

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.17.011

滋阴明目方对视网膜色素变性模型小鼠视网膜组织
凋亡及内质网应激的影响欧晨^{1,2}, 宋厚盼², 谢薇², 王英², 彭俊^{1,2}, 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

[摘要] 目的 探讨滋阴明目方治疗视网膜色素变性的可能机制。方法 将60只rd10小鼠采用随机数字表法分为模型组、维生素A组和滋阴明目方低、中、高剂量组, 每组12只; 另将12只C57BL/6小鼠作为空白组。滋阴明目方低、中、高剂量组小鼠分别给予滋阴明目方13.5、27.0、54.0 g/(kg·d)灌胃, 维生素A组小鼠给予维生素A软胶囊750 IU/(kg·d)灌胃, 空白组和模型组小鼠给予生理盐水13.5 ml/(kg·d)灌胃。各组均每天灌胃1次, 共28天。运用眼底照相、光学相干断层扫描检测小鼠眼底、视网膜形态, TUNEL法检测小鼠视网膜组织细胞凋亡情况, 微滴式数字PCR和免疫荧光双染检测小鼠视网膜组织葡萄糖调节蛋白78 (GRP78)、1型内质网转膜蛋白激酶 (IRE1)、活化转录因子6 (ATF6)、C/EBP同源蛋白 (CHOP) mRNA和蛋白表达水平。结果 模型组小鼠视盘色蜡黄, 眼底萎缩样改变, 可见大片色素沉着, 视网膜血管变细, 可见大量血管白鞘, 视网膜细胞核排列紊乱, 可见大量凋亡细胞; 滋阴明目方各剂量组和维生素A组小鼠眼底状况较模型组均有不同程度改善, 凋亡细胞减少, 其中以滋阴明目方中、高剂量组改善较显著。与空白组比较, 模型组小鼠视网膜厚度减少, GRP78、IRE1、ATF6、CHOP mRNA及蛋白表达均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 维生素A组和滋阴明目方中、高剂量组视网膜厚度均增加, GRP78、IRE1、ATF6 mRNA和蛋白表达均降低; 滋阴明目方低、中、高剂量组CHOP mRNA和蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与维生素A组和滋阴明目方低剂量组比较, 滋阴明目方高剂量组视网膜厚度增加 ($P<0.01$)。与维生素A组比较, 滋阴明目方中、高剂量组GRP78、ATF6、IRE1、CHOP mRNA表达降低, GRP78、CHOP蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与滋阴明目方低剂量组比较, 滋阴明目方中、高剂量组CHOP蛋白表达降低 ($P<0.01$)。结论 滋阴明目方可以通过抑制内质网应激反应以减少视网膜组织的细胞凋亡, 进而延缓视网膜病变进展, 保护视功能, 且具有剂量依赖性。

[关键词] 视网膜色素变性; 内质网应激; 细胞凋亡; 滋阴明目方

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是以进行性视网膜色素上皮和感光细胞功能丧失为共同表现的常见遗传性视网膜变性疾病^[1]。RP患病率约为1/4000, 影响全球超过200万患者^[2]。该病临床表现早期为夜盲, 暗环境下周边视野缺损; 中期夜盲明显, 眼底出现骨细胞样色素沉着、视网膜血管变细、视乳头萎缩; 晚期出现管状视野, 视力

严重下降甚至完全失明^[1]。目前RP尚无有效治疗方法, 关于RP的防治研究已成为眼科领域的重点和难点^[3]。中医学认为, RP主要病机为先天禀赋不足或后天失所养致神光衰微, 虚则气不足, 不能推动血液运行而致血流滞涩; 肾藏精, 肝藏血, 精血互滋互用, 则目有所养, 故临床多以滋补肝肾、活血明目为基本治法^[4]。本团队长期从事RP的防治研究, 总结出滋阴明目方治疗该病, 且已有临床研究^[5-6]表明该方可提高RP患者暗适应b波振幅, 减轻视网膜黄斑中心凹水肿与渗出, 疗效确切。现代研究发现, RP的发病机制与内质网应激密切相关^[7]。内质网应激是一种保护性应激反应,

基金项目: 国家自然科学基金(82074196, 82004427); 湖南省自然科学基金(2023JJ40474); 湖南省教育厅科学研究项目(23B0347); 湖南省重点实验室工程技术研究中心和科技基础条件平台组建立项(2018TP2008); 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组建立项(2017TP1018)

✉ 通讯作者: pengqinghua@hnuucm.edu.cn

当内质网腔内未折叠蛋白或错误折叠蛋白大量聚集时会放大促凋亡信号,导致细胞功能丧失^[8]。据此本研究以 RP 模型 rd10 小鼠为研究对象,从内质网应激角度探讨滋阴明目方治疗 RP 的可能作用机制。本实验方案已通过湖南中医药大学动物实验中心伦理委员会审批(批准号:LL2021042805)。

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, -/-) 60 只,雌雄各半,4 周龄,体质量(20.0±2.0) g,购自美国杰克森实验室,实验动物合格证号:1911A11353。对照实验鼠选用同种系 C57BL/6 小鼠 12 只,雌雄各半,4 周龄,体质量(20.0±2.0) g,由湖南中医药大学动物实验中心采购,实验动物合格证号:430727211103058731。所有小鼠均饲养于湖南中医药大学 SPF 级动物房,温度 23~25℃,湿度 55% 左右,12 h 昼夜循环,自由进食饮水。

1.2 药物

滋阴明目方组成:熟地黄(批号:2108203,产地河南)、枸杞子(批号:NG21112803,产地宁夏)、黄精(批号:2021102508,产地河北)、丹参(批号:TH21102403,产地山东)、川芎(批号:2106076,产地四川)、牛膝(批号:TH21092601,产地河南)各 15 g。所有药材均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,药物用蒸馏水浸泡 2 h 后加水煎煮 2 次,每次 1 h,合并煎液浓缩至浓度 1 g/ml,4℃ 保存备用。维生素 A 软胶囊(5000 IU/粒),批号:190915,青岛双鲸药业有限公司,配制成 1 g/ml 溶液备用。

1.3 主要试剂及仪器

TUNEL 凋亡检测试剂盒(货号:KTA2010),美国 Abbkine 公司;1 型内质网转膜蛋白激酶(IRE1)抗体(货号:ab37073),英国 Abcam 公司;葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)抗体(货号:NBP1-06274SS)、活化转录因子 6 (ATF6)抗体(货号:NBP1-75478SS)、C/EBP 同源蛋白 (CHOP)抗体(货号:NB600-1335SS),美国 Novus Biologicals 公司;QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (货号:1864034),美国 Bio-Rad 公司;戊巴比妥钠(货号:57-33-0),德国 Merck 公司;复方托吡卡胺滴眼液(5 ml/瓶,货号:MP2264),参天制药有限公司;免疫组化笔(货号:BC004),合肥白鲨生物科技有限公司;抗荧光淬灭封片剂(货号:

S2110),北京索莱宝科技有限公司;RNA 提取试剂盒(货号:RC112)、逆转录试剂盒(货号:R123-01),南京诺唯赞生物科技股份有限公司;EDTA 抗原修复缓冲液(货号:G1203),武汉赛维尔生物科技有限公司;山羊抗兔 HRP 二抗(货号:7074)、山羊抗小鼠 HRP 二抗(货号:7076),美国 CST 公司。

BP001 型造影 OCT 眼底照相一体机,美国 Phoenix Research Labs 公司;Panoramic MIDI 型全景扫描仪,匈牙利 3D HISTECH 公司;1861096 型梯度 PCR 仪、1864002 型微流控微滴发生仪、1864001 型微滴式单分子核酸检测仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.4 动物分组与给药

采用随机数字表法将 rd10 小鼠随机分为模型组、维生素 A 组和滋阴明目方低、中、高剂量组,每组 12 只;另将 12 只 C57BL/6 小鼠设为空白组。参照“动物与人体重的每千克体重等效剂量折算系数”^[9]进行折算,滋阴明目方低、中、高剂量组小鼠分别给予滋阴明目方 13.5、27.0、54.0 g/(kg·d)灌胃,其中滋阴明目方低剂量组为临床等效剂量;维生素 A 组给予维生素 A 软胶囊 750 IU/(kg·d)灌胃;空白组和模型组给予生理盐水 13.5 ml/(kg·d)灌胃。各组均每天灌胃 1 次,共 28 天。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 眼底照相、光学相干断层扫描(OCT)检测小鼠眼底、视网膜形态 灌胃结束后,在次日取材前采用随机数字表法,每组选取 6 只小鼠给予 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,麻醉后双眼点滴复方托吡卡胺滴眼液 1 或 2 滴扩瞳。打开眼底照相一体机,将小鼠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。打开眼底照相一体机 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。在距离视神经乳头 200 μm 处测量各组视网膜厚度,采用 Image J 1.8.0 软件分析图片数据。

1.5.2 TUNEL 法检测视网膜组织细胞凋亡情况 每组剩余 6 只小鼠采用随机数字表法选取 3 只,麻醉下摘除眼球,予固定液固定,常规石蜡包埋,切片。严格按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒步骤操作,将石蜡切片依次放入二甲苯 I (15 min)、二甲苯 II (15 min)、无水乙醇 I (5 min)、无水乙醇 II (5 min)、85% 酒精 (5 min)、75% 酒精 (5 min),然后水清洗。用免疫组化笔在组织周围画圈,在圈内滴加蛋

白酶K工作液覆盖组织, 37℃孵育25 min, PBS洗涤3次。再滴加破膜工作液室温下孵育30 min, PBS洗涤3次。随后滴加50 μl反应混合液37℃孵育2 h, PBS洗涤3次, 行DAPI核染色10 min, 抗荧光淬灭封片剂封片, 使用全景扫描仪采集图像。

1.5.3 微滴式数字PCR(ddPCR)法检测视网膜组织GRP78、IRE1、ATF6、CHOP mRNA表达水平 各组剩余3只小鼠麻醉下摘除眼球, 分离视网膜组织进行ddPCR法和免疫荧光双染检测。使用RNA提取试剂盒从视网膜组织中提取总RNA, 再用逆转录试剂盒将mRNA逆转录为cDNA。配制ddPCR反应液: 1 μl cDNA、1 μl引物、8 μl DNase-free water和10 μl Supremix。采用微流控微滴发生仪制备微滴后, 将微滴转移至96孔PCR板上, 封膜仪封膜, 于梯度PCR仪上进行扩增。扩增条件为95℃、5 min后; 95℃、30 s, 58℃、1 min, 40个循环; 4℃、5 min, 90℃、5 min; 4℃保温, 升降温速度≤2℃/s。然后用微滴式单分子核酸检测仪检测微滴, 结果用QuantaSoft software1.7软件进行分析。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称	序列	产物长度/bp
GRP78	上游: CCGAGGAGGAGGACAAGAAGGAG	83
	下游: GAACACACCGACGAGGAATAGG	
IRE1	上游: GAACACAACCTATCGCCGCTACTC	131
	下游: TGTCCACAGCACAATTCCTACTCC	
ATF6	上游: TGCCTTGGGAGTCAGACCTATGG	86
	下游: CTGTGGACCGAGGAGAGGAGATG	
CHOP	上游: CTCAGATTCCAGTCAGAGTTC	150
	下游: ACTCTGTTCCGTTTCCTAGTT	
β-actin	上游: TATGCTCTCCCTCAGCCATCC	129
	下游: GTCACGCACGATTTCCCTCTCAG	

注: GRP78, 葡萄糖调节蛋白78; IRE1, 1型内质网转膜蛋白激酶; ATF6, 活化转录因子6; CHOP, C/EBP同源蛋白。

1.5.4 免疫荧光双染法检测视网膜组织GRP78、IRE1、ATF6、CHOP蛋白表达水平 将石蜡切片依次置于二甲苯(10 min), 100%、95%、85%和75%梯度乙醇(各10 min), 然后水浸洗。用EDTA抗原修复缓冲液于微波炉中对切片进行抗原修复后, 加入3% H₂O₂, 室温孵育10 min以灭活内源性酶。用免疫组化笔圈出视网膜组织, 加入自发荧光淬灭剂, 滴加血清室温封闭20 min。加入GRP78、IRE1、ATF6和CHOP一抗(稀释比例均为1:200),

4℃孵育过夜。PBS浸洗后滴加荧光二抗(山羊抗小鼠、山羊抗兔二抗稀释比例均为1:500), 37℃避光孵育1 h。滴加DAPI避光孵育5 min, 抗荧光淬灭封片剂封片, 使用全景扫描仪采集图像, Image-Pro Plus 6.0软件分析荧光强度。

1.6 统计学方法

采用Graphpad Prism 8软件进行统计分析, 计量资料均符合正态分布且方差齐性, 以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 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 各组小鼠眼底照相结果

图1示, 空白组小鼠眼底呈橘红色, 色泽均匀, 视盘色淡红, 边界清楚, 视网膜动静脉管径均匀。模型组小鼠视盘色蜡黄, 眼底萎缩样改变, 可见大片色素沉着, 视网膜血管变细, 可见大量血管白鞘。维生素A组小鼠视盘色黄, 边界欠清, 眼底可见絮状色素沉着, 分布不规则, 视网膜血管变细, 可见血管白鞘。滋阴明目方低剂量组小鼠视盘色黄, 边界欠清, 眼底萎缩样改变, 周边可见较多色素沉着, 视网膜血管变细, 可见较多血管白鞘。滋阴明目方中剂量组小鼠视盘色淡红, 边界清, 眼底可见片状色素沉着, 分布不规则, 视网膜血管稍变细, 可见少量血管白鞘。滋阴明目方高剂量组小鼠视盘色淡红, 边界清, 眼底可见颗粒样色素沉着, 视网膜血管稍变细, 可见少量血管白鞘。

2.2 各组小鼠视网膜OCT结果

表2示, 与空白组比较, 其余各组小鼠视网膜厚度减少($P < 0.01$)。与模型组比较, 维生素A组和滋阴明目方中、高剂量组视网膜厚度增加($P <$

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	6	229.84±9.43
模型组	6	116.42±8.16 ^{a)}
维生素A组	6	137.96±4.22 ^{a) b) d)}
滋阴明目方低剂量组	6	133.67±11.46 ^{a) d)}
滋阴明目方中剂量组	6	145.85±3.09 ^{a) c)}
滋阴明目方高剂量组	6	167.33±5.57 ^{a) c)}

注: a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与滋阴明目方高剂量组比较, $P < 0.01$ 。

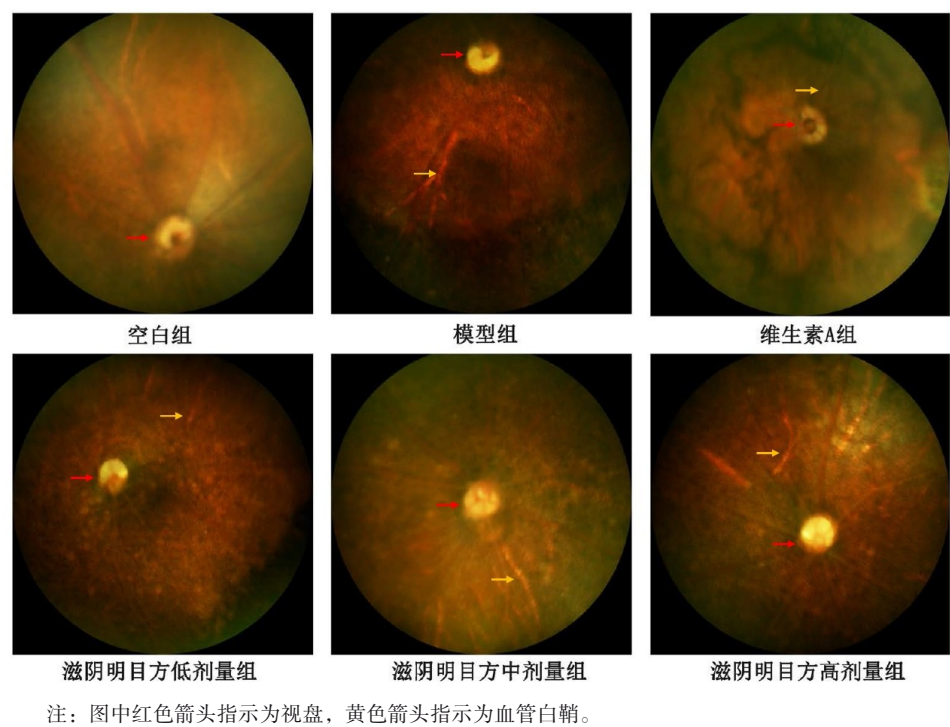


图 1 各组小鼠眼底照相图

Figure 1 Fundus photography of mice in each group

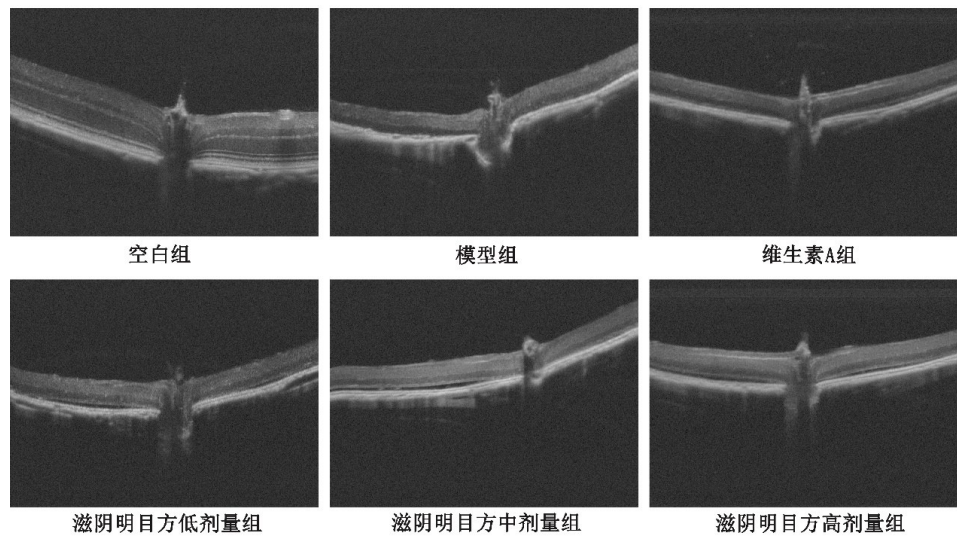


图 2 各组小鼠视网膜光学相干断层扫描图

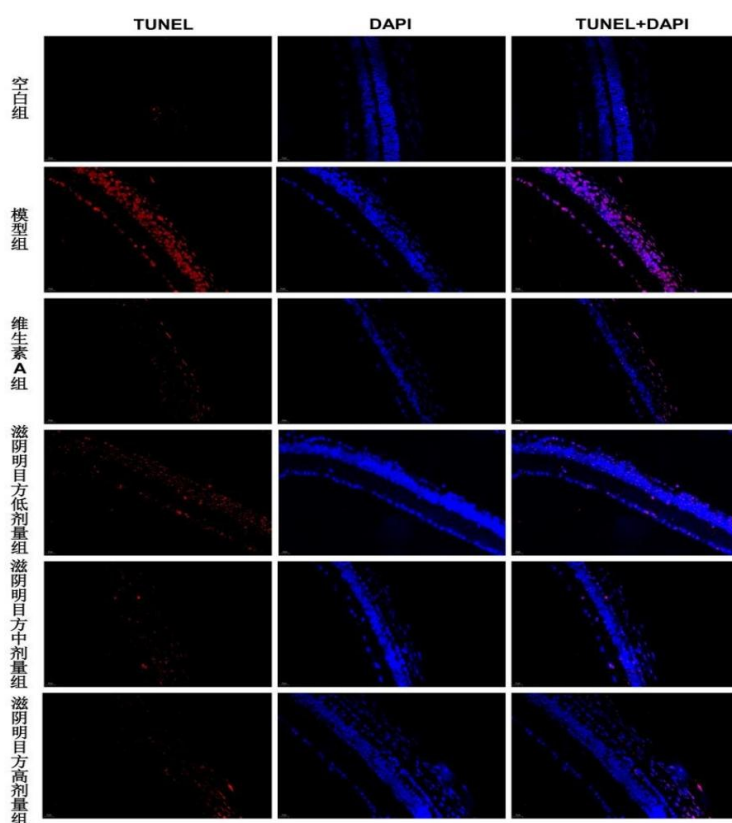
Figure 2 Optical coherence tomography images of mice retina in each group

0.05 或 $P<0.01$), 滋阴明目方低剂量组视网膜厚度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。滋阴明目方高剂量组视网膜厚度高于维生素 A 组、滋阴明目方低剂量组 ($P<0.01$)。图 2 示, 空白组小鼠视网膜形态结构完整, 各层分层明显。模型组小鼠视网膜形态结构紊乱, 萎缩明显, 分层不清。维生素 A 组小鼠视网膜形态结构大致完整, 厚度变薄明显。滋阴明目方低剂量组小鼠视网膜形态结构稍紊乱, 厚度变薄, 分层不清。滋阴明目方中、高剂量组小鼠视

网膜形态结构完整, 厚度稍变薄, 各层分层较明显。

2.3 各组小鼠视网膜组织细胞凋亡情况

图 3 示, 空白组小鼠视网膜细胞核排列紧密, 细胞数量正常, 凋亡细胞少。模型组小鼠视网膜细胞核排列紊乱, 细胞数量减少, 可见大量凋亡细胞。维生素 A 组小鼠视网膜细胞核排列紊乱, 细胞数量减少, 可见凋亡细胞。滋阴明目方低剂量组小鼠视网膜细胞核排列紧密, 细胞数量基本正常, 可见凋亡细胞。滋阴明目方中、高剂量组小鼠视网膜



注：图中红色代表凋亡细胞，蓝色代表DAPI标记的细胞核。

图3 各组小鼠视网膜组织TUNEL染色图 (×400)

Figure 3 TUNEL staining of mice retinal tissue in each group (×400)

细胞核排列紧密，细胞数量正常，可见少量凋亡细胞。

2.4 各组小鼠视网膜组织 GRP78、IRE1、ATF6、CHOP mRNA 表达比较

表3示，与空白组比较，模型组和维生素A组 GRP78、IRE1、ATF6、CHOP mRNA 表达升高，滋阴明目方低剂量组 GRP78、IRE1、ATF6 mRNA 表达升高，滋阴明目方中、高剂量组 GRP78 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较，维生素A组和滋阴明目方低、中、高剂量组 GRP78、

IRE1、ATF6 mRNA 表达降低，滋阴明目方低、中、高剂量组 CHOP mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。与维生素A组比较，滋阴明目方低、中、高剂量组 GRP78、ATF6、CHOP mRNA 表达降低，滋阴明目方中、高剂量组 IRE1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.5 各组小鼠视网膜组织 GRP78、IRE1、ATF6、CHOP 蛋白表达比较

表4示，与空白组比较，模型组、维生素A组、

表3 各组小鼠视网膜组织 GRP78、IRE1、ATF6、CHOP mRNA 表达比较

Table 3 Comparison of GRP78, IRE1, ATF6, and CHOP mRNA expressions in retinal tissues of mice in each group

(copies/ μ l, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	GRP78 mRNA	IRE1 mRNA	ATF6 mRNA	CHOP mRNA
空白组	3	31.57 $\pm$ 6.25	11.60 $\pm$ 2.19	23.20 $\pm$ 3.34	16.33 $\pm$ 1.35
模型组	3	237.00 $\pm$ 12.58 ^{a)}	74.53 $\pm$ 7.22 ^{a)}	74.20 $\pm$ 5.76 ^{a)}	31.50 $\pm$ 4.40 ^{a)}
维生素A组	3	139.70 $\pm$ 17.17 ^{a) c)}	41.60 $\pm$ 5.01 ^{a) c)}	49.33 $\pm$ 6.60 ^{a) c)}	28.90 $\pm$ 2.10 ^{a)}
滋阴明目方低剂量组	3	90.20 $\pm$ 6.05 ^{a) c) d)}	31.10 $\pm$ 6.31 ^{a) c)}	36.90 $\pm$ 4.33 ^{b) c) e)}	19.97 $\pm$ 2.11 ^{c) d)}
滋阴明目方中剂量组	3	78.40 $\pm$ 5.83 ^{a) c) d)}	18.40 $\pm$ 4.43 ^{c) d)}	33.17 $\pm$ 3.06 ^{c) d)}	18.63 $\pm$ 1.90 ^{c) d)}
滋阴明目方高剂量组	3	89.57 $\pm$ 8.91 ^{a) c) d)}	25.20 $\pm$ 4.64 ^{c) e)}	26.47 $\pm$ 2.28 ^{c) d)}	16.67 $\pm$ 0.85 ^{c) d)}

注：GRP78，葡萄糖调节蛋白78；IRE1，1型内质网转膜蛋白激酶；ATF6，活化转录因子6；CHOP，C/EBP同源蛋白。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与维生素A组比较， $P<0.01$ ；e) 与维生素A组比较， $P<0.05$ 。

表4 各组小鼠视网膜组织GRP78、IRE1、ATF6、CHOP蛋白平均荧光强度比较

Table 4 Comparison of mean fluorescence intensity of GRP78, IRE1, ATF6 and CHOP proteins in retinal tissues of mice

		in each group				($\bar{x}\pm s$)
组别	鼠数	GRP78	IRE1	ATF6	CHOP	
空白组	3	34.29±4.35	15.44±2.95	26.55±2.81	35.34±2.92	
模型组	3	116.30±10.47 ^{a)}	71.41±10.95 ^{a)}	91.54±4.75 ^{a)}	85.47±4.40 ^{a)}	
维生素A组	3	81.32±5.89 ^{a) c)}	41.34±4.96 ^{a) c)}	63.62±6.55 ^{a) c)}	55.51±10.11 ^{b) c)}	
滋阴明目方低剂量组	3	62.11±5.89 ^{a) c) e)}	43.80±6.13 ^{a) c)}	65.04±8.49 ^{a) c)}	52.65±4.30 ^{b) c)}	
滋阴明目方中剂量组	3	56.78±6.73 ^{b) c) d)}	44.67±9.01 ^{a) c)}	42.63±8.13 ^{c)}	42.96±8.07 ^{c) e) f)}	
滋阴明目方高剂量组	3	48.78±5.53 ^{c) d)}	25.18±4.63 ^{c)}	38.12±4.75 ^{c)}	38.47±5.00 ^{c) d) f)}	

注：GRP78，葡萄糖调节蛋白78；IRE1，I型内质网转膜蛋白激酶；ATF6，活化转录因子6；CHOP，C/EBP同源蛋白。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与维生素A组比较， $P<0.01$ ；e) 与维生素A组比较， $P<0.05$ ；f) 与滋阴明目方低剂量组比较， $P<0.01$ 。

滋阴明目方低剂量组GRP78、IRE1、ATF6、CHOP蛋白表达升高，滋阴明目方中剂量组GRP78、IRE1蛋白表达亦升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与模型组比较，维生素A组和滋阴明目方低、中、高剂量组GRP78、IRE1、ATF6、CHOP蛋白表达降低（ $P<0.01$ ）。与维生素A组比较，滋阴明目方低、中、高剂量组GRP78蛋白表达降低，滋阴明目方中、高剂量组CHOP蛋白表达降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与滋阴明目方低剂量组比较，滋阴明目方中、高剂量组CHOP蛋白表达降低（ $P<0.01$ ）。

3 讨论

RP可归属于中医学“高风内障”范畴，《诸病源候论·目病诸侯》曰：“人有昼而睛明，致瞑则不见物，世谓之雀目。言其如鸟雀，瞑便无所见也”，将似鸟雀的视光之夜幕不能视物来形容本病的夜盲症状。RP后期视野缩小，可如《秘传眼科龙木论·高风雀目内障》描述的“惟见顶上之物”。本团队认为，RP为素体真阴不足，阴虚不能济阳，阳气不能为用所致，且瘀血贯穿疾病始终，治疗应重在补益真阴，以滋补肝肾、活血明目为基本治法^[5, 10]。滋阴明目方中熟地黄补肝肾、益真阴，为君药；枸杞子益精明目，黄精补气养阴，二者共为臣药；佐以丹参、川芎活血化瘀；使以牛膝补肝肾，引火下行。目前研究证实，维生素A对RP有一定的临床疗效，其可有效改善夜盲症状，促进视紫红质的再生，提高暗环境下的视力，对于维持正常的暗视觉至关重要^[11]，故本研究使用维生素A软胶囊为阳性对照药物。

rd10小鼠是优良的RP动物模型，能表现出相对缓慢的视网膜退化进程^[12]。RP临床典型的三联征是骨细胞样色素沉着、视网膜血管缩窄和视盘蜡

样苍白^[13]。本研究眼底照相观察到rd10小鼠有类似RP典型的临床表现，通过中、高剂量滋阴明目方干预后小鼠眼底表现有明显改善，而低剂量滋阴明目方干预对眼底表现改善作用不明显。OCT是一种重要的眼科检查方式，采用光波作为成像手段，能够直观地表现视网膜及脉络膜的结构，具有非接触性、非侵入性、高分辨率和高灵敏度的特点^[14]。视网膜OCT检测发现滋阴明目方干预后rd10小鼠视网膜形态结构较模型组有所改善，厚度增加，其中滋阴明目方高剂量组小鼠视网膜厚度增加最明显，且形态结构完整，而滋阴明目方低剂量组和维生素A组小鼠视网膜厚度增加不明显。这些结果表明滋阴明目方中、高剂量有保护视网膜结构的作用。

现代研究显示，内质网应激与RP的发病机制有关^[15-16]。随着rd小鼠视网膜组织的变性凋亡，内质网应激反应蛋白被激活^[17]。TUNEL法染色检测显示，滋阴明目方可减少小鼠视网膜组织的细胞凋亡，且以中、高剂量干预效果较显著。GRP78是主要的内质网分子伴侣，主要负责协助蛋白折叠装配及错误折叠蛋白的降解，维持内质网钙稳态和控制内质网应激传感器的激活^[18]。IRE1和ATF6是内质网应激的主要跨膜蛋白，内质网应激发生后，GRP78与IRE1、ATF6发生解离，同时与未折叠蛋白结合，导致下游相关信号通路激活^[18]。IRE1参与肿瘤坏死相关因子2/凋亡信号调节激酶1介导的募集，激活p38丝裂原活化蛋白激酶（p38 MAPK）并使其磷酸化，从而促进CHOP的表达^[19]。ATF6可调控促凋亡蛋白CHOP，促进细胞凋亡的发生^[20]。本研究通过ddPCR法和免疫荧光双染法检测GRP78、IRE1、ATF6、CHOP mRNA和蛋白在小鼠视网膜组织中的表达水平，发现rd10小鼠视

网膜组织内质网应激反应相关因子的 mRNA 和蛋白表达均升高,而滋阴明目方可不同程度降低各相关因子的 mRNA 和蛋白表达水平,且以中、高剂量效果明显,说明滋阴明目方可以抑制视网膜组织内质网应激反应,其效果与药物浓度有关。维生素 A 亦可降低视网膜组织 GRP78、IRE1、ATF6 mRNA 和蛋白表达水平,但在降低 GRP78、IRE1、ATF6、CHOP mRNA 及 GRP78、CHOP 蛋白表达方面,效果不如滋阴明目方中、高剂量组。

综上所述,滋阴明目方可以改善小鼠视网膜的形态结构,减少视网膜组织的细胞凋亡,下调视网膜组织 GRP78、IRE1、ATF6、CHOP mRNA 和蛋白的表达水平,表明滋阴明目方可以通过抑制内质网应激反应以减少视网膜组织的细胞凋亡,进而延缓视网膜病变进展,保护视功能,且具有一定剂量依赖性。然而,本研究并未对内质网应激的相关病理进行过多研究,今后研究可通过蛋白质组学、转录组学、代谢组学等进一步证实滋阴明目方的临床疗效并探讨其作用机制。

参考文献

- [1]世界中医药学会联合会眼科分会.原发性视网膜色素变性国际中医临床实践指南[J].中国中医眼科杂志,2023,33(4):301-304.
- [2]董玉萍,王磊峰,董秋艳,等.视网膜色素变性的流行病学调查[J].武警医学,2015,26(9):950-952.
- [3]欧晨,王英,徐剑,等.视网膜色素变性治疗研究进展[J].国际眼科杂志,2018,18(9):1608-1611.
- [4]刘仁跃,李慧丽,王辉武.中医药治疗视网膜色素变性的研究进展[J].中国中医急症,2023,32(7):1313-1316.
- [5]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.
- [6]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.
- [7]CHAN P, STOLZ J, KOHL S, et al. Endoplasmic reticulum stress in human photoreceptor diseases [J]. Brain Res, 2016, 1648(Pt B):538-541.
- [8]LAN T, YU Q. Cistanches deserticola PhG-RE through Inhibiting ERS Apoptosis mechanism to protect myocardial cell apoptosis from H₂O₂-induced endoplasmic reticulum stress [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020:8219296. doi:10.1155/2020/8219296.
- [9]陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1996:1103.
- [10]彭清华,朱文锋,李传课.视网膜色素变性血瘀机理的研究(103例眼血流图检测)[J].江苏中医,1990,22(1):39-41.
- [11]SIBULESKY L, HAYES KC, PRONCZUK A, et al. Safety of <7500 RE (<25000 IU) vitamin A daily in adults with retinitis pigmentosa [J]. Am J Clin Nutr, 1999, 69(4):656-663.
- [12]郭从容,马景学,张斌,等.rd10小鼠视网膜组织结构和功能变化[J].河北医药,2013,35(11):1635-1636.
- [13]闻思敏,邵毅,周琼.视网膜色素变性发病机制及治疗进展[J].眼科新进展,2020,40(3):279-283,289.
- [14]马媛,王雪,王月,等.OCT在弱视患者眼底研究中的应用[J].国际眼科杂志,2021,21(12):2086-2089.
- [15]OU C, XIE W, JIANG P, et al. Lycium barbarum L. and Salvia miltiorrhiza Bunge protect retinal pigment epithelial cells through endoplasmic reticulum stress [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 296:115519. doi:10.1016/j.jep.2022.115519.
- [16]KANG K, YU M. Protective effect of sulforaphane against retinal degeneration in the Pde6 (rd10) mouse model of retinitis pigmentosa [J]. Curr Eye Res, 2017, 42(12):1684-1688.
- [17]吴乐萌,曹安民,朱秀安,等.rd小鼠遗传性视网膜变性中内质网应激蛋白的激活[J].中华眼科杂志,2008,44(9):807-812.
- [18]STROBERG W, EILERTSEN J, SCHNELL S. Information processing by endoplasmic reticulum stress sensors [J]. J R Soc Interface, 2019, 16(158):20190288.
- [19]耿娜娜,吴明松,郑翔,等.单宁酸联合顺铂增强肝癌 HepG2 细胞 IRE1-XBP1 通路的激活水平[J].天然产物研究与开发,2017,29(11):1934-1939,1894.
- [20]SHARMA RB, SNYDER JT, ALONSO LC. Atf6α impacts cell number by influencing survival, death and proliferation [J]. Mol Metab, 2019, 27S(Suppl):S69-S80.

The Effect of *Ziyin Mingmu Formula* (滋阴明目方) on Retinal Tissue Apoptosis and Endoplasmic Reticulum Stress in Retinitis Pigmentosa Model Mice

OU Chen^{1,2}, SONG Houpan², XIE Wei², WANG Ying², PENG Jun^{1,2}, PENG Qinghua^{1,2}

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

ABSTRACT **Objective** To study the effect of *Ziyin Mingmu Formula* (滋阴明目方) on retinitis pigmentosa mice and its possible mechanism. **Methods** Sixty rd10 mice were randomly divided into model group, vitamin A group, and *Ziyin Mingmu Formula* low-, medium-, and high-dose groups, 12 mice in each group; twelve C57BL/6 mice as the blank group. The mice in *Ziyin Mingmu Formula* low-, medium-, and high-dose groups were given 13.5, 27.0 and 54.0 g/(kg·d) of *Ziyin Mingmu Formula* by gavage, respectively; mice in the Vitamin A group were given 750 IU/(kg·d) of vitamin A soft capsule by gavage; mice in the blank group and model group were given 13.5 ml/(kg·d) of physiological saline by gavage. Each group was gavaged once a day for 28 days. Fundus photography and optical coherence tomography were used to detect the morphology of the fundus and retina, TUNEL method was used to detect apoptosis, microtitre digital PCR and immunofluorescence double staining were used to detect glucose-regulated protein 78 (GRP78), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), activated transcription factor 6 (ATF6), and C/EBP homologous protein (CHOP) mRNA and protein expression levels. **Results** In the model group, optic discs were yellowish, fundus was atrophic with large pigmentation. The retinal blood vessels were thinned, a large number of vascular white sheaths were seen, the retinal cell nuclei disorganised, and a large number of apoptotic cells were seen; the fundus conditions of the mice in all dosages of *Ziyin Mingmu Formula* and the vitamin A group were improved to varying degrees compared with those of the model group, the apoptotic cells reduced, with *Ziyin Mingmu Formula* middle- and high-dose groups showing more significant improvement. Compared with the blank group, the retinal thickness of mice in the model group reduced, and the expression of GRP78, IRE1, ATF6, CHOP mRNA and protein elevated ($P<0.01$). Compared with the model group, retinal thickness increased and GRP78, IRE1, ATF6 mRNA and protein expression decreased in the vitamin A group and *Ziyin Mingmu Formula* medium- and high-dose groups; CHOP mRNA and protein expression decreased in low-, medium-, and high-dose groups of *Ziyin Mingmu Formula* ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with vitamin A group and the low-dose group of *Ziyin Mingmu Formula*, retinal thickness increased in the high-dose group of *Ziyin Mingmu Formula* ($P<0.01$). Compared with vitamin A group, GRP78, ATF6, IRE1, and CHOP mRNA expression decreased in the medium- and high-dose groups of *Ziyin Mingmu Formula*, and GRP78 and CHOP protein expression decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the low-dose group of *Ziyin Mingmu Formula*, CHOP protein expression reduced in the medium- and high-dose groups of *Ziyin Mingmu Formula* ($P<0.01$). **Conclusion** *Ziyin Mingmu Formula* can reduce apoptosis of retinal tissues by inhibiting the endoplasmic reticulum stress response, thus slowing down the progression of retinopathy and protecting visual function in a dose-dependent manner.

Keywords retinitis pigmentosa; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; *Ziyin Mingmu Formula* (滋阴明目方)

(收稿日期: 2024-03-11; 修回日期: 2024-05-21)

[编辑: 邓媛]