

温阳益气活血方对遗传性视网膜色素变性小鼠感光细胞凋亡的影响及机制研究

邓婷婷¹ 窦仁慧² 潘琳¹ 张有花² 苑维² 邓辉² 金明²

摘要 **目的** 观察中药温阳益气活血方对遗传性视网膜色素变性小鼠视网膜感光细胞凋亡的影响,并探寻其分子机制。**方法** 将 RDS (retinal degeneration slow) 小鼠随机分为模型组和中药组,并设 C57BL/6J 小鼠为正常对照组,每组 4 雌 2 雄。中药组自雌雄合笼之日起开始给予温阳益气活血方 (10 mg/g) 灌胃,仔鼠出生后母鼠给予中药水煎液代替日常饮水,仔鼠出生 7 天开始给予中药水煎剂小剂量灌胃,出生 21 天按成年鼠剂量灌胃。模型组和正常组同时给予生理盐水灌胃。3 组均于仔鼠出生后 18、28、48 天时采用视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 检测视网膜功能,进行 HE 染色并计算外核层感光细胞层数, TUNEL 法检测感光细胞凋亡率,免疫组织化学染色法计算视紫红质 (Rhodopsin) 及碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 表达。**结果** 与模型组比较,仔鼠出生后 18 天时,中药组最大混合反应 ERG (Max-ERG) a、b 波振幅及 bFGF 表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 28、48 天时,中药组 Max-ERG a、b 波振幅明显升高,外核层感光细胞层数明显增加,视网膜感光细胞凋亡率明显降低, Rhodopsin 及 bFGF 表达明显升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 温阳益气活血方可以有效抑制 RDS 小鼠感光细胞的凋亡,其机制可能与上调 bFGF 的表达有关。

关键词 温阳益气活血方; 视网膜色素变性; 感光细胞; 凋亡; 视紫红质; 碱性成纤维细胞生长因子

Effect and Mechanisms of Wenyang Yiqi Huoxue Recipe on the Apoptosis of Photoreceptor Cells in Retinal Degeneration Slow Mice DENG Ting-ting¹, DOU Ren-hui², PAN Lin¹, ZHANG You-hua², YUAN Wei², DENG Hui², and JIN Ming² 1 Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029), China; 2 Department of Ophthalmology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Wenyang Yiqi Huoxue Recipe (WYHR) on the apoptosis of photoreceptor cells in retinal degeneration slow (RDS) mice, and to investigate its molecular mechanisms. **Methods** RDS mice were randomly divided into the model group and the Chinese medicine group, and C57BL/6J mice were selected as the normal control group. Each group consisted of 4 female mice and 2 male mice. Mice in the Chinese medicine group were administered with WYHR (10 mg/g) by gastrogavage since mating. Baby mice drunk WYHR decoction instead of drinking water once they were born. The offspring were administrated with low dose WYHR decoction by gastrogavage from the 7th postnatal day, and the dose was increased to that for adult mice from the 21st postnatal day. Physiological saline was administrated to mice in the model group and the normal control group by gastrogavage. At 18, 28 and 48 postnatal days, electroretinogram (ERG) was used to evaluate the retina functional variation, and the apoptotic rate of photoreceptor cells was determined by TUNEL staining. HE staining was performed. The number of photoreceptor cells of the outer nuclear layer was calculated. Furthermore, effect of WYHR on Rhodopsin and basic fibroblast growth factor (bFGF) expression was examined using immunochemical assay. **Results** Compared with the model group, a- and b-wave latency and amplitude, as well as the bFGF expression sharply increased in the Max-ERG of the Chinese medicine group ($P < 0.05$, $P < 0.01$) at 18 postnatal days. At 28 and 48 postnatal days, a- and b-wave latency and amplitude sharply increased, pho-

作者单位: 1. 中日友好医院临床医学研究所 (北京 100029); 2. 中日友好医院眼科 (北京 100029)

通讯作者: 金明, Tel: 010-84206298, E-mail: jinming321@yahoo.com.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2013.08.1122

photoreceptor cell layer numbers of the outer nuclear layer obviously increased, the apoptosis rate of retinal photoreceptor cells obviously decreased, expressions of Rhodopsin and bFGF in the Chinese medicine group significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion WYHR could effectively inhibit the apoptosis of photoreceptor cells in RDS mice, which might be attributed to up-regulating bFGF expression.

KEYWORDS Wenyang Yiqi Huoxue Recipe; retinitis pigmentosa; photoreceptor cell; apoptosis; rhodopsin; basic fibroblast growth factor

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一种视网膜进行性营养不良性退行病变,其临床表现主要为夜盲、进行性视野缩小、视力下降、眼底特征性改变及视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 波形振幅减低或熄灭^[1,2]。中医药治疗 RP 有着悠久的历史,虽然被多方面证明具有可靠疗效但却缺乏科学有力的证据,临床科研设计不够严谨,缺乏与临床观察相配套的实验研究^[3],特别是关于中医药治疗 RP 作用机制的研究甚少。温阳益气活血方为笔者临床治疗 RP 的基本方,前期临床发现患者治疗前后对比视野和 ERG 均有明显改善。近年研究表明,感光细胞凋亡是 RP 重要的发病机制之一^[4]。因此,本研究以遗传性视网膜色素变性 RDS (retinal degeneration slow) 小鼠为研究对象,观察温阳益气活血方对小鼠视网膜感光细胞凋亡的影响,并进一步探寻其分子机制,旨在为临床中医药治疗 RP 提供依据。

材料与方法

1 动物 遗传性 RP 纯合动物模型 RDS 小鼠 (C3H-Prph^{2Rds}) 和正常对照 C57BL/6J 小鼠,8 周龄,体重 (20 ± 2) g,均购自南京大学模式动物研究所,动物合格证号: SCXK (苏) 2010 - 0001。其中 RDS 小鼠 12 只,雌性 8 只,雄性 4 只;正常对照小鼠 6 只,雌性 4 只,雄性 2 只。所有小鼠于 SPF 级动物房饲养,标准颗粒饲料和无菌蒸馏水喂养,自由饮食,室内通风良好,室温 22 ~ 25 °C,背景噪音 (40 ± 10) dB,光/暗周期 12 h/12 h (光照时间 6:00 ~ 18:00)。

2 药物、试剂及仪器 温阳益气活血方,组方:鹿茸、红参、丹参、葛根、夜明砂、菊花和炙甘草。上述药物水煎 2 次,煎液过滤后浓缩并灭菌,浓度为 1 g/mL,真空包装,4 °C 冰箱保存备用。TUNEL 原位细胞凋亡试剂盒,美国 Roche 公司;小鼠抗鼠视紫红质 (Rhodopsin) 单抗,美国 Abcam 公司;兔抗鼠碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 多抗,美国 Santa Cruz 公司。RETIScan 多焦视觉电生理检查系统,德国 ROLAND 公司;CRM-440 切片机,日本 SAKURA 公司;光学显微镜,日本 Olympus 公司。

3 分组及给药 8 周龄 RDS 小鼠雌雄共养,每只鼠笼内 2 雌 1 雄,按随机数字表法分为中药组和模型组,每组 2 笼;同时设 C57BL/6J 小鼠为正常对照组 (正常组)。自雌雄合笼日起开始给药。(1) 中药组:小鼠雌雄合笼后均给予温阳益气活血方水煎剂灌胃,剂量为 10 mg/g 体重。仔鼠出生后母鼠停止灌胃,给予中药水煎液取代日常饮水,浓度为 0.10 g/mL。仔鼠出生 7 天后开始给予中药水煎剂 0.05 mL 灌胃,14 天后改为 0.10 mL,每天 1 次。小鼠离乳后 (出生后 21 天) 按 10 mg/g 体重灌胃。(2) 模型组和正常组:小鼠雌雄合笼后均给予生理盐水 0.20 mL 灌胃。仔鼠出生后母鼠停止灌胃。仔鼠出生 7 天后开始给予生理盐水 0.05 mL 灌胃,14 天后改为 0.10 mL,21 天后改为 0.20 mL,每天 1 次。3 组均于仔鼠出生后 18、28、48 天时分别随机选取 6 只仔鼠作如下处理。

4 ERG 检测 实验前将小鼠暗适应 2 h,速眠新 0.4 mL/kg 体重麻醉,常规散瞳 (复方托品酰胺)。于暗红光条件下安放电极,记录电极置于小鼠左眼角巩膜缘,参考电极刺入左侧颊部皮下,接地电极置于尾部。再次暗适应 5 min 后,顺序记录视杆反应 ERG (Rod-ERG)、最大混合反应 ERG (Max-ERG)、振荡电位 (OPs),均为单次白色闪光刺激,闪光刺激间隔 1 min;再于 20 cd/m² 背景光下明适应 10 min 后,记录视锥反应 ERG (Cone-ERG)、闪烁 ERG (Flick-ERG)。Cone-ERG 为连续白光闪光刺激,共叠加 3 次,刺激频率为 0.5 Hz;Flick-ERG 刺激光亦为白光,频率为 20 Hz,叠加约 10 次,直至波形平滑为止。Rod-ERG 的刺激光强度为 $1.54 \times 10^{-2} \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$;其他 ERG 刺激光强度均为 $2.0 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ 。OPs 通频带为 100 ~ 300 Hz,其余各项均为 1 ~ 100 Hz。

5 视网膜 HE 染色及外核层感光细胞层数 分别于出生后 18、28、48 天处死仔鼠,立刻摘除眼球,置于 10% 的中性甲醛中固定 48 h,脱水,石蜡包埋,切片,厚度为 4 μm,进行 HE 染色,在光学显微镜下 (200 ×) 分别观察、拍照。图像采集完成后,每只小鼠标本取 3 张不连续切片,每张切片在镜下沿视神经至锯齿缘等距离选取 5 处视野,计算视网膜外核层感光

细胞的层数,进行定量分析。

6 TUNEL 法检测感光细胞凋亡 视网膜石蜡切片脱蜡、脱水,PBS 洗 2 次后滴加 TUNEL 反应混合液,湿盒中 37 ℃ 孵育 60 min,阴性对照只加荧光素标记溶液;PBS 洗 3 次,加入 50 μL 转化剂-POD,于湿盒中 37 ℃ 孵育 30 min;PBS 洗 3 次,加入 50 ~ 100 μL DAB 底物溶液,室温孵育 30 min,PBS 洗 3 次,苏木素复染。细胞核呈深棕色者为阳性凋亡细胞。自视盘向锯齿缘方向连续取 3 个视野,500 μm/视野,记录每个视野中阳性细胞数及感光细胞总数,统计 6 张不同切片,计算平均值。细胞计数采用 3Y-Pixel-PRO 分析软件,感光细胞凋亡率(%) = 阳性细胞数/感光细胞总数 × 100%。

7 视网膜石蜡切片免疫组织化学染色及 Rhodopsin、bFGF 表达定量分析 石蜡切片脱蜡、脱水后置于 0.3% H₂O₂ 液中,室温孵育 15 min,以封闭内源性过氧化物酶;PBS 洗 3 次后,加入 Rhodopsin、bFGF 一抗,4 ℃ 孵育过夜,PBS 洗后,加入过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 3 h,加 DAB 显色。免疫组化标本在光学显微镜下(200 ×)分别观察、拍照,图像采集完成后,用 ImagePlusPro 6.0 图像分析系统对 Rhodopsin、bFGF 阳性表达进行分析。每只小鼠取 3 张不连续切片,每张切片随机选取 6 处视野,计算阳性表达的平均光密度(OD)值,进行定量分析。

8 统计学方法 应用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据进行独立 *t* 检验分析;多组数据进行单因素方差分析,多组间的两两比较采用 SNK 法。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠不同日龄 ERG 比较(图 1,表 1)

正常组小鼠各种反应波形均可引出。模型组小鼠暗适应中的 Max-ERG 大多可引出,Rod 反应波形部分可引出,Ops 基本未成形且与背景噪音接近,受干扰较大,很难分辨;明适应中的 Cone 反应波形只有个别小鼠可以引出,Flick 反应波形未引出。故将 Max-ERG a、b 波的潜时和振幅作为定量统计指标,Rod 反应波形作为定性参考指标。

仔鼠出生后 18、28、48 天时,与正常组同期比较,除 18 天时 Max-ERG b 波潜时差异无统计学意义外,模型组 Max-ERG a、b 波潜时显著延长(*P* < 0.05),Max-ERG a、b 波振幅显著下降(*P* < 0.05)。与模型组同期比较,中药组 Max-ERG a、b 波振幅明显升高(*P* < 0.05);两组 Max-ERG a、b 波潜时比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。仔鼠出生后 18 天时,中药组有 3 只小鼠可引出 Rod 反应波形;28 天时,中药组和模型组各有 3 只小鼠可引出 Rod 反应波形;48 天时,中药组有 2 只小鼠可引出 Rod 反应波形,模型组有 1 只小鼠可引出 Rod 反应波形。

2 各组小鼠不同日龄视网膜 HE 染色及外核层感光细胞层数比较(图 2,表 2) 正常组小鼠视网膜各层结构完整,外核层感光细胞有 9 ~ 10 层,且不随小鼠日龄的增加而减少,其外侧依次可见感光细胞内节与外节。中药组与模型组小鼠视网膜结构相似,外核层与内核层分界清楚,较正常组节段层薄,外丛状层变薄,排列疏松、欠整齐,各时间点均缺少外节,其余结构发育正常。仔鼠出生后 28、48 天时,中药组较模型组外核层感光细胞层数明显增加(*P* < 0.05)。外核层感光细胞层数随小鼠日龄增长而逐渐减少,与本组 18 天时比较,模型组 48 天差异有统计学意义(*P* < 0.05)。内核层的厚度也有随日龄增长变薄的趋势。

表 1 各组小鼠不同日龄 Max-ERG 潜时和振幅比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	日龄 (d)	Max-ERG			
			a 波		b 波	
			潜时(μm)	振幅(μV)	潜时(μm)	振幅(μV)
正常	6	18	27.33 ± 6.12	70.35 ± 9.93	95.00 ± 15.22	112.40 ± 23.42
		28	17.67 ± 2.16	98.47 ± 13.97	59.17 ± 2.79	212.17 ± 28.18
		48	16.50 ± 1.52	151.83 ± 26.71	52.50 ± 6.38	376.33 ± 64.88
模型	6	18	63.00 ± 11.71 *	2.53 ± 0.82 *	119.17 ± 17.43	20.88 ± 4.22 *
		28	39.33 ± 2.50 *	1.78 ± 0.37 *	117.33 ± 16.23 *	46.77 ± 10.64 *
		48	28.17 ± 4.45 *	1.69 ± 0.42 *	98.33 ± 15.59 *	39.98 ± 4.71 *
中药	6	18	59.33 ± 12.56	7.82 ± 1.50 [△]	111.33 ± 17.22	32.20 ± 4.94 [△]
		28	36.00 ± 4.69	5.33 ± 0.73 [△]	115.67 ± 9.77	72.22 ± 13.27 [△]
		48	27.67 ± 4.93	4.85 ± 1.05 [△]	97.67 ± 11.84	57.82 ± 5.97 [△]

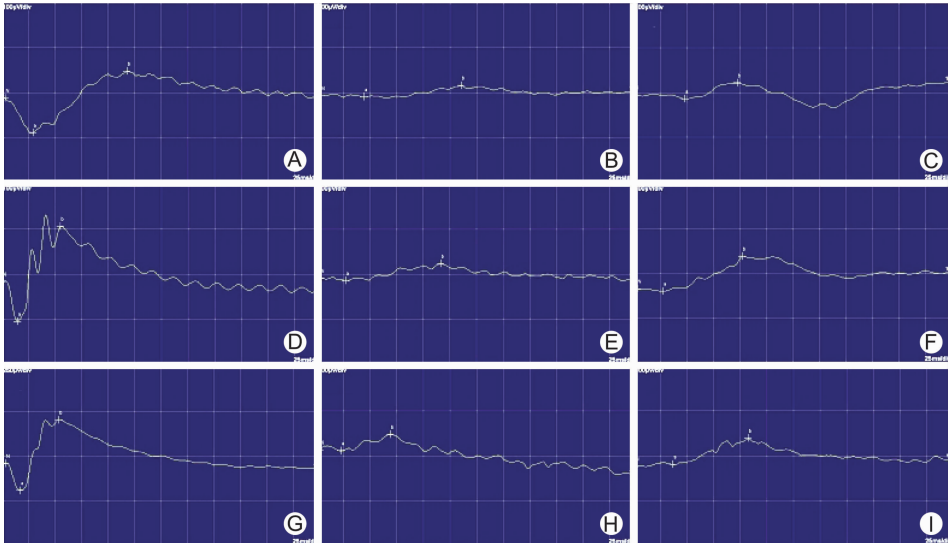
注:与正常组同期比较,**P* < 0.05;与模型组同期比较,[△]*P* < 0.05

表 2 各组小鼠不同日龄外核层感光细胞层数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	感光细胞层数		
		18 天	28 天	48 天
正常	6	9.96 $\pm$ 0.52	10.18 $\pm$ 0.42	9.87 $\pm$ 0.38
模型	6	9.86 $\pm$ 0.49	8.28 $\pm$ 0.35	6.34 $\pm$ 0.40 *
中药	6	10.34 $\pm$ 0.48	9.51 $\pm$ 0.50 Δ	8.10 $\pm$ 0.45 Δ

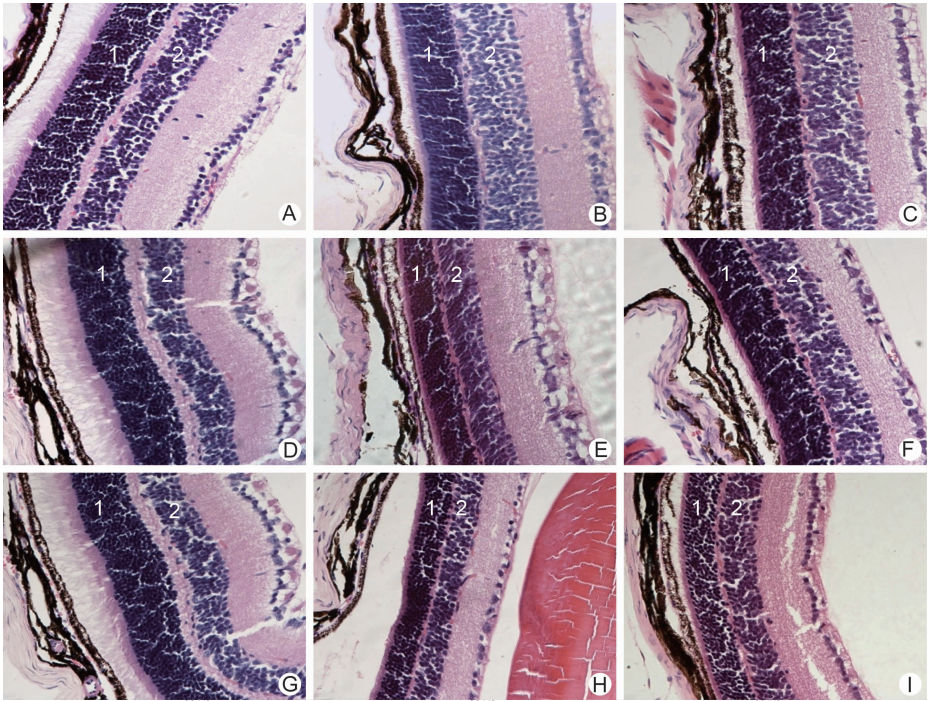
注:与本组 18 天时比较, * $P < 0.05$; 与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$

3 各组小鼠 TUNEL 凋亡检测结果比较(图 3, 表 3) 正常组小鼠在外核层偶见阳性细胞。仔鼠出生后 18 天时,模型组和中药组小鼠外核层均出现少量散在细胞核呈深棕色的凋亡细胞,中药组着色较浅,两组凋亡细胞数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。出生后 28 天时,模型组和中药组外核层阳性染色细胞均较本组 18 天时增多($P > 0.05$),且模型组凋亡细胞



注:A、D、G 为正常组,B、E、H 为模型组,C、F、I 为中药组;A ~ C 为仔鼠出生 18 天时;D ~ F 为仔鼠出生 28 天时;G ~ I 为仔鼠出生 48 天时;图 2 同;纵轴为 250 μ V/div,横轴为 25 ms/div

图 1 各组小鼠不同日龄 Max-ERG 变化



注:1 为外核层;2 为内核层

图 2 各组小鼠不同日龄视网膜 HE 染色比较 ($\times 200$)

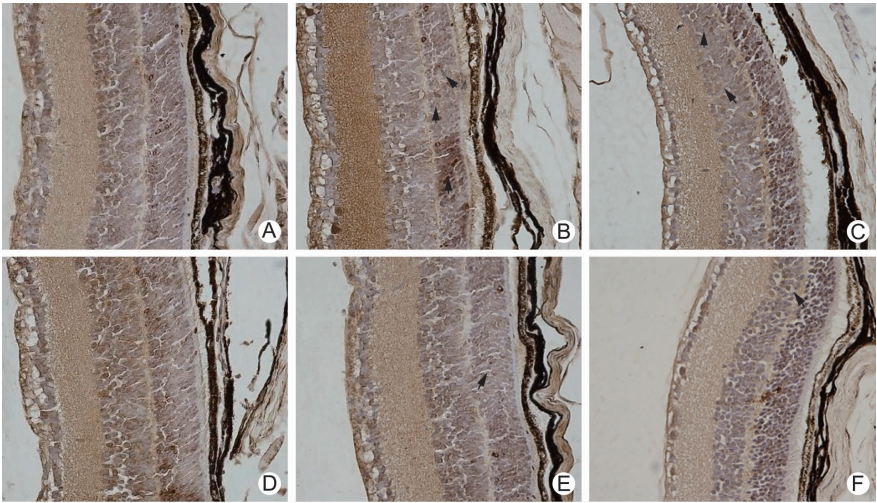
表 3 模型组与中药组小鼠不同日龄感光
细胞凋亡比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	日龄(d)	凋亡细胞数 (个/500 μm)	凋亡率 (%)
模型	6	18	11.2 $\pm$ 0.4	6.1
		28	15.0 $\pm$ 0.6	9.4
		48	17.5 $\pm$ 0.5 [*]	12.5 [*]
中药	6	18	9.9 $\pm$ 0.4	5.2
		28	10.2 $\pm$ 0.5 ^{Δ}	5.5 ^{Δ}
		48	10.8 $\pm$ 0.8 ^{Δ}	5.7 ^{Δ}

注:与本组 18 天时比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组同期比较, ^{Δ} $P < 0.05$

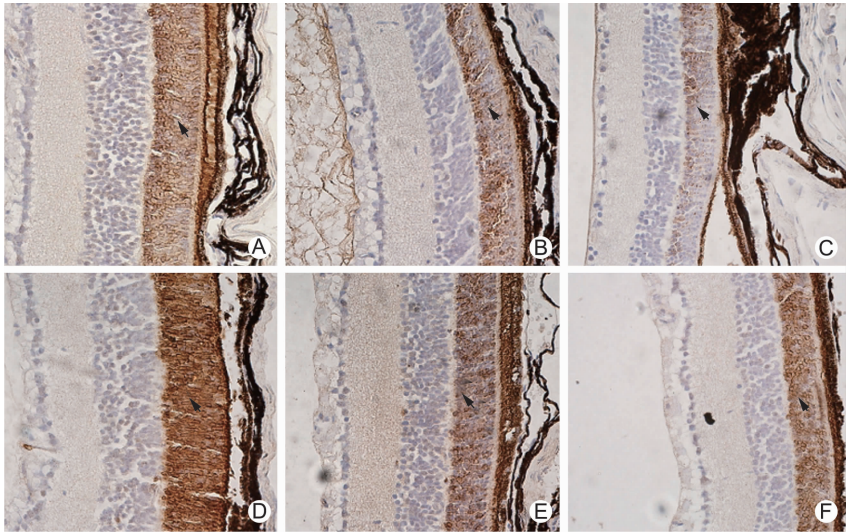
数明显多于中药组($P < 0.05$),模型组内核层也出现少量阳性染色凋亡细胞。出生后 48 天时,模型组和中药组外核层依然有较多阳性细胞,两组内核层均出现阳性染色凋亡细胞,模型组凋亡细胞数明显多于同期中药组($P < 0.05$)。与本组 18 天时比较,模型组 48 天时凋亡细胞数明显增加($P < 0.05$)。

4 模型组与中药组小鼠不同日龄视网膜 Rhodopsin 表达比较(图 4,表 4) Rhodopsin 主要表达于视网膜外核层的视杆细胞。模型组和中药组 Rhodopsin 阳性表达细胞均见于外核层,且阳性表达细胞



注:A~C 为模型组;D~F 为中药组;A、D 为仔鼠出生 18 天时;B、E 为仔鼠出生 28 天时;C、F 为仔鼠出生 48 天时;下图同;箭头所示为 TUNEL 染色阳性细胞

图 3 模型组与中药组小鼠不同日龄视网膜 TUNEL 染色比较 ($\times 200$)



注:箭头所示为外核层

图 4 模型组与中药组小鼠不同日龄视网膜 Rhodopsin 表达比较
(免疫组化染色, $\times 200$)

表 4 模型组与中药组小鼠不同日龄视网膜 Rhodopsin 及 bFGF 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	日龄(d)	Rhodopsin 表达	bFGF 表达
模型	6	18	0.312 ± 0.011	0.135 ± 0.016
		28	0.279 ± 0.015	0.131 ± 0.017
		48	0.240 ± 0.014 *	0.098 ± 0.015
中药	6	18	0.347 ± 0.038	0.253 ± 0.047 $\Delta\Delta$
		28	0.320 ± 0.020 Δ	0.328 ± 0.025 $\Delta\Delta$
		48	0.293 ± 0.013 Δ	0.267 ± 0.022 $\Delta\Delta$

注:与本组 18 天时比较,* $P < 0.05$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

数量均随着小鼠日龄的增长而减少,以模型组更为显著。仔鼠出生后 18 天时,中药组与模型组 Rhodopsin 表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);28、48 天时,中药组 Rhodopsin 表达明显高于模型组($P < 0.05$)。与本组 18 天时比较,模型组 48 天时 Rhodopsin 表达明显降低($P < 0.05$)。

5 模型组与中药组小鼠视网膜 bFGF 表达比较(图 5,表 4) bFGF 主要在模型组和中药组的内核层表达,神经节细胞层和外核层也有少量表达。仔鼠出生后 18、28、48 天时,中药组 bFGF 阳性表达均较模型组同期明显增高($P < 0.01$)。

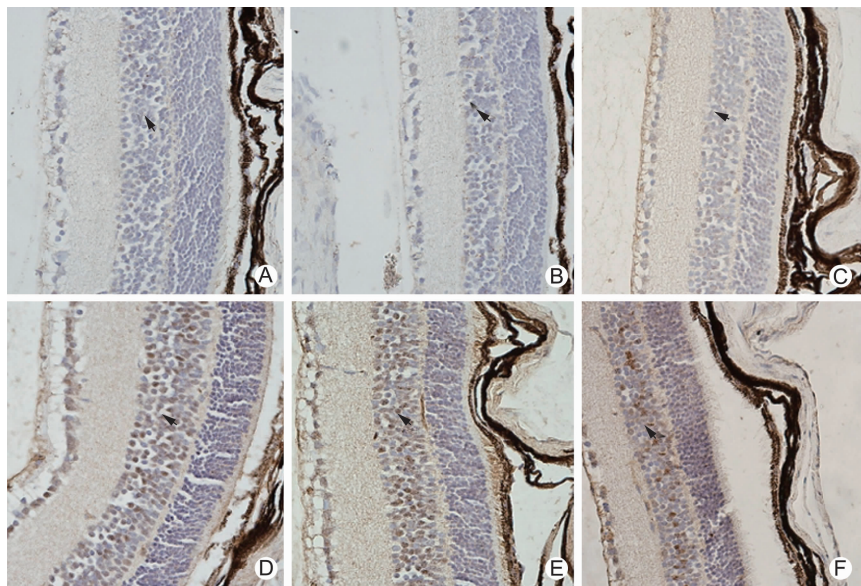
讨 论

中医学称 RP 为“高风内障”、“高风雀目”。中医学理论认为,本病为先天禀赋不足,肝肾脾虚;或后天失养,阳气下陷,不能升清;或肝肾亏损,精血不足;或脾

胃虚弱,清阳不升而致。RP 以中心视力下降、夜盲、视野缩窄为主要表现,临床上采用温阳益气活血法趋病之本改善视瞻昏渺:益气健脾,推动视网膜有氧供给;温阳补肾,改善视网膜的视觉功能;活血祛瘀,助视网膜纤细的动脉充盈和增加视盘血供^[5]。本法标本辨治体现了中医改善视觉功能的优势。

温阳益气活血方中鹿茸大补阳气,益精血,为君药;红参益气升阳,丹参活血通络,共为臣药;夜明砂清热明目,起佐助的作用。现代药理研究证实,鹿茸含有丰富的生长因子,且具有抗氧化和改善血液循环的作用,能促进机体的新陈代谢和生长发育,对神经、心血管、免疫、生殖系统等具有显著的调节作用^[6],但其在眼科 RP 方面的研究尚未见报道。笔者前期研究证实,红参能抑制糖尿病大鼠神经节细胞的凋亡,具有神经保护作用^[7]。丹参具有改善微循环及血液流变性的作用,其所含的丹参素能增强视网膜血管及视神经纤维的耐缺氧能力,改善缺血缺氧损伤所致的线粒体氧化磷酸化功能障碍,使细胞凋亡和坏死的百分率明显降低^[8]。

感光细胞是传送视觉信息的第一级神经元,在视觉形成中具有极其重要的作用^[9]。RDS 小鼠是由于编码盘膜边缘蛋白(peripherin)的基因变异而导致感光细胞凋亡的先天性遗传性视网膜变性模型^[10]。这是一种公认的较为理想的先天性视网膜变性模型鼠,具有明确的 peripherin/RDS 基因突变,属常染色体显性遗传,这种基因突变在人类也可引起 RP,即常染色



注:箭头所示为内核层

图 5 模型组与中药组小鼠不同日龄视网膜 bFGF 表达比较 (免疫组化染色, ×200)

体显性遗传视网膜色素变性 (autosomal dominant retinitis pigmentosa, ADRP), 且 RDS 小鼠属于慢性视网膜变性模型鼠, 发病过程与大多数 RP 患者相似, 因此被广泛应用于 RP 发生和干预的研究^[11]。RDS 小鼠出生后 7 天视网膜发育正常, 感光细胞凋亡最早出现在出生后 2 周, 14~28 天时感光细胞层和外丛状层快速退化并迅速丧失功能, 出生后 18 天是其凋亡的第一个高峰^[12], 因此本研究选择第 18 天、凋亡开始由快变慢的转折点第 28 天, 以及凋亡逐渐进入缓慢阶段的第 48 天进行观察比较。

ERG 是目前客观评价人类和动物视网膜电生理功能的可靠检测方法之一, 主要反映视网膜从光感受器细胞到无长突细胞的全层电活动, 能了解视锥细胞和视杆细胞的功能及被损害程度^[13]。ERG 是临床上客观评价 RP 视功能的一种极有价值的检查方法, 特别对其早期诊断有独特的意义。在病变早期表现为 ERG 潜时的延长和振幅的降低, 暗适应阈值升高, 至晚期可见 ERG 熄灭。由本实验结果可知, 正常小鼠随日龄增长, a、b 波振幅逐渐上升, 至 48 天时达到最高值。而 RDS 小鼠由于感光细胞变性凋亡, 其 b 波振幅最高值出现在 28 天时, 至 48 天时振幅已经开始下降。在 18、28、48 天时, 中药组 a、b 波振幅均明显高于模型组, 说明温阳益气活血方对于小鼠视网膜功能的改善从变性早期即已开始, 而且本研究是从母鼠孕期开始干预用药, 这些均提示临床上对于此类疾病患者应本着早发现、早治疗的原则。

视网膜 HE 染色结果显示, 模型组和中药组视网膜厚度均随着小鼠日龄的增长而变薄, 细胞丢失主要发生在外核层, 但中药组的变性速度明显较慢。TUNEL 染色结果显示, 不同日龄中药组和模型组均可在外核层发现阳性染色细胞, 在 28、48 天时中药组凋亡细胞数量较模型组减少。TUNEL 阳性细胞表达的程度与外核层变薄的程度在时间上具有一致性。

另外, RDS 小鼠在 18 天时 a、b 波振幅较正常小鼠即显著下降, 而同期 HE 染色所示的形态学改变与正常组差异并不大。中药组和模型组的形态学差异在 28 天时才有统计学意义。证实其功能下降早于形态学改变, 同时说明温阳益气活血方对于 RDS 小鼠感光细胞的改善先表现在视功能方面, 而后体现在形态学上。

Rhodopsin 主要表达于视锥与视杆细胞外节以及感光细胞层。由于 RDS 小鼠外节不发育, 故只在外核层的视杆细胞可见其阳性表达。Rhodopsin 的表

达量在一定程度上可反映视杆细胞的数量。本实验结果表明, 温阳益气活血方可以保持 RDS 小鼠视杆细胞的数量, 从而延缓了 RP 的进展。

bFGF 是一种多功能的多肽生长因子。在视网膜中, bFGF 提供了重要的丝裂原活性。bFGF 是第一个被证实对 RP 有疗效的神经营养因子。本研究中, bFGF 的阳性表达主要在内核层, 且中药组的阳性表达在各时间点均明显高于模型组。温阳益气活血方可以促进内源性 bFGF 的表达, 对感光细胞的凋亡起着重要的抑制作用。

综上所述, 温阳益气活血方能够改善遗传性视网膜色素变性 RDS 小鼠感光细胞的功能, 延缓感光细胞凋亡的进程, 这一作用与其促进 bFGF 表达密切相关。

参 考 文 献

- [1] Mitamura Y, Mitamura-Aizawa S, Nagasawa T, et al. Diagnostic imaging in patients with retinitis pigmentosa[J]. J Med Invest, 2012, 59(1-2): 1-11.
- [2] 张起, 余敏忠, 陈振超. 视网膜色素变性的 ERGs 观察[J]. 中国实用眼科杂志, 2000, 18(1): 11-13.
- [3] 陈大颖, 刘静霞. 视网膜色素变性中西医治疗进展[J]. 中国中医眼科杂志, 2011, 21(6): 59-61.
- [4] Cottet S, Schorderet DF. Mechanisms of apoptosis in retinitis pigmentosa[J]. Curr Mol Med, 2009, 9(3): 375-383.
- [5] 庞荣. 中医治疗视网膜色素变性疗效观察[C]. 全国第九次中医、中西医结合眼科学术年会, 2010: 148-149.
- [6] 张艳禾, 朱晓俊. 浅谈鹿茸药用价值[J]. 特种经济动植物, 2002, 5(9): 6-7.
- [7] 邓辉, 金明, 潘琳, 等. 红参对糖尿病视网膜神经节细胞的神经保护作用[J]. 中国中医眼科杂志, 2004, 14(2): 63-64.
- [8] 张文生, 朱陵群, 牛福玲. 丹参素对缺糖缺氧损伤神经细胞的保护作用[J]. 中草药, 2004, 35(8): 921-924.
- [9] 管怀进, 龚启荣. 现代基础眼科学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1978: 71-72.
- [10] Chang B, Hawes NL, Hurd RE, et al. Retinal degeneration mutants in the mouse[J]. Vision Res, 2002, 42(4): 517-525.
- [11] McNally N, Kenna PF, Rancourt D, et al. Murine model of autosomal dominant retinitis pigmentosa generated by targeted deletion at codon 307 of the RDs-peripherin gene[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(9): 1005-1016.
- [12] Lohr HR, Kuntchithapautham K, Sharma AK, et al. Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death[J]. Exp Eye Res, 2006, 83(2): 380-389.
- [13] 吴乐正, 吴德正. 临床视觉电生理[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 330-349.

(收稿: 2013-01-21 修回: 2013-05-12)