

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.04.014

益气明目丸对视网膜色素变性大鼠视网膜 Fas、FasL 蛋白表达的影响

蒋鹏飞¹, 王英¹, 潘坤¹, 彭俊², 徐剑¹, 彭清华^{*}

(1. 湖南中医药大学中医学院, 湖南省长沙市雨花区韶山中路 113 号, 410007; 2. 湖南中医药大学第一附属医院)

摘要 目的 探讨益气明目丸治疗视网膜色素变性的可能作用机制。方法 24 只 RCS 大鼠随机分为空白组、模型组、益气明目丸组, 每组 8 只。空白组 RCS (rdy + / +, p + / +) 大鼠 (无视网膜色素变性) 和模型组 RCS (rdy - / -, p - / -) 大鼠 (视网膜色素变性模型) 均灌胃生理盐水 12 ml / (kg · d), 益气明目丸组 RCS (rdy - / -, p - / -) 大鼠灌胃益气明目丸悬浊液 7.8 g / (kg · d)。灌胃 30 天后, HE 染色观察各组大鼠视网膜各层结构, 采用免疫组化法和 Western blot 法检测各组大鼠视网膜中 Fas、FasL 蛋白表达。结果 HE 染色显示, 益气明目丸组大鼠视网膜厚度明显较模型组大鼠视网膜增厚, 视网膜色素上皮条带部分可见, 部分外核层光感受器感觉纤毛层部分可见, 光感受器细胞核数目较模型组多, 外丛状层、外核层、视杆视锥层较模型组结构清晰且增厚。免疫组化法结果显示, 与空白组比较, 模型组 Fas、FasL 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益气明目丸组 Fas、FasL 蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且与空白组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。Western blot 法结果显示, 与空白组比较, 模型组 Fas、FasL 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益气明目丸组 Fas 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), FasL 蛋白表达明显降低, 但仍高于空白组 ($P < 0.01$)。结论 益气明目丸对视网膜色素变性大鼠视网膜的超微结构具有保护作用, 其机制可能是通过抑制视网膜 Fas、FasL 蛋白表达, 从而减轻视网膜感光细胞的凋亡, 达到保护视细胞的目的。

关键词 视网膜色素变性; 益气明目丸; Fas; FasL; 细胞凋亡

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一组以进行性感光细胞及色素上皮功能丧失为共同表现的遗传性视网膜疾病, 根据不同的遗传学方法, 视网膜色素变性可以分为常染色体显性^[1]、常染色体隐性^[2]、X 连锁^[3]等。RP 是最常见的遗传性危害眼底的致盲性眼病之一^[4], 大多数 RP 患者在青少年时期发病, 发病时隐匿, 主要临床特征为夜盲、进行性视野缺损、眼底的特征性改变以及视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 异常^[5], 晚期仅残留中央管状视野, 严重影响患者生活质量, 若不及时治疗, 病情将持续发展^[6]。大多数学者认为, RP 的视力损伤机制与视网膜感光细胞的凋

亡有关^[7]。本研究以视网膜色素变性皇家外科学院 (Royal College Surgeons, RCS) (rdy - / -, p - / -) 大鼠^[8]为研究对象, 通过观察益气明目丸对 RCS (rdy - / -, p - / -) 大鼠视网膜各层结构、凋亡相关因子受体 Fas 与凋亡相关因子配体 FasL 的相对蛋白表达的影响, 探讨益气明目丸治疗 RP 的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 RCS 大鼠 24 只, 1.5 月龄, 体重 75 ~ 130 g, 其中 16 只 RCS (rdy - / -, p - / -) 大鼠, 8 只 RCS (rdy + / +, p + / +) 大鼠, 两种大鼠均雌雄各半, 实验动物合格证号: 201614068, 苏州昭衍新药研究中心有限公司, 饲养在湖南中医药大学实验楼动物实验中心 SPF 级实验房, 湿度 50% ~ 55%, 室温 (23 ± 2) °C, 自由进食进水, 每 3 ~ 4 天更换 1 次垫料。RCS (rdy - / -, p - / -) 大鼠

基金项目: 国家自然科学基金 (30772824, 81574031); 湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科开放基金 (2015ZYD02); 湖南省科技创新平台与人才专项重点实验室和工程技术研究中心建设项目 (2017TP1018); 长沙市 2017 年度落实“创新 33 条”政策第四批科技计划 (kc1704005)

* 通讯作者: pqh410007@126.com

为视网膜色素变性模型大鼠; RCS (rdy + / + , p + / +) 大鼠为未造模大鼠, 即无视网膜色素变性病变, 两组大鼠除视网膜色素变性外无任何不同。

1.2 主要药品和试剂

益气明目丸 (湖南中医药大学第一附属医院药剂科, 湘药制字 Z20080745), 组成: 党参 10 g, 黄芪 15 g, 白术 10 g, 菟丝子 15 g, 山药 10 g, 茯苓 10 g, 黄精 15 g, 北柴胡 10 g, 葛根 10 g, 丹参 15 g, 当归 10 g, 三七粉 7 g, 甘草 3 g, 用灭菌蒸馏水配制成浓度为 0.156 g/ml 混悬液, 室温摇匀。

水合氯醛 (上海国药集团化学试剂有限公司, 批号 20151023); HE 染色液 (上海如吉科技发展有限公司, 批号: 71020784); RIPA 蛋白裂解液 (批号: G2002)、转移缓冲液 (批号: G2017)、ECL 发光试剂盒 (批号: G2014), 均为武汉赛维尔生物科技有限公司产品; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: P0006)、细胞裂解液 (批号: P0013), 均为江苏碧云天生物技术有限公司产品; 脱脂奶粉 (伊利公司, 批号 G5002); 羊抗兔二抗 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号: GB23303); 3% H_2O_2 (江西健宝医药科技有限公司, 批号: 20170810); Fas 单抗隆抗体 (批号: kt54223)、FasL 单抗隆抗体 (批号: kt21599), 均为武汉默沙克生物科技有限公司产品; Polymer Helper (批号: E-EL-R0373c)、polymeroxidase-anti-mouse/rabbit IgG (批号: 68405S), 均为武汉伊莱瑞特生物科技有限公司产品。

1.3 主要仪器

电泳仪 (北京六一仪器厂, 型号 DYY-6C); 轮转石蜡切片机 (徕卡, 型号 RM2235); 数码医学图像分析系统 Motic 6.0 (深圳市沅恒科技有限公司); -80℃ 超低温冰箱 (中科美菱低温科技有限责任公司, 型号 DW-HL538); 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂, 型号 YXQ-LS-S II); 净化工作台 (苏州净化设备有限公司, 型号 SW-CJ-1D); 电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司, 型号: 101-1AB); 低温台式高速离心机 (赫西仪器装备有限公司, 型号 HR/T 16M); 超微量分光光度计 (型号 nanodrop2000c); 台式高速冷冻离心机 (型号 Thermo ST8), 均为美国赛默飞公司产品; 凝胶成像系统 (美国伯乐公司, 型号 1708495); 微量移液器 (德国艾本德股份公司, 型号 3111000807); 垂直板电泳槽 (型号 DYCZ-24D)、水平电转槽

(型号 DYCP-40C)、水平摇床 (型号 WD-9405B) 均为北京六一仪器厂产品; 超纯水仪 (Millipore 公司, 型号 Millipore-Q A10); 紫外可见分光光度计 (上海 Spectrum 公司, 型号 SP-752); 恒温摇床 (金坛华特实验仪器有限公司, 型号 THZ-82A); 扫描仪 (日本 Canon 公司, 型号 9000F Mark II); 光学显微镜 (上海万衡精密光学仪器厂, 型号 MM-7C)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

将 8 只 RCS (rdy - / , p - / -) 雄鼠依次编为 1~8 号, 从随机数字表第 3 行第 5 个数开始抄录 8 个数 (84、51、67、47、97、19、98、40), 单数划入模型组, 双数划入益气明目丸组, 模型组和益气明目丸组各 4 只。将 8 只 RCS (rdy - / , p - / -) 雌鼠依次编为 9~16 号, 同样方法分为模型组和益气明目丸各 4 只。最终模型组和益气明目丸组各 8 只。8 只 RCS (rdy + / + , p + / +) 大鼠设为空白组。

大鼠适应性饲养 1 周后进行给药。按照人-动物体表面积等效剂量比值表^[8]折算给药剂量。益气明目丸组给予益气明目丸混悬液 7.8 g/(kg · d) 灌胃。模型组和空白组给予生理盐水 12 ml/(kg · d) 灌胃。每日 1 次, 连续 30 天。

2.2 取材方法

于灌胃结束后 24 h 取材。用 10% 水合氯醛 3.5 ml/kg 腹腔注射麻醉后, 迅速摘取两只眼球, 断颈处死大鼠。从每组眼球中选取 1 只固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 用于 HE 染色和免疫组化检测。剩下另一只眼球置于冰块上, 在显微镜下用眼科显微器械仔细去除眼前节及玻璃体等多余组织, 小心分离视网膜组织后, 将其置于 EP 管内, 保存于 -80℃ 冰箱中, 用于 Western blot 法检测。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 HE 染色观察视网膜形态 经脱水浸蜡、二甲苯溶液脱蜡、无水乙醇洗蜡、乙醇浸泡、自来水洗、苏木素染色、乙醇盐酸分色、伊红染色、乙醇分色脱水、二甲苯溶液透明、中性树脂封片等步骤, 在光学显微镜下观察并拍照。

2.3.2 免疫组化法检测大鼠视网膜 Fas、FasL 蛋白表达 1) 脱蜡、复水组织切片; 2) 根据所应用的一抗的特殊要求, 对组织切片进行预处理; 3) 3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min, 用来阻断内源性过氧化物酶; 4) PBS 冲洗 2 min × 3 次; 5) 滴

加 Fas、FasL 单克隆抗体, 室温或 37℃ 孵育 1~2 h 或 4℃ 过夜, PBS 冲洗 2 min × 3 次; 6) 滴加 Polymer Helper, 室温或 37℃ 孵育 20 min, PBS 冲洗 2 min × 3 次; 7) 滴加 polymeroxidase-anti-mouse/rabbit IgG, 室温或 37℃ 孵育 20 min, PBS 冲洗 2 min × 3 次; 8) 应用 DAB 溶液显色; 9) 自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片。在高放大倍率显微镜下观察到 Fas、FasL 蛋白的表达。标准如下: 细胞质为棕色或深棕色为阳性标记, 使用高倍显微镜随机选择 5 个视网膜视野, 用图像分析系统分析各组大鼠视网膜 Fas、FasL 平均光密度值。

2.3.3 Western blot 法检测大鼠视网膜 Fas、FasL 蛋白表达 1) 制备蛋白样品: 组织块称量后剪碎、裂解, 4℃ 下离心 5 min (12000 r/min), 取上清液, -20℃ 保存; 2) Bradford 法测定蛋白质含量; 3) SDS-PAGE 凝胶电泳: 清洗并晾干玻璃板, 灌胶后计算上样量, 然后电泳; 4) 转膜: 垫滤纸, 铺凝胶, 去气泡, 加电转移缓冲液, 4℃ 下, 380 mA 转移 1.5 h; 5) 抗体孵育和显色; 6) 凝胶图像分析: 扫描胶片, 采用图像分析软件 IPP 6.0 对图像进行灰度分析。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 若满足正态性和方差齐性, 多组比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 q 检验 (S-N-K 法); 非正态性、方差不齐的计量资料, 组间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠视网膜组织 HE 染色结果

图 1 示, 空白组大鼠视网膜色素上皮层、视杆视锥层、外核层、外丛状层、内核层、内丛状层、神经节细胞层、神经纤维层等各层结构清晰正常。

模型组大鼠视网膜的厚度明显薄于空白组, 其主要病灶位于外层视网膜, 视细胞萎缩变性, 上皮细胞不连续并大部分损失, 视网膜的外层较薄, 部分感光细胞形态欠规则, 且细胞核数量减少, 大部分区域无外感光器核染色, 一小部分区域可见聚集成团的细胞核染色, 并有少量的点状黑色素颗粒散在视网膜内层。益气明目丸组大鼠视网膜厚度明显高于模型组, 并且可以见到一部分视网膜色素上皮感光细胞核的数量大于模型组, 外丛状层、外核层、视杆视锥层的结构厚于模型组, 并且结构更清晰。

3.2 免疫组化法检测各组大鼠视网膜 Fas、FasL 蛋白表达比较

空白组视网膜色素上皮层、视杆视锥层、外核层、外丛状层、内核层、内丛状层、神经节细胞层、神经纤维层等各层结构形态规则, 排列整齐; 在视网膜外层可见少量 Fas 蛋白与 FasL 蛋白分散表达。模型组视网膜各层结构紊乱萎缩变薄, 病灶集中在外层视网膜, 视细胞萎缩变性, 视网膜色素上皮细胞不连续并大部分损失; 视网膜的外层较薄, 部分感光细胞形态欠规则, 且细胞核数量减少, 大部分区域无外感光器核染色, 一小部分区域可见聚集成团的细胞核染色, 并有少量的点状黑色素颗粒散在视网膜内层; 视网膜外层明显可见大量 Fas 蛋白与 FasL 蛋白表达, 其余视网膜各层也可见部分表达。益气明目丸组视网膜厚度明显高于模型组且视网膜色素上皮部分可见, 光感受器细胞核数量多于模型组, Fas 蛋白与 FasL 蛋白在视网膜中的阳性表达显著低于模型组, 但高于空白组。表 1 示, 与空白组比较, 模型组 Fas、FasL 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益气明目丸组 Fas、FasL 蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且与空白组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

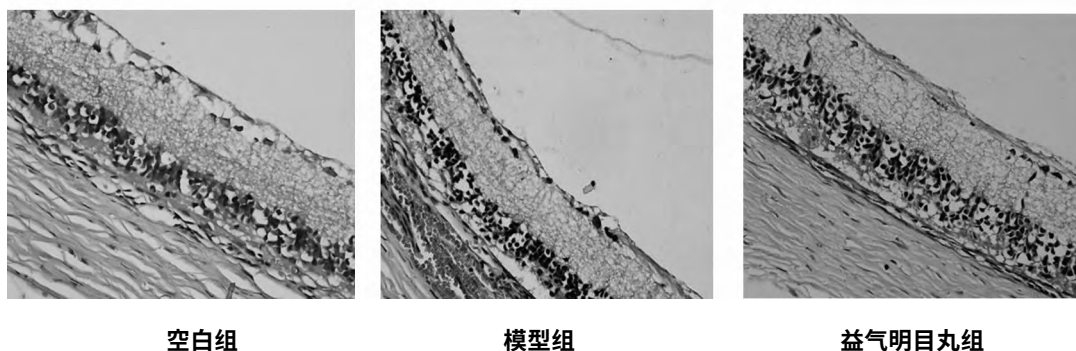


图 1 各组大鼠视网膜组织 HE 染色病理图 (×400)

表 1 各组大鼠视网膜 Fas、FasL 蛋白表达免疫组化法检测结果比较 (平均光密度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Fas	FasL
空白组	8	0.015 ± 0.004	0.010 ± 0.004
模型组	8	0.029 ± 0.008*	0.026 ± 0.007*
益气明目丸组	8	0.021 ± 0.008 [△]	0.004 ± 0.001 ^{△△}

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3.3 Western blot 法检测各组大鼠视网膜 Fas、FasL 蛋白表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组 Fas、FasL 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益气明目丸组 Fas 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), FasL 蛋白表达明显降低, 但仍高于空白组 ($P < 0.01$)。各组大鼠视网膜 Fas、FasL 蛋白电泳图见图 2。

表 2 各组大鼠视网膜 Fas、FasL 蛋白表达 Western blot 法检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Fas	FasL
空白组	8	0.27 ± 0.13	0.21 ± 0.10
模型组	8	0.69 ± 0.15*	0.68 ± 0.13*
益气明目丸组	8	0.38 ± 0.14	0.43 ± 0.22* [△]

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

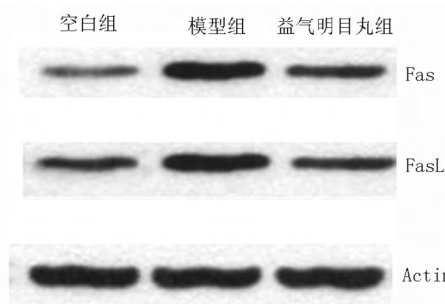


图 2 各组大鼠视网膜 Fas、FasL 蛋白电泳图

4 讨论

中医学将 RP 归为“高风内障”范畴, 并认为“虚”是 RP 发生的主要原因, 或肾阳虚亏, 命门火衰; 或肝肾两亏, 精血不足, 阴阳不济, 阳气不能为用; 或脾胃虚弱, 清阳不升, 浊阴上盛, 阳不彰明; 或气血不足, 气虚无以摄血, 血虚致瘀, 阻碍气机等。我们认为, RP 的主要发病机制为本虚标实, 虚中夹瘀, 且血瘀贯穿始终^[10-11]。治则为补脾益气、活血明目。益气明目丸方中党参、黄芪、白术、山药、茯苓、黄精健脾补虚, 益气明目; 山药、黄精、菟丝子既可补脾, 又可补肾, 久

服聪耳明目; 柴胡助补益药升举清阳, 上达于目; 当归、丹参养血活血以化瘀; 葛根可助柴胡升举脾胃之清气, 又因葛根含黄酮苷, 现代研究认为其能扩血管, 增加血流^[12], 用此以助当归、丹参加强活血化瘀, 改善微循环, 增加局部营养, 以提高视网膜功能。诸药合用, 共奏补脾益气、活血明目之功。

视网膜感光细胞能将视觉信号转换为光能信号, 是传送视觉信息的第一级神经元, 在视觉形成中占据着举足轻重的地位^[13]。细胞凋亡是细胞自主有序死亡的过程, 它由基因控制, 并分为起始、效应器、凋亡执行三个阶段, 各个阶段的完成也受到相关基因的激活、表达以及调控等^[14]。视网膜中的感光细胞很脆弱, 随着人造光源的污染增加以及来自外界环境的光刺激都极易引起感光细胞损伤, 而感光细胞一旦受损, 便无法再生^[15]。感光细胞的凋亡是 RP 病程的最终结局, 所以通过有效的方法延缓或者抑制视网膜感光细胞的凋亡是治疗 RP 的关键所在。

Fas/FasL 系统介导的受体途径是细胞凋亡的经典途径之一^[16]。Fas 在体内表达的部位十分有限, 通常分布于免疫豁免器官 (眼和睾丸)^[17]。FasL 是 Fas 的天然配体, Fas 与配体 FasL 结合后, 可以直接激活死亡受体途径, 通过一系列反应过程, 最后导致执行型半胱氨酸天冬酶的激活, 引起细胞凋亡^[18-19]。Fas/FasL 系统可诱导多种细胞的凋亡, 如干扰素- γ 可通过调节 Fas/FasL 信号通路影响白血病细胞的凋亡^[20], 抗肿瘤效应 B 细胞通过 Fas / FasL 系统的凋亡途径可直接杀死肿瘤细胞^[21], 边缘毒素可通过激活 Fas / FasL 介导的凋亡途径诱导人肝癌 BEL-7402 细胞体外和体内凋亡^[22]。Fas / FasL 介导的凋亡途径还可诱导脑缺血/再灌注损伤的细胞凋亡^[23]。研究表明, Fas / FasL 触发的细胞凋亡导致视网膜感光细胞的大量损失, 但只有膜结合 FasL 触发感光细胞死亡, 而可溶性 FasL 表现出神经保护作用^[24]。

研究证实, RCS (rdy - / -, p - / -) 大鼠具有虚中夹瘀证候^[25]。RCS 大鼠由 Bourne 等^[26]首先报道, 其出生后 8 周时, 后极部视网膜色素上皮 (RPE) 细胞开始丢失; 10 周时, 在 RPE 丢失的地方, 毛细血管内皮细胞变厚, 内皮窗消失, 这种退行性改变的多中心发生在视网膜的不同地方^[27]; 12 周时所有的光感受器细胞均消失, 退行光感受器相邻的一些 RPE 细胞与同龄正常的 RPE 细胞相

比, 基底面的皱褶明显增多, 细胞质中的线粒体增加^[2]。RCS (rdy - 1, p - / -) 大鼠的 RPE 细胞存在一种基因突变, 使 RPE 细胞不能吞噬脱落的膜盘, 从而导致了病变的发生^[2]。本研究以该种遗传性 RCS (rdy - 1, p - / -) 大鼠作为干预对象, 益气明目丸组经过 30 天干预后, 视网膜各层组织结构、视网膜厚度均高于模型组, Fas、FasL 蛋白表达也明显低于模型组, 表明益气明目丸可能通过抑制视网膜 Fas、FasL 等凋亡相关因子的表达抑制视网膜感光细胞的凋亡。

综上所述, 益气明目丸可能通过抑制视网膜 Fas、FasL 蛋白的表达, 从而抑制 RP 的感光细胞的凋亡, 改善视网膜超微结构及视功能, 这可能是益气明目丸治疗 RP 有效的可能机制之一。本研究也存在一些局限性, 虽然 Fas/FasL 系统是细胞凋亡的经典途径, 但可能有其他途径对细胞凋亡产生影响, 益气明目丸是否还通过抑制或降低其他细胞凋亡途径而影响感光细胞的死亡还不清楚, 仍然需要进行更深一步的研究与探索。

参考文献

- [1] JONES BW, PFEIFFER RL, FERRELL WD, et al. Retinal remodeling in human retinitis pigmentosa [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 150: 149-165. doi: 10.1016/j.exer.2016.03.018.
- [2] WEISZ HUBSHMAN M, BROEKMAN S, VAN WIJK E, et al. Whole-exome sequencing reveals POC5 as a novel gene associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(4): 614-624.
- [3] PAWLYK BS, BULGAKOV OV, SUN X, et al. Photoreceptor rescue by an abbreviated human RPGR gene in a murine model of X-linked retinitis pigmentosa [J]. *Gene Ther*, 2016, 23(2): 196-204.
- [4] VERBAKEL SK, VAN HUET RAC, BOON CJF, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa [J]. *Prog Retin Eye Research* 2018, 66(9): 157-186.
- [5] FAHIM AT, DAIGER SP, WELEBER RG. Nonsyndromic retinitis pigmentosa overview [M]. Seattle: University of Washington, 2017: 1993-1995.
- [6] VAN SCHIL K, KARLSTETTER M, ASLANIDIS A, et al. Autosomal recessive retinitis pigmentosa with homozygous rhodopsin mutation E150K and non-coding cis-regulatory variants in CRX-binding regions of SAMD7 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21307. doi: 10.1038/srep21307.
- [7] DAIGER SP, SULLIVAN LS, BOWNE SJ. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa [J]. *Clin Genet*, 2013, 84(2): 132-141.
- [8] 胡小凤, 黎晓新. 视网膜色素变性的自然动物模型及人工造模 [J]. *眼科研究*, 2007, 25(2): 157-160.
- [9] 罗永煌. 药理学实验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 9.
- [10] 彭清华, 李传课. 视网膜色素变性虚中夹瘀的机理研究小结 [J]. *中国医药学报*, 1993, 8(6): 7-10, 61.
- [11] 彭清华, 罗萍, 江晓芬, 等. 视网膜色素变性血瘀机理的初步研究 [J]. *国医论坛*, 1993(1): 37-40.
- [12] 侯晓敏, 秦小江. 葛根素对大鼠离体冠状动脉血管环的舒张作用及其机制研究 [J]. *中国药物与临床*, 2014, 14(1): 36-37.
- [13] ISHIKAWA M, SAWADA Y, YOSHITOMI T. Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells [J]. *Exp Eye Res*, 2015, 133: 3-48. doi: 10.1016/j.exer.2015.02.017.
- [14] MEIER P, FINCH A, EVAN G. Apoptosis in development [J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 796-801.
- [15] 叶河江, 王莹, 张露, 等. 针刺对感光细胞凋亡大鼠视网膜形态学的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2012, 39(9): 1857-1859.
- [16] PARK JB, LEE JK, PARK EY, et al. Fas/FasL interaction of nucleus pulposus and cancer cells with the activation of caspases [J]. *Int Orthop*, 2008, 32(6): 835-840.
- [17] ZHANG J, JIN P P, GONG M, et al. Roles of Fas/FasL-mediated apoptosis and inhibin B in the testicular dysfunction of rats with left-side varicocele [J]. *Andrologia*, 2018, 50(2). doi: 10.1111/and.12850.
- [18] RISTIC T, DJORDJEVIC VB, DELJANIN-ILIC M, et al. Serum Fas/FasL levels in dependence on clinical presentations of coronary disease and their relationship with risk factors [J]. *Vojnosanit Pregl*, 2010, 67(7): 537-542.
- [19] CARNEVALE G, CARPINO G, CARDINALE V, et al. Activation of Fas/FasL pathway and the role of c-FLIP in primary culture of human cholangiocarcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14419. doi: 10.1038/s41598-017-14838-3.
- [20] XIA HL, LI CJ, HOU XF, et al. Interferon- γ affects leukemia cell apoptosis through regulating Fas/FasL signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(9): 2244-2248.
- [21] TAO H, LU L, XIA Y, et al. Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10 [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(4): 999-1009.
- [22] HU X, HE D, ZHOU C, et al. Marginatoxin induces human hepatoma BEL-7402 cells apoptosis in vitro and in vivo via activation of Fas/FasL-mediated apoptotic path-

- way [J]. Biomed Res, 2017, 28(3): 1242-1246.
- [3] ZHANG JF, SHI LL, ZHANG L, et al. MicroRNA-25 negatively regulates cerebral ischemia/reperfusion injury-induced cell apoptosis through Fas/FasL pathway [J]. J Mol Neurosci, 2016, 58(4): 507-516.
- [4] MATSUMOTO H, MURAKAMI Y, KATAOKA K, et al. Membrane-bound and soluble Fas ligands have opposite functions in photoreceptor cell death following separation from the retinal pigment epithelium [J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1986. doi: 10.1038/cddis.2015.334.
- [5] 徐剑. 基于 RHO、XBP1、Caspase12 表达探讨枸杞、丹参对虚中夹瘀证 RP 模型大鼠的干预研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [6] BOURNE MC, CAMPBELL DA, TANSLEY K. Hereditary degeneration of the rat retina [J]. Br J Ophthalmol, 1938, 22(10): 613-623.
- [7] NEUHARDT TH, MAY CA, WILSCH C, et al. Morphological changes of retinal pigment epithelium and choroid in rd-mice [J]. Exp Eye Res, 1999, 68(1): 75-83.
- [8] LUE CL. Rod cell activity in retinal degenerative rats [J]. J Formos Med Assoc, 1994, 93(7): 605-610.
- [9] STRAUSS O, STUMPF F, MERGLER S, et al. The Royal College of Surgeons rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect [J]. Acta Anat, 1998, 162(2-3): 101-111.

Effects of *Yiqi Mingmu Pills* (益气明目丸) on Retinal Fas, FasL Protein Expression in Retinal Pigmented Rats JIANG Pengfei¹, WANG Ying¹, PAN Kun¹, PENG Jun², XU Jian¹, PENG Qinghua¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yiqi Mingmu Pills* (益气明目丸) in treatment of retinitis pigmentosa (RP). **Methods** A total of 24 RCS rats were randomly divided into blank group, model group and *Yiqi Mingmu Pills* group, with 8 rats in each group. The blank group RCS rats (rdy + / +, p + / +), and the model group RCS rats (rdy - / -, p - / -) were given 12 ml/(kg · d) of normal saline by gavage. The *Yiqi Mingmu Pills* group RCS rats (rdy - / -, p - / -) were given 7.8 g/(kg · d) of suspension turbid solution of *Yiqi Mingmu Pills*. After intragastric administration for 30 days, the structure of retina layers was observed by HE staining. Expressions of Fas and FasL in retinal tissues of each group were detected by immunohistochemistry and Western Blot method. **Results** HE staining showed that the retina thickness of rats in *Yiqi Mingmu Pills* group was significantly thicker than that of the model group. The retinal pigment epithelial band was partially visible, and part of the outer nuclear layer photoreceptor sensory ciliary layer was visible. The number of photoreceptor cell nuclei was higher than that of the model group. The outer layer, outer core layer, and the visual cone layer were clearer and thicker than the model group. The results of immunohistochemistry showed that the expression of Fas and FasL protein in the model group was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of Fas and FasL protein in *Yiqi Mingmu Pills* group decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and there was no significant difference with the blank group ($P > 0.05$). Western blot analysis showed that the expression of Fas and FasL protein in the model group was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of Fas protein in *Yiqi Mingmu Pills* group was not statistically significant ($P > 0.05$), and the expression of FasL protein was significantly lower, but was still higher than that of the blank group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Yiqi Mingmu Pills* has protective effects on the ultrastructure of RP retina. *Yiqi Mingmu Pills* can reduce the apoptosis of retinal photoreceptor cells and protect the visual cells by inhibiting the expression of Fas and FasL on the retina.

Keywords retinitis pigmentosa; *Yiqi Mingmu Pills* (益气明目丸); Fas; FasL; apoptosis

(收稿日期: 2018-05-04; 修回日期: 2018-11-16)

编辑: 王利芬