

# 驻景丸加减方对形觉剥夺性近视小鼠视网膜自噬的影响

马捷<sup>1</sup>, 莫亚<sup>1,2</sup>, 叶映含<sup>1</sup>, 龙丹宁<sup>1</sup>, 邓晞远<sup>1</sup>

引用: 马捷, 莫亚, 叶映含, 等. 驻景丸加减方对形觉剥夺性近视小鼠视网膜自噬的影响. 国际眼科杂志 2022; 22(7): 1079-1084

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 2020 年度“杏林学者”学科人才科研提升计划 (No. XSGG2020003); 成都中医药大学附属医院科技发展基金项目 (No. 20ZJ10)

作者单位: <sup>1</sup>(610071) 中国四川省成都市, 成都中医药大学; <sup>2</sup>(610072) 中国四川省成都市, 成都中医药大学附属医院眼科  
作者简介: 马捷, 在读硕士研究生, 研究方向: 近视相关基础及临床研究。

通讯作者: 莫亚, 毕业于成都中医药大学, 博士研究生, 博士生导师, 主任医师, 研究方向: 近视相关基础及临床研究. moyas286@cdutcm.edu.cn

收稿日期: 2021-10-11 修回日期: 2022-06-13

## 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自噬的影响。

**方法:** C57BL/6 小鼠 30 只随机分为阴性对照组、近视模型组以及中药干预组, 每组 10 只。除了阴性对照组外, 近视模型组、中药干预组小鼠均使用半透明 EP 管遮盖右眼形成形觉剥夺性近视 (FDM) 模型; 中药干预组灌胃驻景丸加减方混悬液 0.546g/(kg·d) (0.15mL/d), 阴性对照组、近视模型组灌胃等量生理盐水 (0.15mL/d), 共 4wk。分别于实验开始、实验结束, 使用带状检影镜测量小鼠右眼屈光度, A 超测量小鼠右眼眼轴长度。实验结束时, 取所有小鼠右眼进行检测, 免疫荧光法定位和检测视网膜小胶质细胞标志物 (Iba1) 活性与迁移; 透射电镜观察视网膜色素上皮细胞中自噬小体形成情况; Western Blot、实时荧光定量 PCR (q-PCR) 检测视网膜组织自噬标志物 LC3 II 和 p62 蛋白定量及基因表达情况。

**结果:** 实验结束时小鼠右眼屈光度示, 近视模型组、中药干预组形成相对近视, 近视模型组、中药干预组较阴性对照组显著降低 (均  $P < 0.01$ )。实验结束时, 近视模型组、中药干预组眼轴长度较阴性对照组眼轴长度显著增加 ( $P < 0.01$ )。免疫荧光法定位和检测 Iba1 示, 近视模型组视网膜中 Iba1 的平均光密度增加趋势最明显, 阴性对照组增高趋势次之, 中药干预组有降低趋势, 近视模型组较阴性对照组显著增加 ( $P < 0.05$ ), 中药干预组较近视模型组显著降低 ( $P < 0.05$ ), 且发现近视模型组、中药干预组 Iba1 向神经节细胞层迁移。透射电镜示, 近视模型组、中药干预组视网膜色素上皮细胞中观察到自噬小体。Western Blot 法、q-PCR 检测结果示, LC3 II、p62 表达在中药干预组增加趋势最明显、近视模型组其次、阴性对照组最低。

**结论:** 驻景丸加减方可能通过抑制小胶质细胞活化, 增强 FDM 小鼠视网膜自噬。

**关键词:** 自噬; 小胶质细胞; 驻景丸加减方; Iba1; LC3 II; p62

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.7.03

## Effects of modified Zhujing pill on retinal autophagy in mice with form deprivation myopia

Jie Ma<sup>1</sup>, Ya Mo<sup>1,2</sup>, Ying - Han Ye<sup>1</sup>, Dan - Ning Long<sup>1</sup>, Xi - Yuan Deng<sup>1</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81674031); Sichuan Science and Technology Plan Project (No. 2021YJ0252); Chengdu University of Traditional Chinese Medicine 2020 “Xinglin Scholars” Discipline Talents Scientific Research Promotion Plan (No. XSGG2020003); Chengdu University of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital Science and Technology Development Fund Project (No. 20ZJ10)

<sup>1</sup>Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610071, Sichuan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

**Correspondence to:** Ya Mo. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610071, Sichuan Province, China; Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China. moyas286@cdutcm.edu.cn  
Received: 2021-10-11 Accepted: 2022-06-13

## Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of modified Zhujing pill on retinal autophagy in mice with form deprivation myopia.

• **METHODS:** Thirty C57BL/6 mice were randomly divided into a negative control group, a myopia model group and a traditional Chinese medicine intervention group, with 10 mice in each group. Except for the negative control group, all mice in the myopia model group and the traditional Chinese medicine intervention group used translucent EP tubes to cover their right eyes to make a form deprivation myopia (FDM) model; The traditional Chinese medicine intervention group gavage Zhujing pill modified suspension 0.546g/(kg·d) (0.15mL/d), the negative control group and the myopia model group were given an equal amount of normal saline (0.15mL/d) for 4wk. At the beginning and the end of the experiment respectively, the right eye diopter of the mouse was measured with a strip retinoscope, measurement of the axial length of the right eye of mouse by A-ultrasound. At

the end of the experiment, the right eyes of all mice were taken for detection, and immunofluorescence method was used to locate and detect the activity and migration of the retinal microglia marker (Iba1); Transmission electron microscope observation of autophagosome formation in retinal pigment epithelial cells; Western Blot, real-time fluorescent quantitative PCR (q-PCR) to detect the autophagy marker LC3 II and p62 protein quantitative and gene expression in retinal tissues.

• **RESULTS:** At the end of the experiment, the refractive power of the right eyes of mice showed that the myopia model group and the traditional Chinese medicine intervention group formed relative myopia, the myopia model group and the traditional Chinese medicine intervention group were significantly lower than those of the negative control group (all  $P < 0.01$ ). At the end of the experiment, the axial length of the myopia model group and the Chinese medicine intervention group were significantly increased compared with the negative control group ( $P < 0.01$ ). Immunofluorescence method for locating and detecting Iba1 showed that the average optical density of Iba1 in the retina of the myopia model group increased the most obviously, followed by the increase in the negative control group, and the decrease in the traditional Chinese medicine intervention group. Compared with the negative control group, the myopia model group increased significantly ( $P < 0.05$ ), and the traditional Chinese medicine intervention group was significantly lower than the myopia model group ( $P < 0.05$ ). It was found that Iba1 migrated to the ganglion cell layer in the myopia model group and the traditional Chinese medicine intervention group. Transmission electron microscopy showed that autophagosomes were observed in the retinal pigment epithelial cells of the myopia model group and the Chinese medicine intervention group. The results of Western Blot and q-PCR showed that the expression of LC3 II and p62 increased most obviously in the traditional Chinese medicine intervention group, followed by the myopia model group, and the negative control group was the lowest.

• **CONCLUSION:** The results of the study show that modified Zhujing pill may enhance retinal autophagy in mice with FDM by inhibiting the activation of microglia.

• **KEYWORDS:** autophagy; microglia; modified Zhujing pill; Iba1; LC3 II; p62

**Citation:** Ma J, Mo Y, Ye YH, *et al.* Effects of modified Zhujing pill on retinal autophagy in mice with form deprivation myopia. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(7):1079-1084

## 0 引言

近年来,近视的患病率在全球范围内呈爆发性增长且逐渐呈低龄化发展趋势,由近视引起的近视视网膜退变也随之上升<sup>[1]</sup>,是青年患者首要致盲性眼病。虽然近视形成的确切机制尚不明确,但已有研究指出近视形成过程与炎症、氧化反应等密切相关<sup>[2]</sup>。视网膜中含有大量线粒体,是活性氧(reactive oxygen species, ROS)的重要来源,ROS积累过多可造成蛋白质和不饱和脂肪酸的氧化,从而损伤

机体组织。研究表明减少 ROS 的产生可防止视网膜病变<sup>[3]</sup>,ROS 过多增加则会诱导细胞凋亡和自噬<sup>[4]</sup>。自噬是一种基本的分解代谢机制,主要通过溶酶体降解细胞内受损细胞器及下调 ROS、炎症小体等<sup>[5]</sup>,维持细胞内稳态<sup>[6]</sup>。LC3 II 的量与自噬小体数量密切相关,可作为观察细胞自噬活性的关键指标,p62 作为自噬受体蛋白,是反映自噬活性的辅助指标。小胶质细胞是中枢神经系统重要的免疫细胞之一,神经系统发育早期,可快速清除凋亡的轴突,并启动程序性死亡调控神经元的数量。研究发现当机体受到刺激时,小胶质细胞将发生活化与迁移<sup>[7]</sup>。活化的小胶质细胞将产生对神经元有害的 ROS、分泌炎症因子诱导炎症反应,导致细胞内环境稳态失衡<sup>[8]</sup>。研究发现自噬与小胶质细胞联系紧密,可调控小胶质细胞活化介导的炎症反应<sup>[9-10]</sup>。近视,在古籍中被称之为“目不能远视”“能近怯远症”。《审视瑶函》记载本病为“肝经不足肾经病,光华咫尺视模糊”及“阳不足,病于少火者也”,认为近视之病,多因肝肾不足所致。驻景丸加减方,最早源于倪德维的《原机启微》,现临床使用多出自陈达夫<sup>[11]</sup>《中医眼科六经法要》,方中主要含有菟丝子、枸杞子、楮实子、五味子、茺蔚子、三七等,具有肝肾同补、活血明目的作用。研究发现驻景丸加减方可激活抗氧化系统与自噬系统,对近视发展过程中出现的视网膜病变、视神经退行性病变具有保护作用<sup>[12-13]</sup>。研究表明视网膜病变、视神经退行性病变与小胶质细胞活化有关<sup>[14-15]</sup>。综上,本研究通过建立形觉剥夺性近视(FDM)小鼠模型,探究驻景丸加减方是否通过调控自噬,达到干预近视及近视视网膜退变的目的。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 **动物** 3 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠 30 只,体质量  $18 \pm 2g$ ,许可证号:SYXK(川)2019-049,检查小鼠健康无眼病及皮肤破损,保持实验室光照 12h/d,饲养于  $(22 \pm 2)^\circ C$  的环境中,自由摄食和饮水。本研究通过成都中医药大学动物实验伦理审查审批(备案编号:2002-22)。

1.1.2 **主要试剂与药品** Iba1,小鼠克隆抗体(批号:GB12105,Servicebio);LC3 II 抗体,兔克隆抗体(货号:A19665,abclonal);p62 抗体,兔克隆抗体[货号:ab109012,英国 abcam-艾博抗(上海)贸易有限公司];Iba1 抗体,小鼠克隆抗体(批号:GB12105,Servicebio);RNA Trizol Reagent(批号:vs18061730,合肥博美生物科技有限公司);驻景丸加减方采用该方制成的我院院内制剂补精益视片,每片 0.3g(批号:20200703,成都中医药大学附属医院药剂科),主要成分为:楮实子、菟丝子、茺蔚子、五味子、枸杞子、三七等。

1.1.3 **仪器** 带状检影镜(六六视觉医疗器械有限公司);A 超(KN-1800);显微手术器械(宿迁奕菲电子商务有限公司);手术显微镜(合肥密维光学仪器有限公司);化学发光凝胶成像仪 5200(上海天能科技有限公司);图像分析软件 Image-J(美国 National Institutes of Health);透射电子显微镜:型号 JEM-1400FLASH(日本电子 JEOL);实时荧光定量(RT-PCR)仪:型号 PIKORed 96(美国 ThermoFisher 仪器有限公司);莱卡组织处理机:EM TP,(德国莱卡);玻璃制刀机:EM KMR3(德国莱卡)。

### 1.2 方法

1.2.1 **分组与造模** 小鼠 30 只随机分为阴性对照组、近视



模型组、中药干预组,每组 10 只。阴性对照组双眼不做任何处理,剩余两组使用半透明眼罩遮盖右眼使其形成 FDM 模型,左眼不做任何处理。

**1.2.2 治疗方法** 阴性对照组与近视模型组灌胃生理盐水 0.15mL/d,中药干预组灌胃驻景丸加减方混悬液 0.546g/(kg·d)(0.15mL/d),连续灌胃 4wk。

**1.2.3 屈光度与眼轴长度检测** 分别于实验开始时、实验结束时测量所有小鼠右眼屈光度、眼轴长度。所有小鼠使用托吡卡胺散瞳,共 4 次,每次间隔 5min,4 次后间隔 20min,散瞳完成后由 1 名有经验的验光师使用带状检影镜,对小鼠右眼验光,每只小鼠验光 3 次,取平均值。固定小鼠后,使用盐酸丙美卡因滴其右眼结膜囊,后使用眼部 A 超测量小鼠右眼眼轴长度,测量 5 次,取其平均值。

**1.2.4 免疫荧光法定位和检测 Iba1** 实验结束时,每组随机选 3 只小鼠使用过量麻醉[10%水合氯醛溶液(350mg/kg)]处死小鼠,在手术显微镜下完整摘除所选小鼠右眼球,并将其放入 4%多聚甲醛固定液中固定 2h,梯度乙醇、二甲苯脱水,浸蜡包埋,制备视网膜切片;将脱蜡后的切片浸入 0.01mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH6.0),微波炉中高火加热至沸腾后断电,间隔 5min 后,反复 1 次,冷却,分别加入浓度 1:100 Iba1 一抗,4℃下过夜后水冲洗 3 次;加入二抗,按常规步骤进行,通过荧光扫描显微镜摄像系统对切片进行图像采集,每张切片先低倍镜下观察后,分别选取 3 个视野采集 400 倍显微图像。

**1.2.5 透射电镜** 实验 4wk 时,小鼠右眼视网膜取材与固定方法同“1.2.4”项,各组选用 1 只小鼠右眼视网膜,通过丙酮逐级脱水,渗透与包埋,制成超薄切片(50nm),经醋酸铀和铅盐染色后使用 JEM-1400FLASH 透射电镜观察、进行图像采集。

**1.2.6 Western Blot 检测视网膜组织 LC3 II 和 p62 表达** 实验结束时,各组取 3 只小鼠右眼视网膜摇匀吸出上清液并测蛋白水平,分别放入  $\beta$ -actin(内参蛋白)、LC3 II、p62 一抗,浓度分别对应 1:100000、1:1000、1:5000,常规孵育过夜,PVDF 膜洗 3 次,放入浓度 1:5000 二抗,重复冲洗,显色凝胶成像系统扫描观察,最后使用天能 GIS 机箱控制软件 V2.0 对条带进行曝光扫描,目标蛋白条带灰度值与  $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值比值为相应蛋白表达结果。

**1.2.7 q-PCR 检测视网膜组织 LC3 II 和 p62 mRNA 表达** 实验结束时,各组取 3 只小鼠右眼视网膜,提取总 RNA,逆转录为 cDNA,采用 q-PCR 技术检测 LC3 II、p62 mRNA 表达水平,以  $\beta$ -actin 为内参基因。使用 Primer Premier 引物设计软件设计筛选各基因特异性引物。所有引物均交由上海生物工程技术服务有限公司设计合成,见表 1。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对各组小鼠眼球中的 LC3 II、p62 mRNA 相对表达水平进行定量分析。

统计学分析:采用统计软件 SPSS 26.0 进行统计分析。计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,多样本均数间比较采用单因素方差分析,如果多组间存在差异,则进行两两比较时方差齐则采用 LSD-*t* 检验,方差不齐则采用 Tamhane's *T2* 检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 屈光度与眼轴长度** 屈光度变化见表 2,图 1A,眼轴长度变化见表 3,图 1B。实验开始,三组小鼠屈光度差异无统计学意义( $P>0.05$ );实验结束时屈光度结果示,与阴

性对照组比较,中药干预组、近视模型组屈光度降低(均  $P<0.01$ ),近视模型组、中药干预组造模眼形成相对近视。实验开始,3 组小鼠眼轴长度差异无统计学意义( $P>0.05$ );实验结束时眼轴长度结果示,近视模型组、中药干预组眼轴长度较阴性对照组眼轴长度显著增加(均  $P<0.01$ ),且近视模型组眼轴长度较中药干预组眼轴长度有增加趋势。

**2.2 免疫荧光法定位和检测 Iba1 结果** 实验结束时 Iba1 标记小胶质细胞观察到:阴性对照组少量静息状态 Iba1 阳性表达位于视网膜外丛状层与内丛状层,近视模型组、中药干预组主要位于外丛状层、内丛状层与神经节细胞层,近视模型组、中药干预组 Iba1 向神经节细胞层迁移,见图 2。Iba1 通过平均光密度计算,实验结束时结果示,近视模型组 Iba1 蛋白含量( $29.6087\pm 0.4998$ )表达最强,阴性对照组( $25.2637\pm 2.7394$ )次之,中药干预组( $24.4810\pm 1.8684$ )最少,三组差异有统计学意义( $F=6.107, P=0.036$ );与阴性对照组比较,近视模型组 Iba1 蛋白含量增加( $P<0.05$ );与近视模型组比较,中药干预组 Iba1 蛋白含量降低( $P<0.05$ ),见图 1C。

**2.3 透射电镜观察各组小鼠自噬形态学表征** 透射电镜观察见图 3,实验结束时阴性对照组小鼠视网膜色素上皮细胞超微结构未见明显病变;近视模型组视网膜色素上皮细胞胞浆内见少量自噬小体,但线粒体等细胞器无明显异常;中药干预组小鼠视网膜色素上皮细胞超微结构较正常,见少量自噬小体,且细胞器结构完整。

**2.4 Western Blot 法检测视网膜组织中 LC3 II 及 p62 表达** LC3 II、p62 蛋白表达结果显示,实验结束时,与近视模型组比较,中药干预组 LC3 II 及 p62 表达具有明显增加趋势,阴性对照组有递减趋势( $P>0.05$ ,图 1D,表 4),蛋白条带见图 1F。

**2.5 q-PCR 检测视网膜组织 LC3 II 及 p62 mRNA 表达** 实验结束时 q-PCR 结果见图 1E,表 5。与阴性对照组相比,近视模型组小鼠眼球视网膜组织中 LC3 II mRNA 表达升高( $P<0.05$ );与近视模型组相比,中药干预组小鼠眼球视网膜组织中 LC3 II mRNA 表达升高( $P<0.05$ )。与阴性对照组相比,近视模型组小鼠眼球视网膜组织中 p62 mRNA 具有升高趋势( $P>0.05$ );与近视模型组相比,中药干预组小鼠眼球视网膜组织中 p62 mRNA 有升高趋势( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

近年来,近视发病率呈爆发性增长,将给患者、社会带来极大的经济负担<sup>[15]</sup>,虽然近视的发病机制尚不明确,但多数学者认为近视发生发展受环境、遗传以及种族因素共同影响<sup>[16]</sup>。近视的发展与炎症因子、肿瘤坏死因子、ROS 累积密切相关,近视持续发展将造成视网膜退变,例如视网膜色素上皮层功能障碍、视网膜厚度、氧供、血管、微循环及神经节细胞层等异常<sup>[17-19]</sup>,将增加近视患者视力障碍及失明的风险<sup>[20]</sup>。因此应积极寻找有效干预近视所致视网膜退变的方法。

由于 FDM 小鼠被广泛用于近视研究中<sup>[21]</sup>,本研究采用遮盖 3 周龄 C57BL/6J 小鼠右眼的方法制成 FDM 动物模型。小鼠视力发育呈生理化远视发展<sup>[22]</sup>,因此我们用测量结果“相对近视化”即屈光度降低来评判近视造模是否成功。本实验研究结果示,实验结束时与阴性对照组比较,近视模型组、中药干预组屈光度降低( $P<0.01$ ),向近

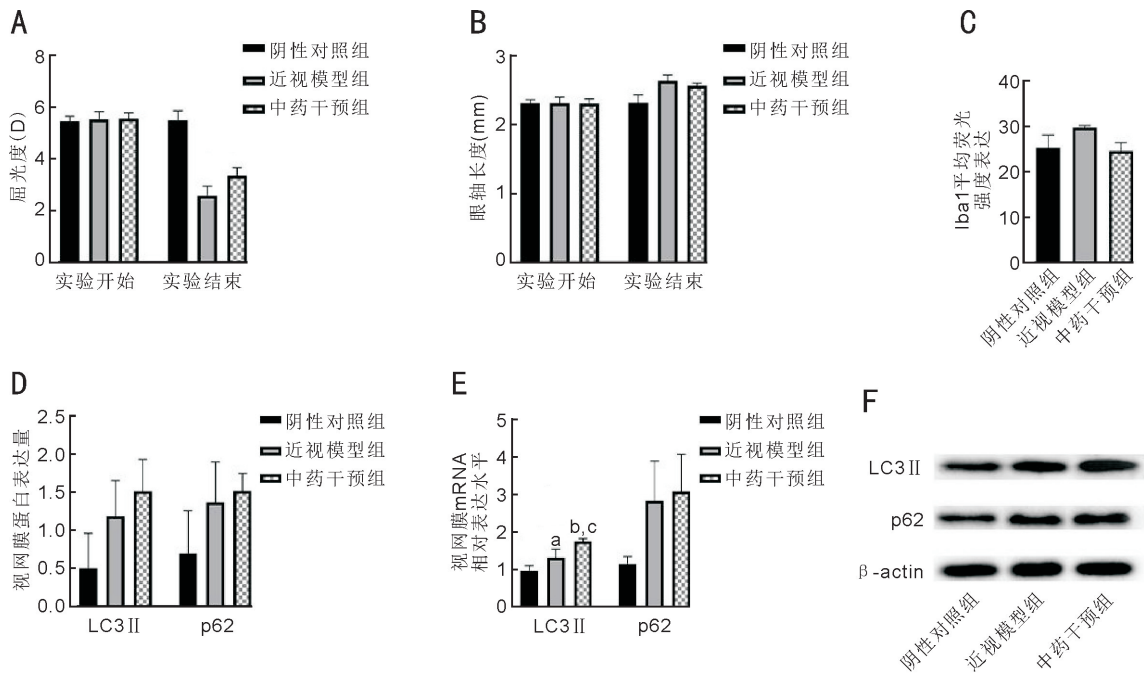


图1 各组小鼠检测指标汇总 A:小鼠屈光度;B:小鼠眼轴长度;C:免疫荧光法检测视网膜组织中Iba1平均荧光强度;D:Western Blot法检测视网膜组织中LC3 II及p62蛋白相对表达水平;E:q-PCR法定测定视网膜组织中LC3 II、p62 mRNA相对表达水平;F:LC3 II、p62、 $\beta$ -actin蛋白条带。<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 阴性对照组;<sup>c</sup> $P<0.05$  vs 近视模型组。

表1 本次检测所用引物及碱基序列

引物名称	上游	下游
LC3-II	CCACCAAGATCCCAGTGATTAT	TGATTATCTTGATGAGCTCGCT
p62	TCCAGCACAGGCACAGAAGACAAGAG	CAGTCATCGTATCCTCCTGAGCAGTT
$\beta$ -actin	GAAGATCAAGATCATTTGCTCC	TACTCCTGCTTGCTGATCCA

表2 各组小鼠屈光度的变化 ( $\bar{x}\pm s, D$ )

组别	n	实验开始	实验结束
阴性对照组	10	5.4417 $\pm$ 0.2005	5.4917 $\pm$ 0.3588
近视模型组	10	5.5333 $\pm$ 0.2892	2.5833 $\pm$ 0.3600 <sup>b</sup>
中药干预组	10	5.5500 $\pm$ 0.2297	3.3500 $\pm$ 0.3162 <sup>b,d</sup>
F		0.578	190.189
P		0.568	<0.01

注:<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 阴性对照组;<sup>d</sup> $P<0.01$  vs 近视模型组。

表3 各组小鼠眼轴长度的变化 ( $\bar{x}\pm s, mm$ )

组别	n	实验开始	实验结束
阴性对照组	10	2.3082 $\pm$ 0.0540	2.3132 $\pm$ 0.1200
近视模型组	10	2.3124 $\pm$ 0.0872	2.6328 $\pm$ 0.0864 <sup>b</sup>
中药干预组	10	2.3040 $\pm$ 0.0689	2.5662 $\pm$ 0.0377 <sup>b</sup>
F		0.035	36.654
P		0.966	<0.01

注:<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 阴性对照组。

视方向漂移,形成相对近视,与李欣蒙等<sup>[23]</sup> FDM造模结果一致,表明近视造模成功。实验结束时与阴性对照组比较,近视模型组及中药干预组眼轴长度显著增加,与本课题组前期实验通过使用半透明眼罩遮盖小鼠右眼,诱导小鼠眼轴增加、视网膜厚度改变结果相一致<sup>[24]</sup>,结合屈光度向近视方向漂移,表明轴性近视造模成功。

本课题组前期研究发现,近视发展过程中,通过调节

自噬,可延缓近视进一步发展<sup>[13]</sup>,然而其具体机制尚不明确。研究发现压力刺激下,可通过启动自噬以维持细胞稳态、适应不利环境<sup>[25]</sup>。近视视网膜疾病中,自噬具有促进视网膜细胞的存活与死亡的双重作用;正常水平的自噬可诱导视网膜细胞在有害压力环境下防御能力增加,自噬过多可能会诱导视网膜受损<sup>[26]</sup>。小胶质细胞作为免疫细胞,正常机制下可调节内环境稳态。Lennikov等<sup>[27]</sup>发现小胶质细胞受到炎症因子、肿瘤坏死因子等刺激时可促进其活化、迁移,并导致视网膜病变。另外研究指出视网膜缺氧时,活化的小胶质细胞促进视网膜新生血管生成与血管病变<sup>[28]</sup>,加速视网膜神经节细胞凋亡<sup>[29]</sup>。Dang等<sup>[30]</sup>发现增强自噬,可有效抑制小胶质细胞活化引起的炎症反应与氧化反应。

本实验干预药物使用源于驻景丸加减方制成的我院院内制剂补精益视片,前期研究发现该方可恢复感光细胞自噬,抑制感光细胞凋亡,促进视网膜的修复等作用<sup>[31]</sup>。方中含有枸杞子、菟丝子、楮实子、五味子、茺蔚子、三七等,全方配伍起到“肝肾同补、活血明目”的作用。现代药理学研究发现菟丝子<sup>[32]</sup>、枸杞子<sup>[33]</sup>、五味子<sup>[34]</sup>、楮实子<sup>[35]</sup>具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等作用;三七<sup>[36]</sup>可以减少细胞凋亡和增强自噬,具有抗凋亡作用、改善缺血灌注的作用。综上所述,驻景丸加减方具有调节视网膜自噬、抗炎抗氧化、改善微循环的功能。

本实验研究结果示,实验结束时与阴性对照组比较,近视模型组Iba1表达显著增加并向神经节细胞层迁移( $P<0.05$ ),表明近视形成过程中,近视模型组小胶质细胞



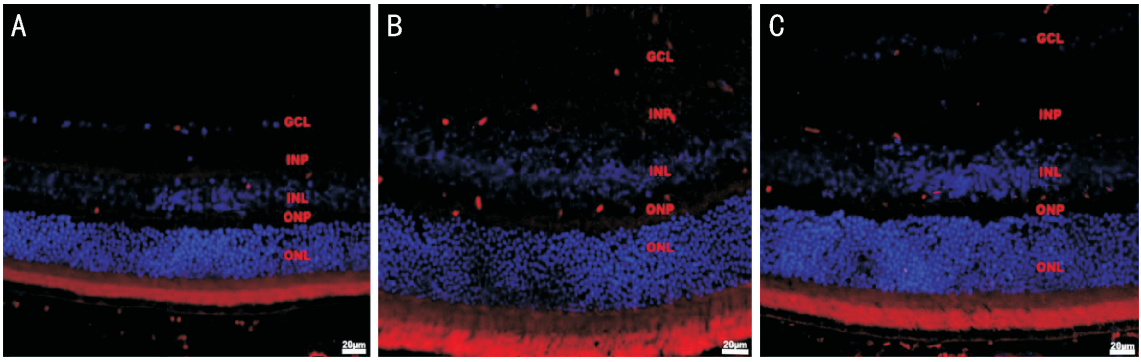


图2 各组小鼠视网膜免疫荧光定位 Iba1 结果 A:阴性对照组;B:近视模型组;C:中药干预组。Iba1 为红色点状染色。GCL:神经节细胞层;INP:内丛状层;INL:内核层;ONP:外丛状层;ONL:外层。

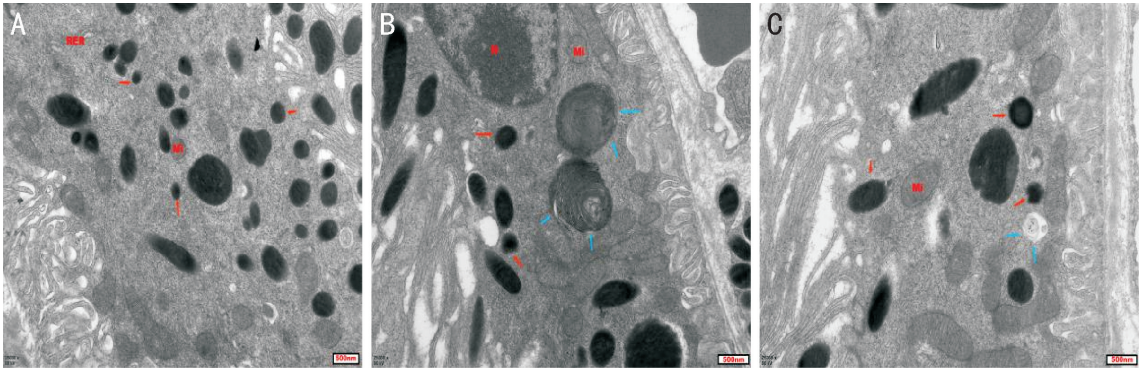


图3 透射电镜观察各组小鼠视网膜色素上皮细胞超微结构 A:阴性对照组;B:近视模型组;C:中药干预组。细胞核(N)、线粒体(Mi)、粗面内质网(RER)、色素颗粒(↑)、自噬的色素细胞(↑)。

表4 实验结束时各组小鼠视网膜组织中 LC3 II、p62 蛋白表达

组别	n	LC3 II	p62
阴性对照组	3	0.4987±0.4586	0.6943±0.5596
近视模型组	3	1.1821±0.4663	1.3586±0.5346
中药干预组	3	1.5082±0.4156	1.5119±0.2262
F		3.978	2.615
P		0.079	0.153

表5 实验结束时各组小鼠视网膜组织中 LC3 II、p62 mRNA 的表达

组别	n	LC3 II mRNA	p62 mRNA
阴性对照组	3	0.967±0.139	1.147±0.201
近视模型组	3	1.317±0.230 <sup>a</sup>	2.830±1.058
中药干预组	3	1.753±0.076 <sup>b,c</sup>	3.083±0.981
F		17.901	4.701
P		0.003	0.059

注:<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 阴性对照组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 近视模型组。

活化并发生迁移。近视的发生发展与炎症、ROS 积累过多相关<sup>[2]</sup>,而炎症因子与 ROS 积累过多将导致小胶质细胞活化<sup>[37]</sup>,研究发现活化的小胶质细胞将再次释放炎症细胞因子及 ROS,进一步加重光感受器细胞受损<sup>[38]</sup>。光感受器细胞受损,具有增加小鼠视网膜病变的风险<sup>[39]</sup>。研究发现视网膜色素上皮细胞具有吞噬脱落光感受器细胞外节盘膜、防止受损光感受器细胞的作用,在维持光感受器正常功能方面具有重要意义<sup>[40]</sup>,故本实验通过透射电镜观察小鼠视网膜色素上皮层细胞自噬情况。q-PCR 结

果示,与阴性对照组比较,近视模型组 LC3 II mRNA 显著增加(P<0.05),p62 mRNA、LC3 II 与 p62 蛋白表达有增加趋势,结合透射电镜结果,表明近视模型组自噬激活。研究表明增强自噬可抑制炎症反应与氧化反应<sup>[41]</sup>,故推测近视模型组自噬的发生可能与抑制近视发展过程中出现的炎症反应、氧化反应相关。

实验结束时,与近视模型组比较,中药干预组 LC3 II mRNA 相对表达水平显著增加(P<0.05),p62 mRNA、LC3 II 与 p62 蛋白表达有增加趋势,结合透射电镜结果,表明中药干预组视网膜自噬增强;此外中药干预组屈光度向近视漂移相对减少(P<0.05),Iba1 表达显著降低(P<0.05),提示驻景丸加减方对抑制相对近视发展、小胶质细胞活化均有一定的干预作用。小胶质细胞活化可造成视网膜新生血管生成与血管病变<sup>[27]</sup>,研究发现三七<sup>[42]</sup>、枸杞<sup>[43]</sup>、五味子<sup>[44]</sup>可通过促进自噬并抑制细胞凋亡改善机体缺血,故推测中药干预组干预近视发展的同时,通过抗炎抗氧化、改善微循环等抑制小胶质细胞活化,并起到增强视网膜自噬的作用。

综上所述,本研究发现驻景丸加减方可通过抑制小胶质细胞活化,增强视网膜自噬以达到干预近视进一步发展和保护视网膜的目的,为驻景丸加减方在近视干预中提供理论依据。

参考文献

1 Li ZG, Li HR, Xu X, et al. Haploinsufficiency of GCP4 induces autophagy and leads to photoreceptor degeneration due to defective spindle assembly in retina. *Cell Death Differ* 2020;27(2):556-572  
 2 Wei CC, Kung YJ, Chen CS, et al. Allergic conjunctivitis-induced retinal inflammation promotes myopia progression. *EBio Medicine* 2018; 28:274-286  
 3 Fan N, Silverman SM, Liu Y, et al. Rapid repeatable in vivo detection

- of retinal reactive oxygen species. *Exp Eye Res* 2017;161:71-81
- 4 You L, Chen JB, Liu WY, et al. Enterovirus 71 induces neural cell apoptosis and autophagy through promoting ACOX1 downregulation and ROS generation. *Virulence* 2020;11(1):537-553
- 5 Liu T, Wang LQ, Liang PP, et al. USP19 suppresses inflammation and promotes M2-like macrophage polarization by manipulating NLRP3 function via autophagy. *Cell Mol Immunol* 2021;18(10):2431-2442
- 6 de duve C. The lysosome. *Sci Am* 1963;208:64-72
- 7 武静, 王慧, 杨毅, 等. P2X4受体介导小胶质细胞促进肠易激综合征内脏痛脊髓中枢敏化及大建中汤干预作用. *中成药* 2021;43(9):2318-2323
- 8 Sun W, Shen Y, Xiao H, et al. Resveratrol attenuates rotenone-induced inflammation and oxidative stress via STAT1 and Nrf2/Keap1/SLC7A11 pathway in a microglia cell line. *Pathol Res Pract* 2021;225:153576
- 9 Xiao L, Wei F, Zhou YH, et al. Dihydrolipoic acid-gold nanoclusters regulate microglial polarization and have the potential to alter neurogenesis. *Nano Lett* 2020;20(1):478-495
- 10 Yao LP, Zhu ZY, Wu JY, et al. microRNA-124 regulates the expression of p62/p38 and promotes autophagy in the inflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. *FASEB J* 2019;33(7):8648-8665
- 11 陈达夫. 中医眼科六经法要. 成都:四川人民出版社 1978:69
- 12 柯玲玲. 基于 p62-keap1/Nrf2 通路研究驻景丸加减方对干性 AMD 模型小鼠视网膜保护作用机制. 南京中医药大学 2020
- 13 何沐霖. 基于单细胞 RNA 测序技术探讨补精益视片对近视小鼠视网膜色素上皮细胞的影响. 成都中医药大学 2020
- 14 孔涛, 王兰兰, 高岚. 转基因荧光小鼠视神经轴索钝性损伤后逆行性病变观察. *眼科新进展* 2017;37(8):719-722,727
- 15 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
- 16 Huang LM, Kawasaki H, Liu YQ, et al. The prevalence of myopia and the factors associated with it among university students in Nanjing: a cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(10):e14777
- 17 Ucak T, Icel E, Yilmaz H, et al. Alterations in optical coherence tomography angiography findings in patients with high myopia. *Eye (Lond)* 2020;34(6):1129-1135
- 18 Milani P, Montesano G, Rossetti L, et al. Vessel density, retinal thickness, and choriocapillaris vascular flow in myopic eyes on OCT angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2018; 256(8):1419-1427
- 19 Mo Y, He ML, Yu JZ, et al. Bioinformatics analysis of the gene expression profile of retinal pigmented epithelial cells based in single-cell RNA sequencing in myopic mice. *Arch Med Sci* 2021;17(2):574-577
- 20 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
- 21 Huang FR, Wang QS, Yan TT, 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
- 22 李巧莲. 不同透镜诱导后小鼠屈光发展及视网膜 VIPR<sub>2</sub> 表达的观察. 中南大学 2013
- 23 李欣蒙, 高洪莲, 刘奇奇, 等. 雷帕霉素对豚鼠形觉剥夺性近视的干预作用及相关机制研究. *眼科新进展* 2021;41(3):212-217
- 24 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
- 25 Jiang SS, Wang R, Han L, et al. Activation of autophagy reverses gemcitabine-induced immune inhibition of RAW264.7 macrophages by promoting TNF- $\alpha$ , IL-6 and MHC-II expression. *Immunol Res* 2021;69(4):352-362
- 26 Song JY, Fan B, Che L, et al. Suppressing endoplasmic Reticulum stress-related autophagy attenuates retinal light injury. *Aging* 2020;12(16):16579-16596
- 27 Lennikov A, Saddala MS, Mukwaya A, et al. Autoimmune-mediated retinopathy in CXCR5-deficient mice as the result of age-related macular degeneration associated proteins accumulation. *Front Immunol* 2019;10:1903
- 28 Yin J, Xu WQ, Ye MX, et al. Up-regulated basigin-2 in microglia induced by hypoxia promotes retinal angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2017;21(12):3467-3480
- 29 Liu YJ, Chen X, Zhang JQ, et al. Semaphorin3A increases M1-like microglia and retinal ganglion cell apoptosis after optic nerve injury. *Cell Biosci* 2021;11(1):97
- 30 Dang RL, Yang MQ, Cui CM, et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/mas receptor axis triggers autophagy and suppresses microglia proinflammatory polarization via forkhead box class O1 signaling. *Aging Cell* 2021;20(10):e13480
- 31 罗维, 祁玉麟, 李杰, 等. 补精益视片调控 MNU 大鼠感光细胞钙蛋白酶活性对凋亡和自噬之间的影响研究. *时珍国医国药* 2018;29(9):2069-2072
- 32 Liu ZJ, Wang YL, Li QL, et al. Improved antimelanogenesis and antioxidant effects of polysaccharide from *Cuscuta chinensis* Lam seeds after enzymatic hydrolysis. *Revista Brasileira De Pesquisas Med E Biol* 2018;51(7):e7256
- 33 Zhao R, Master BQ, Master BM, et al. Improving activity of *Lycium barbarum*. polysaccharide on depressive mice induced by reserpine. *Iran J Pharm Res* 2019;18(3):1556-1565
- 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 祁永华, 吴迪, 张晏航, 等. 楮实子多糖提取工艺及抗皮肤光老化能力研究. *化学工程师* 2021;35(7):82-85
- 36 Tian RM, Wang PC, Huang LH, et al. Sanqi oral solution ameliorates renal ischemia/reperfusion injury via reducing apoptosis and enhancing autophagy: involvement of ERK/mTOR pathways. *Front Pharmacol* 2020;11:537147
- 37 Yao ZA, Xu L, Jin LM, et al. K-carrageenan oligosaccharides inhibit the inflammation of lipopolysaccharide-activated microglia via TLR4/NF- $\kappa$ B and p38/JNK MAPKs pathways. *Neurochem Res* 2022;47(2):295-304
- 38 张萌. 小胶质细胞失稳态在光损伤视网膜变性中的作用研究. 复旦大学 2013
- 39 Landis EG, Park HN, Chrenek M, et al. Ambient light regulates retinal dopamine signaling and myopia susceptibility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2021;62(1):28
- 40 Hanke-Gogokhia C, Lehmann GL, Benedicto I, et al. Apical CLC-2 in retinal pigment epithelium is crucial for survival of the outer retina. *FASEB J* 2021;35(7):e21689
- 41 Pan JA, Zhang H, Lin H, et al. Irisin ameliorates doxorubicin-induced cardiac perivascular fibrosis through inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition by regulating ROS accumulation and autophagy disorder in endothelial cells. *Redox Biol* 2021;46:102120
- 42 Liu XW, Lu MK, Zhong HT, et al. *Panax notoginseng* saponins protect H9c2 cells from hypoxia-reoxygenation injury through the forkhead box O3a hypoxia-inducible factor-1 alpha cell signaling pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2021;78(5):e681-e689
- 43 严文英, 姚靖. 枸杞多糖对 HK-2 细胞缺糖缺氧损伤后线粒体功能及自噬的影响. *中国临床药理学杂志* 2020;36(24):4010-4012,4017
- 44 臧瑞, 杨继苹, 郭涛, 等. 五味子醇甲诱导缺血半影区神经元自噬提高脑卒中后神经保护. *中国生物化学与分子生物学报* 2020;36(5):544-551