

· 基础研究 ·

四君子汤对脾气虚证模型大鼠视网膜脱离
复位后感光细胞凋亡的影响任秀瑜^{1,2} 康紫薇² 张妍春^{2,3} 屈超义^{2,3} 李亚芙² 李京珂¹

摘要 目的 观察四君子汤对脾气虚型大鼠视网膜脱离(RD)自动复位后感光细胞凋亡的影响。方法 成年 SD 大鼠 40 只随机分为对照组(A 组)、RD 自动复位组(B 组)、脾气虚 RD 自动复位组(C 组)、四君子汤组(D 组)。C、D 组使用破气耗气加饥饱失常法制备脾气虚证动物模型;于实验开始后 6 周 B、C、D 组使用视网膜下注射 0.1% 透明质酸钠的手术方法制备 RD 自动复位模型;并分别于术后 2、3 周分批处死动物取材。记录大鼠进食量、体重及大鼠精神状态;测定大鼠血清 D-木糖值、眼内液超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)水平;眼球石蜡切片 HE 染色、原位末端标记(TUNEL)染色;Western Blot 分析视网膜 Caspase-3、SOD2、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)蛋白表达量变化。结果 与 A、B 组比较,C、D 组于术前体重及进食量、血清 D-木糖值明显降低($P<0.05$),C 组上述症状持续至实验结束,D 组于灌服四君子汤后症状改善,术后 3 周,与 A 组比较,血清 D-木糖值差异无统计学意义($P>0.05$);与 C 组比较,D 组进食量在术后 3 周显著增加($P<0.05$)。与 B 组比较,术后 2、3 周 C 组眼内液 T-SOD 活性、视网膜组织 SOD2、HIF-1 α 显著降低,视网膜组织 Caspase-3、感光细胞凋亡指数显著上升($P<0.05$);术后 3 周 MDA 水平显著升高($P<0.05$);与 C 组比较,D 组术后 2、3 周眼内液 T-SOD 活性、视网膜 SOD2、HIF-1 α 显著增高($P<0.05$),Caspase-3 显著降低($P<0.05$);术后 3 周 MDA 水平、感光细胞凋亡指数显著降低($P<0.05$)。结论 脾气虚证通过加重 RD 复位后眼内氧化应激损伤加重视网膜感光细胞凋亡的发生,使用益气健脾经方四君子汤能有效提高眼内抗氧化能力,减少脾气虚证大鼠 RD 复位后感光细胞凋亡,发挥神经保护作用。

关键词 四君子汤;脾气虚证;视网膜脱离自动复位;感光细胞凋亡;氧化应激

Effect of Sijunzi Decoction on Photoreceptor Apoptosis after Experimental Retinal Detachment Rats with Pi Qi Deficiency Syndrome REN Xiu-yu^{1,2}, KANG Zi-wei², ZHANG Yan-chun^{2,3}, QU Chao-yi^{2,3}, LI Ya-fu², and LI Jing-ke¹ 1 Department of Traditional Chinese Medicine, First Clinical Medical College, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an (712000); 2 Department of Ophthalmology, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an (710000); 3 Xi'an Institute of Fundus Diseases, Xi'an (710000)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Sijunzi Decoction (SJZD) on photoreceptor apoptosis after experimental retinal detachment (RD) rats with Pi qi deficiency syndrome (PQDS). **Methods** Forty adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group (Group A), RD automatic reattachment group (Group B), RD automatic reattachment with PQDS group (Group C), and SJZD treatment group (Group D). The PQDS model was established by dietary disorder, medicine-induced Pi-qi consumption in Group C and D. At week 6 after starting the experiment, the model of RD automatic reattachment was prepared by sub-retinal injecting 0.1% sodium hyaluronate to rats in Group B, C, and D. Animals were sacrificed by batches at week 2 and 3 after operation respectively. Food intake, body weight, and mental states of rats were recorded.

基金项目:陕西省自然科学基金面上项目(No. 2015JM8408);陕西省中医管理局中医药科研课题面上项目(No. JCMS063);西安市科技计划重大项目(No. 201805104YX12SF38-3);陕西省西安市第四医院内科研孵化基金项目(No. FZ-26)

作者单位:1. 陕西中医药大学第一临床医学院中医系(陕西 712000); 2. 陕西省西安市人民医院(西安市第四医院)眼科(西安 710000); 3. 陕西省西安市眼底病研究所(西安 710000)

通讯作者:张妍春, Tel: 029-87480925, E-mail: zhangyanchun1239@126.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20201010. 362

The contents of D-xylose in serum, total superoxide dismutase (T-SOD) activities and malondialdehyde (MDA) contents in humor aqueous were measured. The retina were paraffin sliced by HE staining and TUNEL staining. Expressions of Caspase-3, superoxide dismutase 2 (SOD2), and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) were analyzed by Western Blot. **Results** Pre-operative body weight, food intake, and the serum D-xylose level were significantly lower in Group C and D, as compared with those in Group A and B ($P<0.05$). In Group C, the above symptoms lasted to the end of the experiment. Rats' symptoms were improved in Group D after taking SJZD. There was no difference in serum D-xylose level between Group D and Group A at week 3 after operation ($P>0.05$). Compared with Group C, food intake in Group D significantly increased ($P<0.05$). Compared with Group B, the T-SOD activity in humor aqueous, the expressions of SOD2 and HIF-1 α in retinal tissues decreased significantly, the expression of Caspase-3 in retinal tissues and photoreceptor cell apoptotic index significantly increased in Group C at post-operative week 2 and 3. And the MDA activity significantly increased at post-operative week 3 ($P<0.05$). Compared with Group C, the T-SOD activity in humor aqueous, the expressions of SOD2 and HIF-1 α in retinal tissues increased significantly, the expression of Caspase-3 in retinal tissues significantly decreased in Group D at post-operative week 2 and 3. And the MDA activity and photoreceptor cell apoptotic index significantly decreased at post-operative week 3 ($P<0.05$). **Conclusions** PQDS aggravated oxidative stress injury and retinal photoreceptor cell apoptosis in retina reattachment of RD rats. SJZD played neuroprotective roles by effectively enhancing the antioxidant capacity and attenuating photoreceptor cell apoptosis of retinal reattachment with PQDS.

KEYWORDS Sijunzi Decoction; Pi qi deficiency syndrome; retinal reattachment; photoreceptor cell apoptosis; oxidative stress

视网膜脱离(retinal detachment, RD)是一种严重的致盲性眼部疾病,尽管目前孔源性 RD 手术复位率较高,但患者视功能恢复不佳^[1]。感光细胞凋亡是导致视功能恢复不佳的主要原因^[2-4]。有研究表明,氧化应激、线粒体形态以及功能异常与凋亡的关系十分密切^[5-7],抗氧化剂可以明显减轻神经元细胞以及视网膜感光细胞的氧化应激,抑制细胞凋亡^[8,9]。多年来,中医辅助治疗 RD 已经取得一定疗效^[10,11]。RD 属中医学“暴盲”“视瞻昏渺”等范畴,认为其与脾脏的关系十分密切。脾气虚导致固摄失司,使得视网膜不能紧贴眼球壁;脾气虚弱,无力运化水湿,视网膜下存留积液,导致 RD,术后残留的视网膜下液影响视功能的恢复^[12]。有研究证实,细胞内 ATP 合成不足是脾气虚证发生的内在机制之一,脾气虚证与线粒体异常在多个器官中关系密切^[13]。本课题组前期的实验观察到脾气虚加重 RD 自动复位后光感受器内节、神经节细胞等部位线粒体结构的破坏^[14],同时加重机体氧化应激损伤、视网膜各层结构的破坏以及感光细胞凋亡的发生,进而影响视功能的恢复^[15-17]。研究表明,RD 发生后线粒体功能障碍以及 Caspase 家族激活,进而引发细胞凋亡^[18]。由此笔者提出假说:脾气虚证可加重 RD 复位后大鼠眼内氧化应激损伤,激活线粒体源凋亡信号通路,导致 RD 复位后感光细胞凋亡发生增加,使用具有益气健脾作用的经方“四君子汤”可改善脾气虚证 RD 复位后视网膜的抗

氧化能力,减轻线粒体源信号通路所致的凋亡,发挥对 RD 复位后感光细胞保护的作用。现报告如下。

材料与方法

1 动物及分组 健康清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只,体重(205.76 ± 19.05) g, 8 周龄,经裂隙灯、直接检眼镜检查大鼠眼前节及眼底均无异常,实验动物由第四军医大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(陕)2018-001。按照随机数字表法将 40 只大鼠分为对照组(A 组),RD 自动复位组(B 组),脾气虚 RD 自动复位组(C 组),四君子汤治疗组(D 组),每组 10 只。本实验严格遵守动物福利和伦理原则,并通过西安市第四医院伦理委员会审查(No. 2016016)。

2 药物 中药免煎颗粒小承气汤(大黄:厚朴:枳实=4:5:3)5 剂(相当于原中药大黄 200 g 原朴 250 g 枳实 150 g)加 100 ℃纯净水定容至 100 mL,使中药免煎颗粒溶液浓度相当于原中药 6 g/mL。中药免煎颗粒四君子汤(人参:茯苓:炒白术:炙甘草=3:3:3:2)4 剂(相当于原中药人参 60 g 茯苓 60 g 炒白术 60 g 炙甘草 40 g)加 100 ℃纯净水定容至 110 mL,使中药免煎颗粒溶液浓度相当于原中药 2 g/mL,均由陕西中医药大学第一附属医院提供;医用透明质酸钠凝胶(1 mL:浓度:17 mg/mL,美国博士伦,

产品批号:191226013),使用眼用平衡盐溶液稀释浓度至 0.1%;0.3%左氧氟沙星眼水(7 mL:21 mg,珠海联邦制药股份有限公司,产品批号:H20020327);5%聚维酮碘溶液(250 mL,浓度:0.05 mg/mL,南京南大制药有限公司,产品批号:H32024086);0.5%复方托吡卡胺滴眼液(1 mL 托吡卡胺与盐酸去氧肾上腺素 5 mg,日本参天制药株式会社,产品批号:H20150482);盐酸噻拉嗪注射液(2 mL:0.1 g,吉林省华牧动物保健品公司,产品批号:191019)。

3 主要试剂及仪器 D-木糖测定试剂盒(货号:A035)购自南京建成生物研究所;D-木糖(货号:G8360)购自北京索莱宝科技有限公司,使用蒸馏水震荡溶解为 50 mg/mL 溶液;蛋白定量分析试剂盒(货号:23225)购自美国 Thermo Fisher 公司;兔抗缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)多克隆抗体(货号:ab2185)、兔抗 SOD2 多克隆抗体(货号:ab13533)均购自美国 Abcam 公司; β -actin 鼠单克隆抗体(货号:NC010)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(货号:CW 0022S)、辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG(货号:EK020)、山羊抗小鼠 IgG(货号:EK010)、化学发光检测试剂盒(货号:ECL-001)均购自西安壮志生物科技有限公司;原位末端标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)。解剖显微镜(型号:EZ4HD,德国 Leica);30G 微量动物注射器(型号:1710RN,瑞士 Hamilton);台式高速冰冻离心机(型号:Centrifuge 5415R,德国 Eppendorf);万分之一称量天平(型号:BSA124S,北京赛多利斯科学仪器有限公司);病理切片机(型号:RM2016,上海徕卡仪器有限公司);核酸蛋白定量仪(型号:6136,德国 Eppendorf);琼脂凝胶电泳装置(型号:JY600C,北京君意东方电泳设备有限公司);化学发光机(型号:TANON 4200SF,上海天能科技有限公司);直接检眼镜(型号:KJ8C,苏州康捷医疗股份有限公司);荧光显微镜(型号:BX51,日本, Olympus)。

4 造模及干预方法 所有动物适应性喂养 1 周后开始实验。造模方法参照参考文献[19],A、B 组正常饮食,C、D 组隔日清晨空腹灌服小承气汤,每次 60 g/kg,灌胃当天禁食,隔日喂饲不限量,A、B 组同时使用生理盐水灌胃,共持续造模 9 周。实验开始 6 周后,B、C、D 组制备 RD 自动复位模型:术前使用盐酸噻拉嗪注射液麻醉组大鼠,5%聚维酮碘溶液清洗结膜囊后用 0.5%复方托吡卡胺滴眼液散瞳,在显微镜下使用 30G 针头于颞上角巩缘后 3 mm 进入玻璃

体,在鼻侧视网膜避开血管造孔,用微量进样针向视网膜下推注 0.1%的透明质酸钠 15 μ L,尽量扩大视网膜脱离面积,显微镜下观察视网膜高度隆起至晶体后,RD 范围>60%,行前房穿刺放出少量房水至角膜透明。A 组玻璃体腔注射眼用平衡盐溶液 15 μ L。如有晶体意外损伤、眼内大量出血者剔除实验。造 RD 模型后每日 1 次散瞳后使用瞳孔笔及直接检眼镜观察角膜、晶体及眼底,于造模后 2、3 周各组随机处死 5 只取材。RD 自动复位模型制备后 D 组即开始灌服四君子汤,每日 1 次,每次 20 g/kg(四君子汤用药量以临床等效剂量为标准,实验等效剂量按人与动物系数折算,相当于 60 kg 成人每日临床用量的 10 倍)^[20],持续灌胃至实验预定处死取材时间。

5 观察指标及检测方法

5.1 一般情况 观察各组大鼠的精神、活动度、大便性状、毛色、进食量、体重等情况,以大鼠出现精神倦怠、活动度减少、便溏、毛色枯黄、进食量减少和体重降低等症状为脾气虚证造模成功^[21]。

5.2 血清 D-木糖值水平 分别在实验开始时、手术前、手术后 2、3 周空腹使用 D-木糖溶液 0.5 g/kg 灌胃,1 h 后断尾采血 1 mL,室温静置 2 h,4 $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心 10 min 后收集血清,用间苯三酚法测定血清 D-木糖值,以血清 D-木糖吸收率降低为脾气虚证造模成功^[21]。

5.3 观察大鼠眼部情况 术后使用直接检眼镜观察眼底,记录 RD 范围、裂孔大小、视网膜平复时间、出血等情况。

5.4 大鼠眼球石蜡切片 HE 染色 各组在术后 2、3 周随机处死大鼠,每组随机摘取眼球 3 枚立即置于眼球固定液中 24 h,按照常规方法制备蜡块,用切片机于鼻侧发生过 RD 并已经复位区域连续切成厚 4 μ m 切片,按照常规实验方法进行 HE 染色。

5.5 细胞凋亡实验 按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(显色法)说明书操作制作 TUNEL 石蜡染色标本,具体为:石蜡切片脱蜡后滴加 20 μ g/mL 不含 DNase 的蛋白酶 K,37 $^{\circ}$ C 放置 30 min,PBS 洗涤 3 min/次 $\times$ 3 次,3% H_2O_2 室温孵育 20 min,PBS 洗涤 3 min/次 $\times$ 3 次,滴加 50 μ L TUNEL 检测液,37 $^{\circ}$ C 湿盒避光孵育 90 min,PBS 洗涤 3 min,滴加标记反应终止液,室温湿盒孵育 10 min,PBS 洗 3 min/次 $\times$ 3 次,滴加 DAB 显色液室温孵育 10 min,PBS 洗 3 min/次 $\times$ 3 次,苏木素复染,PBS 洗 3 min/次 $\times$ 3 次,树胶加盖片封片。荧光显微镜及照相系统下分析结果并拍照,以细胞核内出现棕黄色颗粒为 TUNEL 阳性标记细胞,高倍镜下(40 $\times$)对每张切片

取 5 个视野,每组 20 个视野,分别计数外核层凋亡阳性细胞及细胞总数,以凋亡指数 (apoptosis index, AI) 反映视网膜细胞凋亡的情况, $AI = (\text{计数范围内凋亡细胞个数} / \text{所有细胞个数}) \times 100\%$ 。

5.6 眼内液总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD) 活性、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 值测量 于解剖显微镜下用 30G 针头前房穿刺抽取眼内液。采用黄嘌呤氧化酶法检测眼内液 T-SOD, 采用硫代巴比妥法测定眼内液 MDA。

5.7 视网膜组织抗氧化相关蛋白 SOD2、HIF-1 α 及凋亡相关蛋白 Caspase-3 检测 于解剖显微镜下快速分离大鼠全视网膜置于冰上,提取总蛋白后应用蛋白定量分析试剂盒进行样品蛋白定量,依次制备凝胶、加样电泳、转膜,按标准分子量的位置及目标蛋白分子量将 PVDF 膜分段剪开,用等渗缓冲盐溶液洗膜 5 min/次 $\times 3$ 次,5% 的脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,分别加入 SOD2 (1:5 000)、HIF-1 α (1:1 000)、Caspase-3 (1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,等渗缓冲盐溶液洗膜 5 min/次 $\times 3$ 次,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:2 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,等渗缓冲盐溶液洗膜 5 min/次 $\times 3$ 次,避光条件下加入显影液发光。所得图像使用 Image J 软件进行分析并记录各灰度值,计算目标蛋白的相对表达量。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 4 组大鼠一般情况、进食量和体重比较 (表 1) 实验开始 1 周后 C、D 组大鼠出现便溏、精神萎靡、蜷缩嗜卧、毛色枯黄等脾气虚症状,该症状持续至实验结束。与 A 组比较, B 组不同时间点体重及进食量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 B 组比较,术前 C、D 组体重及进食量较均明显降低 ($P < 0.01$), C 组体重及进食量、D 组体重持续降低至实验结束 ($P < 0.01$); D 组进食量较 C 组有升高趋势,至术后 3 周进食量差异明显 ($P < 0.05$),但较 B 组仍显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2 4 组大鼠血清 D-木糖值比较 (表 1) 实验开始时,各组大鼠血清 D-木糖值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 实验过程中 A、B 组不同时间点血清 D-木糖值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 术前 C 组及 D 组均较 B 组显著降低 ($P < 0.01$),但 C、D 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 B 组同期比较, C 组血清 D-木糖

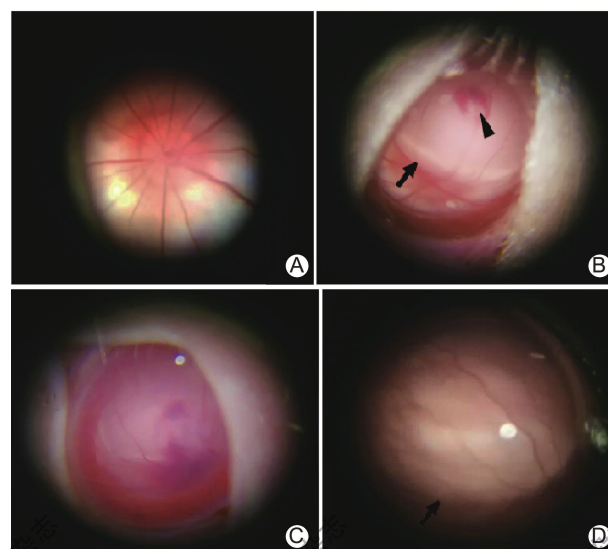
值持续在较低水平 (至实验结束) ($P < 0.01$); D 组随着四君子汤给药时间增长,血清 D-木糖值有所升高 (至术后 2 周),差异有统计学意义 ($P < 0.05$),至术后 3 周, D 组血清 D-木糖值持续升高,与 B 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 4 组不同时间点体重、进食量及血清 D-木糖值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	体重 (g)	进食量 (g)	D-木糖值 (mmol/L)
A	5	0 d	196.72 $\pm$ 16.73	39.74 $\pm$ 4.77	1.45 $\pm$ 0.23
		术前	321.72 $\pm$ 16.93	44.23 $\pm$ 3.24	1.25 $\pm$ 0.32
		术后 2 周	380.48 $\pm$ 14.78	46.65 $\pm$ 1.82	1.48 $\pm$ 0.21
		术后 3 周	420.38 $\pm$ 21.17	48.73 $\pm$ 2.20	1.35 $\pm$ 0.18
B	5	0 d	204.00 $\pm$ 12.95	40.26 $\pm$ 3.34	1.38 $\pm$ 0.20
		术前	330.25 $\pm$ 21.98	44.06 $\pm$ 2.68	1.35 $\pm$ 0.15
		术后 2 周	404.36 $\pm$ 30.11	47.90 $\pm$ 4.21	1.38 $\pm$ 0.2
		术后 3 周	437.65 $\pm$ 35.34	48.43 $\pm$ 2.81	1.34 $\pm$ 0.16
C	5	0 d	197.57 $\pm$ 19.76	43.17 $\pm$ 4.45	1.33 $\pm$ 0.14
		术前	262.57 $\pm$ 19.49 [*]	37.82 $\pm$ 2.21 ^{**}	0.82 $\pm$ 0.25 ^{**}
		术后 2 周	285.44 $\pm$ 9.68 ^{**}	36.48 $\pm$ 1.33 ^{**}	0.85 $\pm$ 0.09 ^{**}
		术后 3 周	308.28 $\pm$ 8.48 ^{**}	38.81 $\pm$ 2.70 ^{**}	0.85 $\pm$ 0.08 ^{**}
D	5	0 d	194.77 $\pm$ 15.87	44.15 $\pm$ 4.79	1.30 $\pm$ 0.11
		术前	260.49 $\pm$ 17.59 ^{**}	37.82 $\pm$ 1.72 ^{**}	0.93 $\pm$ 0.09 ^{**}
		术后 2 周	300.62 $\pm$ 11.37 ^{**}	39.66 $\pm$ 1.02 ^{**}	1.05 $\pm$ 0.09 [*]
		术后 3 周	325.46 $\pm$ 12.62 ^{**}	43.06 $\pm$ 1.15 ^{*Δ}	1.12 $\pm$ 0.21

注:与 B 组同期比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与 C 组同期比较, ^{Δ} $P < 0.05$; 0 d 为实验开始时的数据

3 眼部检查情况及复位时间比较 (图 1) 造模过程中无晶体意外损伤、眼内大量出血者,在解剖显微

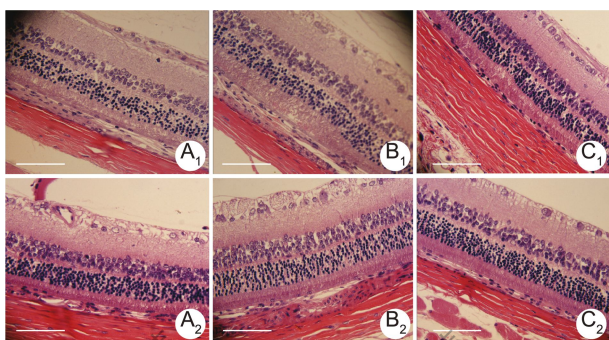


注: A 组视网膜平伏,血管走行正常; B、C、D 组鼻侧视网膜灰白色高度隆起伴裂孔旁少量出血,黑箭所指为 RD 边缘,黑箭头所指为造孔处

图 1 各组显微镜下眼底照相

镜下均可见鼻侧视网膜灰白色高度隆起范围>60% (图 1B、C、D)。术后直接检眼镜下观察,所有角膜透明,前房无异常,晶状体透明,术后早期鼻侧下方可见 1/2~1 PD 裂孔,随复位时间延长 RD 范围逐渐缩小并自行复位,裂孔处瘢痕灶形成;B、C、D 组视网膜自动复位时间分别为(8.63±1.99)日、(8.75±1.28)日、(9.75±1.28)日,经方差分析,各组 RD 自动复位时间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 术后 2、3 周各组大鼠眼球石蜡切片 HE 染色结果比较(图 2) 术后 2、3 周,A 组在光镜下清晰可见视网膜各层细胞及组织排列整齐,层次结构清晰,内外节界限可见,细胞形态正常,müller 细胞框架纤维结构完整。B、C、D 组视网膜石蜡切片在光镜下观察,所有眼视网膜均复位。B 组术后 2 周视网膜色素上皮层(retinal pigment epithelial, RPE)基本正常,视锥视杆层、内外核层、网状层排列紊乱、较多空泡样变性,细胞水肿,有核固缩现象,部分神经节细胞水肿,空泡变性(图 2A₁);至术后 3 周视网膜结构基本清晰,光感受器形态基本正常,局部有空泡变性(图 2A₂);C 组术后 2 周视网膜厚度较 B 组明显增加,色素上皮细胞肥大,光感受器外节结构显著紊乱,内节疏松水肿变性明显,各层细胞均可见肿胀、空泡变性,尤以双极细胞层和节细胞层明显,内、外核层细胞均可见明显核固缩现象(图 2B₁);至术后 3 周视网膜外层水肿较术后 2 周稍减轻,光感受器外节仍有断裂缺失,内节空泡样变性形成空洞。内外核层、网状层排列结构紊乱,尤以内核层为著,仍有较多细胞水肿、空泡样变性,神经节细胞空泡变性减轻(图 2B₂);与 C 组比较,D 组术后 2 周外节及内节结构紊乱以及内外核层、节细胞层水肿较轻,视细胞内节、内核层及内丛状层空泡变性减轻(图 2C₁);至术后 3 周视网膜各层结构基本清晰,光感



注:A、B、C 分别为 B、C、D 组;其中 A₁、B₁、C₁ 为术后 2 周,A₂、B₂、C₂ 为术后 3 周

图 2 术后 2、3 周各组大鼠眼球视网膜组织石蜡切片结果比较 (HE, ×40)

受器形态接近正常,少量空泡变性,外核层排列明显较 C 组整齐,内核层结构仍有紊乱,细胞稍有水肿,部分细胞空泡变性,神经节细胞和神经纤维层结构基本正常(图 2C₂)。以上形态结构改变与既往本课题组在兔眼观察到的情况基本一致^[14]。

5 4 组大鼠眼内液 T-SOD 活性及 MDA 值比较(表 2) 与 A 组比较,术后 2、3 周 B 组眼内液 T-SOD 活性显著降低($P<0.05$),MDA 值显著升高($P<0.05$);与 B 组比较,C 组术后 2、3 周眼内液 T-SOD 活性明显降低($P<0.05$);与 C 组比较,D 组术后 2、3 周眼内液 T-SOD 活性明显升高($P<0.05$);到术后 3 周眼内液 MDA 值 C 组较 B 组升高,D 组较 C 组则显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 4 组不同时间点 T-SOD 活性及 MDA 值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	时间	T-SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)
A	6	术后 2 周	148.65±7.36	8.82±0.46
		术后 3 周	148.15±8.18	8.83±0.46
B	6	术后 2 周	125.42±3.29*	13.21±1.20*
		术后 3 周	129.94±6.36*	13.65±0.79*
C	6	术后 2 周	115.91±4.51 [△]	15.77±1.29
		术后 3 周	117.55±5.21 [△]	17.94±1.37 [△]
D	6	术后 2 周	132.89±4.31 [▲]	13.34±0.95
		术后 3 周	140.39±7.42 [▲]	11.99±0.99 [▲]

注:与 A 组同期比较,* $P<0.05$;与 B 组同期比较,[△] $P<0.05$;与 C 组同期比较,[▲] $P<0.05$

6 4 组大鼠视网膜组织 SOD2、HIF-1 α 及 Caspase-3 蛋白表达量比较(图 3,表 3) 术后 2 周,与 A 组比较,B 组视网膜组织 SOD2、HIF-1 α 蛋白表达量均明显降低,Caspase-3 显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 B 组比较,C 组视网膜组织 SOD2、HIF-1 α 含量显著降低,Caspase-3 含量显著升高($P<0.05$);与 C 组比较,D 组视网膜组织 SOD2、HIF-1 α 含量明显升高,Caspase-3 含量显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);术后 3 周,与 A 组比较,B 组视网膜组织 SOD2 含量降低、Caspase-3

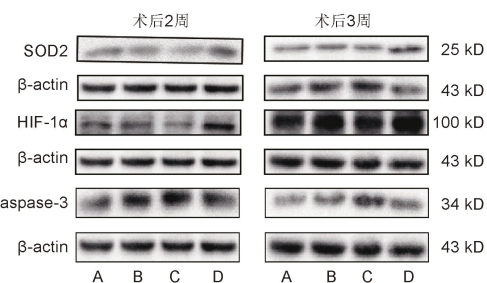


图 3 4 组不同时间点视网膜组织 SOD2、HIF-1 α 及 Caspase-3 蛋白表达图

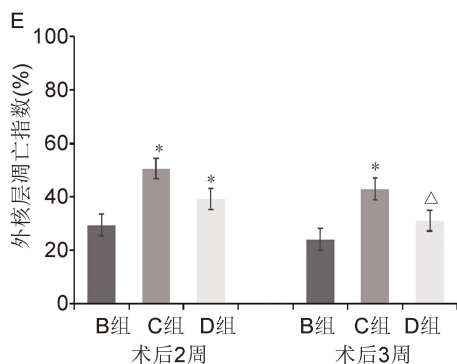
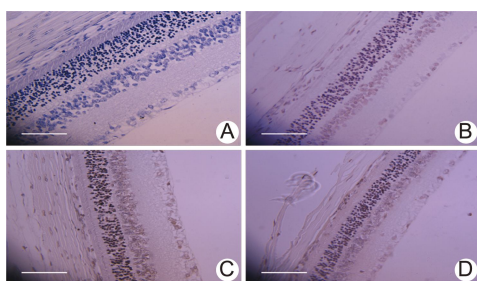
表 3 4 组不同时间点视网膜组织 SOD2、HIF-1 α 及 Caspase-3 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	SOD2	HIF-1 α	Caspase-3
A	6	术后 2 周	1.06 $\pm$ 0.12	2.09 $\pm$ 0.19	0.95 $\pm$ 0.11
		术后 3 周	1.05 $\pm$ 0.17	1.52 $\pm$ 0.15	0.76 $\pm$ 0.10
B	6	术后 2 周	0.79 $\pm$ 0.09*	1.78 $\pm$ 0.15*	1.32 $\pm$ 0.13*
		术后 3 周	0.74 $\pm$ 0.15*	1.62 $\pm$ 0.14	0.98 $\pm$ 0.09*
C	6	术后 2 周	0.62 $\pm$ 0.09 Δ	1.53 $\pm$ 0.22 Δ	1.53 $\pm$ 0.16 Δ
		术后 3 周	0.61 $\pm$ 0.14 Δ	1.43 $\pm$ 0.16 Δ	1.65 $\pm$ 0.24 Δ
D	6	术后 2 周	0.95 $\pm$ 0.07 Δ	1.89 $\pm$ 0.23 Δ	1.27 $\pm$ 0.18 Δ
		术后 3 周	0.94 $\pm$ 0.11 Δ	1.75 $\pm$ 0.13 Δ	1.22 $\pm$ 0.11 Δ

注:与 A 组同期比较, * $P < 0.05$; 与 B 组同期比较, Δ $P < 0.05$; 与 C 组同期比较, Δ $P < 0.05$

显著升高 ($P < 0.05$); 与 B 组比较, C 组视网膜组织 SOD2、HIF-1 α 含量明显降低, Caspase-3 显著升高 ($P < 0.05$); D 组视网膜组织 SOD2、HIF-1 α 显著高于 C 组, Caspase-3 显著低于 C 组 ($P < 0.05$)。

7 4 组大鼠 TUNEL 原位细胞凋亡实验结果比较 (图 4) A 组少有被 TUNEL 染色阳性标记的细胞, B、C、D 组均可见胞核被标记为黄棕色的细胞分散于外核层、内核层及节细胞层, 细胞核被环形或均匀一致着色, 周围未见明显炎症反应 (图 4, A~D)。计数并比较各组术后 2、3 周外核层细胞凋亡指数, 术后 2 周 C、D 组外核层细胞凋亡指数均较 B 组明显升高, 差异



注: A、B、C、D 分别为 A、B、C、D 组术后 2 周 TUNEL 染色光镜照片 (Bar = 50 μ m, $\times 40$); E 为 B、C、D 组术后 2、3 周外核层凋亡细胞指数柱形图; 与 B 组同期比较, * $P < 0.05$; 与 C 组同期比较, Δ $P < 0.05$

图 4 TUNEL 染色结果及外核层细胞凋亡指数柱形图

有统计学意义 ($P < 0.05$), 随着视网膜复位时间增长, C 组外核层细胞凋亡指数较 B 组仍显著升高, D 组则较 C 组显著降低, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

本实验采用“病证结合”的造模方法观察脾气虚证这一病理状态对 RD 复位后视细胞超微结构的影响。本实验具体造模方法使用中国中医研究院陈小野提出的耗气破气加饥饱失常脾气虚证动物模型, 该方法的造模因素为多因素复合造模, 造模时间相对较长, 模型表现较为稳定, 符合中医学脾气虚证形成的病因病机理论, 同时可重复性较强^[22]。本实验采用对 Cook B 等^[23] RD 自动复位模型改进后的方法, 通过在大鼠视网膜下直接注射透明质酸钠建立 RD 自动复位模型, 比较符合人眼 RD 发病过程, 手术并发症少, 方法简便实用。既往的研究多采用猫、兔子等眼球较大的动物进行实验, 但存在动物相对不易获得, 较大样本开展研究困难的问题, 本实验采用大鼠作为实验动物, 来源广泛, 尽管大鼠眼球较小, 但通过精细的显微操作还是能达到模型要求, 在动物手术的过程中以及术后对实验眼的观察过程中可以清楚地看到 RD 的发生和复位, 病理切片也可看到 RD 自动复位, 且仅发现少量炎性细胞浸润, 证明透明质酸钠有较少的组织刺激性, 可以最大限度地减少介质本身对视网膜的毒性作用。RD 的发生与玻璃体及视网膜的退行性改变密切相关, 在正常动物眼人为制造 RD 模型进行观察研究忽略了这种退行性改变因素的影响, 中西医结合、证病结合的思路在一定程度上能弥补这种研究缺陷。

本研究结果再次证实了脾气虚证对大鼠 RD 复位后视网膜组织结构的恢复有严重的不良影响, 加重了视网膜感光细胞的凋亡发生, 益气健脾方四君子汤作为治疗脾气虚证经典方剂, 其抗氧化应激作用明显^[24,25], 方中人参为君药, 有研究表明, 人参皂苷 Rg3 可升高糖尿病大鼠视网膜组织中 SOD 活性, 降低 MDA 及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 表达, 提示人参皂苷 Rg3 能够降低糖尿病视网膜病变大鼠视网膜组织氧化应激损伤^[26]; 人参皂苷 Rg1 能够通过抑制细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生、调控氧化应激相关蛋白以及 Caspase-3 表达, 改善由 CoCl 导致的 RPE 细胞缺氧, 进一步发挥细胞保护作用^[27]。白术为臣药, 其有效成分白术多糖能提高血清和脑组织中 SOD 活力, 降低小鼠血清、脑组织中 MDA 含量, 并通过提高抗氧化酶的活力, 减少脂质过氧化物的生成, 从而提高机体抗

氧化能力^[28];茯苓为佐药,使用茯苓酸预处理氧化低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞后能够显著降低细胞内 ROS 及 MDA 的产生,并增加细胞内源性抗氧化酶 SOD 活性^[29]。甘草作为使药在四君子汤抗氧化应激中发挥重要作用^[30];甘草甜素可以抑制 RPE 细胞 ROS 生成进一步减少碘酸钠诱导 RPE 细胞凋亡的发生^[31]。本研究使用四君子汤治疗后大鼠视网膜各层结构明显好转,表现为细胞排列较脾气虚组整齐,细胞水肿、空泡变性均明显减轻,术后 3 周与 RD 对照组比较形态学差异不明显。同时感光细胞凋亡发生比例、视网膜组织 Caspase-3 蛋白水平也显著降低。以上结果表明补气健脾法能够减少脾气虚证大鼠 RD 复位后感光细胞的凋亡,发挥感光细胞保护作用。

感光细胞凋亡作为 RD 术后影响视功能恢复的主要原因,与氧化应激及线粒体功能密切相关。氧化应激是指 ROS 的生成和抗氧化作用失衡的一种状态,过量产生的 ROS 若未被内源性抗氧化因子或相关酶清除,引起脂质过氧化以及蛋白质等变性,导致线粒体能量合成障碍,进而导致细胞凋亡、死亡等多种病理改变。MDA 作为脂质过氧化反应的终产物,反映细胞受氧自由基损伤的程度。SOD 负责清除代谢产生的自由基,保护细胞免受损伤;SOD2 作为内源性抗氧化因子,有研究表明,当人体 RPE 中 SOD2 缺失,可引起眼内氧化应激水平升高^[32];另有研究指出 HIF-1 α 稳定表达可以减少 RD 后细胞死亡^[33]。研究表明 Caspase-3 在 RD 后视网膜中也有表达^[18]。本研究表明 RD 复位后 2 周大鼠眼内液检测 MDA 值明显升高,提示眼内脂质过氧化程度加重,而抗氧化酶 SOD 活性下降,视网膜组织 SOD2 以及 HIF-1 α 蛋白表达降低,表明视网膜组织氧化应激增强;RD 复位后 2、3 周视网膜组织 Caspase-3 表达增加以及 TUNEL 阳性细胞增加,这表明 RD 复位后线粒体源凋亡信号通路被激活以及氧化应激水平升高从而导致细胞凋亡;脾气虚证气虚进一步加重眼内氧化应激损伤、增加视网膜组织 Caspase-3 表达以及 TUNEL 阳性细胞数量,给予益气健脾经典方剂四君子汤对症治疗后,眼内液检测 MDA 值降低,而抗氧化酶 SOD 活性、抗氧化因子 SOD2 以及 HIF-1 α 表达随之升高,Caspase-3 含量以及 TUNEL 阳性细胞数量减少,表明四君子汤可以降低眼部氧化应激损伤以及抑制线粒体源凋亡信号通路,从而减少凋亡的发生。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Wilkinson CP. Mysteries regarding the surgically reattached retina [J]. Trans Am Ophthalmol Soc, 2009, 107: 55-57.
- [2] Lo ACY, Woo TTY, Wong RLM, et al. Apoptosis and other cell death mechanisms after retinal detachment: implications for photoreceptor rescue [J]. Ophthalmologica, 2011, 226(suppl 1): 10-17.
- [3] Murakami Y, Notomi S, Hisatomi T, et al. Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations [J]. Progr Retin Eye Res, 2013, 37: 114-140.
- [4] Sene A, Apte RS. Inflammation-induced photoreceptor cell death [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1074: 203-208.
- [5] Schenk B, Fulda S. Reactive oxygen species regulate Smac mimetic/TNF α -induced necroptotic signaling and cell death [J]. Oncogene, 2015, 34 (47): 5796-5806.
- [6] She XJ, Lu XM, Li T, et al. Inhibition of mitochondrial fission preserves photoreceptors after retinal detachment [J]. Am J Pathol, 2018, 188 (7): 1713-1722.
- [7] Maes ME, Schlamp CL, Nickells RW. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells [J]. Progr Retin Eye, 2017, 57: 1-25.
- [8] Zhang XS, Zhang XZ, Zhang ML, et al. Amelioration of oxidative stress and protection against early brain injury by astaxanthin after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosurg, 2014, 121(1): 42-45.
- [9] Li T, Yang SQ, She XJ, et al. Modulation of α -adrenoceptor signaling protects photoreceptors after retinal detachment by inhibiting oxidative stress and inflammation [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176 (6): 801-813.
- [10] 曾红艳, 彭清华. 益气养阴利水活血经验方治疗原发性视网膜脱离术后患者的疗效观察 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(4): 915-916.
- [11] 李超颖, 胡秋明, 黎海平, 等. 益气固脱、清热利湿法在视网膜脱离复位术后视力恢复中的作用 [J]. 中国中医眼科杂志, 2015, 25(3): 162-164.
- [12] 侯慧媛, 惠延年. 视网膜脱离复位手术对视功能恢复及其影响因素 [J]. 国际眼科纵览, 2011, 35(4): 271-276.
- [13] 游艳婷, 金丽琴. 中医脾虚证与线粒体的相关性 [J]. 温州医科大学学报, 2015, 45(10): 774-778.

- [14] 张妍春, 毕春潮, 杨新光, 等. 脾气虚型兔视网膜脱离复位后视细胞超微结构改变的实验研究[J]. 中国中医眼科杂志, 2009, 19(2): 323-326.
- [15] 张妍春, 孙娟玲, 任秀瑜, 等. 脾气虚型兔视网膜脱离自动复位后视网膜电图的研究[J]. 中国中医眼科杂志, 2019, 29(2): 93-96.
- [16] 张妍春, 王卉芳, 毕春潮, 等. 脾气虚型兔视网膜脱离自动复位后视网膜组织形态学观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(3): 267-269.
- [17] 张妍春, 雷春灵, 杨新光, 等. 益气养阴利水剂对脾气虚型视网膜脱离复位后抗凋亡及抗氧化作用的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(2): 153-158.
- [18] Zacks DN, Hanninen V, Pantcheva M, et al. Caspase activation in an experimental model of retinal detachment[J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2003, 44(3): 1262-1267.
- [19] 宋雅芳, 刘友章, 王汝俊, 等. 健脾益气中药对脾虚大鼠肝组织线粒体功能的影响[J]. 中国新药与临床药理, 2009, 20(5): 423-426.
- [20] 段永强, 程卫东, 成映霞, 等. 四君子汤和理中汤干预腹泻型 IBS 大鼠胃肠转运功能和 P 物质、胆囊收缩素的比较研究[J]. 中成药, 2015, 37(2): 405-408.
- [21] 曾梅艳, 陈雪莲, 宋厚盼, 等. 脾气虚证动物模型造模方法与模型评价的研究概述[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(2): 284-289.
- [22] 陈小野主编. 实用中医症候动物模型[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医学院联合出版社, 1993: 184-189.
- [23] Cook B, Lewis GP, Fisher SK, et al. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(6): 990-996.
- [24] 胡艳红, 李颖, 林淑娜, 等. 四君子汤含药血清抑制晶状体上皮细胞凋亡的实验研究[J]. 眼科新进展, 2018, 38(7): 630-633.
- [25] 宫健伟, 孙喜灵, 王超云, 等. 四君子汤对脾气虚模型大鼠血清 SOD, CAT 和 GSH-Px 及 MDA 的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 46-47.
- [26] 王皎皎, 胡燃燃, 张丹, 等. 人参皂苷 Rg3 对糖尿病视网膜病变大鼠 PI3K-Akt/PKB 通路和血管内皮生长因子、细胞间黏附分子-1 表达的影响[J]. 眼科新进展, 2020, 40(1): 20-25.
- [27] 李珂然. 人参皂苷 Rg1 对缺氧诱导的视网膜色素上皮(RPE)细胞损伤的保护作用和机制研究[D]. 江苏: 南京医科大学, 2015.
- [28] 石娜, 苏洁, 杨正标, 等. 白术多糖对 D-半乳糖致衰老模型小鼠的抗氧化作用[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(5): 577-581, 584.
- [29] 刘凤, 刘增长. 茯苓酸通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路改善 OX-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞损伤[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(2): 164-168, 179.
- [30] 陈健. 复方四君子汤抗氧化活性研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2012.
- [31] He HJ, Wei DH, Liu H, et al. Glycyrrhizin protects against sodium iodate-induced RPE and retinal injury through activation of AKT and Nrf2/HO-1 pathway[J]. J Cellul Molec Med, 2019, 23(5): 3495-3504.
- [32] Brown EE, DeWeerd AJ, Idefonso CJ, et al. Mitochondrial oxidative stress in the retinal pigment epithelium (RPE) led to metabolic dysfunction in both the RPE and retinal photoreceptors[J]. Redox Biol, 2019, 24: 101201.
- [33] Liu HY, Zhu H, Li T, et al. Prolyl-4-hydroxylases inhibitor stabilizes HIF-1 α and increases mitophagy to reduce cell death after experimental retinal detachment[J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2016, 57(4): 1807-1815.

(收稿: 2020-05-22 在线: 2020-12-09)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶