

· 基础研究 ·

四君子汤调控线粒体凋亡保护脾气虚模型大鼠
视网膜脱离复位后感光细胞的作用任秀瑜¹ 康紫薇¹ 张妍春^{1, 2} 李京珂³ 薛大喜^{1, 2} 崔阳阳¹

摘要 目的 观察四君子汤是否通过线粒体凋亡信号通路发挥对脾气虚型大鼠视网膜脱离(RD)复位后感光细胞的保护作用。方法 成年SD大鼠52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,实验开始6周后B、C、D组使用视网膜下注射0.1%透明质酸钠的方法制备RD自动复位模型,D组随后灌服四君子汤(20 g/kg)至实验结束。分别于实验开始后8、9周随机分批处死动物取材。记录大鼠进食量、体重及精神状态;比色法测定红细胞膜钠钾ATP酶($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$)活性;JC-1荧光探针法检测视网膜组织线粒体膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)水平;Western Blot检测各组视网膜组织B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)及视网膜细胞核细胞凋亡诱导因子(AIF)表达量变化;免疫荧光法检测AIF、细胞色素C(Cyt C)在视网膜组织中的分布。结果 与A、B组比较,C、D组大鼠在实验开始后1周出现便溏、精神萎靡、毛色枯黄等脾气虚症状,6周红细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性明显降低($P<0.05$),C组上述症状持续至实验结束,D组于9周时上述症状好转,红细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性较C组升高($P<0.05$)。与A组比较,B组8、9周视网膜组织 $\Delta\Psi\text{m}$ 降低($P<0.01$);与B组比较,C、D组8周时 $\Delta\Psi\text{m}$ 降低($P<0.01$);随着实验时间延长,至9周时D组 $\Delta\Psi\text{m}$ 较C组显著升高($P<0.05$)。与A组比较,8、9周时C组视网膜组织Bax升高($P<0.05$),D组则较C组显著降低($P<0.05$),同时9周时C组Bax水平亦高于B组($P<0.01$)。8周时C组Bcl-2/Bax较A组降低($P<0.05$),9周时较A、B、D组降低($P<0.01$)。8周时,与B组比较,C、D组细胞核AIF蛋白表达量升高($P<0.01$);至9周时,C组细胞核AIF蛋白表达量仍持续升高,且高于D组($P<0.05$)。免疫荧光结果显示B、C、D组AIF及Cyt C较A组着色弥散,其中B组AIF特异性表达于少量外核层细胞核;C组AIF及Cyt C在外核层特异性着色显著;D组AIF及Cyt C在外核层部分细胞着色。结论 四君子汤能稳定脾气虚RD自动复位模型大鼠视网膜线粒体内膜及外膜的通透性,抑制线粒体源凋亡信号通路,减少脾气虚RD复位后感光细胞凋亡的发生,发挥神经保护作用。

关键词 四君子汤;脾气虚证;视网膜脱离复位;线粒体膜透化;感光细胞凋亡

Effect of Sijunzi Decoction Protecting Rats' Photoreceptor Cells of Reattached Retina with Pi-Qi Deficiency Syndrome by Regulating Mitochondrial Apoptosis Pathway REN Xiu-yu¹, KANG Zi-wei¹, ZHANG Yan-chun^{1, 2}, LI Jing-ke³, XUE Da-xi^{1, 2}, and CUI Yang-yang¹ 1 Ophthalmology Department, Shaanxi Eye Hospital, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Affiliated People's Hospital of Northwest University, Xi'an (710004); 2 Xi'an Ocular Fundus Disease Research Institute, Xi'an (710004); 3 Department of Chinese Medicine, First Clinical Medical College, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi (712000)

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(No. 2021SF-162); 西安市科技计划重大项目[No. 201805104YX12SF38(3)]; 白求恩-朗沐科研发展专项基金项目(No. BJ2020IIT001)

作者单位: 1. 西安市人民医院(西安市第四医院)陕西省眼科医院, 西北大学附属人民医院眼科(西安 710004); 2. 西安市眼底病研究所(西安 710004); 3. 陕西中医药大学第一临床医学院中医系(陕西 712000)

通讯作者: 张妍春, Tel: 029-61199686, E-mail: zhangyanchun1239@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20230106.061

ABSTRACT Objective To observe whether Sijunzi Decoction (SJZD) protects rats' photoreceptor cells of reattached retina with Pi-Qi deficiency syndrome by regulating mitochondrial apoptosis pathway. **Methods** Fifty-two adult SD rats were randomly divided into 4 groups, the control group (Group A), retinal spontaneous reattached group (Group B), retinal spontaneous reattached with Pi-Qi deficiency syndrome group (Group C) and SJZD treated group (Group D). The rats in Group C and Group D were established with Pi-Qi deficiency syndrome by herbs inducing exhaustion, dissipating stagnant qi and irregular diet. After 6 weeks, retinal spontaneous reattached model was prepared by sub-retinal injection of 0.1% sodium hyaluronate in Group B, C and D, then Group D was given SJZD (20 g/kg) until the end of the experiment. Animals were sacrificed randomly at 8th and 9th week respectively. Food intake, body weight, and mental status of rats were recorded. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ of erythrocyte membrane was detected by colorimetric method, and mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) of retinal tissue was detected by JC-1 fluorescent probe. The retinal expressions of BCL2-associated X (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and apoptosis inducing factor (AIF) were measured by Western Blot. The AIF and Cytochrome C (Cyt C) were detected by immunofluorescence staining. **Results** Rats in Group C and D showed symptoms of Pi-Qi deficiency syndrome, such as loose stool, listlessness, dull fur at 1th week, and the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ of erythrocyte membrane was significantly lower than Group A and B at 6 weeks ($P<0.05$). In Group C, the above symptoms lasted until the end of the experiment. At 9 weeks, compared with Group C, the above symptoms in Group D were improved and the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ of erythrocyte membrane was significantly increased ($P<0.05$). At 8th and 9th week, compared with Group A, $\Delta\Psi\text{m}$ in Group B reduced significantly ($P<0.01$). Compared with Group B, the $\Delta\Psi\text{m}$ decreased at 8th week in Group C and D ($P<0.01$), with the extension of experiment time, the $\Delta\Psi\text{m}$ in Group D was significantly higher than Group C at 9th week ($P<0.05$). Compared with Group A, Bax of retinal tissue in Group C increased at 8th and 9th week ($P<0.05$), Group D was significantly lower than Group C ($P<0.05$), meanwhile, at 9th week compared with Group B, Bax of retinal tissue in Group C decreased ($P<0.01$). Compared with Group A, Bcl-2/Bax in Group C decreased significantly at 8th week ($P<0.05$) and lower than Group A, B and D at 9th week ($P<0.01$). At 8th week, the nuclear AIF protein expression in Group C and Group D was increased compared with Group B ($P<0.01$). At 9th week, nuclear AIF protein expression in Group C was still increased, and was higher than that in Group D ($P<0.05$). Immunofluorescence showed that AIF and Cyt C in Group B, C and D were more diffused than those in Group A, and AIF could be found in outer nuclear layer in Group B, while AIF and Cyt C in Group C were more abundant in outer nuclear layer than in Group B but scattered in Group D. **Conclusion** SJZD played neuroprotective roles by alleviating mitochondrial membrane permeabilization, inhibiting mitochondrial apoptosis signal pathway and reduced photoreceptor cells apoptosis in experimental spontaneous reattached retina with Pi-Qi deficiency syndrome.

KEYWORDS Sijunzi Decoction; Pi-Qi deficiency syndrome; retinal reattachment; mitochondrial pathway; photoreceptor cells apoptosis

视网膜脱离 (retinal detachment, RD) 发生于多种眼部疾病, 包括年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)、糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 以及孔源性、牵拉性和渗出性视网膜脱离。RD 导致患者视功能严重受损, 其主要原因在于当感光细胞与其下的色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE) 和脉络膜血管发生分离后, 视网膜外层正常的新陈代谢受到严重破坏导致感光细胞死亡, 其中感光细胞凋亡扮演着重要角色^[1, 2]。线粒体是具有双层膜结构的细胞器, 线粒体膜透化 (mitochondrial membrane

permeabilization, MMP) 在不同程度上改变线粒体内膜及外膜, 被认为是许多程序性细胞死亡过程的早期阶段和关键环节^[3, 4], 线粒体膜通透性改变后促凋亡因子释放至胞浆或移位至细胞核, 导致细胞凋亡发生^[5, 6]。已经有研究发现 RD 后细胞色素 C (cytochrome c, Cyt C)、凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 等线粒体内蛋白释放导致感光细胞凋亡的发生^[7, 8]。因此阻止 RD 后 MMP 是潜在的保护神经细胞的方法之一^[9]。

本课题组已在 SD 大鼠通过视网膜下注射玻璃酸钠的方法及耗气破气 + 饥饱失常的实验方法, 在体

证实脾气虚证可以加重实验性 RD 复位后动物机体及眼内氧化应激损伤, 视网膜光感受器内节、神经节细胞等线粒体结构的破坏^[10], 视网膜感光细胞的凋亡, 影响视网膜功能恢复^[11]; 使用具有益气健脾作用的益视汤及四君子汤能有效提高机体或眼内抗氧化能力, 发挥神经保护作用^[12], 减少实验动物 RD 复位后感光细胞凋亡的发生^[12]。脾气虚证可导致多个器官线粒体结构及功能的异常^[13], 包括细胞内 ATP 合成不足影响能量代谢以及激活线粒体源细胞凋亡信号通路^[14]。具有益气健脾作用的经方“四君子汤”是否通过对 RD 复位后视网膜线粒体膜透化及凋亡相关信号蛋白的调控来发挥感光细胞神经保护作用? 笔者进行了相关研究, 现报道如下。

材料与方法

1 动物 健康清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 通过方差分析的自由度 (E) 进行样本量估算^[15], 自由度 (E) 取值范围应在 10~20 之间, 其中 E 的计算公式如下: $E = \text{各组实验动物之和} - \text{组数}$ 。经计算, 每组大鼠在处死前的数量应至少在 4~6 只, 共纳入 52 只大鼠。纳入标准: 8 周龄, 经裂隙灯、直接检眼镜检查大鼠眼睑、结膜、角膜、晶状体、玻璃体及眼底均无异常, 排除标准: 不符合健康要求大鼠及裂隙灯、直接检眼镜检查发现眼部异常大鼠。体重 (221.36 ± 18.25) g, 实验动物由西安交通大学动物实验中心提供 (动物合格证号: SCXK (陕) 2018-001)。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), 使用 100 °C 纯净水震荡溶解, 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), 使用 100 °C 纯净水震荡溶解, 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 (美国, 博士伦, 产品批号: 191226013, 规格: 1 mL, 浓度: 17 mg/mL) 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 (珠海联邦制药股份有限公司, 产品批号: H20020327, 规格: 7 mL: 21 mg); 0.5% 复方托吡卡胺滴眼液 (日本, 参天制药株式会社, 产品批号: H20150482, 规格: 每支 1 mL 含托吡卡胺 5 mg 与盐酸去氧肾上腺素 5 mg); 盐酸噻拉嗪注射液 (吉林省华牧动物保健品公司, 产品批号: 191019, 规格: 2 mL: 0.1 g)。

3 主要试剂及仪器 ATP 酶试剂盒 (货号: A016-1) 购自南京建成生物研究所; 组织线粒体分离试剂盒 (货号: C3606)、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1, 货号: C2006) 均购自碧云天生物技术有限公司; AIF 多克隆抗体 (货号: 4642)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (BCL2-Associated X, Bax) 多克隆抗体 (货号: 2722) 均购自美国 CST 公司; B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 多克隆抗体 (货号: ab59348)、Cyt C 单克隆抗体 (货号: ab13575) 均购自美国 Abcam 公司; β -Actin (货号: NC010) 购自西安壮志生物科技有限公司。

解剖显微镜 (德国, LEICA, 型号: EZ4HD); 30G 微量动物注射器 (瑞士, HAMILTON, 型号: 1710RN); 多功能酶标仪 (美国, SpectraMax Paradigm-Multi-Mode Plate Reader, 型号: Molecular Devices); 荧光显微镜 (日本, Olympus, 型号: BX43); 核酸蛋白定量仪 (德国, Eppendorf, 型号: 6136); 琼脂凝胶电泳装置 (北京君意东方电泳设备有限公司, 型号: JY600C); 化学发光机 (上海天能科技有限公司, 型号: TANON 4200SF)。

4 造模及干预方法 所有动物适应性喂养 1 周后开始实验。按照随机数字表法将 52 只大鼠分为对照组 (共 16 只, A 组, 其中 12 只为空白对照, 4 只用于检测线粒体膜电位时的阳性对照组)、RD 自动复位组 (12 只, B 组)、脾气虚 RD 自动复位组 (12 只, C 组)、四君子汤治疗组 (12 只, D 组)。使用既往研究方法制备大鼠脾气虚证及 RD 自动复位模型^[16], 即 A、B 组正常饮食, C、D 组隔日空腹灌服小承气汤, 每次 60 g/kg (相当于 60 kg 成人临床用量 10 倍)^[17, 18], 灌胃当天禁食, 隔日喂饲不限量, 持续至实验结束。按照先前的方法, 实验开始 6 周后, B、C、D 组采用显微镜下手术的方法, 使用微量注射器将 0.1% 的透明质酸钠注射至视网膜下, 制备 RD 自动复位模型。术后显微镜下观察, 如有晶体意外损伤、眼内大量出血或造模失败者剔除实验。于实验开始后 8、9 周各组随机处死 6 只大鼠取材。D 组术后即开始灌服四君子汤, 每日 1 次, 每次 20 g/kg (相当于 60 kg 成人临床用量 10 倍)^[19], 持续灌胃至实验预定时间。

5 观察指标及检测方法

5.1 全身及眼部情况 观察各组大鼠的饮食、活动度、大便、毛色等一般情况。分别在实验开始、6、8、9 周断尾采血 1 mL, 收集红细胞, 用比色法测定红细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性。以大鼠出现精

神倦怠、活动度减少、便溏、毛色枯等症状,同时红细胞 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性降低为脾气虚证造模成功^[17, 20]。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。

5.2 视网膜组织线粒体膜电位检测 按照实验设定的时间处死动物,用于线粒体膜电位阳性对照大鼠在显微镜下玻璃体腔注射氰化羰基-3-氯苯胺 (0.02 mmol/L) 50 μL , 2 h 后处死。动物处死后快速分离全视网膜,随机取出 3 枚,按照线粒体分离试剂盒要求提取高纯度线粒体及视网膜组织细胞核,采用 JC-1 荧光探针检测视网膜线粒体膜电位 ($\Delta\Psi\text{m}$),按照说明书步骤操作,用荧光酶标仪检测 JC-1 聚合物 (激发波长 525 nm,发射波波长 590 nm) 与 JC-1 单体 (激发波长 490 nm,发射波波长 530 nm) OD 值, $\Delta\Psi\text{m}$ 水平用聚合物 OD 值/单体 OD 值表示。

5.3 Western Blot 检测 Bax、Bcl-2、AIF 蛋白水平 各组分别收集 3 枚全视网膜蛋白及 3 枚视网膜组织细胞核蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,常规方法制备 SDS-PAGE 凝胶、电泳、转膜、封闭,加入 Bax (1: 1 000)、Bcl-2 (1: 1 000)、AIF (1: 1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗膜后加入二抗 (1:3 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, ECL 显影、曝光。以 $\beta\text{-actin}$ 为内参,用 Gel-Pro Analyzer 软件测量条带灰度值,计算目的蛋白条带和内参条带灰度值的比值作为目的蛋白表达量。

5.4 石蜡组织切片 AIF、Cyt C 免疫荧光 按照实验预定的时间每组随机摘取眼球 3 枚,立即置于眼球固定液中 24 h,按照常规方法制备石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,进行抗原热修复处理,然后用 2 mL/L 的 Triton X 破膜;滴加过氧化物酶阻断剂 10 min,滴加山羊血清进行封闭,分别加 AIF 抗体 (1:100) 或 Cyt C (1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,第 2 天避光分别加加 FITC 标记的山羊抗兔 Ig G (1:100)、罗丹明标记的山羊抗大鼠 IgG (1:200), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, 1 $\mu\text{g/mL}$ DAPI 避光染细胞核,抗淬灭荧光封片剂封片,荧光显微镜下观察各组 AIF、Cyt C 蛋白表达差异。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,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,所有计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组脾气虚表现及视网膜脱离发生、复位情况比较 (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、体重降低等脾气虚症状, C 组该症状持续至实验结束, D 组于四君子汤给药 3 周后上述症状明显改善。实验开始时,各组大鼠红细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性差异无统计学意义 ($P>0.05$); 6 周后 C 组红细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性较 B 组持续显著降低 ($P<0.01$) 至实验结束, D 组 8 周较 6 周有上升趋势,至 9 周进一步升高,与 C 组比较明显升高 ($P<0.05$)。

B、C、D 组制备 RD 模型中在手术显微镜下均可见鼻侧视网膜灰白色高度隆起范围 $>60\%$,制备模型过程中无意外损伤晶体及眼内大量出血者,大鼠术后早期鼻侧视网膜可见 1/2~1 PD 裂孔,随复位时间延长视网膜脱离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 (8.73 ± 1.98)、(8.72 ± 1.36)、(9.70 ± 1.31) 天,组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。实验过程中 A 组眼部检查无明显异常。

表 1 4 组大鼠不同时间点红细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性比较 (U/mgprot , $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	0 天	6 周	8 周	9 周
A	6	2.05 $\pm$ 0.35	2.06 $\pm$ 0.16	2.05 $\pm$ 0.25	2.08 $\pm$ 0.16
B	6	1.94 $\pm$ 0.32	1.99 $\pm$ 0.26	2.03 $\pm$ 0.14	2.08 $\pm$ 0.19
C	6	1.92 $\pm$ 0.27	1.32 $\pm$ 0.12**	1.40 $\pm$ 0.05**	1.50 $\pm$ 0.17**
D	6	2.12 $\pm$ 0.19	1.39 $\pm$ 0.15**	1.66 $\pm$ 0.07*	1.82 $\pm$ 0.07 $^{\Delta}$

注:与 B 组同期比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 C 组同期比较, $^{\Delta}P<0.05$

2 各组视网膜组织线粒体膜电位测定结果 (表 2) 阳性对照组眼视网膜 $\Delta\Psi\text{m}$ 较空白对照眼显著降低 ($P<0.01$), 与 A 组比较, B 组 8、9 周视网膜组织 $\Delta\Psi\text{m}$ 降低 ($P<0.01$); 与 B 组比较, C、D 组 8 周时 $\Delta\Psi\text{m}$ 降低 ($P<0.01$); 随着实验时间延长,至 9 周时 D 组较 C 组显著升高 ($P<0.05$)。

表 2 不同时间点各组大鼠视网膜 $\Delta\Psi\text{m}$ 结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

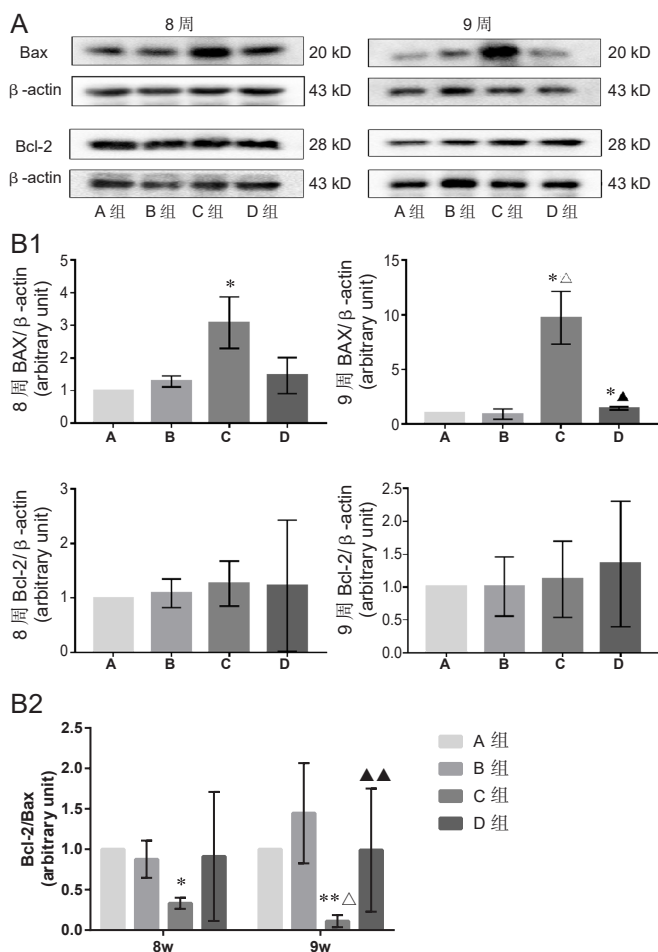
组别	<i>n</i>	8 周	9 周
A	3	2.68 $\pm$ 0.16	2.52 $\pm$ 0.11
阳性对照	3	1.41 $\pm$ 0.10*	1.51 $\pm$ 0.09*
B	3	1.75 $\pm$ 0.36*	1.37 $\pm$ 0.05*
C	3	1.25 $\pm$ 0.12 $^{\Delta}$	1.22 $\pm$ 0.04
D	3	1.18 $\pm$ 0.03 $^{\Delta}$	1.62 $\pm$ 0.12 $^{\Delta}$

注:与 A 组比较, * $P<0.01$; 与 B 组同期比较, $^{\Delta}P<0.01$; 与 C 组同期比较, $^{\Delta}P<0.05$

3 各组视网膜组织 Bax、Bcl-2 及细胞核 AIF 水平比较 (图 1、2) 与 A 组比较, B 组各项均差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 A 组比较, 8、9 周时 C

组视网膜组织 Bax 升高 ($P<0.05$), D 组则较 C 组显著降低 ($P<0.05$), 同时 9 周时 C 组 Bax 水平亦高于 B 组 ($P<0.01$)。8 周及 9 周时 B、C、D 组视网膜组织 Bcl-2 蛋白表达量虽较 A 组有上升趋势, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。8 周时 C 组 Bcl-2/Bax 较 A 组降低 ($P<0.05$), 9 周时较 A、B、D 组降低 ($P<0.01$)。

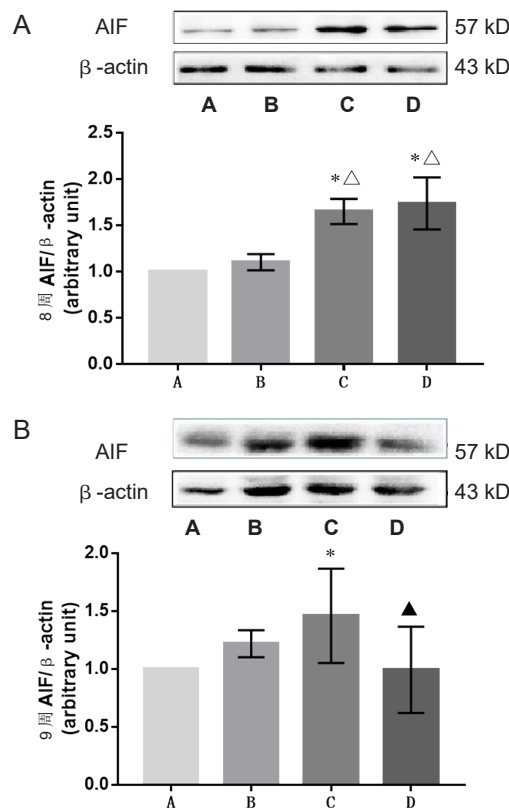
8 周及 9 周时 B 组视网膜组织细胞核 AIF 较 A 组有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 8 周时, 与 B 组比较, C、D 组细胞核 AIF 蛋白表达量升高 ($P<0.01$); 至 9 周时, C 组细胞核 AIF 蛋白表达量仍持续升高, 且高于 D 组 ($P<0.05$)。



注: A 为 8 周及 9 周视网膜组织 Bcl-2 及 Bax 蛋白印迹; B1 为为各组 8 周及 9 周视网膜组织 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达量; B2 为各组 8 周及 9 周时 Bcl-2 及 Bax 比值; 与 A 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P<0.01$; 与 C 组比较, $\blacktriangle P<0.05$

图 1 各组 8 周及 9 周视网膜组织 Bax、Bcl-2 蛋白水平及 Bcl-2 与 Bax 比值

4 各组视网膜细胞色素 C 及 AIF 免疫荧光表达比较 (图 3、4) A 组 Cyt C 主要在线粒体丰富的视



注: A 为 8 周各组蛋白表达条带图; B 为 9 周各组蛋白表达条带图; 与 A 组比较, * $P<0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P<0.01$; 与 C 组比较, $\blacktriangle P<0.05$

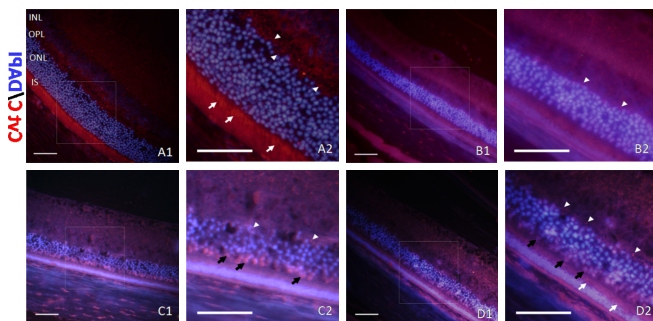
图 2 各组 8 周及 9 周视网膜细胞核 AIF 蛋白水平

网膜感光细胞内节特异性表达, 外丛状层及内核层细胞质也可见着色; 8 周及 9 周 B 组、C 组及 D 组感光细胞内节 Cyt C 表达显著降低、弥散, 外丛状层散在少量点状 Cyt C 着色; B 组个别外核层细胞核区域可见 Cyt C 着色; C 组外核层大量感光细胞核及细胞质可见 Cyt C 阳性表达, 该现象在 9 周时更为明显; D 组外核层也可见部分细胞核及细胞质 Cyt C 阳性着染, 9 周时较同期 C 组细胞核着色降低。

在 A 组视网膜组织切片上, AIF 在神经节细胞、内核层、外丛状层、光感受器层均有特异性表达, 在感光细胞内节聚集呈团状表达, 外核层细胞核中未见有明显 AIF 特异性着色。B 组、C 组及 D 组 8 周及 9 周时可以看到 AIF 在视网膜分布较正常对照组弥散, AIF 散在表达于外核层细胞质及细胞核中, 内核层、外丛状层、感光细胞内节 AIF 表达弥散并较正常对照组明显降低; 9 周时 B 组外核层细胞核特异性 AIF 着色较 8 周时降低, C 组大量外核层细胞核 AIF 特异性着色, D 组外核层散在少许细胞核 AIF 特异性着色。

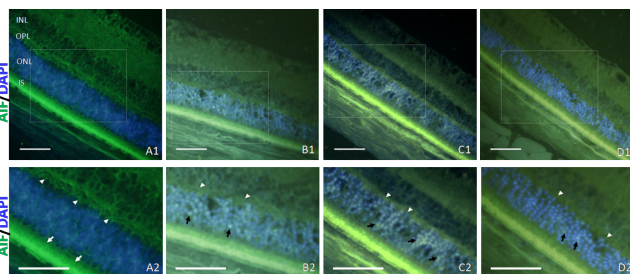
讨论

本实验采用“病证结合”的造模方法观察四君



注: A 为正常对照组, B 为 RD 自动复位模型组, C 为脾气虚 RD 自动复位组, D 为四君子汤组; 红色为 Cyt C, 蓝色为 DAPI; 2 为 1 中白框内区域局部放大; Bar=50 μ m, A1~D1 放大倍数为 40。正常视网膜 Cyt C 特异性着色于感光细胞内节 (A2, 白箭头)、外丛状层 (A2, 白箭头); B、C、D 组 Cyt C 着色降低、弥散, 外层状层少许点状特异性着色 (白箭头); C、D 组 Cyt C 在外核层细胞核及细胞质中出现特异性表达 (黑箭头), D 组感光细胞内节可见 Cyt C 点团状着色 (白箭头)

图 3 各组 9 周视网膜石蜡切片 Cyt C 免疫荧光表达



注: A 为正常对照组, B 为 RD 自动复位模型组, C 为脾气虚 RD 自动复位组, D 为四君子汤组; 绿色为 AIF, 蓝色为 DAPI; 第二排为第一排图片中白框内区域局部放大; Bar=50 μ m, A1~D1 放大倍数为 40。正常视网膜 AIF 特异性着色于光感受器 (A2, 白箭头)、外丛状层 (A2, 白箭头) 及内核层、节细胞层; B、C、D 组 AIF 着色弥散, 外层状层少许点状特异性着色 (白箭头), 外核层细胞质及细胞核 (黑箭头) AIF 着色, C 组该现象较 B、D 组明显加重

图 4 各组 9 周视网膜石蜡切片 AIF 免疫荧光表达

子汤对脾气虚型 RD 复位后视网膜感光细胞凋亡的影响。脾气虚证具体造模方法参照陈小野^[21]提出的耗气破气加饥饱失常法多因素复合造模, 造模时间相对较长, 符合脾气虚证慢性形成的原则, 模型表现较为稳定, 符合中医脾气虚证形成的病因病机理论, 在本次实验过程中观察到脾气虚证一般宏观症状体征在 C、D 组大鼠造模因素开始后 1 周就有所表现, 以后逐渐加重, C、D 组大鼠在术前红细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性明显降低, 证明本实验中脾气虚证大鼠模型的制备是成功的^[22]。在此基础上, 延续既往的方法, 采用对 Cook B 等^[23]RD 模型改进后的方法, 在大鼠视网膜下直接注射透明质酸钠, 造模过程中以及其后对实验眼的观察过程中清楚地观察到实验眼 RD 的发生和自动复位, 成功制备了大鼠脾气虚型 RD 自动复位模型。

脾为后天之本, 脾胃气机不足, 脾运化及胃受纳功能失调, 导致摄食量减少, 湿浊内生, 大便溏泄; 脾主肌肉, 脾气虚则见四肢无力, 倦怠嗜卧; 气虚上不能荣头面, 外不能荣肌肤, 则见精神不振, 毛色枯黄。四君子汤, 是治疗脾胃气虚证的经典方剂。方中人参补益中气为君, 其所含多种药理活性成分均可以抑制凋亡, 主要成分人参皂苷可以抑制神经干细胞凋亡, 且浓度越高抑制作用越明显^[24], 人参皂苷 Rg1 通过调控 Bcl-2 及 Bax 蛋白表降低顺铂致心肌细胞的凋亡^[25], 人参糖肽可有效改善 β 淀粉样蛋白 25-35 干预后鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞凋亡的发生^[26]; 白术甘苦温为臣, 可健脾燥湿, 和胃益气, 是治疗脾胃气虚, 食纳减少, 大便溏泄的要药, 其中白术多糖其主要活性成分被证实具有抗凋亡作用, 可通过下调 Caspase-3、Bax 凋亡蛋白表达, 上调 Bcl-2 抗凋亡蛋白表达保护缺氧的神经细胞减少凋亡^[27]; 茯苓甘淡平为佐, 健脾渗湿, 与白术合用, 使湿去则脾气健, 现代药理学研究表明, 羧甲基茯苓多糖可以降低氟尿嘧啶所致小鼠肠炎模型中结肠组织 p-p38 的表达, 发挥抗凋亡作用^[28]; 甘草益气和中, 既可加强人参、白术益气补中之效, 又可调和诸药为使, 甘草苷是甘草有效成分的提取物, 可以通过降低脑缺血大鼠额前皮质组织中 Bax 蛋白表达及增加 Bcl-2 蛋白表达发挥神经保护作用^[29]。利用经典方剂四君子汤对 D 组进行灌胃后, 该组大鼠脾气虚一般宏观体征较 C 组好转, 且给药 3 周后 D 组红细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性较 C 组升高, 表明四君子汤能从一定程度上改善实验动物脾气虚证。既往的研究已经证实四君子汤能够减少脾气虚大鼠 RD 复位后感光细胞的凋亡, 发挥感光细胞保护作用^[16]。线粒体通路是细胞凋亡的主要途径之一, 由于视网膜光感受器细胞内节存在丰富的整齐排列的线粒体, 因而线粒体通路对感光细胞凋亡中占据着重要的作用。研究显示, 位于线粒体外膜的 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白 (如 Bcl-2、Bcl-x1、Ced-9、Bcl-w 等) 和促凋亡蛋白 (如 Bcl-Xs、Bid、Bax、Bad、Bak 等) 成员的平衡及相互作用紧紧调控着线粒体外膜的通透性 (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP)^[30-32], 当这种平衡被破坏时, 线粒体膜间可溶蛋白, 包括 Caspase 激活物如 CytC、AIF 等以及其他非 Caspases 依赖死亡因子, 可能释放到线粒体外^[6], 导致细胞凋亡的发生。既往的研究显示, Bax^{-/-}小鼠 RD 后感光细胞丢失减少, 使用 Bcl-xL BH4 结构域多肽治疗可以阻止实验性 RD 后感光细胞

死亡,同时抑制 Caspase-9 活性和减少 AIF 易位^[22],这些发现提示 Bcl-2 蛋白家族对 RD 感光细胞死亡发挥至关重要的作用。本研究表明,在术后 2 周及 3 周时,复位后视网膜组织 Bax、Bcl-2 蛋白及视网膜细胞核 AIF 蛋白水平与对照组差异不明显,免疫荧光结果则显示 AIF 及 Cyt C 较正常对照组着色弥散,其中 AIF 特异性表达于少量外核层细胞核;而脾气虚证显著提高了术后 2 周及 3 周视网膜 Bax 及 AIF 蛋白水平,降低了 Bcl-2/Bax 蛋白水平,并且在术后 3 周较术后 2 周蛋白差异更明显,提示随着脾气虚证的时间延长病情加重,尽管视网膜自动复位时间延长,线粒体源凋亡通路仍被显著激活,AIF 及 Cyt C 转位于感光细胞核的表现较视网膜脱离复位组更为显著;四君子汤灌服改善大鼠脾气虚证表现,Bax、AIF、Bcl-2/Bax 蛋白水平均与 RD 对照组差异不显著,术后 3 周视网膜 Bax 及细胞核 AIF 蛋白水平较脾气虚 RD 自动复位组显著降低,AIF 及 Cyt C 在外核层着色情况也明显好转,表明四君子汤药效具有一定的累积过程。

位于线粒体内膜的线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 的开放,会导致线粒体基质渗透性膨胀,进而引起外膜破裂,使促凋亡因子释放^[33], $\Delta\Psi m$ 降低,使细胞内 ATP 合成障碍,导致细胞死亡^[34],此外,Histomi 等在实验性 RD 中证明了 HIV 蛋白酶抑制剂能够保护 RD 后光感受细胞^[22],抑制细胞死亡^[35]。这些发现表明,除了 Bax 通道外,PTPC 开放导致线粒体膜完整性丧失,感光细胞死亡发生。本研究显示,视网膜下注射透明质酸钠后 2 周及 3 周,脱离的视网膜尽管已自动复位,但线粒体内膜通透性仍受影响, $\Delta\Psi m$ 仍显著降低;而脾气虚组较 RD 自动复位组 $\Delta\Psi m$ 降低更为显著,D 组大鼠灌服四君子汤 3 周后 $\Delta\Psi m$ 较脾气虚组升高,线粒体内膜稳定性升高。

综上,脾气虚证能够加重 RD 复位后视网膜线粒体内膜及外膜损伤,导致 $\Delta\Psi m$ 降低、视网膜组织 Bax 及细胞核 AIF 蛋白水平升高、AIF 及 Cyt C 向感光细胞核转位,使感光细胞凋亡发生显著增多;四君子汤治疗 3 周后,可稳定视网膜线粒体内膜及外膜,提高视网膜 $\Delta\Psi m$ 、降低视网膜组织 Bax 及细胞核 AIF 蛋白水平,抑制 AIF 及 Cyt C 向感光细胞核转位,降低脾气虚 RD 复位后感光细胞凋亡的发生,发挥神经保护作用。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Lo AC, Woo TT, Wong RL, et al. Apoptosis and other cell death mechanisms after retinal detachment: implications for photoreceptor rescue[J]. *Ophthalmologic*, 2011, 226 (Suppl 1): 10-17.
- [2] Murakami Y, Notomi S, Hisatomi T, et al. Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 37: 11-140.
- [3] Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death[J]. *Nat Med*, 2000, 6 (5): 513-519.
- [4] Mishra E, Thakur MK. Alterations in hippocampal mitochondrial dynamics are associated with neurodegeneration and recognition memory decline in old male mice[J]. *Biogerontology*, 2022, 23 (2): 251-271.
- [5] Shoshan-Barmatz V, Krelin Y, Chen Q. VDAC1 as a player in mitochondria-mediated apoptosis and target for modulating apoptosis[J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24 (40): 4435-4446.
- [6] Rasheed MZ, Tabassum H, Parvez S. Mitochondrial permeability transition pore: a promising target for the treatment of Parkinson's disease[J]. *Protoplasma*, 2017, 254 (1): 33-42.
- [7] Santucci R, Sinibaldi F, Cozza P, et al. Cytochrome c: an extreme multifunctional protein with a key role in cell fate[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 136: 1237-1246.
- [8] Novo N, Ferreira P, Medina M. The apoptosis-inducing factor family: Moonlighting proteins in the crosstalk between mitochondria and nuclei[J]. *IUBMB Life*, 2021, 73 (3): 568-581.
- [9] Wubben TJ, Besirli CG, Zacks DN. Pharmacotherapies for retinal detachment[J]. *Ophthalmology*, 2016, 123 (7): 1553-1562.
- [10] 张妍春, 杨新光, 朱赛林, 等. 益视汤对脾气虚证兔视网膜脱离复位后超微结构的影响 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2010, 20 (2): 67-71.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [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] 屈小虎, 黄玲, 陈慧, 等. 脾气虚证和脾不统血证模型大鼠脾主肌肉实质的探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(2): 217-222.
- [15] Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies?[J]. J Pharmacol Pharmacother, 2013, 4(4): 303-306.
- [16] 任秀瑜, 康紫薇, 张妍春, 等. 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[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(2): 204-211.
- [17] 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.
- [18] 彭艳, 易受乡, 常小荣, 等. “脾虚证”与能量代谢关系的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(11): 2278-2281.
- [19] 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.
- [20] 彭艳, 易受乡, 常小荣, 等. “脾虚证”与能量代谢关系的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(11): 2278-2281.
- [21] 陈小野主编. 实用中医症候动物模型学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医学院联合出版社, 1993: 184-189.
- [22] 王彩霞, 李德新, 王淑娟, 等. 脾虚衰老大鼠红细胞膜 ATP 酶活性及海马神经 PKC 活性的变化[J]. 中医药学刊, 2005, 23(8): 1362-1364.
- [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] 闻丽芬, 徐静. 人参皂苷在神经干细胞中的干预机制及对 HIF-1 α -VEGF 表达水平的影响研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(4): 191-195.
- [25] 卫衡, 施展, 张若冰, 等. 人参皂苷 Rg1 对顺铂致 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用与机制[J/OL]. 吉林农业大学学报, 2021, doi: 10.13327/j.jjlau.2021.1021.
- [26] 胡婧婷, 邱智东, 朱迪夫, 等. 人参糖肽的结构及其对 A β ₂₅₋₃₅ 处理 PC12 细胞的抗凋亡作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(2): 286-293.
- [27] 胡微煦, 向勤, 文珠, 等. 白术多糖抗神经细胞缺氧性凋亡的机制研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4): 84-88.
- [28] 王灿红, 何晓山, 张丽静, 等. 羧甲基茯苓多糖对氟尿嘧啶致肠炎小鼠的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 484-489.
- [29] 王秀云, 李云, 朱含笑, 等. 甘草苷对脑卒中后抑郁大鼠额前皮质脑源性神经营养因子及 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(6): 647-650.
- [30] Cheung EC, Melanson-Drapeau L, Cregan SP, et al. Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms[J]. J Neurosci, 2005, 25(6): 1324-1334.
- [31] Deng H, Yue JK, Zusman BE, et al. B-Cell lymphoma 2 (Bcl-2) and regulation of apoptosis after traumatic brain injury: a clinical perspective[J]. Medicina (Kaunas), 2020, 56(6): 300.
- [32] Ngoi NYL, Choong C, Lee J, et al. Targeting mitochondrial apoptosis to overcome treatment resistance in cancer[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(3): 574.
- [33] Forini F, Kusmic C, Nicolini G, et al. Triiodothyronine prevents cardiac ischemia/reperfusion mitochondrial impairment and cell loss by regulating miR30a/p53 axis[J]. Endocrinology, 2014, 155(11): 4581-4590.
- [34] Zhang C, Liao P, Liang R, et al. Epigallocatechin gallate prevents mitochondrial impairment and cell apoptosis by regulating miR-30a/p53 axis[J]. Phytomedicine, 2019, 61: 152845.
- [35] Weaver JG, Tarze A, Moffat TC, et al. Inhibition of adenine nucleotide translocator pore function and protection against apoptosis *in vivo* by an HIV protease inhibitor[J]. J Clin Invest, 2005, 115(7): 1828-1838.

(收稿: 2021-12-14 在线: 2023-02-08)

责任编辑: 汤静