

丹蒞片通过 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路缓解视网膜缺血-再灌注损伤

蔺彦娜¹, 吴惠琴², 郑博², 陈晓冬², 雷鹏², 陈梦涵¹

引用: 蔺彦娜, 吴惠琴, 郑博, 等. 丹蒞片通过 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路缓解视网膜缺血-再灌注损伤. 国际眼科杂志, 2024, 24(7):1027-1031.

基金项目: 陕西省中医药管理局科技项目基金 (No.2021-ZZ-JC014)

作者单位: ¹(712046) 中国陕西省咸阳市, 陕西中医药大学; ²(710002) 中国陕西省西安市第一医院眼七科

作者简介: 蔺彦娜, 毕业于陕西中医药大学, 硕士, 住院医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 吴惠琴, 毕业于陕西中医药大学, 主任医师, 研究方向: 眼底病. wuhuiqin65@163.com

收稿日期: 2023-12-11 修回日期: 2024-05-29

摘要

目的: 探讨丹蒞片对小鼠视网膜缺血-再灌注损伤 (RIRI) 的保护作用及其机制。

方法: 将 40 只 ApoE^{-/-} 小鼠给予高脂饲料喂养 6 wk, 通过前房灌注加压法建立 RIRI 模型, 分为对照组 (给予生理盐水灌胃 8 wk)、RIRI 模型组 (给予生理盐水灌胃 8 wk) 及丹蒞片低、中、高剂量组 [分别给予丹蒞片溶液 1、2、4 g/(kg·d) 灌胃 8 wk]。采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察各组小鼠视网膜组织形态学变化情况, TUNEL 染色检测各组小鼠视网膜细胞凋亡情况, Western-blot 法检测各组小鼠视网膜组织中 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Keap1)、转录因子核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶-1 (HO-1)、超氧化物歧化酶 (Sod2) 蛋白表达情况。

结果: 与对照组比较, RIRI 模型组小鼠视网膜萎缩, 厚度变薄, 细胞凋亡增加, 视网膜组织中 Sod2 蛋白表达下调, Keap1 蛋白表达上调 (均 $P < 0.01$); 与 RIRI 模型组比较, 丹蒞片中、高剂量组小鼠视网膜厚度增加 (均 $P < 0.01$), 丹蒞片低、中、高剂量组小鼠视网膜细胞凋亡降低 (均 $P < 0.05$), 丹蒞片低剂量组小鼠视网膜组织中 Keap1 和 HO-1 蛋白表达水平无明显差异 ($P > 0.05$), 丹蒞片中、高剂量组小鼠视网膜组织中 Sod2、Nrf2、HO-1 蛋白表达上调, Keap1 蛋白表达下调 (均 $P < 0.05$)。

结论: 丹蒞片能缓解 RIRI 小鼠模型视网膜萎缩变薄, 减少视网膜细胞凋亡, 其作用是通过调控 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路降低 RIRI 氧化应激反应来实现。

关键词: 丹蒞片; ApoE^{-/-} 小鼠; 高脂血症; 视网膜缺血-再灌注损伤; Keap1-Nrf2/HO-1 通路

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.7.04

Danlou tablet alleviates retinal ischemia-reperfusion injury through Keap1-Nrf2/HO-1 pathway

Lin Yanna¹, Wu Huiqin², Zheng Bo², Chen Xiaodong², Lei Peng², Chen Menghan¹

Foundation item: Science and Technology Project Fund of Traditional Chinese Medicine Administration of Shaanxi Province (No.2021-ZZ-JC014)

¹Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi Province, China; ²Seventh Department of Ophthalmology, Xi'an No.1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Wu Huiqin. Seventh Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. wuhuiqin65@163.com

Received:2023-12-11 Accepted:2024-05-29

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect and mechanism of Danlou tablet on retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI) in mice.

• **METHODS:** A total of 40 ApoE^{-/-} mice were fed with high fat diet for 6 wk, and the RIRI model was established by anterior chamber infusion of pressurized saline. The mice were divided into control group (normal saline for 8 wk), RIRI model group (normal saline for 8 wk), and low-, medium-, and high-dose Danlou tablets groups [1, 2, and 4 g/(kg·d), respectively, for 8 wk]. The morphological changes of retina were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, retinal cell apoptosis was detected by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated Nick-End Labeling (TUNEL) staining. The Western-blot assay was used to detect the expression of retinal tissue sample Kelch-like ech-associated protein 1 (Keap1), nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1), and superoxide dismutase (Sod2) proteins.

• **RESULTS:** Compared with the control group, the mouse retina was atrophic with thinning thickness and increasing cell apoptosis, down-regulation of Sod2 protein expression, and up-regulation of Keap1 protein expression in the RIRI model group (all $P < 0.01$). Compared with the RIRI model group, the retinal thickness increased in the medium- and high-dose of Danlou tablets groups (all $P < 0.01$), and the cell apoptosis of retina decreased in the low-, medium- and high-dose of Danlou tablets groups (all $P < 0.05$). There were no

significant differences in the expression of Keap1 and HO-1 proteins of mouse retina tissue in the low-dose of Danlou tablets group ($P>0.05$). The expression of Sod2, Nrf2 and HO-1 proteins up regulated, and the expression of Keap1 protein down regulated in the medium- and high-dose of Danlou tablets groups (all $P<0.05$).

• CONCLUSION: Danlou tablet can alleviate RIRI-induced atrophy and thinning of retina and retinal cell apoptosis by regulating Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway and reducing oxidative stress.

• KEYWORDS: Danlou tablets; ApoE^{-/-} mice; hyperlipidemia; retinal ischemia - reperfusion injury; Keap1-Nrf2/HO-1 pathway

Citation: Lin YN, Wu HQ, Zheng B, et al. Danlou tablet alleviates retinal ischemia-reperfusion injury through Keap1-Nrf2/HO-1 pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024, 24(7): 1027-1031.

0 引言

视网膜缺血-再灌注损伤(retinal ischemia reperfusion injury, RIRI)在眼科疾病中比较常见,是糖尿病视网膜病变、急性青光眼、视网膜动脉阻塞和早产儿视网膜病变等一系列眼科疾病共有的病理机制之一^[1]。目前,RIRI的发病机制尚不清楚,既往研究认为多种因素参与RIRI的发生,特别是氧化应激损伤^[2]。虽然目前已有多种针对氧化应激的治疗方式,但其疗效甚微。因此,探索治疗RIRI的有效疗法具有重要意义。中成药丹蒾片是国医大师雷忠义教授研发的国家级新药,研究显示,丹蒾片具有抗炎^[3]、抗凋亡^[4]、抗氧化^[5]、调节脂质代谢^[6]、抗心肌缺血^[7]、保护血管内皮细胞^[8]及改善血流动力^[9]等药理功效,已入选国家中药药典和2014/2016年中西医结合心脏病康复治疗专家共识,是治疗胸痹(冠心病)痰瘀互结证的公认有效药物。心血管领域研究显示,丹蒾片能对抗心肌缺血-再灌注损伤,抑制氧化及炎症侵袭和细胞凋亡,减少心肌梗死面积和保护内皮细胞,改善心脏功能^[10]。然而,丹蒾片是否对RIRI有保护作用尚需进一步研究。

转基因 ApoE^{-/-}小鼠易诱导形成高脂血症,使动脉粥样硬化斑块更早的出现,更能模拟基础疾病下出现缺血-再灌注损伤,且造模时间相比其他小鼠时间短,过程类似于人类高脂血症,成模率高,模型稳定,死亡率低^[11-13]。因此,本研究利用转基因 ApoE^{-/-}小鼠建立 RIRI 模型,探讨丹蒾片对 RIRI 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 40只 SPF 级 6-8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠购自于北京维通利华实验技术有限公司。体质量 18-22 g,饲养于陕西省感染与免疫重点实验室 SPF 级动物房内,饲养环境温度 22-25 ℃,湿度 50%-60%,自然照明,所有小鼠饮水及饮食自由随意。实验中使用的所有动物处理均符合美国视觉和眼科研究协会(ARVO)关于在眼科研究中动物使用的声明要求,并严格遵守国家和实验室的动物管理规定。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂:丹蒾片粉末(吉林康乃儿药业)、TUNEL 染色试剂盒(碧云天)、苏木素-伊红(HE)试剂(贝索)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1

(kelch-like ech-associated protein1, Keap1)、转录因子核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2 related factor2, Nrf2)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase1, HO-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, Sod2)抗体(英国 Abcam 公司)、β-actin 抗体(康为试剂)。主要仪器:低温高速离心机(英泰仪器公司)、电泳仪、电泳槽、转膜槽(美国 Bio-Rad 公司)、化学发光凝胶成像系统(BIO-RAD, USA)、光学显微镜(Murzider)。

1.2 方法

1.2.1 ApoE^{-/-}小鼠 RIRI 模型制备及分组 40 只 ApoE^{-/-}小鼠给予高脂饲料喂养 6 wk 后建立 RIRI 模型,并随机分为 5 组,分别为对照组、RIRI 模型组、丹蒾片低剂量组、丹蒾片中剂量组、丹蒾片高剂量组,每组各 8 只。RIRI 模型建立方法:给予腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠,右眼结膜囊滴奥布卡因滴眼液进行表面麻醉,辅以 0.5% 复方托吡卡胺滴眼液滴入右眼以散大瞳孔。将 32G 针头通过输液器连接生理盐水,输液瓶与小鼠眼球高度 150 cm,沿角膜缘插入小鼠右前房,此时观察角膜混浊,对光反射消失,视网膜血管中断,维持 60 min 后轻轻拔出针头,用检眼镜确认小鼠视网膜血管血液回流以证明 RIRI 建模成功。建模后 24 h,参照文献给药方法和时间^[6,14-16],根据成人每日口服药物剂量折算小鼠服药剂量,折算系数为 12.33,成人每日需服用丹蒾片 4.5 g,则小鼠用药浓度为 4.5 g ÷ 60 kg × 12.33 = 924.75 mg/kg ≈ 1 g/kg。选择以成人的临床药物剂量作为丹蒾片低剂量组,临床的 2 倍剂量为丹蒾片中剂量,4 倍剂量为丹蒾片高剂量组,即分别给予丹蒾片溶液 1、2、4 g/(kg · d)灌胃,对照组和 RIRI 模型组给予生理盐水灌胃,连续灌胃 8 wk,每日 1 次。

1.2.2 样本采集 灌胃 8 wk 后,水合氯醛麻醉处死小鼠后摘除眼球,去除眼球前节和玻璃体,小心分离视网膜后装入 1.5 mL 的 EP 管中,-80 ℃ 冰箱保存进行蛋白免疫印迹(Western-blot)检测;另每组选取 3 只小鼠眼球放入眼球固定液中,制作厚度为 3 μm 石蜡切片进行 HE 染色和 TUNEL 染色。

1.2.3 HE 染色观察视网膜组织结构 小鼠眼球放入眼球固定液中 24 h,进行脱水、透明、浸蜡及包埋,取厚度为 3 μm 的连续切片 6 张进行 HE 染色,于显微镜(40×)下采集图像并进行分析,采用 Image J 软件测量视网膜厚度(内界膜至视细胞层),每张切片选取 3 个位置测量后取平均值。

1.2.4 TUNEL 染色观察视网膜细胞凋亡情况 取石蜡切片参照 TUNEL 凋亡试剂盒说明书操作步骤进行染色,37 ℃ 恒温滴加蛋白酶 K 作用 30 min,室温孵育内源性过氧化物酶 20 min,生物素标记液 37 ℃ 恒温箱避光作用 60 min,滴加终止液 10 min,Streptavidin-HRP 工作液 30 min,DAB 显色,封片。随机选取 3 个视野计算神经节细胞、内核细胞及外核细胞总的阳性细胞数,细胞凋亡指数=(计数范围内总的阳性细胞数/细胞总数)×100%。

1.2.5 Western-blot 检测 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路蛋白表达 取视网膜组织,提取蛋白,SDS-PAGE 凝胶制备、上样、电泳、转膜、封闭、孵育一抗(工作浓度:Keap1 抗体 1:1 000;Nrf2 抗体 1:1 000;Sod2 抗体 1:1 000;HO-1 抗体 1:1 000;β-actin 抗体 1:5 000)、孵育二抗(工作浓度:1:1 000)、显影,采用 Image J 软件分析条带灰度值,以 β-actin 为内参计算目的蛋白相对表达量。

统计学分析:采用 GraphPad Prism 9.14 分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,多组间比较用单因素方差分析,组间的两两比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹莪片对 RIRI 小鼠视网膜组织结构的影响 HE 染色结果显示,与对照组比较,RIRI 模型组小鼠视网膜结构紊乱,细胞排序杂乱,神经节细胞坏死脱落,视网膜萎缩变薄。对照组、RIRI 模型组、丹莪片低剂量组、丹莪片中剂量组、丹莪片高剂量组小鼠视网膜厚度分别为 163.11 ± 8.41 、 112.47 ± 10.33 、 122.97 ± 12.92 、 131.48 ± 12.34 、 $151.17 \pm 11.93 \mu\text{m}$,差异有统计学意义($F = 30.07, P < 0.01$),其中与对照组比较,RIRI 模型组小鼠视网膜厚度明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 RIRI 模型组比较,丹莪片低剂量组小鼠视网膜厚度虽有所改善但差异无统计学意义($P > 0.05$),丹莪片中、高剂量组小鼠视网膜厚度明显改善且差异均有统计学意义($P < 0.01$);丹莪片低、中、高剂量组组间比较,丹莪片高剂量组小鼠视网膜厚度较丹莪片低、中剂量组增厚,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。

2.2 丹莪片对 RIRI 小鼠视网膜细胞凋亡的影响 TUNEL 染色结果显示,对照组、RIRI 模型组、丹莪片低剂量组、丹莪片中剂量组、丹莪片高剂量组小鼠视网膜细胞凋亡指数分别为 $(10.89 \pm 6.70)\%$ 、 $(68.22 \pm 4.32)\%$ 、 $(58.33 \pm 6.65)\%$ 、 $(42.11 \pm 6.52)\%$ 、 $(29.44 \pm 7.21)\%$,差异有统计学意义($F = 115.6, P < 0.01$),其中与对照组比较,RIRI 模型

组小鼠视网膜细胞凋亡指数升高,差异有统计学意义($P < 0.001$);与 RIRI 模型组比较,丹莪片低、中、高剂量组小鼠视网膜细胞凋亡指数降低且差异均有统计学意义($P < 0.05$);丹莪片低、中、高剂量组组间比较,丹莪片中、高剂量组小鼠视网膜细胞凋亡指数均较丹莪片低剂量组降低,丹莪片高剂量组小鼠视网膜细胞凋亡指数较丹莪片中剂量组明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

2.3 丹莪片对 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路蛋白表达的影响 Western-blot 检测结果显示,与对照组比较,RIRI 模型组小鼠视网膜组织中 Keap1 蛋白表达上调,Sod2 蛋白表达下调,差异均有统计学意义($P < 0.01$),但 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$);与 RIRI 模型组相比,丹莪片低剂量组小鼠视网膜组织中 Keap1、HO-1 蛋白表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$),Sod2 和 Nrf2 表达上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$),丹莪片中、高剂量组小鼠视网膜组织中 Keap1 蛋白表达均下调,Sod2、Nrf2、HO-1 蛋白表达均上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$);丹莪片低、中、高剂量组组间比较,丹莪片高剂量组小鼠视网膜组织中 Keap1 蛋白表达较丹莪片低、中剂量组下调,丹莪片高剂量组小鼠视网膜组织中 Sod2、Nrf2 蛋白表达较丹莪片低剂量组上调,丹莪片中剂量组小鼠视网膜组织中 HO-1 蛋白表达较丹莪片低剂量组上调,丹莪片高剂量组小鼠视网膜组织中 HO-1 蛋白表达较丹莪片低、中剂量组上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 3,表 1。

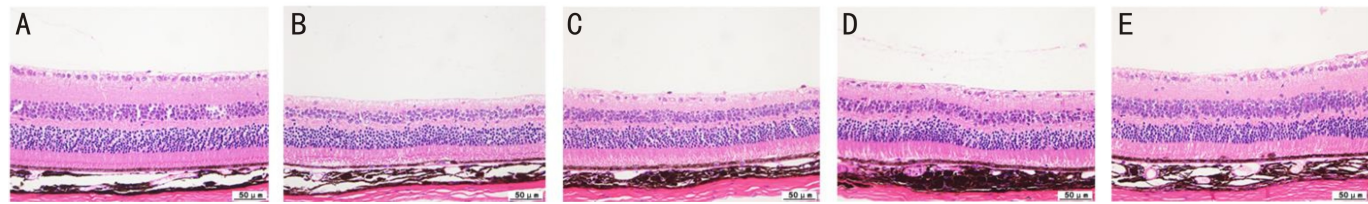


图 1 丹莪片对 RIRI 小鼠视网膜组织结构的影响 A:对照组;B:RIRI 模型组;C:丹莪片低剂量组;D:丹莪片中剂量组;E:丹莪片高剂量组。

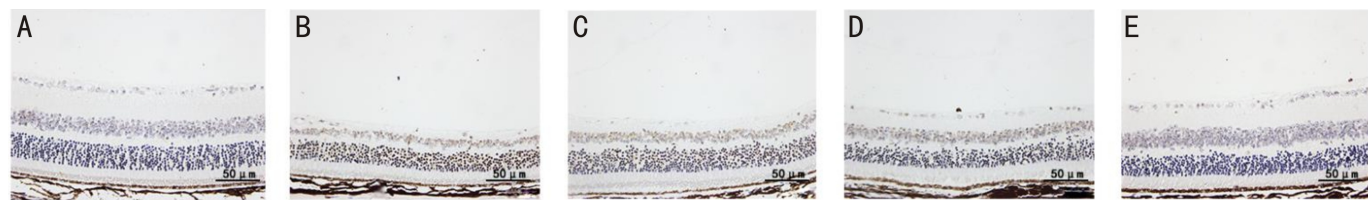


图 2 丹莪片对 RIRI 小鼠视网膜细胞凋亡的影响 A:对照组;B:RIRI 模型组;C:丹莪片低剂量组;D:丹莪片中剂量组;E:丹莪片高剂量组。

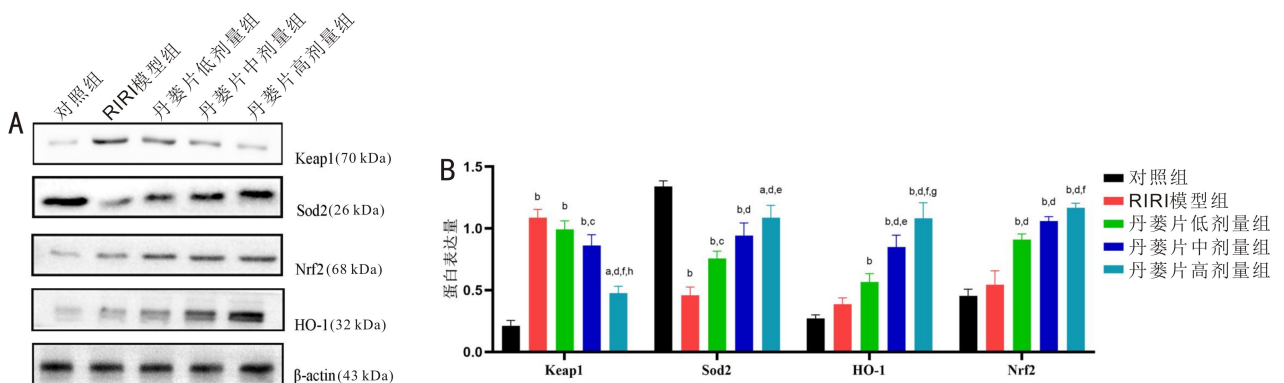


图 3 丹莪片对 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路蛋白表达的影响 A:Western-blot 检测结果;B:量化分析结果。^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs 对照组;^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ vs RIRI 模型组;^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$ vs 丹莪片低剂量组;^g $P < 0.05$,^h $P < 0.01$ vs 丹莪片中剂量组。

表1 Western-blot 检测各组小鼠视网膜组织中相关蛋白表达水平

组别	Keap1	Sod2	HO-1	Nrf2
对照组	0.21±0.045	1.34±0.045	0.27±0.030	0.45±0.055
RIRI 模型组	1.09±0.068 ^b	0.46±0.066 ^b	0.39±0.051	0.54±0.114
丹蒺片低剂量组	0.99±0.068 ^b	0.76±0.060 ^{b,c}	0.57±0.068 ^b	0.91±0.045 ^{b,d}
丹蒺片中剂量组	0.86±0.086 ^{b,c}	0.94±0.101 ^{b,d}	0.85±0.095 ^{b,d,e}	1.06±0.036 ^{b,d}
丹蒺片高剂量组	0.48±0.055 ^{a,d,f,h}	1.09±0.101 ^{a,d,e}	1.08±0.125 ^{b,d,f,g}	1.17±0.038 ^{b,d,f}
<i>F</i>	94.26	54.82	50.92	71.51
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs RIRI 模型组; ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs 丹蒺片低剂量组; ^g*P*<0.05, ^h*P*<0.01 vs 丹蒺片中剂量组。

3 讨论

视网膜的血流中断会造成视网膜组织缺血,并导致缺氧和其它营养物质的缺乏,而随后的再灌注会加剧组织损伤。临床上单纯的视网膜缺血患者很少见,绝大多数视网膜缺血情况是在一些基础疾病的作用下发生,如高血压、高血糖和高血脂等^[17],李水等^[18]研究视网膜静脉阻塞的危险因素发现,高血脂、糖尿病、高血压等危险因素之间存在协调关系,能增加视网膜静脉阻塞的发病率。王静等^[19]研究发现,甘油三酯-葡萄糖指数升高是2型糖尿病患者发生糖尿病视网膜病变的高危因素。因此在高血脂症小鼠基础上建立 RIRI 模型更符合临床上缺血性眼血管疾病的病理生理基础。而对于视网膜缺血的研究,目前多采取急性 RIRI 模型研究其发病机制和干预措施。齐赞等^[20]通过小鼠 RIRI 模型观察藏红花素对小鼠视网膜神经节细胞的保护作用。罗晋媛^[21]观察 RIRI 损伤后视网膜细胞、视网膜功能及 SIRT1 蛋白表达的变化。综合以上,为了更好地模拟在全身基础病变状态下的 RIRI,本研究采用经典的 ApoE^{-/-}小鼠,给予高脂饲料喂养 6 wk 以诱导高血脂状态,再通过前房灌注加压法建立 RIRI 模型,该造模方法的优点在于技术难度较低,操作简单,可成功诱导 RIRI,较好地模拟血脂异常状态下 RIRI 的发病机制。

丹蒺片是治疗胸痹(冠心病)痰瘀互结证的公认有效药物,组成为瓜蒌皮、薤白、葛根、川芎、丹参、赤芍、泽泻、黄芪、骨碎补、郁金等,有活血化瘀之功效。研究表明,丹蒺片有助于保护血管内皮损伤和改善血流动力^[22]、抗氧化、抑制细胞凋亡等作用^[10]。现代药理学研究也表明薤白皂苷能够降低冠心病大鼠血小板的聚集和凝血能力,具有“活血化瘀”的效果^[23]。丹参酮 II A 能有效缓解因缺血缺氧引起的脑水肿,防止血-脑屏障通透性增加,修复受损的神经元,疗效显著^[24]。同时,张新等^[5,25]研究发现,丹蒺片能够通过调节氧化应激、炎症反应和脂质代谢等信号通路治疗非酒精性脂肪肝。李珠^[26]研究发现,丹蒺片治疗痰瘀互结型冠心病可能是通过调节氧化应激和炎症因子相关指标,发挥抗氧化应激的作用。瓜蒌皮水提取物可以防止心肌细胞在缺血缺氧情况下凋亡,并强化心肌细胞的生长状态,显著上调磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)等蛋白表达水平^[27]。黄芪多糖能缓解高眼压造成的视神经萎缩,减少视网膜细胞凋亡,减轻视网膜水肿^[28]。川芎嗪具有抑制 RIRI 线粒体途径中的细胞凋亡和抗炎作用^[29]。本研究结果显示,与对照组比较, RIRI 模型组小鼠视网膜萎缩变薄、视网膜细胞凋亡增加(均 *P*<0.01),而与 RIRI 模型组比较,丹蒺片中、高剂

量组小鼠视网膜厚度增加,丹蒺片低、中、高剂量组小鼠视网膜细胞凋亡降低,提示丹蒺片对 RIRI 具有显著的保护作用。

氧化应激在 RIRI 损伤中起着至关重要的作用, RIRI 导致 ROS 水平升高,诱发氧化应激损伤和细胞凋亡^[30-31]。Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路是一种重要的抗氧化应激途径^[32]。有学者发现,视网膜内具有内源性抗氧化机制以维持氧化还原稳态的蛋白因子,其中最重要的是 Keap1 和 Nrf2 之间的调控,在细胞没有受到伤害的情况下 Nrf2 与 Keap1 稳定结合存在于细胞质^[33]。然而,当细胞受到伤害, Nrf2 易位到细胞核,在细胞核与小蛋白 Maf 相互作用,并结合抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)参与启动下游抗氧化酶 HO-1 和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的转录表达,达到保护视网膜细胞作用^[33]。其中 HO-1 具备调节免疫系统、抗炎和保护细胞的特性,在视网膜损伤模型中, Nrf2 和 HO-1 通路(Nrf2/HO-1)的激活显示出神经保护作用,表明其可能是有意义的治疗靶点^[34]。既往研究表明, Nrf2 途径激活是视网膜血管保护的重要策略,保护视网膜细胞免受 RIRI 诱导损伤。胡寅等^[35]研究发现,白藜芦醇通过调控 Nrf2/HO-1 通路对高糖小鼠的视网膜细胞具有保护作用。Hui 等^[36]发现,通过药物诱导 Nrf2 途径激活,使 Nrf2 蛋白表达水平和核易位增加,最终可抑制氧化应激引起的组织损伤。Sheng 等^[37]研究发现,海洋甾体衍生物对 RIRI 的保护是通过 Keap1 的负调节激活和上调 Nrf2 及其下游 HO-1,有助于维持视网膜轴突的完整性和维持视觉功能。洪萌等^[38]研究发现木犀草素可以调控 Nrf2/HO-1 通路,上调 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞中 Nrf2 及 HO-1 蛋白的表达,提示木犀草素能够通过某种方式激活 Nrf2,从而上调下游抗氧化因子 HO-1 蛋白的表达,增强细胞清除活性氧(ROS)的能力,抑制氧化应激反应,保护细胞免受氧化应激损伤。另有研究发现,松果菊苷能降低大鼠视网膜组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平,并诱导视网膜中抗氧化酶 SOD、过氧化氢酶(certified accounting technician, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活化,保护视网膜细胞免受 RIRI 引起的损伤^[39]。

本研究结果显示, RIRI 模型组小鼠视网膜组织中 Nrf2 和 HO-1 表达较对照组略有增加,分析可能是当机体受到氧化应激刺激时, Nrf2 激活,上调了抗氧化蛋白 HO-1 的转录活动, Nrf2 和 HO-1 表达升高,机体经过自我抗氧化反应,促进 Keap1 与 Nrf2 解离和 Nrf2 核转位,但这不足

以保证其对抗氧化应激。RIRI 模型组较对照组 Sod2 蛋白表达下调,这可能是 RIRI 引起氧化应激反应过度,消耗了机体通过自身的内源性保护通路 Nrf2/HO-1/Sod2 激活的 Sod2,同时 RIRI 模型组较对照组 Keap1 表达增加导致氧化应激反应,最终导致视网膜细胞凋亡增加。而丹莪片可明显提高 RIRI 小鼠视网膜组织中 Nrf2、HO-1 和 Sod2 表达水平,下调视网膜组织中 Keap1 表达。上述研究结果提示,丹莪片具有激活抗氧化和抑制氧化应激反应的功 效,能过 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路发挥保护视网膜细胞的作用。然而,本研究也存在一些局限性:(1)RIRI 模型不能完全代表临床视网膜病变的缺血缺氧状态;(2)本研究仅观察了视网膜组织切片和相关蛋白的变化,缺少视觉电生理检查等功能性检查,且仅进行了单一时间点的观察,未进行不同时间点的关联性研究。后续实验研究中将建立更可靠的 RIRI 模型进一步深入探讨丹莪片的作用机制。

综上所述,丹莪片可能通过调控 Keap1-Nrf2/HO-1 通路减轻 RIRI 造成的视网膜氧化应激反应和视网膜细胞凋亡,并且保护视网膜结构,从而对 RIRI 相关疾病发挥治疗作用。

参考文献

[1] Zhang M, Yang JY, Ji KB, et al. Inhibition of p66Shc attenuates retinal ischemia-reperfusion injury-induced damage by activating the Akt pathway. *Exp Eye Res*, 2022,220:109082.

[2] 王玉丽,林娟,李新,等.丹红化瘀口服液对视网膜缺血再灌注损伤大鼠视网膜中央静脉阻塞症的保护作用及机制研究. *中草药*, 2022,53(6):1621-1627.

[3] 高爱社,杨洒,张振强,等.丹莪片对 $A\beta_{1-40}$ 致脑微血管内皮细胞损伤保护作用的机制研究. *中药新药与临床药理*, 2021,32(2):234-239.

[4] 杨海龙,刘春萍,刘建滔,等.基于自噬探讨丹莪片减轻心肌缺血再灌注损伤的机制研究. *中国中西医结合杂志*, 2020,40(3):318-323.

[5] 张新,陈文娜,宋囡,等.丹莪片通过铁死亡途径减轻非酒精性脂肪性肝病模型小鼠肝脏氧化损伤. *中国病理生理杂志*, 2021,37(12):2180-2188.

[6] 刘小微,李娟娟,姜小帆,等.丹莪片对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血脂及 AMPK/SREBP 通路的影响. *陕西中医*, 2021,42(11):1531-1535.

[7] 谭亚芳,潘诗婷,祁建勇,等.丹莪片改善大鼠急性心肌缺血的作用研究. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022,20(15):2743-2746.

[8] 张妍,史占江,牛春玲,等.丹莪片对同型半胱氨酸诱导的兔主动脉内皮细胞 CHOP、BIP 蛋白表达和凋亡的影响. *郑州大学学报(医学版)*, 2016,51(4):463-466.

[9] 王文灵.丹莪片联合单硝酸异山梨酯治疗对老年冠心病心绞痛患者心绞痛发作情况及血流动力学指标的影响. *中国药物滥用防治杂志*, 2021,27(4):596-598.

[10] 李俊平,郭丽丽,陈中,等.丹莪片对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制. *中国实验方剂学杂志*, 2017,23(1):95-100.

[11] 王成,胡乃华,余琳媛,等.降脂模型研究进展. *中国比较医学杂志*, 2020,30(4):121-130.

[12] 刁婷婷,闵清.高脂血症动物模型研究进展. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2018,32(6):541-545.

[13] 马尚伟,高媛洁,赵玲娟,等.实验性高脂血症动物模型的研究进展. *黑龙江医学*, 2018,42(11):1145-1148.

[14] 缪静,周鑫斌,毛威,等.丹莪片与血府逐瘀颗粒对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块影响的比较研究. *中国中西医结合杂志*, 2021,41(5):577-582.

[15] 姚晰晨,高爱社,田浩,等.丹莪片对 SAMP8 小鼠认知功能和脑微血管连接蛋白表达的影响. *中药新药与临床药理*, 2023,34(4):480-486.

[16] 陈燕芬.丹莪片对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型的影响及其

机制研究. *广州中医药大学*, 2016.

[17] O'Mahoney PR, Wong DT, Ray JG. Retinal vein occlusion and traditional risk factors for atherosclerosis. *Arch Ophthalmol*, 2008,126(5):692-699.

[18] 李水,杨华静,代家乐,等.视网膜静脉阻塞机制及危险因素研究进展. *国际眼科杂志*, 2024,24(1):72-76.

[19] 王静,张海芳,李春慧.甘油三酯-葡萄糖指数对糖尿病视网膜病变的预测价值. *国际眼科杂志*, 2022,22(8):1385-1390.

[20] 齐赟,张艺馨,程育宏.藏红花素对视网膜缺血再灌注损伤小鼠视网膜神经节细胞的保护作用及其机制研究. *眼科新进展*, 2022,42(1):6-10.

[21] 罗晋媛.白藜芦醇及 SIRT1 在小鼠视网膜缺血-再灌注损伤中的作用及机制研究. *武汉大学*, 2022.

[22] 刘勇,刘超峰.丹莪片药理作用及临床应用研究进展. *河北医药*, 2019,41(18):2861-2865.

[23] 刘泽君.雍白皂苷对血小板功能的影响及其干预冠心病寒痰阻滞证的机制分析. *东南大学*, 2020.

[24] 李济方,宋文秀.丹参酮 II A 对缺氧缺血脑损伤新生大鼠脑组织中 MicroRNA-181b 表达的影响. *医学食疗与健康*, 2022,20(18):176-178,190.

[25] 张新,陈文娜,宋囡,等.基于分子互作网络探讨丹莪片干预 PI3K/AKT/NF- κ B/TNF 通路防治非酒精性脂肪肝病的机制. *中国免疫学杂志*, 2022,38(11):1324-1332.

[26] 李珠.基于血清代谢组学技术探讨丹莪片治疗冠心病痰瘀互结证大鼠的抗炎和抗氧化研究. *天津中医药大学*, 2020.

[27] 杨玉婭,薛慧文,胡超群,等.瓜蒌皮水提物通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路抑制缺血缺氧大鼠原代心肌细胞的凋亡. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2023,62(1):111-118.

[28] 葛薇,徐哲,刘升强,等.黄芪多糖对急性高眼压诱导大鼠视网膜神经节细胞的保护作用. *中华实验眼科杂志*, 2012,30(12):1080-1084.

[29] 张雅丽,王国海,孟祥波.川芎嗪减轻大鼠视网膜缺血-再灌注损伤的作用及机制探究. *临床和实验医学杂志*, 2021,20(12):1245-1248.

[30] Zhang ZZ, Qin XH, Zhao XF, et al. Valproic acid regulates antioxidant enzymes and prevents ischemia/reperfusion injury in the rat retina. *Curr Eye Res*, 2012,37(5):429-437.

[31] Chao HM, Chuang MJ, Liu JH, et al. Baicalein protects against retinal ischemia by antioxidant, antiapoptosis, downregulation of HIF-1 α , VEGF, and MMP-9 and upregulation of HO-1. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013,29(6):539-549.

[32] 吴巍.基于 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路探讨枸杞多糖对脑缺血损伤保护作用. *宁夏医科大学*, 2018.

[33] Guo Z, Mo ZH. Keap1-Nrf2 signaling pathway in angiogenesis and vascular diseases. *J Tissue Eng Regen Med*, 2020,14(6):869-883.

[34] Lambros ML, Plafker SM. Oxidative stress and the Nrf2 anti-oxidant transcription factor in age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol*, 2016,854:67-72.

[35] 胡寅,崔莎,李卓君,等.白藜芦醇通过 Nrf2/HO-1 通路对高糖诱导的视网膜神经节细胞损伤的保护作用机制. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022,24(12):4681-4688.

[36] Hui QY, Karlstetter M, Xu ZH, et al. Inhibition of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction protects retinal cells and ameliorates retinal ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*, 2020,146:181-188.

[37] Sheng LX, Lu BZ, Chen H, et al. Marine-steroid derivative 5 α -androst-3 β , 5 α , 6 β -triol protects retinal ganglion cells from ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2 pathway. *Mar Drugs*, 2019,17(5):267.

[38] 洪萌,洪道先,石荣先,等.木犀草素调控 Nrf2/HO-1 通路保护视网膜色素上皮细胞氧化损伤. *国际眼科杂志*, 2021,21(1):21-26.

[39] Li L, Wang YF, Qin XH, et al. Echinacoside protects retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion-induced injury in the rat retina. *Mol Vis*, 2018,24:746-758.