

六味地黄汤对老化模型大鼠视网膜组织铁死亡通路的影响

张琦¹, 赵磊², 左韬²

引用:张琦,赵磊,左韬. 六味地黄汤对老化模型大鼠视网膜组织铁死亡通路的影响. 国际眼科杂志, 2024,24(3):338-344.

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 82104714);国家中医药管理局“中医药循证能力建设项目”(No. 2019XZZX-YK008)

作者单位:¹(110847)中国辽宁省沈阳市,辽宁中医药大学;
²(110034)中国辽宁省沈阳市,辽宁中医药大学附属第二医院眼科

作者简介:张琦,在读博士研究生,主治医师,研究方向:中西医结合治疗眼科疾病。

通讯作者:左韬,博士,主任医师,研究方向:中西医结合治疗眼科疾病. ykzt208@163.com;赵磊,博士,主治医师,研究方向:中西医结合治疗眼科疾病. 781208930@qq.com

收稿日期:2023-09-20 修回日期:2024-01-24

摘要

目的:观察六味地黄汤对老化模型大鼠视网膜组织中 ferritin、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)表达水平的影响。

方法:将45只SD大鼠随机分成空白组、模型组、中药组,各15只。空白组腹腔注射生理盐水,模型组、中药组腹腔注射D-半乳糖[500 mg/(kg·d)],同时,中药组灌服六味地黄汤[6.75 g/(kg·d)],空白组、模型组灌服等体积生理盐水,连续8 wk。检测各组大鼠视网膜组织中 ferritin、SLC7A11、GSH、GPX4的表达水平。

结果:模型组较空白组大鼠视网膜组织中 ferritin 表达增高($P<0.05$),GSH、SLC7A11、GPX4表达降低($P<0.05$)。中药组较模型组大鼠视网膜组织中 GSH、SLC7A11、GPX4表达增高($P<0.05$)。

结论:六味地黄汤可能通过调控铁死亡途径发挥延缓视网膜老化的作用。

关键词:六味地黄汤;衰老;视网膜;铁蛋白;铁死亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.3.02

Effect of Liuwei Dihuang Tang on ferroptosis pathway in retinal tissue of aging model rats

Zhang Qi¹, Zhao Lei², Zuo Tao²

Foundation items: Youth Science Fund Project of National Natural Science Foundation of China (No. 82104714); The National Administration of Traditional Chinese Medicine's "Evidence based Capacity Building Project for Traditional Chinese Medicine" (No. 2019XZZX-YK008)

¹Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, Liaoning Province, China

Correspondence to: Zuo Tao. Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, Liaoning Province, China. ykzt208@163.com; Zhao Lei. Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, Liaoning Province, China. 781208930@qq.com

Received:2023-09-20 Accepted:2024-01-24

Abstract

• AIM: To observe the effects of Liuwei Dihuang Tang on the expression levels of ferritin, recombinant solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), glutathione (GSH), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in retinal of aging model rats.

• METHODS: A total of 45 SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, and a traditional Chinese medicine (TCM) group, with 15 rats in each group. The blank group was intraperitoneally injected with physiological saline, while the model group and TCM group were intraperitoneally injected with D-galactose [500 mg/(kg·d)]. At the same time, the TCM group was orally administered with Liuwei Dihuang Tang [6.75 g/(kg·d)], while the blank group and model group were orally administered with equal volume of physiological saline for 8 consecutive wk. The expression levels of ferritin, SLC7A11, GSH, and GPX4 in the retinal tissues of rats in each group were detected.

• RESULTS: The expression of ferritin in the retinal tissue of the model group was increased compared to the blank group ($P<0.05$), while the expression of GSH, SLC7A11, and GPX4 was reduced ($P<0.05$). The expression of GSH, SLC7A11, and GPX4 in the retina tissue of rats in the TCM group was higher than that in the model group ($P<0.05$).

• CONCLUSIONS: Liuwei Dihuang Tang may exert a delaying effect on retinal aging by regulating the ferroptosis pathway.

• KEYWORDS: Liuwei Dihuang Tang; aging; retina; ferritin; ferroptosis

Citation: Zhang Q, Zhao L, Zuo T. Effect of Liuwei Dihuang Tang on ferroptosis pathway in retinal tissue of aging model rats. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2024,24(3):338-344.

0 引言

随着年龄的增长,机体会出现不可逆的衰老性改变,眼球是较早发生与年龄相关的退行性改变的器官之一,如视网膜衰老是年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)的重要病因之一^[1],如能减缓视网膜的衰老,就可以从源头上减少 ARMD 等年龄相关性眼病的发病率或减慢其病程进展^[2]。铁死亡(ferroptosis)是一种程序性细胞死亡,以脂质过氧化、铁积累为特征^[3],在衰老及其相关病理过程中发挥着重要调控作用,这也是衰老研究领域出现的崭新突破口,极大地推动了对于衰老及其相关疾病调控机制的深入研究。铁死亡相关调控分子同样对于衰老进程存在一定的调控作用。因此,本研究基于铁死亡途径研究六味地黄汤对老化模型大鼠视网膜的保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 7-8 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 45 只,体质量 200 ± 20 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司[许可证编号:SCXK(辽)2020-0001]。饲养于 SPF 级实验室,屏障通风循环良好,室温 $20-25$ °C,湿度 45%-55%,光照 12 h/d。实验遵循相关规定,并通过动物实验伦理审查[批件号:2023CS(DW)-003-01],大鼠饲养期间均受人道对待。

1.1.2 主要试剂及仪器

1.1.2.1 主要试剂 D-半乳糖(国药集团化学试剂有限公司,63004434),复方托吡卡胺滴眼液(沈阳兴齐眼药股份有限公司, H20055546),谷胱甘肽(glutathione, GSH) ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, YJ531010)、铁蛋白(ferritin, FE) ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, YJ003262),兔抗鼠溶质载体家族 7 成员 11(recombinant solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)抗体(上海优宁维生物科技股份有限公司, 12691),兔抗鼠谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase4, GPX4)抗体(美国 proteintech 公司, 67763-1-Ig)、兔抗鼠色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)抗体(武汉云克隆科技股份有限公司, PAB972Ra01), β -actin 抗体(美国 SAB 公司, 21338)。

1.1.2.2 主要仪器 体表检测仪(东莞市微视康电子科技有限公司),石蜡包埋机(浙江益迪仪器有限公司, YD-6L),石蜡切片机(Leica, RM2245),石蜡冷冻台(浙江益迪仪器有限公司, YD-6D),摊片机(浙江益迪仪器有限公司, YD-A),烤片机(浙江益迪仪器有限公司, YD-B),普通光学显微镜(Nikon, Eclipse Ci-L),垂直电泳槽(BIO-RAD, JY-ZY5),化学发光成像系统(Tanon, 5200Multi),多功能全波长酶标仪(BioTek, Epoch)。

1.1.3 药品制备 六味地黄汤组成为熟地黄 24 g,山茱萸、山药各 12 g,茯苓、泽泻、牡丹皮各 9 g,均购自辽宁省中医院草药局,将药材用相当于药材 5 倍自来水浸泡 2 h,武火煮沸后文火继续煎煮 30 min,过滤收集煎液,原药渣加少量水继续煎煮,得二煎液;两煎液混合,浓缩至浓度生药含量为 1 g/mL^[4]。成人(60 kg)口服六味地黄汤的剂量为

1.25 g/(kg·d)。通过人与大鼠等效剂量换算公式换算大鼠经口灌服六味地黄汤等效剂量为 6.75 g/(kg·d)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立及分组 将 45 只大鼠适应性饲养 7 d 后,随机分成空白组($n=15$)、模型组($n=15$)、中药组($n=15$)。模型组、中药组复制老化模型,即腹腔注射 D-半乳糖[500 mg/(kg·d)],连续注射 8 wk^[5];空白组腹腔注射生理盐水[500 mg/(kg·d)]。同时,中药组灌服六味地黄汤[6.75 g/(kg·d)],空白组、模型组灌服等体积生理盐水,连续 8 wk。

1.2.2 眼底彩照及图像分析 末次给药后 2 h 对各组大鼠行眼底彩照。具体方法:各组大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉后散瞳(复方托吡卡胺滴眼液点眼,每次 5-10 min,共 3 次),将体表检测仪镜头对准瞳孔,调整距离使电脑屏幕中眼底图片清晰,调整镜头角度,视盘位于屏幕中央,对焦后拍照。在 MATLAB 平台上运行视网膜自动图像分析(automated retinal image analyzer, ARIA)软件测量各组大鼠视网膜血管管径。在 ARIA 软件中打开以视盘为中心的大鼠眼底彩照图片,对距视盘边缘 0.5-1.0 个视盘直径范围内的所有血管进行自动分析,见图 1。手动剔除不合格血管,按照血管直径由大到小的顺序将动脉和静脉分别排序,选取较粗的动脉和静脉各 6 条,分别将管径代入修正后的 Parr-Hubbard 公式^[6]计算视网膜中央动脉管径当量(central retinal artery equivalent, CRAE)、视网膜中央静脉管径当量(central retinal vein equivalent, CRVE)。

1.2.3 HE 染色 采用 HE 染色法检测各组大鼠视网膜病理形态及厚度。大鼠实施安乐死后摘除右眼,FA S 眼球固定液固定 24 h 以上,石蜡包埋,连续切片(厚度为 4 μ m),苏木素-伊红(HE)染色,应用光学显微镜观察视网膜形态,并采用 Image J 软件测量视神经旁 2 mm 处各层视网膜厚度。

1.2.4 免疫组织化学染色 采用免疫组织化学染色法检测各组大鼠视网膜组织中 PEDF、SLC7A11、GPX4 的表达。取石蜡切片,脱蜡,抗原修复液水浴 20 min(100 °C),取出放凉,PBS 缓冲液洗涤 3 次,加 3% H_2O_2 ,山羊血清封闭 10 min,加一抗工作液(稀释比例 1:300)。隔日,4 °C 冰箱中取出后 PBS 缓冲液洗涤 5 次。加二抗工作液(稀释比例 1:500),水浴 90 min(37 °C)。重复冲洗过程,滴加 DAB 显色液,再次冲洗,苏木素复染(30-60 s),1%盐酸乙醇分化,自来水充分冲洗。晾干后中性树脂封片,采集并储存图像。

1.2.5 Western blot 法 采用 Western blot 法检测各组大鼠视网膜组织中 PEDF、SLC7A11、GPX4 的表达。大鼠实施安乐死后摘除右眼,解剖显微镜下将眼球沿角巩膜缘剪开,摘除玻璃体,内皮针固定,慢慢剥离出视网膜后将其剪碎、匀浆,裂解 30 min。 4 °C、 $12\ 000$ r/min 离心 5 min,取上清液,进行蛋白定量,上样行 SDS-PAGE 电泳,转膜,加入 100 g/L 脱脂奶粉后室温封闭 1 h,加入一抗(稀释比例 1:1000), 4 °C 孵育过夜,洗涤,加入二抗(稀释比例 1:1000),室温孵育 1 h,ECL 发光与胶片曝光,扫描胶片,以 β -actin 为内参照物,测定目的条带、 β -actin 的灰度值,计算出两者的比值即该样本所测目的蛋白的相对表达水平。

1.2.6 ELISA 法 ELISA 法检测各组大鼠视网膜组织中铁蛋白、GSH 的表达。取视网膜组织上清液,按照试剂盒说明书检测各组大鼠视网膜组织中铁蛋白、GSH 表达水平,用酶标仪测定 450 nm 处吸光度。制作标准曲线,按照标准曲线的公式,计算其与 BCA 蛋白浓度的比值。

统计学分析:采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据经方差齐性检验和正态性检验,当方差齐时多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两两比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐时采用 Welch 法,两两比较采用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠眼底彩照及图像分析 空白组大鼠眼底呈淡红色,自视盘向周围发出均匀的大血管,分支良好且延伸到视网膜周围;模型组大鼠较空白组视网膜变白,血管增多、收缩;中药组大鼠较空白组眼底颜色略变白,血管略有收缩,见图 2A-C。与空白组相比,模型组、中药组大鼠 CRAE、CRVE 变小 ($P < 0.05$);与模型组相比,中药组大鼠 CRAE、CRVE 变大 ($P < 0.05$),见表 1,图 2D。

2.2 各组大鼠视网膜形态及厚度变化 HE 染色结果显示,空白组大鼠视网膜层次清晰,细胞排列整齐;模型组大鼠较空白组视网膜变薄,外核层 (outer nuclear layer, ONL)、内核层 (inner nuclear layer, INL) 细胞减少;中药组大鼠较空白组视网膜略变薄,ONL、INL 细胞略减少,见图 3A-C。测量视神经旁 2 mm 处视网膜厚度,与空白组相比,模型组、中药组大鼠视网膜厚度、INL 厚度、ONL 厚度均变薄 ($P < 0.05$);与模型组相比,中药组大鼠视网膜厚度、INL 厚度、ONL 厚度均增厚 ($P < 0.05$);三组大鼠 INL 厚度占视网膜厚度百分比、ONL 厚度占视网膜厚度百分比比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2,图 3D。

表 1 各组大鼠 CRAE 和 CRVE 情况 $\bar{x} \pm s$

组别	n	CRAE	CRVE
空白组	6	32.800±0.505	48.618±0.858
模型组	6	30.510±0.626 ^a	45.318±0.805 ^a
中药组	6	31.574±0.829 ^{a,c}	46.258±0.473 ^{a,c}
F		17.729	24.704
P		<0.01	<0.01

注:^a $P < 0.05$ vs 空白组;^c $P < 0.05$ vs 模型组。

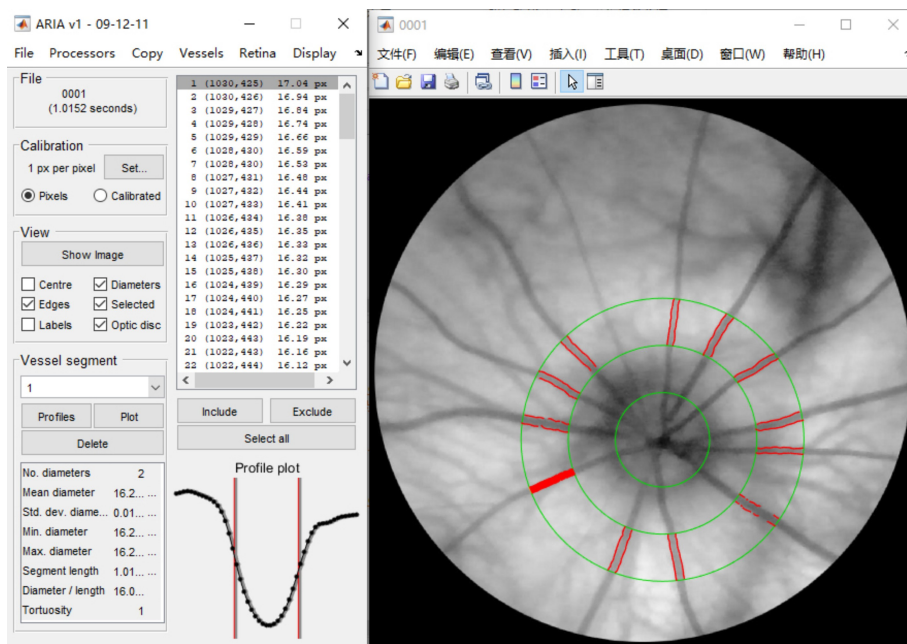


图 1 ARIA 软件操作界面。

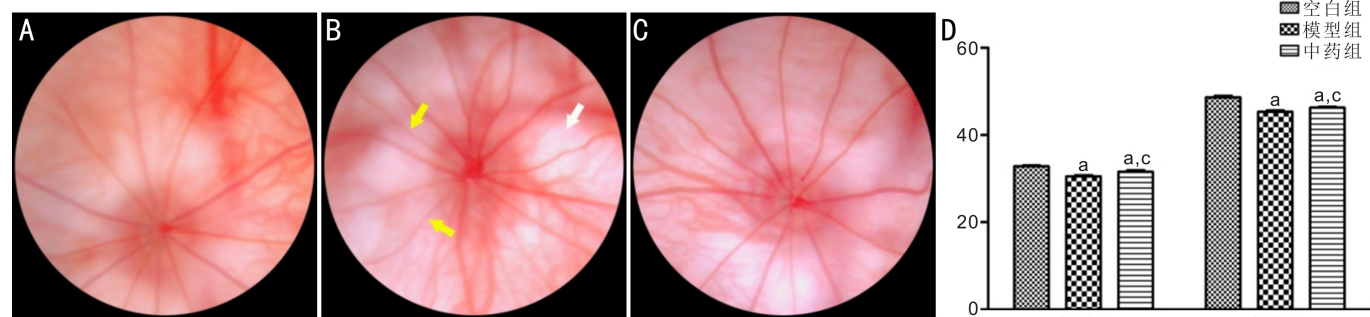


图 2 各组大鼠眼底彩照及图像分析 A:空白组;B:模型组;C:中药组;D:各组大鼠 CRAE 和 CRVE 改变情况。白色箭头:视网膜变白;黄色箭头:视网膜血管收缩。^a $P < 0.05$ vs 空白组;^c $P < 0.05$ vs 模型组。

2.3 各组大鼠视网膜组织中 PEDF 和 SLC7A11 及 GPX4

蛋白表达水平 免疫组织化学染色结果显示,与空白组比较,模型组大鼠视网膜组织中 PEDF、SLC7A11、GPX4 蛋白表达程度降低 ($P<0.05$),中药组大鼠视网膜组织中 PEDF、SLC7A11、GPX4 表达程度降低 ($P>0.05$);与模型组比较,中药组大鼠视网膜组织中 SLC7A11、GPX4 表达程度增高 ($P<0.05$),PEDF 表达程度略有增高 ($P>0.05$),见图 4、5,表 3。PEDF 于 INL 表达相对明显,SLC7A11 于视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 层表达相对明显,GPX4 于 ONL 表达相对明显,证明视网膜在衰老中的不均等性,说明 RPE、ONL 是衰老视网膜发生铁死亡的关键部位。

Western blot 检测结果显示,与空白组比较,模型组、中药组大鼠视网膜组织中 PEDF、SLC7A11、GPX4 蛋白相对表达水平均降低 ($P<0.05$);与模型组比较,中药组大鼠视网膜组织中 PEDF、SLC7A11 蛋白相对表达水平均升高 ($P<0.05$),GPX4 蛋白相对表达水平略有升高 ($P>0.05$),见图 6,表 4。

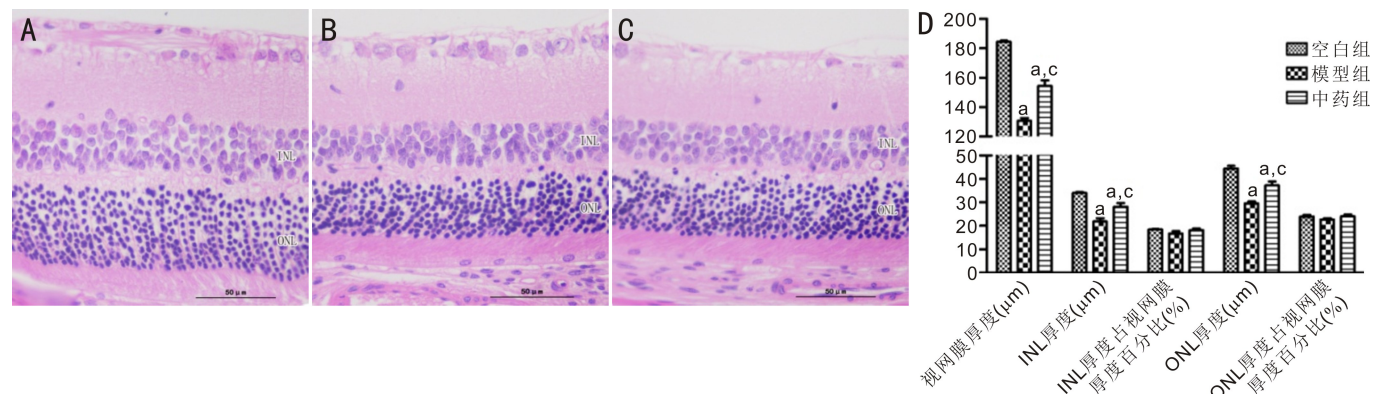


图 3 各组大鼠视网膜 HE 染色情况 A:空白组;B:模型组;C:中药组;D:各组大鼠视网膜厚度改变情况。INL:内核层;ONL:外核层。^a $P<0.05$ vs 空白组;^c $P<0.05$ vs 模型组。

表 2 各组大鼠视网膜厚度改变

组别	<i>n</i>	视网膜厚度 (μm)	INL 厚度 (μm)	INL 占视网膜厚度百分比 (%)	ONL 厚度 (μm)	ONL 占视网膜厚度百分比 (%)
空白组	6	184.572±1.638	33.984±0.884	18.415±0.551	44.331±3.007	24.016±1.569
模型组	6	130.538±4.835 ^a	21.888±3.362 ^a	16.736±2.305	29.566±2.067 ^a	22.656±1.458
中药组	6	154.376±9.061 ^{a,c}	28.162±3.819 ^{a,c}	18.197±1.705	37.258±3.928 ^{a,c}	24.124±1.993
<i>F</i>		122.034	24.704	1.760	34.157	1.408
<i>P</i>		<0.01	<0.01	0.206	<0.01	0.275

注:^a $P<0.05$ vs 空白组;^c $P<0.05$ vs 模型组。

表 3 免疫组织化学染色法检测各组大鼠视网膜组织中相关蛋白表达水平

组别	<i>n</i>	PEDF	SLC7A11	GPX4
空白组	3	0.179±0.024	0.177±0.010	0.171±0.009
模型组	3	0.132±0.005 ^a	0.125±0.002 ^a	0.116±0.011 ^a
中药组	3	0.162±0.015	0.156±0.024 ^c	0.156±0.016 ^c
<i>F</i>		6.207	8.827	14.963
<i>P</i>		0.035	0.016	0.005

注:^a $P<0.05$ vs 空白组;^c $P<0.05$ vs 模型组。

2.4 各组大鼠视网膜组织中 铁蛋白和 GSH 表达水平

ELISA 检测结果显示,与空白组比较,模型组大鼠视网膜组织中 GSH 表达降低 ($P<0.05$),中药组大鼠视网膜组织中 GSH 表达略有降低 ($P>0.05$),模型组、中药组大鼠视网膜组织中 铁蛋白表达均增高 ($P<0.05$);与模型组比较,中药组大鼠视网膜组织中 GSH 表达增高 ($P<0.05$),铁蛋白的表达略有降低 ($P>0.05$),见表 5,图 7。

3 讨论

半乳糖可致全身各系统发生氧化应激和线粒体损伤,模拟自然衰老大鼠所发生的改变,是成熟的用于诱导动物老化模型的药物^[7]。关萍等^[8]研究表明,小鼠连续 49 d 颈背部皮下注射 D-半乳糖 [5.12 mg/(g·d)] 相当于自然生长的 21 月龄小鼠。根据公式 9.125×小鼠日=1 人类年^[9]计算,此法诱导衰老小鼠相当于人类 69 岁。虽然本研究为小鼠,但根据小鼠衰老程度推断,本研究中造模方法可以达到大鼠的高度衰老期。衰老和氧化应激是 ARMD 的重要病因^[10],与碘酸钠注射致 ARMD 模型相比,以 D-半乳糖诱导的亚急性衰老动物模型用于研究 ARMD,

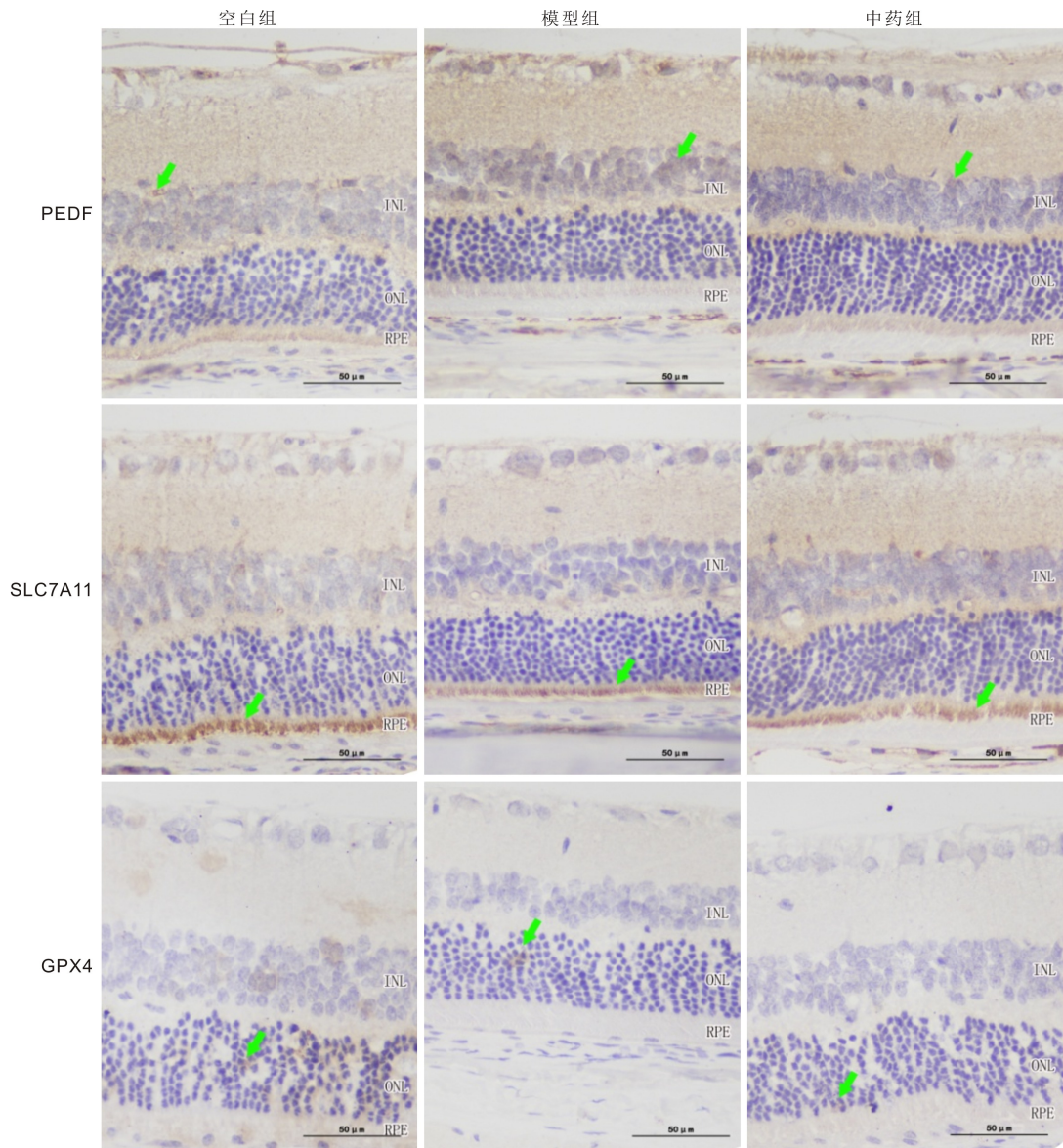


图4 免疫组织化学染色法检测各组大鼠视网膜组织中相关蛋白表达情况 INL:内核层;ONL:外核层;RPE:视网膜色素上皮。绿色箭头示 PEDF/SLC7A11/GPX4 蛋白阳性表达。

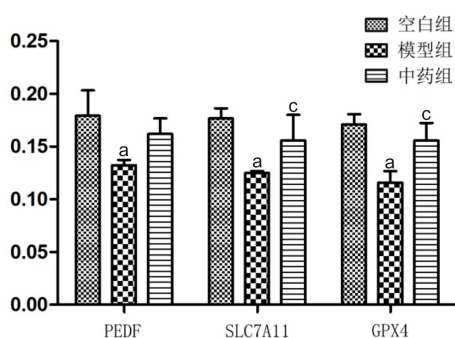


图5 免疫组织化学染色法检测各组大鼠视网膜组织中相关蛋白表达水平 ^a $P < 0.05$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组。

同时还兼具了衰老的因素,更符合 ARMD 的实际病理情况,因此该模型亦可作为 ARMD 模型^[11]。年老体弱,肝肾不足,精血无以上注于目,视衣失养,神光不得发越,本方中熟地、山茱萸、山药可滋补肝肾。黄斑是视力最敏锐的地方^[12],是目中神光发越的源泉^[13]。学者邱礼新、陈达夫、李传课皆认为黄斑属脾^[14-16],然本方山药、茯苓可补脾益气。杨华杰等^[17]通过网络药理学及实验验证了六

味地黄丸具有延缓衰老的作用。研究表明,铁死亡能够调控衰老进程,由此本研究提出假说,即基于调控铁死亡研究六味地黄汤对老化模型大鼠视网膜的保护作用机制。

对于 D-半乳糖诱导的老化模型大鼠视网膜衰老程度的模型评价主要包含:(1)眼底彩照观察眼底。本研究结果显示,模型组大鼠视网膜变白,血管增多、收缩,与方越等^[18]和董伟华等^[19]研究中 ARMD 大鼠模型眼底彩照表现相近。ARIA 软件是一个免费的开源软件,可自动识别血管并分析其平均直径,具有良好的重复性和再现性^[20]。本研究结果显示,模型组大鼠视网膜 CRAE、CRVE 均变小,与王爽等^[21]研究中老年人视网膜血管直径 5 a 变化的队列研究得出的结论一致,说明随着年龄的增长,视网膜动静脉血管均出现逐渐变细的趋势。(2)HE 染色检测视网膜病理形态及厚度。本研究结果显示,模型组大鼠视网膜总厚度及 INL、ONL 厚度均明显变薄,但 INL、ONL 厚度占视网膜总厚度的构成比基本不变,与孙兆霞等^[22]研究结果一致,说明衰老引起大鼠视网膜总厚度及各层厚度不同程度的变薄。(3)免疫组织化学染色法和 Western blot

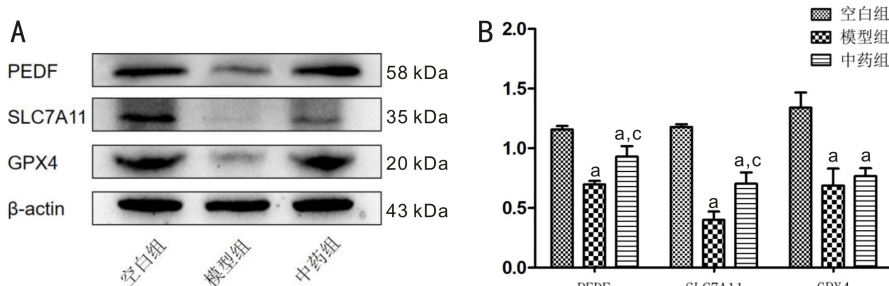


图6 Western blot 法检测各组大鼠视网膜组织中相关蛋白相对表达情况 A:Western blot 检测结果;B:Western blot 检测量化分析结果,^a*P*<0.05 vs 空白组;^c*P*<0.05 vs 模型组。

表4 Western blot 法检测各组大鼠视网膜组织中相关蛋白相对表达水平

组别	<i>n</i>	PEDF	SLC7A11	GPX4	$\bar{x} \pm s$
空白组	6	1.157±0.075	1.180±0.054	1.342±0.308	
模型组	6	0.698±0.073 ^a	0.402±0.169 ^a	0.688±0.349 ^a	
中药组	6	0.932±0.214 ^{a,c}	0.703±0.233 ^{a,c}	0.768±0.164 ^a	
<i>F</i>		16.722	32.308	9.385	
<i>P</i>		<0.01	<0.01	0.002	

注:^a*P*<0.05 vs 空白组;^c*P*<0.05 vs 模型组。

表5 ELISA 法检测各组大鼠视网膜组织中铁蛋白和 GSH 表达水平

组别	<i>n</i>	铁蛋白	GSH	$\bar{x} \pm s$
空白组	6	12.897±0.957	0.506±0.058	
模型组	6	17.677±1.013 ^a	0.351±0.056 ^a	
中药组	6	16.382±3.730 ^a	0.489±0.141 ^c	
<i>F</i>		6.942	4.904	
<i>P</i>		0.007	0.023	

注:^a*P*<0.05 vs 空白组;^c*P*<0.05 vs 模型组。

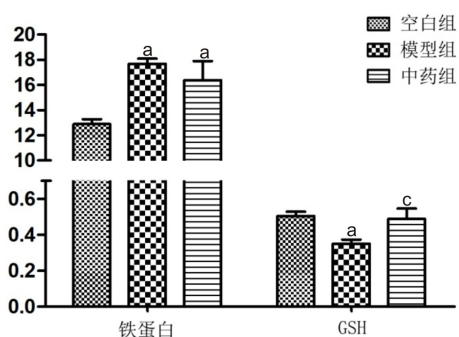


图7 ELISA 法检测各组大鼠视网膜组织中铁蛋白和 GSH 表达水平 ^a*P*<0.05 vs 空白组;^c*P*<0.05 vs 模型组。

法检测视网膜组织中 PEDF 的表达。结果显示,模型组大鼠视网膜组织中 PEDF 表达下调。PEDF 广泛表达于眼、脑等组织中^[23]。眼内 PEDF 主要由 RPE 以旁分泌的方式分泌至感受器间质^[24],在视网膜分化中发挥重要作用。PEDF 被称为“年轻”蛋白质,其原因是老年人较青年人视网膜中 PEDF 表达明显下调^[25],或致视网膜发生与衰老相关的变化。PEDF 降低可能是 RPE 氧化损伤和年龄增加的直接结果^[26]。以上均说明老化模型大鼠视网膜衰老造模成功。经六味地黄汤治疗后,中药组较模型组上述模型评价指标均得到一定的改善,说明六味地黄汤对缓解视网膜衰老起到一定的作用。

本研究结果表明,模型组较空白组大鼠视网膜组织中 铁蛋白表达增高(*P*<0.05),GSH、SLC7A11、GPX4 表达降低(*P*<0.05)。近年提出铁衰老概念,即认为衰老和铁积累之间存在恶性循环^[27]。铁蛋白与体内储存铁含量呈正比。随着年龄的增长铁会逐渐积累^[28],铁稳态的失衡与年龄相关疾病存在关联。与年轻人相比,老年人体内的铁水平增加 2 倍^[29],RPE 内的铁水平增加 3 倍^[30],视网膜内的铁水平增加 1.3 倍^[31]。因铁超负荷而产生氧自由基可以引起视网膜毒性,铁通过 Fenton 反应催化生成不稳定的羟自由基,参与多不饱和脂肪酸的脂质氧化,产生共轭二烯,导致生成脂质过氧化产物,使细胞功能减退,促发铁死亡。SLC7A11 是调控“铁过载-铁死亡”的关键基因,铁离子通过 ROS - Nrf2 - ARE 轴上调 SLC7A11 的表达,SLC7A11 能抑制铁过载引发的铁死亡^[32]。铁死亡的主要下游调控因子 GPX4 是铁死亡的“门控蛋白”,是铁死亡研究领域的明星分子。GPX4 通过将脂质氢过氧化物转变为类脂醇,抑制脂质活性氧的形成,从而减轻脂质过氧化,抑制细胞铁死亡的发生。因此,GPX4 含量降低会使细胞脂质过氧化水平增加,进而发生铁死亡^[33]。GSH 是 GPX4 催化反应的底物,GSH 耗尽引起 GPX4 失活,造成活性氧(ROS)积累,诱导铁死亡。细胞内 GSH 和 GPX4 水平均受 SLC7A11 影响^[34]。本研究结果表明,中药组较模型组大鼠视网膜组织中 GSH、SLC7A11 表达增高(*P*<0.05),说明六味地黄汤可通过影响老化模型大鼠视网膜组织中 GSH、SLC7A11 的表达调控铁死亡途径进而达到保护视网膜老化的目的。

作用于铁死亡的药物有望成为防治视网膜老化的新方案。质膜丧失完整性、细胞质和细胞器肿胀、染色质浓缩是铁死亡的形态学特征,在超微结构水平表现为线粒体萎缩、嵴减少或消失,膜密度增加^[35],因此,未来研究会应用透射电子显微镜观察老化模型大鼠视网膜的超微结构变化情况,进一步从形态学角度证实视网膜老化与铁死亡的相关性。

参考文献

- [1] 李睿婵, 刘华, 李丽华. 氢对氧化应激诱导的视网膜衰老的保护机制. 国际眼科杂志, 2019, 19(2):200-203.
- [2] 朱江, 施叶雯, 康前雁. 辛伐他汀延缓大鼠视网膜衰老的作用和机制. 国际眼科杂志, 2017, 17(12):2212-2217.
- [3] 王巧云, 解来青. 铁死亡机制在视网膜色素上皮细胞损伤相关眼病中的研究进展. 国际眼科杂志, 2023, 23(1):75-78.
- [4] 郭华慧, 李美丹, 黄仁发, 等. 基于 Klotho-FGF23 轴探讨加味六味地黄汤对 CKD-MBD 模型大鼠骨保护作用的机制. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(24):61-70.
- [5] 李红波, 王小琴, 熊飞, 等. 六味地黄丸对 D-半乳糖致衰老大鼠抗氧化功能影响的实验研究. 中国中医药科技, 2019, 26(1):31-33.
- [6] Knudtsen MD, Lee KE, Hubbard LD, et al. Revised formulas for summarizing retinal vessel diameters. *Curr Eye Res*, 2003, 27(3):143-149.
- [7] 杜政德, 宋青玲, 韩曙光, 等. D-半乳糖诱导的小鼠耳蜗带状突触损伤. 中华耳科学杂志, 2019, 17(2):154-158.
- [8] 关萍, 郭搏, 王惠, 等. D-半乳糖促小鼠衰老模型的衰老程度与自然生长鼠龄的比较. 动物医学进展, 2013, 34(1):71-74.
- [9] 陈玥, 苏丹, 贵文娟, 等. 实验动物与人类年龄相关性研究进展. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11):116-122.
- [10] Abokyi S, To CH, Lam TT, et al. Central role of oxidative stress in age-related macular degeneration: evidence from a review of the molecular mechanisms and animal models. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:7901270.
- [11] 陆韞青, 曹程, 郑嘉妮, 等. 菊睛丸改善 D-半乳糖致亚急性衰老小鼠视网膜损伤效应评价与作用机制研究. 南京中医药大学学报, 2023, 39(9):849-859.
- [12] 李铭, 魏伟. 中医对黄斑部疾病的认识. 中国中医眼科杂志, 2018, 28(6):383-388.
- [13] 董志国, 刘新泉, 张殷建, 等. 浅析黄斑变性的五脏辨证治疗. 中国中医眼科杂志, 2019, 29(1):59-62.
- [14] 邱礼新. “内五轮”假说在眼底病治疗中的应用. 中国中医眼科杂志, 2001, 11(1):54-56.
- [15] 陈达夫. 陈达夫中医眼科临床经验. 北京: 中国中医药出版社, 2016:207.
- [16] 李传课. 中医眼科学. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011:621.
- [17] 杨华杰, 谢媛媛, 魏惠珍, 等. 基于网络药理学探讨六味地黄丸延缓衰老的活性成分与作用机制. 中成药, 2022, 44(7):2341-2349.
- [18] 方越, 刘新泉, 苏晶. 滋阴补肾片对干性年龄相关性黄斑变性模型大鼠视网膜保护作用的影响. 中国中医眼科杂志, 2022, 32(9):679-683, 702.
- [19] 董伟华, 魏抗抗, 帖红艳, 等. 褪黑素对年龄相关性黄斑变性模型小鼠视网膜氧化损伤的保护机制研究. 天津医药, 2021, 49(10):1057-1062.
- [20] 李静, 谢茂松, 徐国兴. ARIA 软件测量视网膜血管管径及迂曲度的重复性和再现性. 眼科学报, 2022, 37(5):383-392.
- [21] 王爽, 魏串串, 刘雪, 等. 北京市 40 岁以上中老年人群视网膜血管直径的五年变化. 眼科, 2018, 27(6):438-442.
- [22] 孙兆霞, 封利霞, 张铭, 等. 衰老对大鼠视网膜全层及各层厚度影响的体视学研究. 解剖学报, 2007, 38(2):187-191.
- [23] Filleul S, Nelius T, de Riese W, et al. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J Cell Biochem*, 2009, 106(5):769-775.
- [24] Aymerich MS, Alberdi EM, Martínez A, et al. Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(13):3287-3293.
- [25] 黄琬璐, 杨庆华. 色素上皮源性因子与视网膜疾病关系的研究进展. 眼科新进展, 2014, 34(8):794-797.
- [26] Machalińska A, Safranow K, Mozolewska-Piotrowska K, et al. PEDF and VEGF plasma level alterations in patients with dry form of age-related degeneration—a possible link to the development of the disease. *Klin Oczna*, 2012, 114(2):115-120.
- [27] Sfera A, Bullock K, Price A, et al. Ferroptosis: the iron age of neurodegeneration? *Mech Ageing Dev*, 2018, 174:63-75.
- [28] Ugarte M, Geraki K, Jeffery G. Aging results in iron accumulations in the non-human primate choroid of the eye without an associated increase in zinc, copper or sulphur. *Biomaterials*, 2018, 31(6):1061-1073.
- [29] Sharon D, Blackshaw S, Cepko CL, et al. Profile of the genes expressed in the human peripheral retina, macula, and retinal pigment epithelium determined through serial analysis of gene expression (SAGE). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(1):315-320.
- [30] Chen HY, Liu B, Lukas TJ, et al. Changes in iron-regulatory proteins in the aged rodent neural retina. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(11):1865-1876.
- [31] Chen HY, Lukas TJ, Du N, et al. Dysfunction of the retinal pigment epithelium with age: increased iron decreases phagocytosis and lysosomal activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(4):1895-1902.
- [32] Wang H, An P, Xie EJ, et al. Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis. *Hepatology*, 2017, 66(2):449-465.
- [33] 程峰, 张庸, 王祥, 等. 谷胱甘肽过氧化物酶 GPX4 在铁死亡中的作用与机制研究进展. 现代肿瘤医学, 2021, 29(7):1254-1258.
- [34] 徐寒莹, 张艺缤, 张冬梅, 等. 铁死亡机制与中医药干预脑卒中后神经细胞铁死亡的研究进展. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(20):232-240.
- [35] Tang DL, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res*, 2021, 31(2):107-125.