

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.06.012

滋阴明目丸对视网膜色素变性模型小鼠自噬的影响

欧晨¹, 易肇兰², 黄欣怡², 宋厚盼², 谢薇^{2,3}, 彭清华^{1,2}✉

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南省长沙市雨花区韶山中路95号, 410007; 2. 湖南中医药大学; 3. 湖南省妇幼保健院

[摘要] **目的** 探究滋阴明目丸治疗视网膜色素变性的作用机制。**方法** 将48只rd10小鼠随机分为模型组、乐町组、滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组, 每组12只, 另选取12只C57BL/6小鼠作为空白组。滋阴明目丸低剂量组予4.5 g/(kg·d) 滋阴明目丸溶液灌胃, 滋阴明目丸高剂量组予9 g/(kg·d) 滋阴明目丸溶液灌胃, 乐町组予0.15 g/(kg·d) 乐町软胶囊溶液灌胃, 每日1次, 连续28天。干预结束后, 采用光学相干断层扫描、眼底照相观察小鼠视网膜形态, 透射电镜观察视网膜组织超微结构, Western Blot法检测视网膜组织雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、苡氯素1(Beclin1)、自噬相关蛋白5(ATG5)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)蛋白表达, 实时荧光定量PCR法检测视网膜组织 *mTOR*、*PI3K*、*Beclin1*、*ATG5*、*LC3* mRNA表达。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠视网膜形态结构紊乱, 分层不清, 视网膜厚度下降 ($P<0.01$); 眼底呈青灰色, 色泽分布不均, 可见大量色素沉着; 视网膜线粒体结构破坏, 可见自噬小体; mTOR、PI3K蛋白及mRNA表达降低, Beclin1、ATG5、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ蛋白及mRNA表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 乐町组和滋阴明目丸低、高剂量组小鼠视网膜形态结构、眼底状况均有不同程度改善, 视网膜厚度增加 ($P<0.01$); 线粒体破坏程度减轻, 自噬小体数量减少; 滋阴明目丸低、高剂量组小鼠视网膜组织 mTOR、PI3K 蛋白及mRNA表达升高, Beclin1、ATG5、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ蛋白及mRNA表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 滋阴明目丸可以通过抑制自噬反应以改善视网膜色素变性小鼠的视网膜组织形态结构, 延缓视网膜病变进展, 进而保护视功能。

[关键词] 视网膜色素变性; 滋阴明目丸; 自噬; 视网膜组织

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一组具有高度遗传异质性的进行性、不可逆性视网膜退行性疾病, 其主要病理特征在于视网膜感光细胞 (视杆细胞和视锥细胞) 和视网膜色素上皮细胞丧失与功能障碍^[1]。RP通常首先影响负责暗视力的视杆细胞, 导致患者早期出现夜盲症。随着病情进展, 负责中央视力和色觉的视锥细胞也逐步受损, 引起视野进行性缩小及中心视力下降, 最终可能导致严重的视力损害甚至失明。RP是全球范围内遗传性致盲眼病的主要病因之一, 影响着数百万人, 目前尚无根治方法^[2]。自噬是细胞内的一种清除细胞中损伤或衰老细胞器及生物大分子的保护性

机制, 其通路的成分几乎存在于每个视觉结构, 如眼眶、角膜、晶状体和视网膜^[3]。已有研究^[4]表明自噬相关蛋白在视网膜神经节细胞层、内核层、外核层、视网膜色素上皮层均有大量表达, 并且参与了一系列的感光活动, 但自噬是如何参与RP的病理过程尚不明确。

RP属于中医学“高风雀目”“高风内障”等内障眼病范畴, 其主要病机为先天禀赋不足, 后天肝肾阴虚、精血不足致神光衰微。故本病以虚为本, 临床以肝肾阴虚证多见^[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在多年临床实践中总结出的经验方。团队多年研究^[6-7]表明, 滋阴明目丸可减轻RP患者视网膜黄斑中心凹水肿与渗出, 提高暗适应b波振幅。本研究以RP模型小鼠为研究对象, 从自噬角度探讨滋阴明目丸治疗RP的可能作用机制, 以期为该方的临床应用提供依据。本

基金项目: 国家自然科学基金(82405490); 湖南省教育厅科学研究项目(23B0347); 中国博士后科学基金第76批面上项目(2024M760896); 湖南中医药大学校院联合基金项目(2024XYLH020)

✉ 通讯作者: pengqinghua@hnucm.edu.cn

实验方案通过湖南中医药大学动物实验中心伦理审查, 伦理批件号: HNUCM21-2406-03。

1 材料与方法

1.1 动物

RP 模型鼠选用纯合子基因突变的 rd10 小鼠 (C57 种系, Pde6b, -/-), SPF 级, 4 周龄, 体质量 (20±2) g, 雌雄各半, 共 48 只, 由实验团队前期购于美国杰克森实验室, 动物合格证书编号: 1911A11353。对照实验鼠选用同种系 C57BL/6 小鼠, SPF 级, 4 周龄, 体质量 (20±2) g, 雌雄各半, 共 12 只, 由湖南中医药大学动物实验中心采购, 动物合格证号: 430727241103068946。饲养于湖南中医药大学 SPF 级动物房, 实验动物使用许可证号: SYXK (湘) 2024-0014, 温度 23~25℃, 湿度 50%~60%, 12 h 规律昼夜循环, 自由饮水饮食。

1.2 药物

滋阴明目丸组成: 枸杞子 15 g、熟地黄 30 g、丹参 15 g、黄精 15 g、当归 10 g、山药 20 g、羌活 6 g、牛膝 10 g、菟丝子 15 g、三七 6 g、石决明 15 g、川芎 10 g、石菖蒲 10 g、楮实子 15 g、牡丹皮 10 g、山萸肉 10 g、茯苓 15 g, 购自湖南中医药大学第一附属医院中药房, 生产批号: 20231202。将药丸研制成粉, 沸水溶解后搅拌均匀, 配制成 0.5 g/ml 的溶液保存备用。乐町软胶囊 (批准文号: GD00029891, 规格: 0.5 g/粒, 广州市范乐医药科技有限公司), 配制成 0.1 g/ml 溶液备用。

1.3 主要试剂和仪器

复方托吡卡胺滴眼液 (货号: 0042351), 津药永光 (河北) 制药有限公司; 二水合醋酸铀酰 (货号: 73943)、硝酸铅粉末 (货号: 228621)、磷酸盐缓冲液 (货号: 524650), 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 电镜固定液 (货号: G1102)、BCA 蛋白定量检测试剂盒 (货号: G2026-200T)、RNA 提取液 (货号: G3013)、ECL 化学发光试剂盒 (货号: G2020-25ML)、自噬相关蛋白 5 (ATG5) 抗体 (货号: GB115761)、雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 抗体 (货号: GB11405)、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (货号: GB15003)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 抗体 (货号: GB113801)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 抗体 (货号: GB11525)、苜氯素 1 (Beclin1) 抗体 (货号: GB115741)、HRP-山羊抗兔二抗 (货号: GB23303), 武汉赛维尔生物科技有限公司。

BP001 型光学相干断层扫描 (OCT) 眼底照相一体机, 美国 Phoenix Research Labs 公司; YZ20T4 型眼科手术显微镜, 杭州六六视觉医疗器械有限公司; HT7700 型透射电子显微镜, 日本 HITACHI 公司; RT-6100 型酶标仪, 美国 RAYTO 公司; JY92-11N 型超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; SVT-2 型转印电泳仪、SVE-2 型垂直电泳仪、SCG-W3000 型化学发光仪, 武汉赛维尔生物科技有限公司; CFX Connect 型荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 动物分组及给药

采用随机数字表法将 48 只 rd10 小鼠随机分为模型组、乐町组、滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组, 每组 12 只, 设 12 只 C57BL/6 小鼠作为空白组。动物给药剂量按“动物与人每千克体重等效剂量折算系数”折算^[8], 根据 60 kg 成人临床等效剂量, 滋阴明目丸低剂量组予 4.5 g/(kg·d) 滋阴明目丸溶液灌胃, 滋阴明目丸高剂量组为滋阴明目丸低剂量组的 2 倍, 即予 9 g/(kg·d) 滋阴明目丸溶液灌胃。乐町组予 0.15 g/(kg·d) 乐町软胶囊溶液灌胃, 空白组和模型组给予等体积生理盐水灌胃。所有小鼠灌胃体积为每 0.1 ml/10 g, 每日 1 次, 连续 28 天。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 OCT 及眼底照相观察小鼠视网膜形态 最后 1 次灌胃后次日进行观察。每组采用随机数字表法选取 3 只小鼠, 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉, 麻醉后观察小鼠反应, 双眼点复方托吡卡胺滴眼液 1~2 滴扩瞳。打开 OCT 程序, 选择扫描类型、设定参数, 调整图像至最清晰状态, 记录图片。打开眼底照相软件, 将动物放置支架上调整好位置。调整镜头前部接触眼表, 调节光源大小和镜头焦距, 直至屏幕显示清晰的眼底成像图片。观察眼底血管及视网膜情况, 记录图片。采用 Image-J 1.8.0 软件分析图片数据。

1.5.2 透射电镜观察视网膜组织超微结构 采用随机数字表法选取每组 3 只小鼠, 加入电镜固定液 4℃ 固定 2 h, 使用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液配制的 1% 锇酸, 在室温下对组织样品固定 2 h。依次入梯度乙醇脱水, 每次 15 min。环氧树脂渗透包埋, 放入烤箱过夜。超薄切片 (切片厚度: 60~80 nm) 后铀铅双染色, 透射电镜下对视网膜组织超微结构进行观察。

1.5.3 Western Blot 法检测视网膜组织 mTOR、PI3K、Beclin1、ATG5、LC3 蛋白表达 采用随机数字表法选取每组 3 只小鼠，分离视网膜组织，PBS 洗涤后冰上裂解 30 min，12 000 r/min（离心半径 10 cm）、4℃离心 10 min，收集上清，即为总蛋白溶液，用 BCA 蛋白浓度试剂盒测蛋白浓度。加入蛋白上样缓冲液，蛋白变性，SDS-PAGE 凝胶电泳，转膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 30 min。按 1：1000 比例稀释 mTOR、PI3K、Beclin1、ATG5、LC3 抗体，1：3000 比例稀释 β -actin 抗体，将其与膜 4℃孵育过夜。用 TPBST 按 1：3000 稀释 HRP 标记的二抗，室温下孵育 30 min。将 ECL 化学发光液和膜孵育，反应 1 min 后放入化学发光仪中，按照预设程序开始化学发光。曝光完成后，保存的图片用 AIWBwell™ 分析软件进行数据分析。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。

1.5.4 实时荧光定量 PCR 法检测视网膜组织 mTOR、PI3K、Beclin1、ATG5、LC3 mRNA 表达 采用随机数字表法选取每组 3 只小鼠，分离视网膜组织，加入 1 ml 的 RNA 提取液，提取总 RNA，将总 mRNA 反转录为 cDNA。配制反应体系，荧光定量 PCR 仪上完成扩增，95℃、30 s 预变性，95℃、15 s 变性，60℃、30 s 退火，循环 40 次，60~95℃，每升温 0.5℃采集一次荧光信号。以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 相对表达量。引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成，见表 1。

1.6 统计学方法

使用 Graphpad Prism 8 进行数据处理、统计分析及绘图。符合正态分布的计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，方差齐者多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠视网膜形态比较

表 2 示，与空白组比较，模型组小鼠视网膜厚度降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，乐町组、滋阴明目丸低剂量组、滋阴明目丸高剂量组小鼠视网膜厚度升高 ($P<0.01$)；乐町组、滋阴明目丸低剂量组和滋阴明目丸高剂量组视网膜厚度比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

图 1 示，空白组小鼠视网膜形态结构完整，分

表 1 小鼠视网膜组织基因引物序列

Table 1 Primer sequences of mouse retinal tissue genes

基因	引物序列	产物长度/bp
mTOR	上游: CCTTCACAGATACCCAGTACCTCC	138
	下游: AGTAGACCTTAAACTCCGACCTCAC	
PI3K	上游: ATGCTCCGACCTCTATGTGACT	225
	下游: GACACGGTTGTTCTCCAC	
Beclin1	上游: CCGTACAGGATGGACGTGGA	77
	下游: TGGGTTTTTGATGGAATAGGAGC	
ATG5	上游: GGCCATCAACCGGAAACTCA	90
	下游: CGCTCCGTCGTGCTGTGATAT	
LC3	上游: CCTGTCCTGGATAAGACCAAGTT	180
	下游: ATCCTTCTCCTGTTTCATAGATGTCA	
GAPDH	上游: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游: TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

注：mTOR，雷帕霉素靶蛋白；PI3K，磷脂酰肌醇 3-激酶；Beclin1，苜蓿素 1；ATG5，自噬相关蛋白 5；LC3，微管相关蛋白 1 轻链 3；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

表 2 各组小鼠视网膜厚度比较

Table 2 Comparison of retinal thickness in each group of mice (μm , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	视网膜厚度
空白组	3	237.80±11.51
模型组	3	91.18±3.19 ^{a)}
乐町组	3	125.90±5.89 ^{b)}
滋阴明目丸低剂量组	3	130.80±4.40 ^{b)}
滋阴明目丸高剂量组	3	141.90±5.92 ^{b)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

层明显。模型组小鼠视网膜形态结构紊乱，萎缩明显，分层不清。乐町组小鼠视网膜形态结构稍紊乱，厚度变薄，分层不清。滋阴明目丸低剂量组小鼠视网膜形态结构完整，厚度变薄，分层较明显。滋阴明目丸高剂量组小鼠视网膜形态结构完整，厚度稍变薄，分层明显。

图 2 示，空白组小鼠眼底呈橘黄色，色泽均匀，动静脉血管清晰，视盘色淡红、边界清，无异常色素沉着；模型组小鼠眼底呈青灰色，色泽分布不均，动静脉血管模糊，视盘色蜡黄、边界不清，可见大量色素沉着；乐町组和滋阴明目丸低剂量组小鼠眼底色泽不均，动静脉血管隐约可见，视盘色蜡黄、边界清，视网膜周边部可见色素沉着；滋阴明目丸高剂量组小鼠眼底色泽较均匀，动静脉血管隐约可见，可见血管白鞘，视盘色蜡黄、边界清，视网膜可见少量色素沉着。

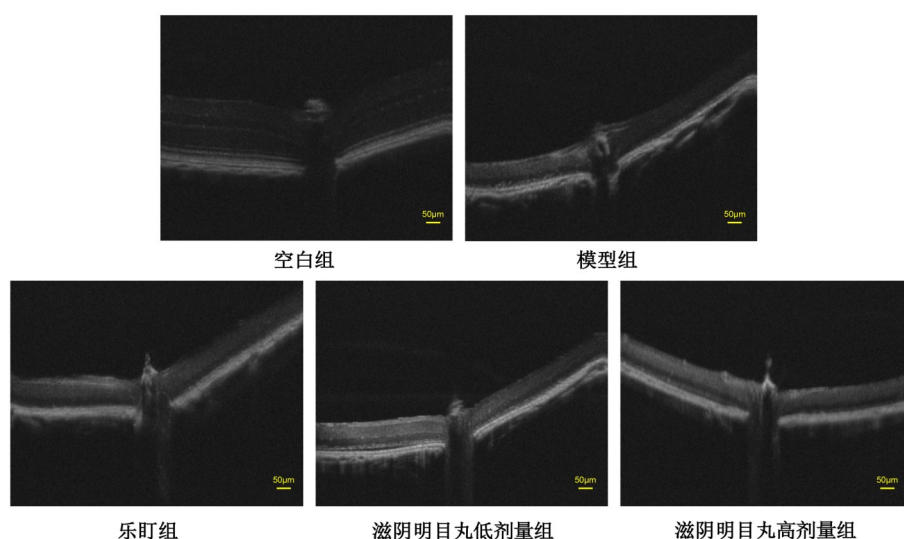
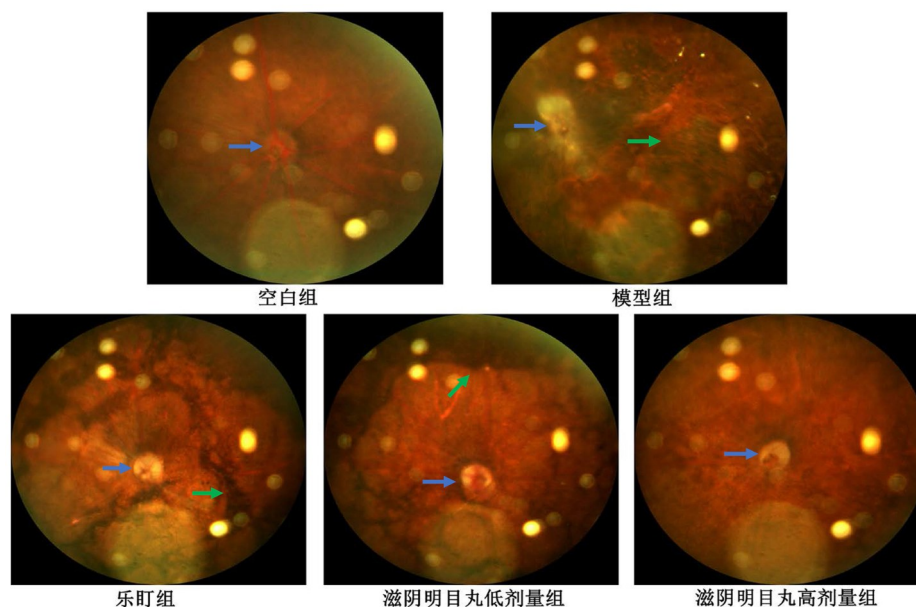


图 1 各组小鼠视网膜形态图 (造影光学相干断层扫描)

Figure 1 Optical coherence tomography images of mice retina in each group



注: 蓝色箭头示视盘, 绿色箭头示色素沉着。

图 2 各组小鼠眼底彩色照相图 (×4)

Figure 2 Fundus photography of mice in each group (×4)

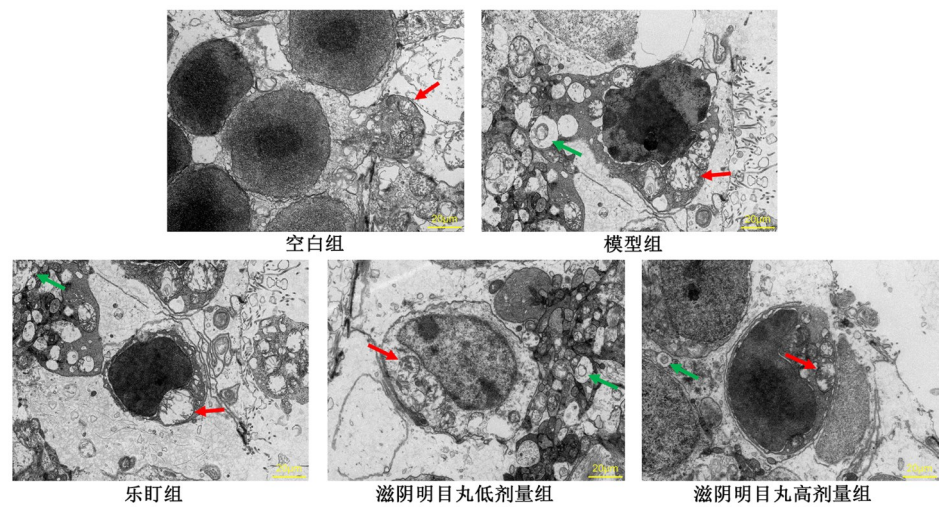
2.2 各组小鼠视网膜超微结构比较

图 3 示, 空白组小鼠视网膜细胞核染色质均匀, 核周隙正常; 线粒体大多膜完整, 基质稀疏, 嵴正常, 未见明显的自噬小体出现。模型组小鼠视网膜细胞核染色质凝集, 核周隙略宽; 线粒体明显肿胀、变大, 膜完整, 基质大量溶解, 嵴断裂、消失, 可见自噬小体。与模型组比较, 乐町组情况大致相同, 滋阴明目丸低、高剂量组线粒体嵴膜结构部分重建, 线粒体破坏程度减轻, 自噬小体数量减少。与滋阴明目丸低剂量组比较, 滋阴明目丸高剂量组视网膜细胞核染色质均匀, 核周隙正

常, 线粒体结构更完整。

2.3 各组小鼠视网膜组织 mTOR、PI3K、Beclin1、ATG5、LC3 蛋白表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组小鼠视网膜组织 mTOR、PI3K 蛋白表达降低, Beclin1、ATG5、LC3II/LC3I 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 乐町组及滋阴明目丸低、高剂量组 mTOR、PI3K 蛋白表达升高, Beclin1 蛋白表达降低, 滋阴明目丸低、高剂量组 ATG5 蛋白表达降低, 乐町组、滋阴明目丸高剂量组 LC3II/LC3I 蛋白表达降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与乐町组比较, 滋阴明



注：红色箭头示线粒体，绿色箭头示自噬小体。

图3 各组小鼠视网膜超微结构透射电镜图（×2000）

Figure 3 Retinal transmission electron micrograph image of mice in each group (×2000)

表3 各组小鼠视网膜组织 mTOR、PI3K、Beclin1、ATG5、LC3 蛋白表达比较

组别	鼠数	mTOR	PI3K	Beclin1	ATG5	LC3II/ LC3I
空白组	3	1.12±0.21	1.41±0.10	0.64±0.06	0.47±0.05	0.20±0.05
模型组	3	0.25±0.06 ^{a)}	0.57±0.05 ^{a)}	1.11±0.03 ^{a)}	1.04±0.14 ^{a)}	0.48±0.04 ^{a)}
乐町组	3	0.82±0.12 ^{b)}	1.25±0.01 ^{b)}	0.71±0.02 ^{b)}	0.94±0.11	0.26±0.07 ^{b)}
滋阴明目丸低剂量组	3	0.60±0.08 ^{c)}	0.79±0.04 ^{c) d)}	0.98±0.02 ^{b) d)}	0.71±0.11 ^{c)}	0.46±0.04 ^{d)}
滋阴明目丸高剂量组	3	0.68±0.10 ^{c)}	0.96±0.09 ^{b) d)}	0.81±0.04 ^{b) f)}	0.63±0.05 ^{b) e)}	0.23±0.05 ^{b) f)}

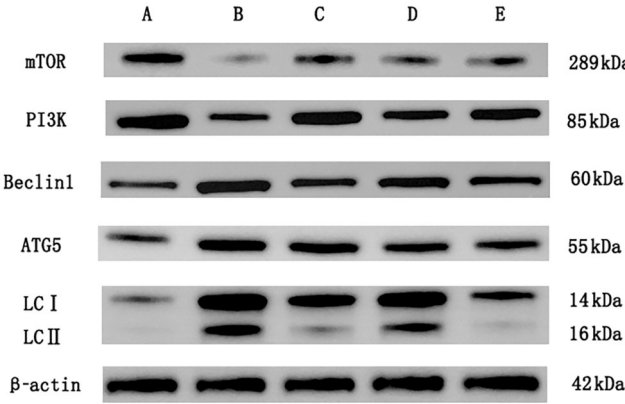
注：mTOR，雷帕霉素靶蛋白；PI3K，磷脂酰肌醇3-激酶；Beclin1，苊氯素1；ATG5，自噬相关蛋白5；LC3，微管相关蛋白1轻链3。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与乐町组比较， $P<0.01$ ；e) 与乐町组比较， $P<0.05$ ；f) 与滋阴明目丸低剂量组比较， $P<0.01$ 。

目丸低剂量组 PI3K 蛋白表达量降低，Beclin1、LC3II/LC3I 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；滋阴明目丸高剂量组 PI3K、ATG5 蛋白表达降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与滋阴明目丸低剂量组比较，滋阴明目丸高剂量组 Beclin1、LC3II/LC3I 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。各组小鼠视网膜组织 mTOR、PI3K、Beclin1、ATG5、LC3 蛋白电泳图见图4。

2.4 各组小鼠视网膜组织 mTOR、PI3K、Beclin1、ATG5、LC3 mRNA 表达比较

表4示，与空白组比较，模型组小鼠视网膜组织 mTOR、PI3K mRNA 表达降低，ATG5、LC3、Beclin1 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，滋阴明目丸低、高剂量组 mTOR、PI3K mRNA 表达升高，乐町组 mTOR mRNA 表达升高，乐町组及滋阴明目丸低、高剂量组 Beclin1、ATG5、LC3 mRNA 表达降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与乐町组比较，滋阴明目丸高剂量组 mTOR mRNA 表达升高 ($P<0.01$)，Beclin1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。



注：A，空白组；B模型组；C，乐町组；D，滋阴明目丸低剂量组；E，滋阴明目丸高剂量组。mTOR，雷帕霉素靶蛋白；PI3K，磷脂酰肌醇3-激酶；Beclin1，苊氯素1；ATG5，自噬相关蛋白5；LC3，微管相关蛋白1轻链3。

图4 各组小鼠视网膜组织 mTOR、PI3K、Beclin1、ATG5、LC3 蛋白电泳图

Figure 4 Western Blot images of mTOR, PI3K, Beclin1, ATG5, and LC3 proteins in retinal tissues of mice in each group

表 4 各组小鼠视网膜组织 *mTOR*、*PI3K*、*Beclin1*、*ATG5*、*LC3* mRNA 表达比较Table 4 Comparison of *mTOR*, *PI3K*, *Beclin1*, *ATG5* and *LC3* mRNA expression in retinal tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	<i>mTOR</i>	<i>PI3K</i>	<i>Beclin1</i>	<i>ATG5</i>	<i>LC3</i>
空白组	3	1.04±0.04	1.06±0.08	1.13±0.15	1.40±0.40	1.17±0.22
模型组	3	0.14±0.01 ^{a)}	0.22±0.08 ^{a)}	4.20±0.69 ^{a)}	29.14±5.29 ^{a)}	9.24±0.97 ^{a)}
乐町组	3	0.43±0.07 ^{b)}	0.36±0.06	2.58±0.39 ^{b)}	17.25±2.35 ^{c)}	6.27±1.02 ^{c)}
滋阴明目丸低剂量组	3	0.49±0.02 ^{b)}	0.50±0.06 ^{c)}	1.62±0.16 ^{b)}	7.96±3.86 ^{b)}	5.66±0.96 ^{c)}
滋阴明目丸高剂量组	3	0.61±0.07 ^{b)} d)	0.62±0.18 ^{b)}	1.44±0.47 ^{b)} e)	10.44±3.35 ^{b)}	5.37±1.52 ^{b)}

注：*mTOR*，雷帕霉素靶蛋白；*PI3K*，磷脂酰肌醇 3-激酶；*Beclin1*，犏氯素 1；*ATG5*，自噬相关蛋白 5；*LC3*，微管相关蛋白 1 轻链 3。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与乐町组比较， $P<0.01$ ；e) 与乐町组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

《仁斋直指方·眼目方论》谓“肝肾之气充，则精采光明，肝肾之气乏，则昏矇运眩。”RP以肝肾亏虚为本、气血瘀滞为标，病因为先天禀赋不足导致肝肾精气不充，久病耗气致血行不畅^[9]。治疗上主张以补虚为主。肝体阴亏，失去柔润之性，肝络拘急，气血不畅，久亦成瘀；肾阴不足，津液亏损，血脉失于濡养，易致为瘀。故临床治疗应注重在辨证施治基础上联合活血化瘀类中药。滋阴明目丸以枸杞子、熟地黄滋补肝肾、益精明目，为君药；黄精、山药、菟丝子、山茱萸、楮实子、石决明助君药补益肝肾、明目除昏，为臣药；丹参、三七、川芎、当归、牛膝、茯苓、牡丹皮养血活血化瘀，为佐药；羌活辛散防滞、引药上行，石菖蒲开窍宣通，为使药。全方共奏滋补肝肾、活血明目之功。

RP的治疗目前缺乏临床特效药，乐町软胶囊的主要成分为叶黄素、维生素、锌等，这些成分在视网膜保护方面具有明确作用^[10-11]。本研究OCT检查发现乐町软胶囊与滋阴明目丸干预后视网膜的结构改善、厚度增加。rd10小鼠是RP的经典动物模型，其病理进程与人类RP相似。眼底照相结果显示rd10小鼠有RP的典型临床表现，滋阴明目丸干预后，眼底的色泽变均匀，色素沉着明显减少。这些结果表明滋阴明目丸具有改善视网膜形态结构的作用。

RP的发病机制与自噬有关，RP发生发展过程中自噬信号可能被过度激活，远超出保护性清除的范畴^[12]。视网膜感光细胞中的自噬作用在1977年被发现，研究^[13-15]也证实视网膜色素上皮细胞存在自噬现象。*PI3K/mTOR*信号通路被认为是参与自噬启动和调控的主要通路^[16]。*PI3K*蛋白家族是始动因子，当其接受来自酪氨酸激酶和G蛋白偶

联受体的信号后，*PI3K*的p110亚基通过与p85亚基结合转化为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸。*mTOR*作为调节蛋白参与细胞自噬调节^[17]。*Beclin1*是哺乳动物中首个被发现的具有调节细胞自噬作用的特异性基因，在介导其他自噬蛋白定位于前自噬小体中起关键作用，是启动自噬过程的标志^[18]。*ATG5*主要位于吞噬泡的外侧，是参与调控自噬的重要基因^[19]。*LC3*是酵母自噬相关蛋白*ATG8*在哺乳动物中的同源物主要有两种形式：1) 当自噬未发生时，细胞内的*LC3*经加工成为自由分布在细胞质中的可溶性*LC3 I*；2) 当自噬发生时，可溶性*LC3 I*被类似泛素化的酶促系统修饰，与磷脂酰乙醇胺结合后形成*LC3 II*，从而促进自噬体的成熟，参与自噬体形成^[20]。本研究通过电镜观察视网膜自噬情况，发现rd10小鼠视网膜组织线粒体结构破坏，自噬小体大量出现，而滋阴明目丸可重建视网膜组织线粒体结构，减少自噬小体数量。滋阴明目丸和乐町软胶囊可以降低rd10小鼠视网膜组织*mTOR*、*PI3K*蛋白和mRNA表达，升高*ATG5*、*LC3*、*Beclin1*蛋白和mRNA表达，说明乐町软胶囊和滋阴明目丸均可以抑制视网膜组织的自噬反应，而滋阴明目丸较乐町软胶囊效果明显，其中以滋阴明目丸高剂量疗效最为显著。

综上所述，滋阴明目丸可以改善视网膜形态结构，减少视网膜组织的自噬，降低视网膜组织*mTOR*、*PI3K*蛋白和mRNA表达，升高*ATG5*、*LC3*、*Beclin1*蛋白和mRNA表达，表明滋阴明目丸可以通过抑制自噬反应以改善视网膜组织的形态结构，延缓视网膜病变进展，进而保护视功能。然而，本研究使用的滋阴明目丸为中药复方粗提物，其化学成分复杂，观察到的药效可能是多种成分协同作用的结果，但究竟是哪些成分进入体内发挥了直接作用，以及其在视网膜组织中的分布和代谢情况尚不明

确。未来需结合血清药物化学或药代动力学研究,明确其药效物质基础。

参考文献

- [1] LIVINGSTON CA, WENG CY, CHANCELLOR JR. Retinitis pigmentosa and therapeutic candidates [J]. Int Ophthalmol Clin, 2025, 65(1): 17-21.
- [2] LIU Y, CHEN SJ, LI SY, et al. Long-term safety of human retinal progenitor cell transplantation in retinitis pigmentosa patients [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1):209.
- [3] IANNUCCI LF, DI BENEDETTO G, LEFKIMMIATIS K. PRKA/PKA signals and autophagy: space matters [J]. Autophagy, 2021, 17(6):1563-1564.
- [4] EL-ASRAG ME, SERGOUNIOTIS PI, MCKIBBIN M, et al. Biallelic mutations in the autophagy regulator DRAM2 cause retinal dystrophy with early macular involvement [J]. Am J Hum Genet, 2015, 96(6): 948-954.
- [5] 艾慧, 夏飞, 李波, 等. 视网膜色素变性的中医综合治疗及用药规律分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(2):165-169.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996:1103.
- [9] 彭清华. 中医眼科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021, 185.
- [10] OU C, SONG HP, PENG J, et al. Lycium barbarum L. and Salvia miltiorrhiza Bunge extract ameliorates retinitis pigmentosa in rd10 mice by affecting endoplasmic reticulum stress [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 337 (Pt 3): 118971.
- [11] OU C, JIANG PF, TIAN Y, et al. Fructus Lycii and Salvia miltiorrhiza Bunge extract alleviate retinitis pigmentosa through Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 273: 113993. doi: 10.1016/j.jep.2021.113993.
- [12] YI Z, WEN C, DU H, et al. Retinitis pigmentosa-associated gene TRIM49 regulates ULK1-mediated autophagy and photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium [J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12(43): e12305.
- [13] REMÉ CE, YOUNG RW. The effects of hibernation on cone visual cells in the ground squirrel [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1977, 16(9): 815-840.
- [14] 陈云珍, 张晶晶. 自噬激活剂雷帕霉素对A2E诱导视网膜色素上皮细胞自噬调节的影响[J]. 眼科新进展, 2022, 42(12): 942-946.
- [15] 师若迪, 徐晨, 俞洋. 雷帕霉素对光诱导下视网膜色素上皮细胞自噬的影响[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(9): 658-664.
- [16] 王洋, 张斐, 刘瑞芳, 等. 疏肝补肾方对卵巢早衰大鼠PI3K/AKT/mTOR信号通路的调节作用[J]. 时珍国医国药, 2025, 36(15): 2807-2813.
- [17] SHANG C, ZHOU H, LIU W, et al. Iron chelation inhibits mTORC1 signaling involving activation of AMPK and REDD1/Bnip3 pathways [J]. Oncogene, 2020, 39(29): 5201-5213.
- [18] TRAN S, FAIRLIE WD, LEE EF. BECLIN1: Protein structure, function and regulation [J]. Cells, 2021, 10(6):1522.
- [19] 程建超, 童佳兵, 朱洁, 等. 芪玉三龙汤调节Beclin1, Atg5, LC3B表达以抑制肺癌肿瘤生长机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(9): 29-35.
- [20] 汝少国, 朱增光, 崔鹏飞. 细胞自噬与应激反应[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2022, 52(7): 1-13.

Effect of Ziyin Mingmu Pill (滋阴明目丸) on Autophagy in Retinal Pigmentosa Model Mice

OU Chen^{1,2}, YI Zhaolan², HUANG Xinyi², SONG Houpan², XIE Wei^{2,3}, PENG Qinghua^{1,2}

1. First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007; 2. Hunan University of Chinese Medicine; 3. Hunan Provincial Maternal and Child Health Care Hospital

ABSTRACT Objective To investigate the mechanism of *Ziyin Mingmu Pills* (滋阴明目丸, ZMP) in treatment of retinitis pigmentosa. **Methods** Forty-eight rd10 mice were randomly divided into four groups, a model group, a Leding group, a low-dose and a high-dose ZMP group, with 12 mice in each group. Twelve C57BL/6 mice served as blank control group. The low-dose ZMP group was administered with 4.5 g/(kg·d) of ZMP solution by gavage, while the high-dose ZMP group received 9 g/(kg·d) of ZMP solution, and the Leding group received 0.15 g/(kg·d) of Leding soft capsule solution by gavage, once daily for 28 consecutive days. After the intervention, retinal morphology was assessed using optical coherence tomography and fundus photography. Transmission electron microscopy was used to

observe autophagy in retinal tissue. Western Blot was used to detect the expression of mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Beclin1, autophagy-related protein 5 (ATG5), and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) proteins in retinal tissues. Real-time fluorescence quantitative PCR was employed to measure the mRNA expression of *mTOR*, *PI3K*, *Beclin1*, *ATG5*, and *LC3* in retinal tissues. **Results**

Compared with the blank control group, the model group showed disordered retinal structure, unclear layering, and thinner retinal thickness ($P < 0.01$). The fundus appeared bluish-grey with uneven color distribution and extensive pigmentation. Retinal mitochondrial structures were damaged, and autophagic vesicles were visible. The protein and mRNA expression levels of mTOR and PI3K decreased, while those of Beclin1, ATG5, and LC3 II/LC3 I increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the Leding group and the low-dose and high-dose ZMP groups showed varying degrees of improvement in retinal morphology and fundus condition, along with increased retinal thickness ($P < 0.01$). Mitochondrial damage was reduced, and the number of autophagosomes decreased. In the low-dose and high-dose ZMP groups, the protein and mRNA expression levels of mTOR and PI3K increased, while those of Beclin1, ATG5 and LC3 II/LC3 I decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** ZMP can improve retinal tissue morphology and structure in retinitis pigmentosa model mice by inhibiting autophagy, thereby delaying the progression of retinal degeneration and protecting vision function.

Keywords retinitis pigmentosa; *Ziyin Mingmu Pills* (滋阴明目丸); autophagy; retinal tissue

(收稿日期: 2025-09-18; 修回日期: 2026-02-27)

[编辑: 侯建春]

广告

欢迎订阅 2026 年《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R)是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的中医药综合性学术期刊。创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 中医药科技期刊分级目录 T1 级期刊。荣获第五届中国出版政府奖期刊奖, 第二届、第三届、第四届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、循证中医药、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 40.00 元, 全年 960 元。国内读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: (010) 64035632, (010) 64089195。国外发行: 中国国际图书贸易集团有限公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: SM140)。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。

网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

