

驻景丸加减方对形觉剥夺性近视小鼠视网膜厚度及细胞凋亡的影响

莫 亚^{1,3}, 任郭廷^{2,3}, 邓晞远³, 马 捷³, 唐诗韵⁴, 周绿绿^{1,3}, 肖西立^{1,3}, 黄 群^{1,3}

引用:莫亚,任郭廷,邓晞远,等. 驻景丸加减方对形觉剥夺性近视小鼠视网膜厚度及细胞凋亡的影响. 国际眼科杂志 2021; 21(12): 2053-2059

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81674031);四川省科技计划项目(No.2021YJ0252);成都中医药大学“杏林学者”项目(No.XSGG2020003)

作者单位:(610072)中国四川省成都市,成都中医药大学附属医院¹眼科;⁴GCP中心;²(030600)中国山西省晋中市中医院眼科;³(610071)中国四川省成都市,成都中医药大学眼科学院

作者简介:莫亚,毕业于成都中医药大学,博士研究生,博士研究生导师,主任医师,研究方向:近视相关基础及临床研究。

通讯作者:莫亚. moya5286@cdutcm.edu.cn

收稿日期: 2021-04-24 修回日期: 2021-11-10

摘要

目的:探讨驻景丸加减方对形觉剥夺性近视小鼠视网膜厚度及细胞凋亡的影响。

方法:将 72 只 3 周龄 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组 1、模型组 1、干预组 1、对照组 2、模型组 2 及干预组 2,每组 12 只小鼠,前三组实验进行 3wk,后三组实验进行 6wk,除对照组 1 和对照组 2 外,所有小鼠均用半透明眼罩遮盖右眼诱导形觉剥夺性近视动物模型,干预组 1 在造模同时而干预组 2 则在实验 3wk 后灌胃驻景丸加减方混悬液 0.546g/(kg·d)(0.1mL/d),其余组小鼠灌胃等量生理盐水 0.1mL/d,实验前后均测眼轴,实验结束时取小鼠视网膜行 HE 染色用于观察视网膜各层厚度改变,免疫组织化学(IHC)和 western blotting(WB)用于检测 Bcl-2 和 Caspase3 蛋白的表达。

结果:在实验结束时模型组 1 的眼轴比对照组 1 显著增加($P<0.01$),干预组 1 的眼轴显著低于模型组 1($P<0.01$),模型组 2 的眼轴比对照组 2 显著增加($P<0.01$),干预组 2 的眼轴明显低于模型组 2($P<0.01$);模型组 1 的 NFL 和 ONL 的厚度比对照组 1 显著变薄($P<0.01$),模型组 1 的 INL 厚度比对照组 1 显著变薄($P<0.05$),干预组 1 的 NFL、INL 和 ONL 厚度较模型组 1 显著增加($P<0.05$);模型组 2 的 NFL、INL 和 ONL 的厚度比对照组 1 显著变薄($P<0.01$);IHC 检测显示 Bcl-2 蛋白平均光密度模型组 1 显著低于对照组 1($P<0.05$),干预组 1 显著高于模型组 1($P<0.01$),模型组 2 显著低于对照组 2($P<0.01$),干预组 2 显著高于模型组 2($P<0.01$);Caspase3 蛋白平均光密度模型组 1 显著高于对照组 1($P<0.01$),干预组 1 显著低于模型组 1($P<0.01$),模型组 2 显著高于对照组 2($P<0.05$),干预组 2 显著低于模型组 2($P<0.01$);WB 检测证明,Bcl-2 的蛋白相对表达水平模型组 1 显著低于对照组 1($P<0.01$),干预组 1 显著高于模型组 1($P<0.01$),

模型组 2 显著低于对照组 2($P<0.01$),干预组 2 显著高于模型组 2($P<0.01$);Caspase3 的蛋白相对表达水平模型组 1 显著高于对照组 1($P<0.01$),干预组 1 显著低于模型组 1($P<0.01$),干预组 2 显著低于模型组 2($P<0.05$)。

结论:驻景丸加减方可通过调控凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Caspase3 的表达,减轻近视形成过程中及已形成近视小鼠视网膜细胞凋亡,从而起到干预形觉剥夺性近视小鼠视网膜厚度变薄的作用。

关键词:形觉剥夺性近视;C57BL/6J 小鼠;视网膜厚度;细胞凋亡;驻景丸加减方

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.12.06

Effect of modified Zhujing pill on retinal thickness and apoptosis in form deprivation myopia mice

Ya Mo^{1,3}, Guo - Ting Ren^{2,3}, Xi - Yuan Deng³, Jie Ma³, Shi-Yun Tang⁴, Lyu-Lyu Zhou^{1,3}, Xi-Li Xiao^{1,3}, Qun Huang^{1,3}

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.81674031); Sichuan Science and Technology Program Project (No. 2021YJ0252); Chengdu University of Traditional Chinese Medicine(TCM) “Xinglin Scholars” Project (No.XSGG2020003)

¹Department of Ophthalmology, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, Sichuan Province, China; ²Department of Ophthalmology, Jinzhong City Hospital of TCM, Jinzhong 030600, Shanxi Province, China; ³School of Ophthalmology, Chengdu University of TCM, Chengdu 610071, Sichuan Province, China; ⁴GCP Center, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Correspondence to: Ya Mo. Department of Ophthalmology, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, Sichuan Province, China; School of Ophthalmology, Chengdu University of TCM, Chengdu 610071, Sichuan Province, China. moya5286@cdutcm.edu.cn

Received: 2021-04-24 Accepted: 2021-11-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of modified Zhujing pill on retinal thickness and apoptosis in form deprivation myopia (FDM) mice.

• **METHODS:** Totally 72 C57BL/6J mice aged 3-week-old were randomly divided into control group 1, model group 1, intervention group 1, control group 2, model group 2 and intervention group 2, with 12 mice in each group. The first three groups were tested for 3wk and the last three

groups were tested for 6wk, except for the groups of control 1 and control 2, all the mice used translucent goggles to cover their right eyes for form deprivation. The mice of intervention 1 and intervention 2 were respectively given intragastric administration modified Zhujing pill suspension 0.546g/(kg · d) (0.1mL/d) for 3wk at the beginning and after 3wk of the experiment. Same amount of saline was given to mice in other groups at the same time of modeling. The eye axis was measured before and after the experiment. At the end of the experiment, the eye of mice was taken for HE staining to observe the thickness changes of each layer of retina. Immunohistochemistry (IHC) and western blotting (WB) were used to detect Bcl-2 and Caspase3 expression of protein.

• RESULTS: At the end of the experiment, the axis of model group 1 was significantly higher than that of control group 1 ($P<0.01$), the axis of intervention group 1 was significantly lower than that of model group 1 ($P<0.01$), and the axis of model group 2 was significantly higher than that of control group 2 ($P<0.01$), the eye axis of intervention group 2 was significantly lower than that of model group 2 ($P<0.01$); HE staining showed that the thickness of NFL and ONL of model group 1 was significantly thinner than that of control group 1 ($P<0.01$). The thickness of INL of model group 1 was significantly thinner than that of control group 1 ($P<0.05$), and the thickness of NFL, INL and ONL of intervention group 1 was significantly higher than that of model group 1 ($P<0.05$); The thickness of NFL, INL and ONL model group 2 was significantly thinner than that of control group 1 ($P<0.01$); IHC testing showed that the average optical density of Bcl-2 protein in model group 1 was significantly lower than that of control group 1 ($P<0.05$), which in intervention group 1 was significantly higher than that of model group 1 ($P<0.01$), and which in the average optical density of Bcl-2 protein of model group 2 was significantly lower than that of control group 2 ($P<0.01$), which in intervention group 2 was significantly higher than that of model group 2 ($P<0.01$); Caspase 3 protein average optical density of model group 1 was significantly higher than that of control group 1 ($P<0.01$), which in intervention group 1 was significantly lower than that of model group 1 ($P<0.01$), which in model group 2 was significantly higher than that of control group 2 ($P<0.05$), which in intervention group 2 was significantly lower than that of model group 2 ($P<0.01$); WB test proved that the relative expression level of Bcl-2 protein in model group 1 was significantly lower than that of control group 1 ($P<0.01$), which in intervention group 1 was significantly higher than that of model group 1 ($P<0.01$), and which in model group 2 was significantly lower than that of control group 2 ($P<0.01$), which in intervention group 2 was significantly higher than that of model group 2 ($P<0.01$); The relative expression level of Caspase3 protein in model group 1 was significantly higher than that of control group 1 ($P<0.01$), which in intervention group 1 was significantly lower than that of model group 1 ($P<0.01$), the intervention group 2 was significantly lower than that of model group 2.

• CONCLUSION: The results show that the modified Zhujing pill can interfere with the pathological changes of retinal thickness thinning in the process of myopia and formed myopia mice by regulating the expression of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Caspase3, and alleviating the apoptosis of retinal cells in myopia formation and myopia mice.

• KEYWORDS: form deprivation myopia; C57BL/6J mice; retinal thickness; apoptosis; modified Zhujing pill

Citation: Mo Y, Ren GT, Deng XY, *et al.* Effect of modified Zhujing pill on retinal thickness and apoptosis in form deprivation myopia mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021; 21 (12): 2053-2059

0 引言

目前近视呈爆发性增长趋势,据估计,到2050年全球约有48亿近视患者^[1],其中27%~33%会发展成病理性近视^[2]。在亚洲,儿童高度近视患病率日益上升^[3]。

研究表明晚期高度近视的视网膜会出现视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium,RPE)细胞、脉络膜毛细血管内皮细胞及视网膜光感受器细胞的完全丧失^[4]。早期近视眼的视网膜变薄可能与凋亡有关^[5-6],临床观察发现没有黄斑变性的成年高度近视眼的颞侧和鼻侧视网膜较正常眼薄^[7],甚至在某些近视儿童也出现类似改变^[8]。因此,积极寻找干预近视视网膜感光细胞凋亡的方法,对延缓近视眼视网膜变薄非常重要。

目前,针对近视形成后视网膜变薄、光感受器细胞凋亡的研究少有报道,驻景丸加减方对近视豚鼠脉络膜厚度改变有一定干预作用^[9],且该药已被广泛用于治疗各种眼疾^[10-11],我们前期的临床和动物实验研究也发现该方可干预近视豚鼠巩膜成纤维细胞TGF-β1和smad3的表达^[12],下调近视豚鼠视网膜Caspase3表达及上调Bcl-2的表达^[13],但尚未观察近视小鼠各层视网膜厚度改变,因C57BL/6J小鼠为常用近视动物模型,且基因库完善,本课题拟进一步以C57BL/6J小鼠为近视动物模型,并以驻景丸加减方为干预手段,进一步探讨其对C57BL/6J近视小鼠视网膜结构和细胞凋亡的干预机制,拟为中药驻景丸加减方保护近视早期视觉功能提供实验依据和新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 材料 成都达硕实验动物有限公司[四川省实验动物管理委员会,No.SCXK(川)2015-030,四川成都],72只雄性C57BL/6J小鼠(10~15g,3周龄),均排除眼疾,实验由成都中医药大学动物伦理审查委员会批准并遵循中国视觉与眼科研究协会(ARVO)的规定,饲养温度为24℃±2℃,湿度为50%±10%,光照/黑暗各12h循环,允许小鼠自由进食和饮水。

1.2 方法

1.2.1 造模 将72只3周龄C57BL/6J小鼠随机分为对照组1、模型组1、干预组1、对照组2、模型组2及干预组2,每组12只,除对照组1和对照组2外,其余组小鼠均用半透明眼罩遮盖右眼诱导形觉剥夺性近视动物模型,并在颈部安置伊丽莎白圈防止小鼠自行将眼罩抓掉,干预组1

在造模同时而干预组 2 在造模 3wk 后开始灌胃驻景丸加减方混悬液,浓度 0.546g/(kg·d)(0.1mL/d),其余组小鼠灌胃等量生理盐水 0.1mL/d,对照组 1、模型组 1、干预组 1 饲养 3wk,对照组 2、模型组 2、干预组 2 饲养 6wk。实验前后均测眼轴,实验结束时腹腔内注射 10% 水合氯醛(350mg/kg)处死小鼠,立即取小鼠眼球,其中 6 眼行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色用于观察视网膜各层厚度改变和免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)检测,6 眼行蛋白质印迹(western blotting,WB)检测,IHC 和 WB 用于检测 Bcl-2 和 Caspase3 蛋白的表达。

驻景丸加减方采用该方制成的我院院内制剂补精益视片 0.3g/片(成都中医药大学附属医院药剂科生产, No.20171220),主要成分为:楮实子、菟丝子、茺蔚子、五味子、枸杞子、三七等。

1.2.2 眼轴测量 在实验开始和实验结束时均测量所有小鼠右眼眼轴,固定小鼠后结膜囊滴盐酸丙美卡因用动物 A 超(KN-1800)测量各组小鼠右眼眼轴,每只眼睛重复测量 3 次,取平均值。

1.2.3 视网膜厚度测量 腹腔内注射 10% 水合氯醛(350mg/kg)处死小鼠,取小鼠右眼球立即用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,制备 5μm 厚石蜡切片。行 HE 染色,在显微镜下观察视网膜各层形态(×200),使用图像分析系统(Mias-2000,WiseSoft Co., LTD 中国),将视乳头两端视网膜各取五个视野用于包括神经纤维层(nerve fiber layer,NFL)、内核层(inner nuclear layer,INL)、外核层(outer nuclear layer,ONL)、光感受器细胞(photoreceptor layer,RPL)、视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium,RPE)在内的视网膜全层厚度的半定量测量,每个视野测 10 次。

1.2.4 IHC 检测 将摘除的眼球,包埋切片后行 Bcl-2 和 Caspase 的 IHC 检测。一抗是多克隆兔抗 Bcl-2(1:100, ab194583,abcam)和多克隆兔抗 Caspase 3(1:50, ab13847, abcam)。二抗是山羊抗兔 SP-9001(中山金桥生物有限公司北京,中国)。使用数码相机显微镜(BA 400 Digital, Motic China Group co, LTD)获取视乳头两端视网膜各取五个视野的图像(×200),并通过 image-Pro Plus 6.0 对其进行分析。

1.2.5 WB 检测 使用改良的 Western 和 IP 细胞裂解液(中国上海西唐)提取视网膜中的总蛋白。使用 BCA 蛋白质定量试剂盒(中国上海西唐)测量每个样品的蛋白质浓度,经 10%SDS-PAGE 凝胶电泳,电转膜,室温 5% BSA 封闭,并在 4℃ 下与一抗孵育过夜,HRP 缀合的二抗以 1:10 000 的稀释温育 2h,膜增强化学发光法检测试剂(试剂 A:试剂 B=1:1)反应 2min 后去除膜,用保鲜膜包裹 PVDF 膜,暗室敏化,开发和修复。通过胶片扫描仪(中国上海 Microtek)检测蛋白质,并将 β-actin 用作内参照。一抗为多克隆兔抗 Bcl-2(1:100, ab59348, abcam)和多克隆兔抗 Caspase3(1:50, ab13847, abcam)。二抗是山羊抗兔 IgG(H+L; Jackson, 111-035-003)和山羊抗小鼠 IgG(H+L; Jackson, 115-035-003)。

统计学分析:使用 SPSS 20.0 进行统计分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间比较用单因素方差分析(ANOVA),进一步两两比较时方差齐用 LSD-*t* 检验,方差不齐用 Dunnett's 检验。*P*<0.05 为具有统计学差异。

表 1 各组小鼠实验前后眼轴比较($\bar{x}\pm s$,mm)

组别	<i>n</i>	实验前	实验后
对照组 1	12	2.793±0.328	2.871±0.330
模型组 1	12	2.810±0.328	3.061±0.057 ^b
干预组 1	12	2.824±0.090	2.908±0.042 ^d
对照组 2	12	2.815±0.018	2.931±0.042
模型组 2	12	2.813±0.023	3.524±0.112 ^f
干预组 2	12	2.819±0.036	3.138±0.053 ^h

注:对照组 1:双眼无遮盖观察 3wk;模型组 1:右眼遮盖造模 3wk;干预组 1:右眼遮盖造模并中药灌胃 3wk;对照组 2:双眼无遮盖观察 6wk;模型组 2:右眼遮盖造模 6wk;干预组 2:右眼遮盖造模 3wk 后再中药灌胃 3wk。^b*P*<0.01 vs 对照组 1;^d*P*<0.01 vs 模型组 1;^f*P*<0.01 vs 对照组 2;^h*P*<0.01 vs 模型组 2。

2 结果

2.1 驻景丸加减方对小鼠眼轴的影响 本实验取小鼠右眼造模,各组眼轴测量均检测右眼。如表 1 所示,在实验开始时各组小鼠的眼轴差异均无统计学意义(*P*>0.05);在实验结束时对照组 1、模型组 1 和干预组 1 组间差异有统计学意义(*F*=59.818,*P*<0.01),模型组 1 的眼轴比对照组 1 显著增加(*P*<0.01),干预组 1 的眼轴显著低于模型组 1(*P*<0.01);对照组 2、模型组 2 和干预组 2 组间差异有统计学意义(*F*=93.107,*P*<0.01),模型组 2 的眼轴比对照组 2 显著增加(*P*<0.01),干预组 2 的眼轴明显低于模型组 2(*P*<0.01),由于眼轴增长是近视形成的最大因素^[14],表明随着形觉剥夺时间延长,模型组小鼠近视造模成功,驻景丸加减方可在一定程度上干预小鼠近视的发展。

2.2 驻景丸加减方对视网膜各层厚度的影响 如图 1 所示,模型组中 INL 和 ONL 细胞排列稀疏,感光细胞层的外节盘膜排列紊乱,实验结束时对照组 1、模型组 1 和干预组 1 NFL 组间比较差异有统计学意义(*F*=4.116,*P*<0.05),模型组 1 的 NFL 和 ONL 的厚度比对照组 1 显著变薄(*P*<0.01),模型组 1 的 INL 比对照组 1 显著变薄(*P*<0.05),干预组 1 的 NFL、INL 和 ONL 厚度较模型组 1 显著增加(*P*<0.05);对照组 2、模型组 2 和干预组 2 的 NFL、组间比较差异有统计学意义(*F*=14.376,*P*<0.01),对照组 2、模型组 2 和干预组 2 的 INL 组间比较差异有统计学意义(*F*=12.138,*P*<0.01),对照组 2、模型组 2 和干预组 2 的 ONL 组间比较差异有统计学意义(*F*=17.216,*P*<0.01),模型组 2 的 NFL、INL 和 ONL 的厚度比对照组 2 显著变薄(*P*<0.01),见表 2。

2.3 驻景丸加减方对形觉剥夺性近视小鼠视网膜细胞凋亡的影响

2.3.1 IHC 检测显示 Bcl-2 的蛋白表达情况 图 2A 显示干预组 1 和干预组 2 中 Bcl-2 蛋白阳性表达细胞分别比模型组 1 和模型组 2 多;表 3 及图 2B 显示各组 Bcl-2 蛋白平均光密度情况:模型组 1、对照组 1 和干预组 1 的 Bcl-2 平均光密度差异有统计学意义(*F*=17.739,*P*<0.01),模型组 1 显著低于对照组 1(*P*<0.05),干预组 1 显著高于模型组 1(*P*<0.01);模型组 2、对照组 2 和干预组 2 的 Bcl-2 平均光密度差异有统计学意义(*F*=50.459,*P*<0.01),模型组 2 显著低于对照组 2(*P*<0.01),干预组 2 显著高于模型组 2(*P*<0.01)。

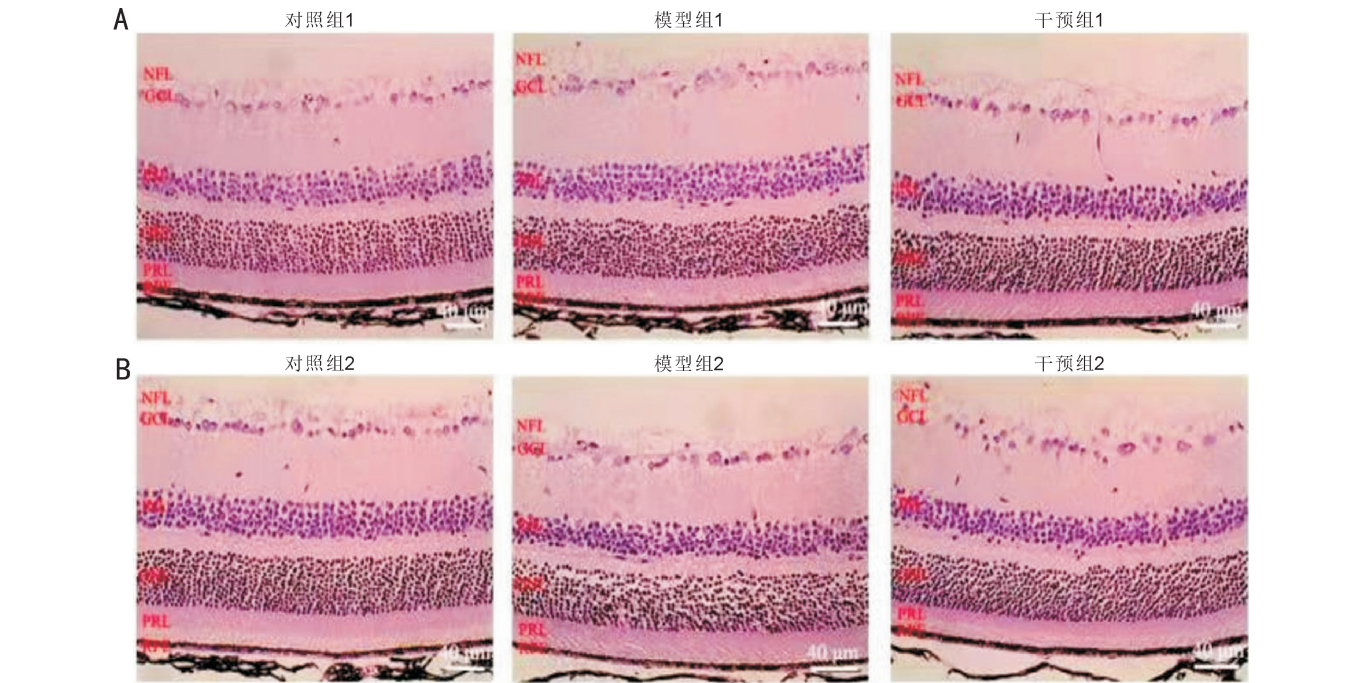


图1 各组小鼠视网膜 HE 染色情况 对照组 1: 双眼无遮盖观察 3wk; 模型组 1: 右眼遮盖造模 3wk; 干预组 1: 右眼遮盖造模并中药灌胃 3wk; 对照组 2: 双眼无遮盖观察 6wk; 模型组 2: 右眼遮盖造模 6wk; 干预组 2: 右眼遮盖造模 3wk 后再中药灌胃 3wk。

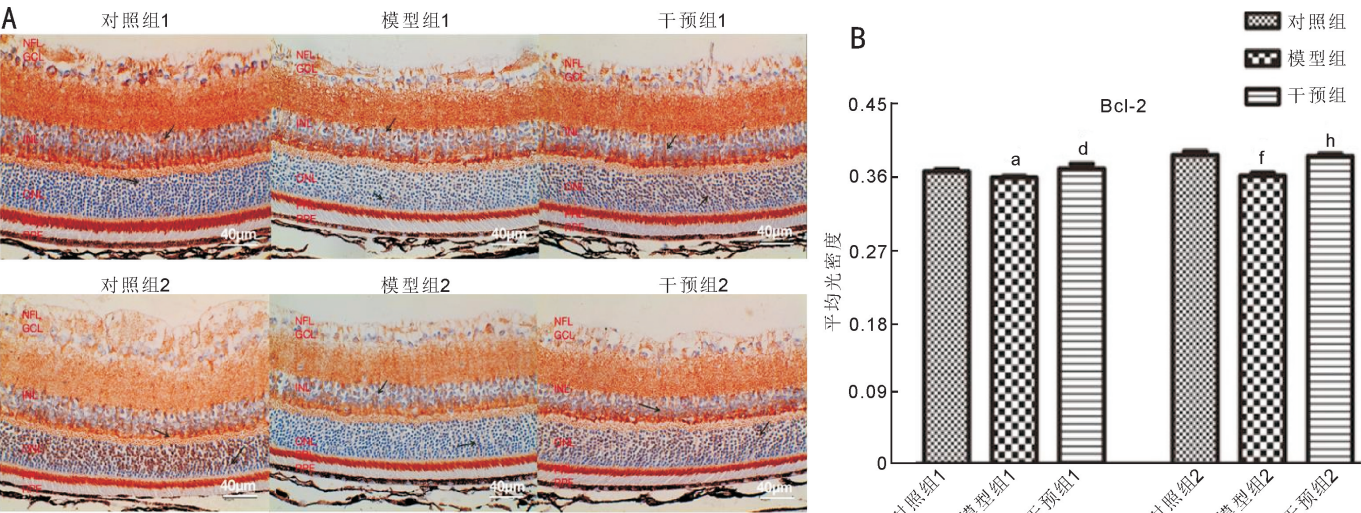


图2 各组视网膜 Bcl-2 的 IHC 染色情况 对照组 1: 双眼无遮盖观察 3wk; 模型组 1: 右眼遮盖造模 3wk; 干预组 1: 右眼遮盖造模并中药灌胃 3wk; 对照组 2: 双眼无遮盖观察 6wk; 模型组 2: 右眼遮盖造模 6wk; 干预组 2: 右眼遮盖造模 3wk 后再中药灌胃 3wk。A: 各组 Bcl-2 的表达情况, 黑色箭头所指为阳性(棕色)细胞染色; B: 各组平均光密度结果比较。^a $P<0.05$ vs 对照组 1; ^d $P<0.01$ vs 模型组 1; ^f $P<0.01$ vs 对照组 2; ^h $P<0.01$ vs 模型组 2。

表2 各组小鼠实验视网膜厚度的比较

组别	n	NFL	INL	ONL	PRL	RPE
对照组 1	6	21.73±4.8	24.19±3.38	37.18±4.71	21.03±2.59	5.72±0.81
模型组 1	6	16.19±3.3 ^b	19.21±3.48 ^a	31.48±3.53 ^b	20.61±1.27	5.51±0.58
干预组 1	6	20.68±1.8 ^e	23.83±4.20 ^e	36.63±4.17 ^c	20.91±2.23	5.54±0.41
对照组 2	6	25.16±2.21	28.23±1.91	39.71±1.76	21.63±2.31	6.10±1.00
模型组 2	6	17.20±2.85 ^f	21.01±2.77 ^f	32.16±2.02 ^f	21.98±2.70	5.61±0.72
干预组 2	6	20.76±2.62	24.35±2.84	35.54±2.79	20.30±1.24	5.84±0.61

注: 对照组 1: 双眼无遮盖观察 3wk; 模型组 1: 右眼遮盖造模 3wk; 干预组 1: 右眼遮盖造模并中药灌胃 3wk; 对照组 2: 双眼无遮盖观察 6wk; 模型组 2: 右眼遮盖造模 6wk; 干预组 2: 右眼遮盖造模 3wk 后再中药灌胃 3wk。NFL: 神经纤维层; INL: 内核层; ONL: 外核层; PRL: 光感受器细胞层; RPE: 视网膜色素上皮层。^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组 1, ^c $P<0.05$ vs 模型组 1, ^f $P<0.01$ vs 对照组 2。

2.3.2 IHC 检测显示 Caspase3 的蛋白表达情况 图 3A 显示模型组 1 和模型组 2 中 Caspase3 阳性细胞分别比干预

组 1 和干预组 2 多; 表 3 及图 3B 显示各组 Caspase3 蛋白平均光密度情况: 模型组 1、对照组 1 和干预组 1 Caspase3

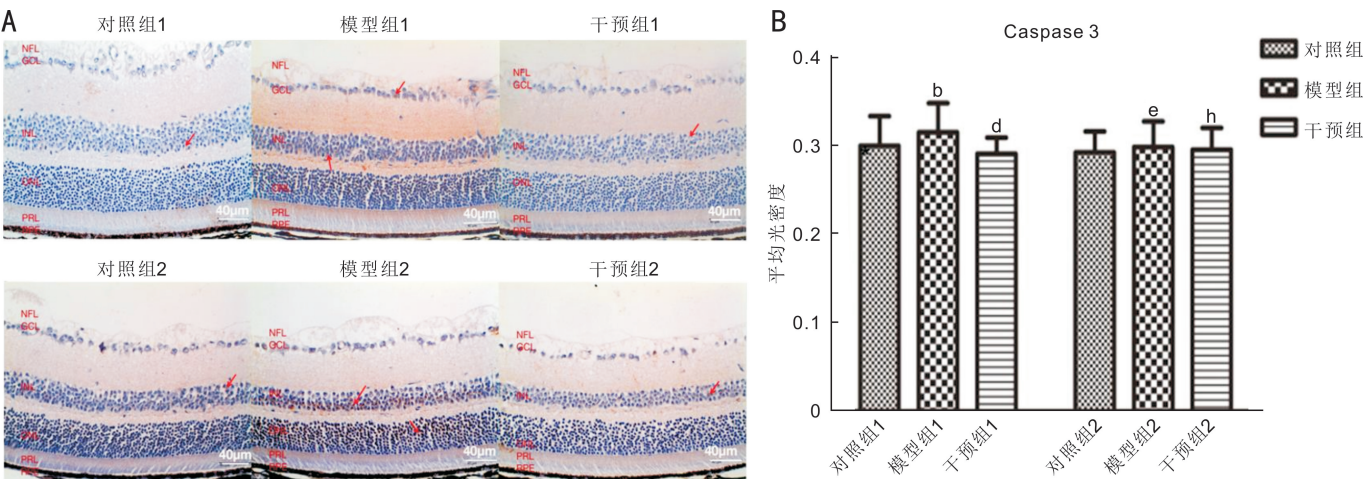


图3 各组小鼠视网膜 Caspase3 的免疫组化各组表达情况 对照组 1: 双眼无遮盖观察 3wk; 模型组 1: 右眼遮盖造模 3wk; 干预组 1: 右眼遮盖造模并中药灌胃 3wk; 对照组 2: 双眼无遮盖观察 6wk; 模型组 2: 右眼遮盖造模 6wk; 干预组 2: 右眼遮盖造模 3wk 后再中药灌胃 3wk。A: Caspase3 的免疫组化各组表达情况, 红色箭头所指为阳性(棕色)细胞染色; B: 各组平均光密度结果比较。^b*P*<0.01 vs 对照组 1; ^d*P*<0.01 vs 模型组 1; ^e*P*<0.05 vs 对照组 2; ^h*P*<0.01 vs 模型组 2。

表3 各组小鼠视网膜 Bcl-2 及 Caspase3 平均光密度比较

$\bar{x}\pm s$			
组别	<i>n</i>	Bcl-2	Caspase3
对照组 1	6	0.3598±0.063	0.2993±0.0234
模型组 1	6	0.3524±0.093 ^a	0.3298±0.0141 ^b
干预组 1	6	0.3662±0.0043 ^d	0.2962±0.0205 ^d
对照组 2	6	0.3875±0.0087	0.2777±0.0038
模型组 2	6	0.3603±0.0061 ^f	0.3072±0.0153 ^e
干预组 2	6	0.3749±0.092 ^h	0.2805±0.0142 ^h

注: ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组 1; ^d*P*<0.01 vs 模型组 1; ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs 对照组 2; ^h*P*<0.01 vs 模型组 2。

平均光密度差异有统计学意义($F=7.093, P<0.01$), 其中模型组 1 显著高于对照组 1($P<0.01$), 干预组 1 显著低于模型组 1($P<0.01$), 模型组 2、对照组 2 和干预组 2 Caspase3 平均光密度差异有统计学意义($F=14.108, P<0.01$), 模型组 2 显著高于对照组 2($P<0.05$), 干预组 2 显著低于模型组 2($P<0.01$)。

2.3.3 WB 检测 Bcl-2 的蛋白表达水平 表 4 及图 4A 显示模型组 1、对照组 1 和干预组 1 Bcl-2 的蛋白相对表达水平的差异有统计学意义($F=8.271, P<0.05$), 模型组 1 显著低于对照组 1($P<0.01$), 干预组 1 显著高于模型组 1($P<0.01$); 模型组 2、对照组 2 和干预组 2 Bcl-2 的蛋白相对表达水平的差异有统计学意义($F=9.828, P<0.01$), 其中模型组 2 显著低于对照组 2($P<0.01$), 干预组 2 显著高于模型组 2($P<0.01$); 表 4 及图 4B 显示模型组 1、对照组 1 和干预组 1 Caspase3 的蛋白相对表达水平差异有统计学意义($F=12.340, P<0.01$), 其中模型组 1 显著高于对照组 1($P<0.01$), 干预组 1 显著低于模型组 1($P<0.01$); 模型组 2、对照组 2 和干预组 2 的 Caspase3 的蛋白相对表达水平差异有统计学意义($F=7.391, P<0.05$), 其中干预组 2 显著低于模型组 2($P<0.05$)。图 4C 显示实验后各组 Bcl-2 和 Caspase3 的蛋白表达灰度图, 灰度显示分别与图 4A 及图 4B 统计结果一致(图 4)。

表4 各组小鼠视网膜 Bcl-2 及 Caspase3 蛋白相对表达水平比较

组别	<i>n</i>	Bcl-2	Caspase3
对照组 1	3	1.6898±0.7345	0.3800±0.0458
模型组 1	3	0.2724±0.0125 ^b	0.7167±0.0451 ^b
干预组 1	3	0.5513±0.2718 ^d	0.5467±0.1286 ^e
对照组 2	3	1.1119±0.5152	0.3867±0.0451
模型组 2	3	0.4891±0.1848 ^f	0.4733±0.0231
干预组 2	3	0.9168±0.0011 ^h	0.3167±0.7024 ^g

注: ^b*P*<0.01 vs 对照组 1; ^e*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 模型组 1; ^f*P*<0.01 vs 对照组 2; ^g*P*<0.05, ^h*P*<0.01 vs 模型组 2。

3 讨论

近视是眼睛屈光不正的一种, 是全世界最常见的视觉障碍^[15]。尤其是新型冠状病毒 2019 (COVID-19) 流行实行居家隔离以来, 学龄儿童的屈光变化和近视患病率呈爆发性增长趋势^[16]。且以青少年中高度及超高度近视增长为主, 高度及超高度近视因晚期常伴视网膜退行性病变甚至后极部视网膜萎缩等并发症导致视力严重受损, 目前此类并发症尚无法治愈, 因此又称为病理性近视, 预计到 2050 年全球病理性近视人数将上升到 5570 万人^[17], 这将是未来青年患者首要的致盲性眼病。

研究表明近视早期视功能就有下降^[18], 伴肌样体带及椭圆体带变薄^[19]、视网膜变薄血管密度降低^[8], 因此早期视功能保护对防止或延缓视网膜退行性病变有重要作用^[20]。前期研究证实以驻景丸加减方制成的我院院内制剂补精益视片对近视患者视功能有一定改善作用^[21], 该方还可减少脉络膜新生血管 VEGF 的表达^[22]及干预形觉剥夺近视豚鼠脉络膜变薄^[9]。因此本研究拟进一步探索该方是否对形觉剥夺近视小鼠视网膜厚度有干预作用, 为近视早期视功能保护提供理论依据。

由于形觉剥夺近视小鼠被广泛用于近视研究中^[23], 本研究遮盖 3 周龄 C57BL/6J 小鼠的右眼制成形觉剥夺性近视动物模型, 近视与眼轴增长密切相关^[24], 眼轴增长

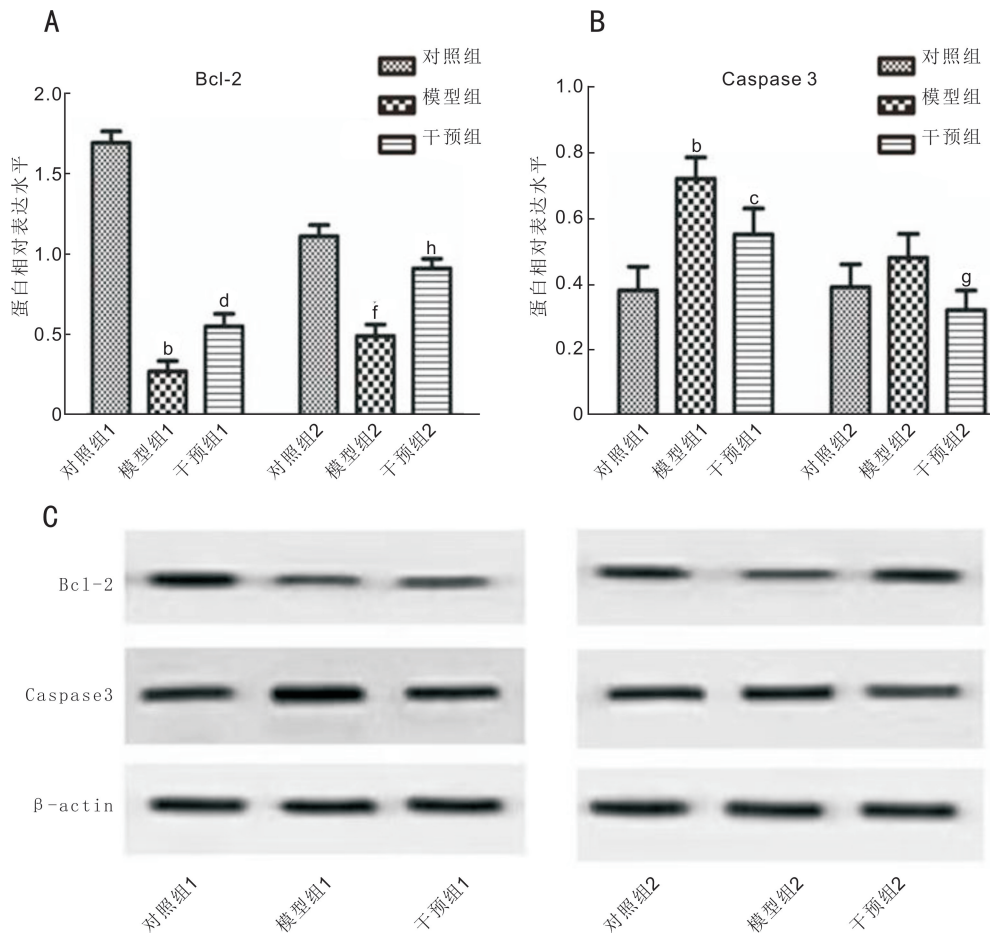


图4 WB分析各组视网膜中Bcl-2和Caspase3蛋白表达情况 对照组1:双眼无遮盖观察3wk;模型组1:右眼遮盖造模3wk;干预组1:右眼遮盖造模并中药灌胃3wk;对照组2:双眼无遮盖观察6wk;模型组2:右眼遮盖造模6wk;干预组2:右眼遮盖造模3wk后再中药灌胃3wk。A:Bcl-2蛋白的相对表达水平;B:Caspase3蛋白的相对表达水平;C:各组Bcl-2和Caspase3的蛋白表达灰度图,β-actin为内参。^b $P<0.01$ vs 对照组1;^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ vs 模型组1;^f $P<0.01$ vs 对照组2;^g $P<0.05$,^h $P<0.01$ vs 模型组2。

被认为是导致近视的最大因素^[14],因此我们用眼轴来评判近视造模是否成功。

本研究通过实验3wk和6wk两个时间点观察,发现模型组1及模型组2的眼轴分别较对照组1及对照组2增加,模型组2眼轴大于模型组1眼轴,结果均有统计学意义,表明本研究成功建立近视模型。干预组1及干预组2的眼轴分别小于模型组1及模型组2的眼轴,结果有统计学意义,提示C57BL/6J小鼠在近视造模同时和近视造模成功后运用中药驻景丸加减方进行干预,该方对C57BL小鼠近视的形成和发展均有一定的干预作用。

Zi等^[25]研究表明形觉剥夺性近视豚鼠视网膜组织变薄,神经节细胞以及视网膜的INL及ONL变薄,并且排列紊乱。本研究也发现,模型组1及模型组2的INL、ONL及NFL的厚度分别较对照组1及对照组2变薄,此改变可能与显微镜下观察到的模型组视网膜INL、ONL细胞数量减少和排列稀疏紊乱有关,也可能与模型组小鼠视网膜凋亡抑制因子Bcl-2表达减少和促凋亡因子Caspase3表达增加有关,与我们前期在近视豚鼠中的研究结果一致^[23],本结果在基因数据库完备的近视C57BL/6J小鼠再次得到验证,我们对近视小鼠RPE细胞RNA测序还发现凋亡标志蛋白Caspase底物Pabpc1及急性细胞磷酸化凋亡相关蛋白Psmid11^[26],因细胞凋亡是视网膜退变主要因素^[27],提示近视形成后视网膜变薄、退变与凋亡密切相关。

在形觉剥夺性小鼠近视形成过程中以及形成近视之后,我们用驻景丸加减方进行干预,干预组1及干预组2的INL、ONL、NFL厚度分别较模型组1及模型组2增加,差异有统计学意义,说明中药驻景丸加减方对形觉剥夺性近视小鼠的视网膜变薄有干预作用,对维持视网膜细胞正常排列和防止细胞减少有积极作用。本研究还发现驻景丸加减方可增加凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达及降低凋亡标志蛋白Caspase3的表达,提示该方在防止近视光感受器细胞的凋亡方面具有一定的作用。

驻景丸加减方源于元代倪维德所著《原机启微》,其主要成分为:楮实子、菟丝子、茺蔚子、五味子、枸杞子、三七,共起肝肾同补,益精明目作用。现代药理研究发现枸杞对视网膜光感受器细胞具有抗氧化和抗凋亡作用^[28-29]且具有神经保护作用^[30]。菟丝子^[31]、楮实子^[32]和茺蔚子^[33]均具有抗氧化特性,有益于神经退行性疾病的治疗,抑制视网膜光感受器细胞凋亡,五味子能抗氧化、抗凋亡^[34],三七能抵抗血小板聚集,同时有保护神经元、抗凋亡作用^[35-36]。综上所述,驻景丸加减方可增强视网膜组织的耐缺氧能力、具有抗氧化、抗凋亡、扩张血管、改善微循环的功能、从而起到保护视细胞的作用。

因此,基于上述药理作用,我们推测中药驻景丸加减方通过调控凋亡抑制蛋白Bcl-2及凋亡标志蛋白Caspase3的在近视小鼠视网膜中的表达,干预小鼠近视视

网膜细胞凋亡来抑制近视小鼠视网膜变薄,在防止近视小鼠视网膜病理改变,延缓近视所致视网膜退变中起着积极作用,该研究为驻景丸加减方在近视眼中的临床应用提供了理论依据。

参考文献

1 Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, *et al.* Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology* 2016;123(5):1036–1042

2 Zhang Z, Xu Y, Liu J, *et al.* Automatic diagnosis of pathological myopia from heterogeneous biomedical data. *Plos One* 2013; 8 (6):e65736

3 刘灵琳,吴峥峥,李冬锋,等.成都和绵阳地区青少年近视患病率及影响因素分析.国际眼科杂志 2019;19(7):1196–1200

4 Jonas JB, Xu L. Histological changes of high axial myopia. *Eye (Lond)* 2014;28(2):113–117

5 Mao J, Liu S, Wen D, *et al.* Basic fibroblast growth factor suppresses retinal neuronal apoptosis in form-deprivation myopia in chicks. *Curr Eye Res* 2006;31(11):983–987

6 徐格致,李维英,曹安民.病理性近视视网膜变性中感光细胞的凋亡.中华眼底病杂志 1996(3):6–8,70

7 Teberik K, Kaya M. Retinal and choroidal thickness in patients with high myopia without maculopathy. *Pak J Med Sci* 2017; 33 (6): 1438–1443

8 Yang S, Zhou M, Lu B, *et al.* Quantification of macular vascular density using optical coherence tomography angiography and its relationship with retinal thickness in myopic eyes of young adults. *J Ophthalmol* 2017;2017:1397179

9 刘俐娜,钟兴武,刘红山,等.雷珠单抗或加减驻景方对形觉剥夺性近视豚鼠眼轴和脉络膜厚度的短期影响.国际眼科杂志 2020;20(4):599–602

10 曹水清,颀瑞萍,刘雪.驻景丸加减方联合雷火灸治疗围绝经期干眼随机对照研究.中国中医眼科杂志 2020;30(4):250–253

11 高君,巢国俊.驻景丸加减对早期特发性黄斑前膜视功能的影响.河北中医 2016;38(10):1528–1530

12 Mo Y, Wang Y, Cao B, *et al.* Scleral TGF- β 1 and Smad3 expression is altered by TCM Bu Jing Yi Shi Tablets in Guinea pigs with form-deprivation myopia. *J Tradit Chin Med Sci* 2016;3(2):124–132

13 曹斌,莫亚,王毅,等.中药补精益视片对豚鼠形觉剥夺性近视视网膜 bcl-2 及 caspase-3 表达的影响.中国中医眼科杂志 2015;25(3):156–162

14 Atchison DA, Jones CE, Schmid KL, *et al.* Eye shape in emmetropia and myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(10):3380–3386

15 Morgan IG, French AN, Ashby RS, *et al.* The epidemics of myopia: aetiology and prevention. *Prog Retin Eye Res* 2018;62:134–149

16 Wang J, Li Y, Musch D C, *et al.* Progression of myopia in school-aged children after COVID-19 home confinement. *JAMA Ophthalmol* 2021;139(3):293–300

17 Fricke TR, Jong M, Naidoo KS, *et al.* Global prevalence of visual impairment associated with myopic macular degeneration and temporal trends from 2000 through 2050: systematic review, meta-analysis and modelling. *Br J Ophthalmol* 2018;102(7):855–862

18 Ho WC, Kee CS, Chan HH. Myopia progression in children is linked with reduced foveal mfERG response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(9):5320–5325

19 Ye J, Wang M, Shen M, *et al.* Deep retinal capillary plexus decreasing correlated with the outer retinal layer alteration and visual

acuity impairment in pathological myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2020;61(4):45

20 Tao Y, He M, Yang Q, *et al.* Systemic taurine treatment provides neuroprotection against retinal photoreceptor degeneration and visual function impairments. *Drug Des Dev Ther* 2019;13:2689–2702

21 莫亚,王红义,黄秀蓉.补虚化瘀法对高度近视患者视野的影响.中国中医眼科杂志 2011;21(2):84–86

22 田楠楠,亢泽峰,张庆,等.驻景方对病理性近视脉络膜新生血管 VEGF 表达的影响.国际眼科杂志 2013;13(8):1525–1528

23 Huang F, Wang Q, Yan T, *et al.* The role of the dopamine D2 receptor in form-deprivation myopia in mice: studies with full and partial D2 receptor agonists and knockouts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2020;61(6):47

24 Hou W, Norton TT, Hyman L, *et al.* Axial elongation in myopic children and its association with myopia progression in the correction of myopia evaluation trial. *Eye Contact Lens: Sci Clin Pract* 2018;44(4):248–259

25 Zi Y, Deng Y, Zhao J, *et al.* Morphologic and biochemical changes in the retina and sclera induced by form deprivation high myopia in Guinea pigs. *BMC Ophthalmol* 2020;20(1):105

26 Mo Y, He ML, Yu JZ, *et al.* Bioinformatics analysis of the gene expression profile of retinal pigmental epithelial cells based in single-cell RNA sequencing in myopic mice. *Arch Med Sci* 2021;17(2):574–577

27 Wei Q, Liang X, Peng Y, *et al.* 17 β -estradiol ameliorates oxidative stress and blue light-emitting diode-induced retinal degeneration by decreasing apoptosis and enhancing autophagy. *Drug Des Devel Ther* 2018;12:2715–2730

28 Li J, Ding ZJ, Yang Y, *et al.* Lycium barbarum polysaccharides protect human trophoblast HTR8/SVneo cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis. *Mol Med Rep* 2018;18(3):2581–2588

29 Tang L, Bao S, Du Y, *et al.* Antioxidant effects of Lycium barbarum polysaccharides on photoreceptor degeneration in the light-exposed mouse retina. *Biomed Pharmacother* 2018;103:829–837

30 Yang D, So KF, Lo AC. Lycium barbarum polysaccharide extracts preserve retinal function and attenuate inner retinal neuronal damage in a mouse model of transient retinal ischaemia. *Clin Experiment Ophthalmol* 2017;45(7):717–729

31 Liu ZJ, Wang YL, Li QL, *et al.* Improved antimelanogenesis and antioxidant effects of polysaccharide from cuscutea chinensis lam seeds after enzymatic hydrolysis. *Braz J Med Biol Res* 2018;51(7):e7256

32 Han Q, Wu Z, Huang B, *et al.* Extraction, antioxidant and antibacterial activities of broussonetia papyrifera fruits polysaccharides. *Int J Biol Macromol* 2016;92:116–124

33 Zhang MY, Xu LP, Yang HJ. Schisandra chinensis fructus and its active ingredients as promising resources for the treatment of neurological diseases. *Int J Mol Sci* 2018;19(7):1970

34 Lin HJ, Zhang XY, Liu JW, *et al.* Schisantherin A improves learning and memory abilities partly through regulating the Nrf2/Keap1/ARE signaling pathway in chronic fatigue mice. *Exp Ther Med* 2021; 21(4):385

35 Yin SJ, Luo YQ, Zhao CP, *et al.* Antithrombotic effect and action mechanism of salvia miltiorrhiza and panax notoginseng herbal pair on the zebrafish. *Chin Med* 2020;15(1):1–10

36 Shi XW, Yu WJ, Yang TT, *et al.* Panax notoginseng saponins provide neuroprotection by regulating NgR1/RhoA/ROCK2 pathway expression, *in vitro* and *in vivo*. *J Ethnopharmacol* 2016;190:301–312