
Table 7 Comparison of *NLRP3*, *ASC*, pro-*Caspase-1*, cleaved-*Caspase-1*, *IL-1 β* , and pro-*IL-1 β* protein levels in R28 cells among groups ($/\beta$ -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	<i>NLRP3</i>	<i>ASC</i>	pro- <i>Caspase-1</i>	cleaved- <i>Caspase-1</i>	<i>IL-1β</i>	pro- <i>IL-1β</i>
空白组	3	1.00±0.43	1.00±0.17	1.00±0.53	1.00±0.12	1.00±0.17	1.00±0.20
模型组	3	2.37±0.10 ^{a)}	2.96±0.24 ^{a)}	3.45±0.17 ^{a)}	7.01±1.24 ^{a)}	2.54±0.57 ^{a)}	3.74±0.21 ^{a)}
正常血清组	3	2.07±0.12 ^{a)}	2.40±0.13 ^{a)}	2.94±0.41 ^{a)}	5.40±1.37 ^{a)}	2.14±0.35 ^{a)}	3.10±0.16 ^{a)}
维生素 B ₁₂ 血清组	3	2.00±0.12 ^{b)}	2.11±0.19 ^{b)}	2.44±0.28 ^{b)}	3.56±0.44 ^{b)}	1.88±0.23 ^{b)}	2.50±0.26 ^{b)}
全方血清组	3	1.32±0.47 ^{b) c)}	1.25±0.23 ^{b) c) d)}	1.28±0.60 ^{b) c)}	1.65±0.12 ^{b) c)}	1.28±0.13 ^{b) c)}	1.40±0.31 ^{b) c) d)}
疏肝血清组	3	1.57±0.38 ^{b)}	1.57±0.30 ^{b) c)}	1.61±0.53 ^{b) c)}	1.99±0.07 ^{b) c)}	1.44±0.17 ^{b)}	1.84±0.25 ^{b) c)}
明目血清组	3	1.78±0.16 ^{b)}	1.75±0.28 ^{b)}	1.89±0.58 ^{b)}	2.39±0.49 ^{b)}	1.53±0.15 ^{b)}	1.93±0.39 ^{b) c)}

注: *NLRP3*, NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3; *ASC*, 凋亡相关斑点样蛋白; pro-*Caspase-1*, 含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶 1 前体; cleaved-*Caspase-1*, 含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶 1 活化形式; *IL-1 β* , 白细胞介素 1 β ; pro-*IL-1 β* , 白细胞介素 1 β 前体。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与维生素 B₁₂ 血清组比较, $P<0.05$; d) 与明目血清组比较, $P<0.05$ 。

pro-IL-1 β 蛋白水平降低 ($P<0.05$)。各组 R28 细胞中 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、cleaved-Caspase-1、IL-1 β 、pro-IL-1 β 蛋白电泳图见图 3。



注：1，空白组；2，全方血清组；3，疏肝血清组；4，明目血清组；5，维生素 B₁₂ 血清组；6，正常血清组；7，模型组；NLRP3，NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3；ASC，凋亡相关斑点样蛋白；pro-Caspase-1，含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶 1 前体；cleaved-Caspase-1，含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶 1 活化形式；IL-1 β ，白细胞介素 1 β ；pro-IL-1 β ，白细胞介素 1 β 前体。

图 3 各组 R28 细胞中 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、cleaved-Caspase-1、IL-1 β 、pro-IL-1 β 蛋白电泳图
Figure 3 Electrophoresis plots of NLRP3, ASC, pro-Caspase-1, cleaved-Caspase-1, IL-1 β , and pro-IL-1 β proteins in R28 cells in each group

3 讨论

青光眼的防治目前已经成为医疗领域关注的热点。通窍明目 IV 号方是本团队根据多年诊治青光眼总结的以疏肝通窍法为总纲，以疏肝解郁、通窍明目为治法的自拟经验方。方中柴胡疏肝解郁理气，引药入经为君药；郁金解郁行气止痛、活血凉血为臣，柴胡、郁金配伍可疏肝理气，活血通窍；川芎活血行气止痛，配伍柴胡疏肝解郁、理气通络、通窍止痛；枸杞子滋肾补肝、明目益精，与生地黄配伍可滋补肾阴、养肝明目；生地黄充肾阴而养肝体；茯苓宁心利窍、护肝利水，佐柴胡解郁消滞、平衡五脏。全方共奏疏肝解郁、开窍明目、活血通络之效。本研究将通窍明目 IV 号方拆方为疏肝方和明目方（疏肝方中柴胡、郁金、川芎可疏肝行气、通络止痛，明目方中茯苓、枸杞子、生地黄可健脾安神、清热凉血明目）探究其组方特点和可能作用机制。

研究显示，细胞损伤后，ROS、谷氨酸等胞内容物大量释放，可引发剧烈的炎症反应^[14]。炎症因子 IL-1 β 可促进多种炎症介质基因表达，ASC 寡聚化是 NLRP3 炎症小体形成、激活的关键点^[15-16]，

激活 NLRP3 炎症小体，线粒体可向胞质释放 ROS^[17]，这些过程都是引起细胞凋亡的重要环节。另有研究显示，通过下调 NLRP3、Caspase-1 表达，减少细胞凋亡、减轻神经炎症，得以保护神经系统^[18]。因此，NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路在视网膜神经节细胞的损伤中起关键作用，在神经系统内小胶质细胞是功能性 NLRP3 炎症小体产生的主要场所^[19]。R28 细胞在氧糖剥夺/再恢复诱导的视网膜缺血再灌注损伤后，NLRP3 蛋白表达增加，出现热凋亡、细胞焦亡、坏死^[20]，所以调控 NLRP3 相关通路的表达，改善视网膜神经元的线粒体功能，可有效控制 R28 细胞的凋亡^[9]、坏死^[21]。

本研究首先评估 L-谷氨酸处理后 R28 细胞凋亡率，以了解最佳药物浓度和给药时间。结果显示，20 mmol/L L-谷氨酸作用 48 h 的细胞凋亡率明显下降，是合适的 R28 细胞损伤模型。为了阐明通窍明目 IV 号方对视网膜神经元的保护，本研究采用 CCK-8 法检测细胞活力，发现全方血清、疏肝血清、明目血清、维生素 B₁₂ 血清干预后 R28 细胞存活率均升高、抑制率均降低；PI/Hoechst 染色亦显示，各血清干预组 PI/Hoechst 染色荧光强度平均值降低，说明细胞凋亡减少。其中全方血清组、疏肝血清组和明目血清组细胞抑制率及凋亡细胞荧光强度平均值显著低于维生素 B₁₂ 血清组，说明通窍明目 IV 号全方及拆方的效果均优于维生素 B₁₂，并且全方的效果优于拆方后的明目方。上述结果提示，通窍明目 IV 号可以通过抑制凋亡与程序性细胞坏死，减轻 R28 细胞损伤。

ROS 与 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路的调控关系十分密切，ROS 激活 NLRP3 炎症小体后，可诱发一系列炎症反应^[16]。本研究结果显示，模型组 ROS 荧光强度最高，各含药血清组的 ROS 荧光强度不同程度的降低，且以全方含药血清组降低最显著，说明通窍明目 IV 号全方可显著抑制 ROS 的升高。免疫荧光法、Western Blot 法、qRT-PCR 法结果显示，模型组细胞中 NLRP3 和 Caspase-1 荧光强度升高，NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、cleaved-Caspase-1、IL-1 β 、pro-IL-1 β 蛋白水平升高，NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β mRNA 表达升高，说明 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路被激活。而各药物血清组中各蛋白及其 mRNA 均不同程度降低，且以全方血清组最显著，说明通窍明目 IV 号可有效抑制 R28 细胞 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路，从而减轻程序性细胞坏死。

综上, 通窍明目Ⅳ号方可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路, 抑制炎症小体活化, 减轻程序性细胞坏死, 从而有效缓解视网膜神经元凋亡, 达到视神经保护的作用。但本研究未使用基因敲除/抑制剂反向验证通路的必要性, 且通路关键节点仅通过蛋白及基因表达间接推测, 缺乏活体成像或分子互作直接验证, 后续研究可以结合基因编辑等手段, 进一步评估干预效果并深入研究可能作用机制。

参考文献

- [1] 中华医学会眼科学分会青光眼学组, 中华医学会中华眼科杂志编辑委员会. 我国原发性青光眼诊断和治疗专家共识[J]. 中华眼科杂志, 2008, 44(9): 862-863.
- [2] 马秋艳, 杨迎新, 刘清泉. 中医药治疗原发性开角型青光眼的 meta 分析[J]. 中国中医眼科杂志, 2018, 28(6): 397-403.
- [3] 孙河, 樊晓瑞, 董霏雪, 等. 原发性青光眼与中医肝郁体质关系的研究[J]. 中国中医眼科杂志, 2019, 29(1): 42-46.
- [4] 孙河, 王秋静. 通窍明目Ⅳ号对原发性闭角型青光眼血流变学的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2014, 24(2): 108-111.
- [5] 马歆瑜. 通窍明目Ⅳ号对肝气郁结型闭角型青光眼 RNFLT 的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [6] 钟旺庚. 通窍明目Ⅳ号对肝郁气滞型青光眼血清 HSP27 抗体的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2024.
- [7] 宋诗易, 梁亮. 程序性细胞死亡在青光眼视网膜神经节细胞中的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2024, 24(9): 1416-1420.
- [8] YAN WT, ZHAO WJ, HU XM, et al. PANoptosis-like cell death in ischemia/reperfusion injury of retinal neurons[J]. Neural Regen Res, 2023, 18(2): 357-363.
- [9] ZHOU Z, SHANG L, ZHANG Q, et al. DTX3L induced NLRP3 ubiquitination inhibit R28 cell pyroptosis in OGD/R injury[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2023, 1870(3): 119433.
- [10] CHATTERJEE N, CALLEN S, SEIGEL GM, et al. HIV-1 Tat-mediated neurotoxicity in retinal cells[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2011, 6(3): 399-408.
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-203.
- [12] 王力倩, 李仪奎, 符胜光, 等. 血清药理学方法研究探索[J]. 中药药理与临床, 1997, 13(3): 30-32.
- [13] 张广云, 胡晓, 袁平, 等. 谷氨酸诱导新生小鼠皮层神经细胞损伤体外模型的建立[J]. 神经解剖学杂志, 2012, 28(4): 363-367.
- [14] DIXON KJ. Pathophysiology of traumatic brain injury[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2017, 28(2): 215-225.
- [15] YUE N, HUANG H, ZHU X, et al. Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors[J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 102.
- [16] 庄万欣. USP3 通过靶向 ASC 调控炎症小体激活的功能与机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [17] DAN DUNN J, ALVAREZ LA, ZHANG X, et al. Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis[J]. Redox Biol, 2015, 6: 472-485. doi: 10.1016/j.redox.2015.09.005.
- [18] 李艳娇, 李双阳, 王饶琼, 等. 细胞焦亡与血管性认知障碍的相关性及中医药研究进展[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(9): 112-117.
- [19] PRAKASH R, VYAWAHARE A, SAKLA R, et al. NLRP3 inflammasometargeting nanomicelles for preventing ischemia-reperfusion-induced inflammatory injury[J]. ACS Nano, 2023, 17(9): 8680-8693.
- [20] YAN WT, ZHAO WJ, HU XM, et al. PANoptosis-like cell death in ischemia/reperfusion injury of retinal neurons[J]. Neural Regen Res, 2023, 18(2): 357-363.
- [21] WAN H, YAN YD, HU XM, et al. Inhibition of mitochondrial VDAC1 oligomerization alleviates apoptosis and necroptosis of retinal neurons following OGD/R injury[J]. Ann Anat, 2023, 247: 152049. doi: 10.1016/j.aanat.2023.152049.

Effects of *Tongqiao Mingmu IV Formula* (通窍明目Ⅳ号方) -Containing Serum on L-Glutamate-Induced R28 Cell Damage Through NLRP3/Caspase-1/IL-1 β Signaling Pathway

GAO Qing^{1,2}, SUN He³, WANG Liyuan³, PANG Qingbao³

1. School of Life Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 310053; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine; 3. First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the protective mechanism of *Tongqiao Mingmu IV Formula* (通窍明目Ⅳ号方) on glaucoma-induced optic nerve damage. **Methods** *Tongqiao Mingmu IV Formula* was divided into *Shugan Formula* (疏肝方) and *Mingmu Formula* (明目方). Thirty rats were randomly assigned to whole formula group, Shugan group,

Mingmu group, normal group, and vitamin B₁₂ group, with five rats in each group. The whole formula group received 94.5 g/(kg·d) of *Tongqiao Mingmu IV Formula* by gavage; Shugan group received 40.5 g/(kg·d) of *Shugan Formula* by gavage; Mingmu group received 54.0 g/(kg·d) of *Mingmu Formula* by gavage; the control group received 18.9 ml/(kg·d) of distilled water by gavage; and the vitamin B₁₂ group received 50 μg/(kg·d) of vitamin B₁₂ by gavage. Administer oral gavage once daily for 7 consecutive days, then collect blood from the abdominal aorta and isolate serum. R28 retinal precursor cell lines were divided into blank group, model group, normal serum group, whole formula serum group, Shugan serum group, Mingmu serum group, and vitamin B₁₂ serum group, with three replicate wells per group. Except for the blank group, all other groups employed L-glutamate to induce R28 cell damage using optimized induction concentrations and durations. After modeling, the blank group and model group received no serum intervention; the normal serum group had its medium removed and replaced with 10% normal serum; the whole formula serum group, Shugan serum group, and Mingmu serum group had their medium removed and replaced with 10% serum from the corresponding herbal formula group; the vitamin B₁₂ serum group had its medium removed and replaced with 10% vitamin B₁₂ serum. After 48 hours of continued culture, cell viability including survival rate and inhibition rate was assessed using the CCK-8 assay; apoptosis rates were determined via PI/Hoechst dual staining, comparing mean fluorescence intensities; reactive oxygen species (ROS) levels were measured using fluorescent probes; immunofluorescence, Western Blot, and qRT-PCR were used to detect the expression of proteins and mRNA related to the NOD-like receptor protein 3 (NLRP3)/Caspase-1/IL-1β signaling pathway. **Results** Cells were treated with 20 mmol/L L-glutamate for 48 hours to induce a cellular injury model. Compared with the blank group, the model group exhibited decreased R28 cell viability, increased cell inhibition rate, elevated average fluorescence intensity of PI/Hoechst staining, and increased levels of cellular ROS, NLRP3/Caspase-1/IL-1β-related proteins, and their mRNA expression ($P<0.05$). Compared with the model group, all serum intervention groups showed varying degrees of improvement in the aforementioned indicators ($P<0.05$). The whole formula serum group demonstrated superior effectiveness to the vitamin B₁₂ serum group in reducing inhibition rates, mean PI/Hoechst staining fluorescence intensity, ROS levels, and mRNA expression of NLRP3/Caspase-1/IL-1β-related proteins ($P<0.05$). The mean PI/Hoechst staining fluorescence intensity in whole formula serum group and Shugan serum group was lower than that in the Mingmu serum group ($P<0.05$). *NLRP3*, *Apoptosis-Related Speck-Like Protein (ASC)*, *Caspase-1*, and *IL-1β* mRNA in the whole formula serum group was lower than that in both Shugan serum group and Mingmu serum group ($P<0.05$).

Conclusion *Tongqiao Mingmu IV Formula* may alleviate programmed cell necrosis by inhibiting the NLRP3/Caspase-1/IL-1β signaling pathway, thereby effectively reducing retinal neuronal apoptosis and achieving optic nerve protection.

Keywords primary glaucoma; optic nerve; *Tongqiao Mingmu IV Formula* (通窍明目Ⅳ号方); apoptosis; reactive oxygen species clusters; NOD-like receptor protein 3; cysteine-containing aspartic protease 1; interleukin-1β

(收稿日期: 2025-03-20; 修回日期: 2025-06-26)

[编辑: 邓媛]