

补肾益气活血方对干性年龄相关性黄斑变性模型小鼠视网膜氧化损伤的保护作用

谢婧, 李敏, 徐新荣*, 杭丽

(南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 研究补肾益气活血方对干性年龄相关性黄斑变性(AMD)模型小鼠视网膜氧化损伤的保护作用及机制。方法 6 月龄的雌性 C57BL/6 小鼠 60 只, 其中 10 只作为年龄对照组, 另 50 只高脂肪饮食喂养 6 月后, 饮水中加入氢醌(0.8%)继续饲养 3 月构建干性 AMD 小鼠模型, 并随机分为溶媒对照组、阳性药物(乐叮)组、补肾益气活血方组(低、中、高剂量组), 灌胃给药, 每日 1 次, 持续 3 月。观察期满处死动物, 摘取眼球, 电镜观察 RPE 细胞下沉积物及 Bruch 膜; 眼静脉取血清分离血清, 摘取眼球分离视网膜并匀浆, 检测血清和视网膜 SOD、GSH-Px、CAT 酶活性及 ROS、MDA 含量; qPCR、Western blot 检测 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL mRNA 转录及蛋白表达。结果 与年龄组对照组比, 溶媒对照组小鼠 RPE 下沉积物显著增加, Bruch 膜明显增厚; 与溶媒对照组比, 补肾益气活血方组小鼠 RPE 下沉积物减少, 对 Bruch 膜增厚有抑制作用; 补肾益气活血方可提高血清及视网膜组织 SOD、GSH-Px、CAT 酶活性, 降低血清及视网膜组织 ROS、MDA 含量; 补肾益气活血方中、高剂量可显著升高 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL mRNA 转录水平, 上调胞核 Nrf2 及 HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达水平。结论 补肾益气活血方对干性 AMD 模型小鼠视网膜氧化损伤有保护作用, 机制可能是激活 Nrf2 通路, 提高 SOD、GSH-Px、CAT 酶活性, 上调下游靶基因酶 HO-1、NQO-1、GCL 表达水平, 增强对模型动物体内活性氧的清除作用。

关键词: 年龄相关性黄斑变性; 小鼠模型; 补肾益气活血方; 氧化损伤; Nrf2 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2018)02-0162-06

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2018.0162

Protective Effect of Bushen Yiqi Huoxue Fang on Retinal Oxidative Damage in Model Mice of Dry Age-Related Macular Degeneration

XIE Jing, LI Min, XU Xin-rong*, HANG Li

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The study was aimed at evaluating protective effect of Bushen Yiqi Huoxue Fang on retinal oxidative damage in model mice of dry age-related macular degeneration (AMD) and to elucidate the underlying mechanism. **METHODS** 60 six-month-old C57BL/6 female mice, 10 were fed normal diet as aging control, 50 were fed a high-fat diet for 6 months followed by HQ (0.8%) in the drinking water for 3 months to established dry AMD model mice. Model mice were divided randomly into vehical control, positive drug(lutein) and 3 treatment groups (dosage: low, middle, high). Drugs were given once-daily through gastrogavage for 3 months. At the end of the experimental period, the mice were killed and the eyes immediately removed. Transmission electron microscopy were used to evaluate sub-RPE deposit formation and Bruch membrane (BrM) thickness; The serum were separated from the blood sampling of mice eye vein, mice retina were detached and homogenated, the serum and retina SOD, GSH-PX, CAT enzyme activity and ROS, MDA content were detected; The mRNA and protein expression of Nrf2, HO-1, NQO-1, GCL were detected by qPCR and Western blot, respectively. **RESULTS** Compared with aging control mice, the sub-RPE deposits was significantly increased, and the Bruch membrane was significantly thickened in vehical control mice; Bushen Yiqi Huoxue Fang can significantly inhibit sub-RPE deposit formation and reduce thickening of BrM in model mice compared to the vehical control mice, the sub-RPE deposits was decreased, BrM thickness was inhibited in treatment mice. Bushen Yiqi Huoxue Fang could increase SOD, GSH-PX and CAT enzyme activity, reduce ROS, MDA content of retina and serum in mice. mRNA and protein expressions of Nrf2, HO-1, NQO-1, GCL of HO-1, NQO-1 were up-regulated in mice treated with Bushen Yiqi Huoxue Fang(middle, high dosage). **CONCLUSION** Bushen Yiqi Huoxue Fang could protect the retina against oxidative damage in model mice of dry AMD, the underlying mechanism may be to increase SOD, GSH-PX and CAT enzyme activity and up-regulate expressions of Nrf2, HO-1, NQO-1, GCL through activa-

收稿日期: 2017-11-05

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20151601)

作者简介: 谢婧(1990-), 女, 硕士研究生。* 通信作者: 徐新荣, 男, 主任医师, 博士生导师, 主要从事中西医结合治疗眼病研究, E-mail: xin-rong_xu@aliyun.com

tion of Nrf2 pathway, which may strengthen the clearance of reactive oxygen species in model mice.

KEY WORDS: age-related macular degeneration; model mice; Bushen Yiqi Huoxue Fang; oxidative damage; Nrf2 pathway

年龄相关性黄斑变性(Age-related macular degeneration, AMD)分干性、湿性两类,其中干性者约占90%。干性AMD眼底主要表现为脉络膜毛细血管萎缩、玻璃膜疣以及视网膜色素上皮(Retinal pigment epithelium, RPE)萎缩,晚期可发生黄斑区地图状萎缩,导致视力明显下降,还有部分干性AMD会进展为湿性AMD。湿性AMD近年因抗VEGF治疗取得较大进展,但干性AMD目前尚无确切有效的治疗措施。研究表明,核因子E2相关因子2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)通路与AMD发病关系密切^[1],激活Nrf2通路可以诱导机体产生抗氧化酶和II相代谢酶,对氧化损伤ARPE-19细胞起到保护作用^[2]。

本研究使用的补肾益气活血方是我们治疗干性AMD的经验方,为进一步提高临床疗效,我们参考国内外近年干性AMD研究进展,结合干性AMD药物防治研究成果,对其进行了优化。本研究观察优化后的补肾益气活血方对干性AMD模型动物视网膜氧化损伤的保护作用,以及对Nrf2通路的影响,以探明作用机制,为临床应用提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

6月龄的雌性C57BL/6小鼠60只,体质量25~33g,购自南京大学模式动物研究所,生产许可证号:SCXK(苏)2005-0002。

1.2 实验药物

补肾益气活血方由枸杞子、桑椹子、菟丝子、太子参、葛根、生山楂、槐花、黄芪、白术、茯苓、川芎、三七组成。中药饮片购自南京中医药大学附属医院,药物共同水提后,浓缩成含生药2g/mL的流浸膏后4℃保存备用。阳性对照药物为乐叮,主要成份为叶黄素,维生素A,维生素C,维生素E,维生素B1,葡萄糖酸锌。每100g含叶黄素1.51g,维生素C3.06g,锌0.8g。0.5×60粒/瓶,广州市范乐医药科技有限公司生产。

1.3 实验试剂

氢醌(美国Alfa Aesar公司,CAS:615-67-8),逆转录试剂盒(美国Thermo Scientific Fisher公司)(SuperScript III, 12574026),超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD) (A001-1)、过氧化氢

酶(Catalase, CAT) (A007-1)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-PX) (A005)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA) (S0131)、活性氧(Reactive oxygen species, ROS) (E004)试剂盒均自南京建成生物研究所, Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,兔Nrf2单克隆抗体(EP1808Y)、兔HO-1多克隆抗体(ab13243)、兔GCL单克隆抗体(EPR6668)、小鼠NQO-1单克隆抗体(A180)、小鼠β-actin单克隆抗体(AC-15)、兔Lamin-B多克隆抗体(ab16048)、羊抗兔(ab6721)和兔抗小鼠(ab6728)IgG/HRP二抗均购自Abcam公司。

1.4 实验仪器

Bio-Tek酶标仪(美国Synergy公司),荧光定量PCR仪:CFX Real-Time System,电泳系统:Mini-Proten Tetra System,凝胶成像仪:ChemiDoc XRS+ System(美国Bio-RAD公司),超薄切片机(美国POWERHOME XL),透射电镜(美国FEI公司Tecnai G2 Spirit Bio TWIN)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药

动物高脂肪饮食喂养3月后,饮水中加入氢醌至终浓度为0.8%,继续饲养3月完成造模。动物分组:年龄对照组(正常饮食)、溶媒对照组(高脂饮食+氢醌)、阳性药物组(高脂饮食+氢醌+乐叮),补肾益气活血方组(高脂饮食+氢醌+中药)。补肾益气活血方分低、中、高3个剂量组,给药量分别为:5.4、10.8、21.6g/kg。乐叮给药量0.1g/kg。溶媒为蒸馏水。灌胃给药,每日1次,持续3月。

2.2 电镜观察

观察期满处死动物,摘取眼球,放入4%多聚甲醛中固定20min。去除角膜、晶体及玻璃体,在视乳头两侧切取2×4mm球壁,常规戊二醛、锇酸固定,环氧树脂包埋,超薄切片后,醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色,透射电镜观察、摄片。RPE下沉积物半定量评定及Bruch膜厚度测量按照文献^[3]方法进行。

2.3 小鼠血清和视网膜SOD、GSH-Px、CAT活性检测

观察期满,眼静脉取血分离血清,摘取眼球分离

视网膜并匀浆,在 3 000 r/min,4 ℃下离心 10 min,上清用于检测。检测时取样 100 μ L,分别在 550、412、405 nm 波长下按照 SOD、CAT 和 GSH-PX 检测试剂盒说明书操作测定 OD 值,计算酶活性。

2.4 小鼠血清和视网膜 ROS、MDA 含量测定

血清及组织取材同上。血清 ROS 检测采用 Fenton 反应及 griess 试剂显色法测定,组织匀浆 ROS 检测采用 DCFH-DA 法,血清及组织匀浆 MDA 检测采用 TBA 比色法。上述检测均按试剂盒说明书操作。

2.5 qPCR 实验

观察期满处死动物,用 Trizol 等试剂提取视网膜和脉络膜总 RNA,按照逆转录试剂盒操作步骤进行反转录。所得 cDNA 在实时荧光定量 PCR 仪上进行反应。每次扩增的同时设置 cDNA 的阴性对照。将 PCR 产物做熔解曲线,证实以上 PCR 反应产物特异性良好。统计 $\Delta\Delta$ Ct 值以比较各组 mRNA 的表达。

引物: Nrf2 F: 5'-AGTGACTCGGAAATG-GATGAG-3', R: 5'-TGTGCTGGCTGTGCGT-TAGG-3'; HO-1 F: 5'-GCTGGTGATGGCTGCCT-TGT-3', R: 5'-ACTGGGTGCTGCTTGTTCG-3'; NQO-1 F: 5'-ATGTATGACAATGGACCCTTCC-3', R: 5'-TCCCTTGCAGAGTGTCCATGG-3'; GCL F: 5'-GAAGTGGATGTGGACACTAGATG-3', R: 5'-TTGTAGTCAGGATGGTCTGCGATAA-3'; GAPDH F: 5'-ATGACATCAAGACGGTGGTG-3', R: 5'-CATACCAGGTATGAGCTTG-3'。

2.6 Western blot 实验

从视网膜和脉络膜组织提取蛋白(Nrf2 另提取核蛋白),BCA 法测定蛋白浓度。变性后取 50 μ g 上样,用 10% 分离胶、5% 浓缩胶电泳,之后转到硝酸纤维素膜上。加一抗(1:1 000) 4 ℃孵育过夜后加兔二抗(1:5 000),GAPDH 为内参(核蛋白内参为 Lamin-B),按 0.1 mL/cm²加入化学发光试剂,采用凝胶成像分析系统检测各蛋白条带。

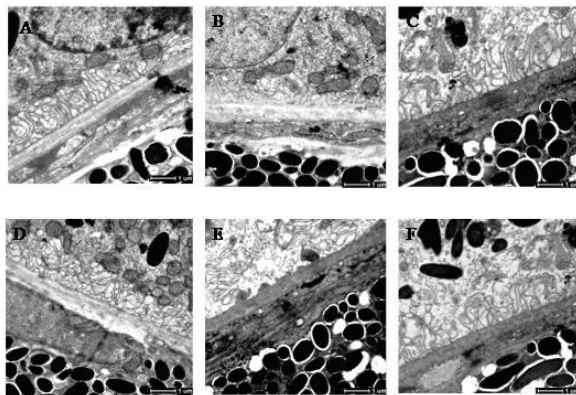
2.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件,2 组比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 电镜观察

各组实验动物电镜观察代表性图片见图 1, RPE 下沉积物评分及 Bruch 膜厚度见表 1。与年龄对照组比,溶媒对照组 RPE 下沉积物显著增加,Bruch 膜明显增厚($P < 0.01$);与溶媒对照组比,阳性药物组模型小鼠 RPE 下沉积物减少($P < 0.05$),但对 Bruch 膜厚度影响不明显,补肾益气活血方高、中、低 3 个剂量组均可使 RPE 下沉积物减少($P < 0.05$),且中、高剂量的补肾益气活血方对 Bruch 膜厚度增厚有抑制作用($P < 0.05$)。



A. 年龄对照组; B. 溶媒对照组; C. 阳性药物组;
D. 补肾益气活血方低剂量组; E. 中剂量组; F. 高剂量组

图 1 各组实验动物电镜观察结果($\times 11\ 000$)

3.2 SOD、GSH-Px、CAT 活性

各组实验动物血清及视网膜组织 SOD、GSH-Px、CAT 活性检测结果见表 2。由表 2 可见,血清 SOD、GSH-Px、CAT 活性明显高于视网膜组织;与年龄对照组比,溶媒对照组动物血清及视网膜组织上述 3 种酶活性显著降低($P < 0.01$);与溶媒对照组比,阳性药物组对 3 种酶活性没有影响,补肾益气活血方高、中、低 3 个剂量组中,低剂量补肾益气活血方提高血清及视网膜组织 GSH-Px、血清 CAT 酶活性($P < 0.05$),中剂量补肾益气活血方能提高血清 3 种酶($P < 0.05 \sim 0.01$)及视网膜组织 GSH-Px 酶活性($P < 0.01$),高剂量补肾益气活血方则能提高血清及视网膜组织 3 种酶活性($P < 0.05 \sim 0.01$),且对 SOD 酶活性提高作用优于中、低剂量($P < 0.05$)。

3.3 ROS、MDA 含量

血清及视网膜组织 ROS、MDA 含量测定结果见表 3。由表 3 可见,血清 ROS、MDA 含量明显高于视网膜组织;与年龄对照组比,溶媒对照组动物血清及视网膜组织 ROS、MDA 含量显著升高($P < 0.01$);与溶媒对照组比,阳性药物、补肾益气活血方均

可降低血清及视网膜组织 ROS、MDA 含量 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 在高、中、低剂量补肾益气活血方 3 个观

察组中, 高剂量组作用优于中、低剂量组 ($P < 0.05$)。

表 1 小鼠 RPE 下沉积物评分及 Bruch 膜厚度比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	RPE 下沉积物评分	Bruch 膜厚度/ μm
年龄对照组	1.86 \pm 0.45	0.35 \pm 0.06
溶媒对照组	4.29 \pm 1.03**	0.68 \pm 0.09**
阳性药物组	3.24 \pm 0.47#	0.59 \pm 0.08
中药低剂量组	3.18 \pm 0.44#	0.56 \pm 0.07
中药中剂量组	3.06 \pm 0.39#	0.48 \pm 0.07#
中药高剂量组	2.91 \pm 0.38#	0.45 \pm 0.06#

注:与年龄对照组比较, ** $P < 0.01$, 与溶媒对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 小鼠血清及视网膜组织 SOD、GSH-Px、CAT 活性比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	血清/(U·mL ⁻¹)			组织/(U·mg ⁻¹)		
	SOD	GSH-Px	CAT	SOD	GSH-Px	CAT
年龄对照组	55.08 \pm 4.80	155.13 \pm 15.42	10.38 \pm 0.76	20.81 \pm 1.44	10.32 \pm 0.69	3.47 \pm 0.15
溶媒对照组	27.03 \pm 1.57##	71.35 \pm 9.14##	3.52 \pm 0.39##	8.27 \pm 0.89##	3.06 \pm 0.31##	1.18 \pm 0.06##
阳性药物组	31.36 \pm 2.55	88.61 \pm 10.37	4.69 \pm 0.34	9.52 \pm 1.02	3.24 \pm 0.42	1.26 \pm 0.08
中药低剂量组	30.22 \pm 2.31	122.43 \pm 12.08*	6.07 \pm 0.63*	10.14 \pm 1.23	6.65 \pm 0.35*	1.73 \pm 0.16
中药中剂量组	42.71 \pm 2.93*	134.26 \pm 10.48*	8.46 \pm 0.72**	11.58 \pm 1.47	9.37 \pm 0.57**	1.85 \pm 0.11
中药高剂量组	50.62 \pm 3.83* Δ	134.51 \pm 10.84*	9.25 \pm 0.75**	18.26 \pm 1.76* Δ	9.79 \pm 0.58**	2.02 \pm 0.16*

注:与年龄对照组比较, ## $P < 0.01$; 与溶媒对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

表 3 小鼠血清及视网膜组织 ROS、MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	血清		组织	
	ROS(FI)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	ROS(FI)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
年龄对照组	3 187.3 \pm 134.5	13.4 \pm 2.5	720.3 \pm 31.7	5.5 \pm 0.4
溶媒对照组	5 537.6 \pm 176.2##	39.6 \pm 5.1##	1 391.5 \pm 50.2##	25.9 \pm 2.9##
阳性药物组	4 673.8 \pm 157.6*	23.9 \pm 2.9*	989.5 \pm 41.3*	7.1 \pm 0.6**
中药低剂量组	4 847.2 \pm 178.3*	26.8 \pm 3.2*	1 072.2 \pm 42.6*	8.4 \pm 1.01**
中药中剂量组	4 196.5 \pm 119.1*	20.6 \pm 2.1*	943.9 \pm 31.6*	7.6 \pm 0.5**
中药高剂量组	3 779.3 \pm 98.9** Δ	16.2 \pm 1.7** Δ	708.2 \pm 22.8**	5.4 \pm 0.7** Δ

注:与年龄对照组比较, ## $P < 0.05$; 与溶媒对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3.4 qPCR 各组实验动物 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL mRNA 转录水平

结果见图 2。与年龄对照组比, 溶媒对照组动物 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL 转录水平升高 ($P < 0.05$); 与溶媒对照组比, 阳性药物、低剂量补肾益气活血方组 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL 转录水平没有统计学差异, 补肾益气活血方高剂量组转录水平则明显高于溶媒对照组 (HO-1、NQO-1: $P < 0.01$, Nrf2、GCL: $P < 0.05$), 中剂量组 HO-1、NQO-1 转录水平升高。

3.5 Western blot 法分析各组实验动物胞核、胞浆 Nrf2 表达水平

结果见图 3。由图 3 可知, 与年龄对照组比, 溶媒对照组动物胞核 Nrf2 表达水平升高 ($P < 0.05$),

胞浆 Nrf2 表达水平无显著差异; 与溶媒对照组比, 阳性药物组胞核、胞浆 Nrf2 表达水平没有显著性差异, 补肾益气活血方 3 个剂量组胞核 Nrf2 表达水平上调 ($P < 0.01$), 高剂量组显著高于低剂量组 ($P < 0.05$), 阳性药物及补肾益气活血方低剂量组胞浆 Nrf2 表达水平无明显差异, 补肾益气活血方中、高剂量组表达上调 ($P < 0.05$)。

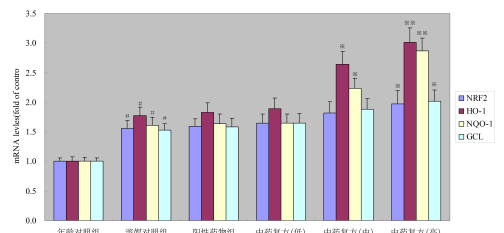
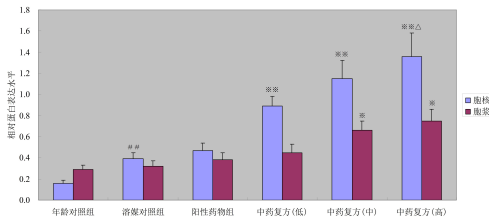
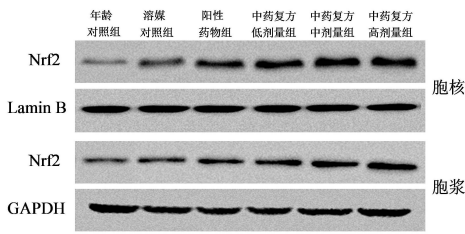


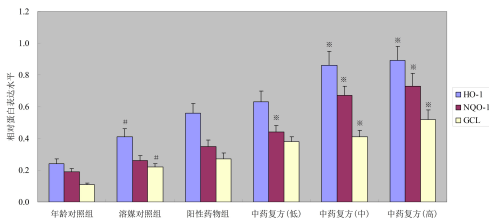
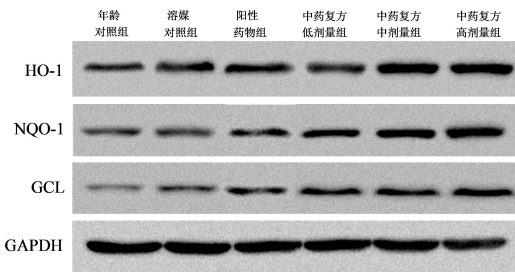
图 2 各组动物 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL mRNA 转录水平比较



注:与年龄对照组比较, # $P < 0.01$; 与溶媒对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 3 各组动物胞核、胞浆 Nrf2 蛋白表达比较

各组实验动物 HO-1、NQO-1、GCL 表达水平检测及分析结果见图 4。由图 4 可知,与年龄对照组比,溶媒对照组动物 HO-1、GCL 表达水平上调 ($P < 0.05$)。表达水平差异不明显;与溶媒对照组比,阳性药物组 HO-1、NQO-1、GCL 表达水平没有显著性差异,补肾益气活血方高、中剂量组表达水平上调 ($P < 0.05$),而低剂量组仅在 NQO-1 表达上调。



注:与年龄对照组比较, # $P < 0.05$, 与溶媒对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 各组动物 HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达比较

4 讨论

大量研究表明,氧化损伤是 AMD 最为重要的发病机制,抗氧化损伤是 AMD 防治的有效途径。如 AREDS (Age - Related Eye Disease Study, AREDS) 在 2001 年开展的首个多中心随机前瞻性研究,评估了药理剂量的抗氧化剂,包括 β -胡萝卜

素、维生素 C 和维生素 E、锌和铜等对 AMD 进展及视敏度的影响,证实应用抗氧化剂可以在 5 年内使晚期 AMD 进展的风险降低 25%,中度视力下降的风险降低 19%^[4]。乐叮的主要成分是叶黄素,具有很强的抗氧化作用,我们的研究发现枸杞提取物及其成分叶黄素和玉米黄素对氧化损伤模型小鼠视网膜及 ARPE-19 细胞有保护作用^[5]。此外,乐叮中的维生素 C、维生素 E 和锌离子也有抗氧化作用。

中医认为本病属视瞻昏渺,发病与肝、脾、肾的功能失调有关。目为肝之窍,肝受血而能视,五脏六腑之精气皆上濡于目;肾为先天之本,肾藏精,受五脏六腑之精而藏之,肾精充足,方能目视精明。肝肾阴虚,虚火上炎,炼液为瘀;脾气虚,推动无力,血行迟涩而为瘀;津血不足,脉络空虚,血行停滞亦可致瘀。瘀血留滞于脉络,导致脉络瘀滞,使精血不能上行于目,目失所养而视物不明。因此,AMD 为本虚标实之证,脾气虚弱、肝肾精血不足是本,痰湿、血瘀是标,前者始终贯穿于疾病的全过程。基于 AMD 的病机,不少医家采用滋补肝肾、益气健脾、活血化瘀法治疗干性 AMD,如陆萍等用柔肝健脾、滋阴明目法治疗肝肾亏损、气血亏虚型干性 AMD^[6],关红丹用滋补肝肾、健脾祛湿法治疗 AMD^[7],均取得一定效果。临床上,我们以滋补肝肾、益气健脾经验方治疗干性 AMD,发现能减缓早、中期干性 AMD 的进展,疗效优于乐叮。

本研究采用的是优化后的组方。其中枸杞子、桑椹子滋阴明目;菟丝子、山萸肉为平补阴阳要药,用其有阳中求阴之意;田七、川芎、生山楂具有祛瘀生新、活血明目功能;葛根理气活血;太子参、黄芪、白术、茯苓益气健脾;槐花有清热作用,其主要成分槲皮素有很强抗氧化作用,能显著减轻 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞氧化损伤^[8]。本研究观察到,乐叮及补肾益气活血方高、中、低 3 个剂量均可使 RPE 下沉积物减少,中、高剂量的补肾益气活血方对 Bruch 膜厚度增厚有抑制作用,显示乐叮及补肾益气活血方对干性 AMD 模型动物视网膜有保护作用,中、高剂量的补肾益气活血方优于乐叮;乐叮对 SOD、GSH-Px、CAT3 种重要的抗氧化酶活性没有影响,高剂量补肾益气活血方则能提高动物血清及视网膜组织 3 种酶的活性,对 SOD 酶活性提高作用优于中、低剂量;乐叮、补肾益气活血方均可降低动物血清及视网膜组织 ROS、MDA 含量,补肾益气活

血方高剂量作用优于中、低剂量。这些研究结果提示,乐町对模型动物视网膜的保护作用可能与其成分中的抗氧化剂直接中和活性氧有关,而补肾益气活血方的作用与提高抗氧化酶的活性有关。研究表明,Nrf2 通路与 AMD 发病关系密切。为此,本研究观察了乐町、补肾益气活血方对 Nrf2 通路及其下游靶基因酶 HO-1、NQO-1、GCL 表达水平的影响,发现乐町对 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL 转录水平没有影响,补肾益气活血方中、高剂量组则转录水平明显升高;乐町对胞核、胞浆 Nrf2 蛋白表达水平没有影响,补肾益气活血方能显著上调胞核 Nrf2 蛋白表达水平,对胞浆 Nrf2 蛋白表达水平也有一定影响;乐町对 HO-1、NQO-1、GCL 表达水平没有影响,而补肾益气活血方高、中剂量可显著上调 HO-1、NQO-1、GCL 表达水平。这些结果提示,补肾益气活血方可能通过激活 Nrf2 通路,提高 SOD、GSH-Px、CAT 酶活性,上调下游靶基因酶 HO-1、NQO-1、GCL 表达水平,从而增强对活性氧的清除作用,对氧化损伤模型小鼠视网膜起到保护作用。

总之,优化后的补肾益气活血方可能通过激活 Nrf2 通路,提高 SOD、GSH-Px、CAT 酶活性,上调下游靶基因酶 HO-1、NQO-1、GCL 表达水平,增强对模型动物体内活性氧的清除,对视网膜氧化损伤起到保护作用。本研究通过干性 AMD 模型动物证实了补肾益气活血方的有效性,并初步探明了作用机制,为下一步开展临床研究提供了依据。

参考文献:

- [1] ZHAO Z, CHEN Y, WANG J, et al. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice[J]. PLoS One, 2011,6(4): e19456.
- [2] XU XR, LI M, CHEN WW, et al. Apigenin attenuates oxidative injury in ARPE-19 cells thorough activation of Nrf2 pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016;4378461.
- [3] 黄冰林,杭丽,郑仕中,等.枸杞提取物对高脂饮食及氢醌诱发的小鼠视网膜色素上皮沉积物形成的抑制作用[J].南京中医药大学学报,2013,29(1):29-34.
- [4] Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of highdose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss. AREDS report No.8[J]. Arch Ophthalmol, 2001, 119: 1417-1436.
- [5] XU XR, HANG L, HUANG BL, et al. Efficacy of ethanol extract of fructus lycii and its constituents lutein/zeaxanthin in protecting retinal pigment epithelium cells against oxidative stress: in vivo and in vitro models of age-related macular degeneration[J]. J Ophthalmol, 2013;862806.
- [6] 陆萍,邹菊生,阮雯洁,等.柔肝健脾、滋阴明目法治疗萎缩性老年性黄斑变性的随机对照临床研究[J].上海中医药杂志,2012,46(6):71-73.
- [7] 关红丹.黄斑宁汤治疗年龄相关性黄斑变性的临床观察[J].河北中医,2008,30(5):521-522.
- [8] XU XR, YU HT, YANG Y, et al. Quercetin phospholipid complex significantly protects against oxidative injury in ARPE-19 cells associated with activation of Nrf2 pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2016,770:1-8.

(编辑:董宇)