

原花青素通过 AMPK/Wnt/ β -catenin 通路调节形觉剥夺性近视豚鼠视网膜自噬作用

刘及福¹, 杨笑天^{1,2}, 郑波汶¹, 叶辰¹, 方美琪¹

引用: 刘及福, 杨笑天, 郑波汶, 等. 原花青素通过 AMPK/Wnt/ β -catenin 通路调节形觉剥夺性近视豚鼠视网膜自噬作用. 国际眼科杂志, 2025, 25(12):1906-1913.

基金项目: 佳木斯大学科学技术重点项目 (No. JMSUSKZX-ZD005)

作者单位: ¹ (154007) 中国黑龙江省佳木斯市, 佳木斯大学; ² (154007) 中国黑龙江省佳木斯市, 佳木斯大学第一附属医院眼科

作者简介: 刘及福, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 近视预防及临床研究。

通讯作者: 杨笑天, 女, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病及斜视基础及临床研究. 949663119@qq.com

收稿日期: 2025-05-23 修回日期: 2025-10-24

摘要

目的: 探究原花青素通过 AMPK/Wnt/ β -catenin 通路对形觉剥夺性近视豚鼠视网膜自噬与凋亡的调控作用。

方法: 将 50 只豚鼠随机分为正常对照组、近视模型组、原花青素低、中、高剂量组 (25、50、100 mg/kg), 采用带状光检影镜与 A 超测量右眼屈光度与眼轴长度, HE 染色观察视网膜病理变化。免疫组化检测视网膜中 p-AMPK、p-mTOR 表达, 免疫荧光检测视网膜中 p62、LC3 表达, TUNEL 染色检测视网膜细胞凋亡情况, Western blot 法检测视网膜中 AMPK/Wnt/ β -catenin 通路、自噬相关蛋白 (p62、Beclin1、LC3-II/LC3-I)、凋亡相关蛋白 (Bax、Bcl-2、Cleaved-Caspase3、Caspase3) 表达情况。

结果: 与正常对照组相比, 近视模型组屈光度显著降低, 眼轴长度显著增加 (均 $P<0.05$); 视网膜细胞排列稀疏且厚度变薄, 视网膜中 p-AMPK 显著降低, p-mTOR 显著增加 (均 $P<0.05$), AMPK-Wnt/ β -catenin 通路被抑制; p62 显著增加, LC3 显著降低 (均 $P<0.05$), 自噬被抑制; Bax 与 Cleaved-Caspase3 显著增加, Bcl-2 显著降低, 细胞凋亡显著增加 (均 $P<0.05$)。与近视模型组相比, 原花青素各剂量组均可显著抑制屈光度降低与眼轴长度增加 (均 $P<0.05$), 恢复视网膜细胞排列与厚度, 激活 AMPK/Wnt/ β -catenin 通路, 显著增加 p-AMPK 表达, 抑制 p-mTOR 表达 (均 $P<0.05$); 显著抑制 p62 表达, 增加 Beclin1 与 LC3-II/LC3-I 表达 (均 $P<0.05$), 激活视网膜自噬; 显著抑制 Bax 与 Cleaved-Caspase3 表达, 增加 Bcl-2 表达 (均 $P<0.05$), 抑制视网膜细胞凋亡。

结论: 原花青素通过激活 AMPK/Wnt/ β -catenin 通路增强视网膜自噬, 抑制视网膜细胞凋亡, 预防或缓解近视的发生。

关键词: 原花青素; 形觉剥夺性近视; AMPK/Wnt/ β -catenin 通路; 视网膜自噬与凋亡

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2025.12.02

Proanthocyanidins regulate retinal autophagy in form-deprivation myopic guinea pigs through the AMPK/Wnt/ β -catenin pathway

Liu Jifu¹, Yang Xiaotian^{1,2}, Zheng Bowen¹, Ye Chen¹, Fang Meiqi¹

Foundation item: Key Science and Technology Project of Jiamusi University (No. JMSUSKZX-ZD005)

¹Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China; ²Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Yang Xiaotian. Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China; Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China. 949663119@qq.com

Received: 2025-05-23 Accepted: 2025-10-24

Abstract

• **AIM:** To investigate the regulatory effects of proanthocyanidins on autophagy and apoptosis in the retinas of guinea pigs with form-deprivation myopia via the AMPK/Wnt/ β -catenin pathway.

• **METHODS:** Fifty guinea pigs were randomly divided into a normal control group, a myopia model group, and low-dose, medium-dose, and high-dose proanthocyanidins groups (25, 50 and 100 mg/kg). Refractive power and axial length of right eye were measured using a retinoscope and A-scan ultrasound. Retinal pathological changes were observed via HE staining. Immunohistochemistry assessed p-AMPK and p-mTOR expression in the retina. Immunofluorescence detected p62 and LC3 expression. TUNEL staining evaluated retinal cell apoptosis. Western blot examined expression of proteins related to the AMPK/Wnt/ β -catenin pathway and autophagy (p62, Beclin1, LC3-II/LC3-I), and apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2, Cleaved-Caspase3, Caspase3) in the retina.

• **RESULTS:** Compared with the control group, the myopia model group showed significantly reduced refractive power and significantly increased axial length (both $P<0.05$); retinal cell arrangement became sparse and retinal thickness thinned. The p-AMPK levels in the retina were significantly reduced, while p-mTOR levels were significantly increased (both $P<0.05$), indicating

suppression of the AMPK-Wnt/ β -catenin pathway. The p62 levels were significantly elevated and LC3 levels were significantly reduced (both $P<0.05$), suggesting inhibition of autophagy. Bax and Cleaved-Caspase3 were significantly increased, while Bcl-2 was significantly decreased, indicating significantly increased apoptosis (both $P<0.05$). Compared with the myopia model group, all proanthocyanidins dose groups significantly inhibited refractive error reduction and axial length growth (both $P<0.05$), restored retinal cell alignment and thickness, activated the AMPK/Wnt/ β -catenin pathway, significantly increased p-AMPK expression, and suppressed p-mTOR expression (all $P<0.05$); significantly suppressed p62 expression, increased Beclin1 and LC3-II/LC3-I expression (both $P<0.05$), and activated retinal autophagy; significantly suppressed Bax and Cleaved-Caspase3 expression, increased Bcl-2 expression (both $P<0.05$), and inhibited retinal cell apoptosis.

• **CONCLUSION:** Proanthocyanidins enhance retinal autophagy by activating the AMPK/Wnt/ β -catenin pathway, thereby inhibiting retinal apoptosis and preventing or alleviating the onset of myopia.

• **KEYWORDS:** proanthocyanidins; form-deprivation myopia; AMPK-Wnt/ β -catenin pathway; retinal autophagy and apoptosis

Citation: Liu JF, Yang XT, Zheng BW, et al. Proanthocyanidins regulate retinal autophagy in form-deprivation myopic guinea pigs through the AMPK/Wnt/ β -catenin pathway. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2025,25(12):1906-1913.

0 引言

全球近视发病率逐年上升,预计2050年,近视患者将占总人口的50%左右,其发病机制与预防是国际研究的热点问题之一^[1]。我国是人口大国,近视已成为我国重点关注的公共卫生问题。随着自媒体与信息时代的来临,高度近视人群已逐渐年轻化,高度近视可导致视网膜裂孔、脱离、黄斑出血等视网膜病变,是常见的致盲原因之一^[2]。近视尚未有明确的治疗方法,一般通过矫正与手术进行干预,因此,寻求一种预防或延缓近视发生的药物一直是近视防控的热点和难点^[3]。

近视引发的视网膜病变主要与炎症、氧化应激、能量代谢异常、自噬等有关^[4]。视网膜的结构和生理功能与近视密不可分,其中自噬是维持视网膜能量与物质供应的关键。正常水平的自噬可促进细胞代谢产物的合成,维持视网膜神经传递与光传导的正常运转,同时抑制氧化应激避免视网膜色素上皮细胞异常凋亡^[5]。自噬水平下降可破坏细胞内稳态,调控下游凋亡蛋白表达,促进视网膜细胞凋亡,导致视网膜结构与功能受损,进一步加重近视的发生^[6]。腺苷5'-单磷酸激活的蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)是调节能量代谢的重要激酶,参与调控多种信号通路转导。AMPK/Wnt/ β -catenin通路是调控自噬的关键通路之一,AMPK通过磷酸化调节下游Wnt与 β -连锁蛋白(β -catenin)表达, β -catenin通过调控雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)活性来调节自噬水平^[7-8]。mTOR是

自噬发生时的核心蛋白,可调节微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3, LC3)、肌球蛋白样BCL2结合蛋白(bcl2-interacting protein, Beclin1)、泛素结合蛋白p62(ubiquitin-binding protein p62, p62)等自噬关键蛋白^[9]。自噬水平的变化会引起凋亡相关蛋白的表达异常,诱导细胞凋亡^[10]。调控AMPK/Wnt/ β -catenin通路调节视网膜细胞自噬水平可能是预防或缓解近视发生的关键途径之一。

原花青素属于多酚化合物,广泛存在于果蔬与植物中,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、增强免疫功能、改善视觉健康等作用^[11]。Liu等^[12]发现原花青素可减少衰老细胞(senescent cells, SnCs)积累与衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)因子的分泌,改善衰老小鼠视网膜的结构和功能损伤。Li等^[13]研究表明,葡萄籽原花青素可调节氧化应激和线粒体功能,保护小鼠视网膜神经损伤。沙棘花青素可通过减轻氧化损伤保护神经系统缓解大鼠视网膜损伤^[14]。花青素也可提高夜间视力,并被用作改善视力健康的补充剂^[15]。原花青素保护近视及视网膜损伤的机制鲜有报道,因此本课题通过建立形觉剥夺性近视模型,探究原花青素能否激活AMPK-Wnt/ β -catenin通路提高视网膜自噬水平,抑制视网膜细胞凋亡,缓解或预防近视导致的视觉功能受损,阐明原花青素缓解近视的作用机制,为近视的防治提供新的思路与实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 2周龄清洁级健康雄性花色豚鼠50只,购自哈尔滨市双城区新兴镇见林养殖场,体质量 120 ± 10 g,实验豚鼠无眼部疾病,饲养于佳木斯大学动物中心,室温 22 ± 3 °C,昼夜交替光照,自由饮食。生产许可证编号:SCXK(黑)2021-001,本研究符合佳木斯大学实验动物伦理审查(伦理审查编号:202510)。

1.1.2 主要试剂与药品 原花青素(上海源叶生物科技有限公司);复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社);盐酸丙美卡因(南京瑞年百思特制药有限公司);AMPK、p-AMPK、Wnt/ β -catenin、mTOR、p-mTOR一抗(上海亲科生物有限公司);p62、Beclin1、LC3、Bax、Bcl-2、Caspase3、Cleaved-Caspase3、 β -actin一抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司);TUNEL凋亡检测试剂盒(瑞士Roche公司);苏木素伊红染色试剂盒(大连美仑生物技术公司);柠檬酸钠抗原修复液(北京索莱宝科技有限公司);DAB显色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);Maker(美国Thermo公司);PVDF膜(美国Millipore公司);飞克特超敏ECL发光液(大连美仑生物技术公司);其余试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器 YZ24带状光检影镜(苏州六六视觉医疗器械有限公司);KN-1800眼科A超(上海寰熙医疗器械有限公司);TGL-16M高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);Synergy HT全自动多功能酶标仪(美国BioTek公司);RM2016型切片机(德国Leica公司);CKX31光学显微镜(日本Olympus公司);DM1400荧光显微镜(日本Olympus公司);DM4000B图像采集信号分析系统(德国Leica公司);VE-180型垂直电泳仪(上海天能科技有限

公司), Tanon-5200Multi 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); Image-J 图像分析软件(美国 National Institutes of Health)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模及给药 豚鼠 50 只采用随机数字法分为正常对照组、近视模型组、原花青素低、中、高剂量组(25、50、100 mg/kg), 每组 10 只。除对照组外, 均采用半透明眼罩遮盖右眼诱导形觉剥夺性近视模型, 每天早晚检查眼罩配戴情况与眼部健康状态。在造模前开始灌胃给予相应剂量的原花青素进行干预, 对照组与近视模型组给予相同体积生理盐水灌胃, 每天 1 次, 持续 6 wk。实验结束后使用 3% 戊巴比妥钠处死豚鼠, 取右眼球组织分别保存于 4% 多聚甲醛与液氮中备用。

1.2.2 屈光度与眼轴长度检测 屈光度检测前使用 5% 复方托吡卡胺滴眼液散瞳, 每 5 min 1 次, 共 4 次。眼轴长度检测前使用 1% 盐酸丙美卡因麻醉眼部表面, 以角膜前顶点到视网膜前表面的距离为眼轴长度, A 超参数设置: 前房、玻璃体腔、晶状体的传播速度分别为 1 557、1 540、1 723 m/s。由同一位有经验的验光师使用带状光检影与 A 超, 分别于造模前与造模 6 wk 对豚鼠右眼屈光度与眼轴长度进行测量, 每只右眼重复测量 3 次取平均值。

1.2.3 HE 染色 取 4% 多聚甲醛中固定保存的眼球组织, 进行梯度乙醇脱水、透明, 石蜡包埋, 切片(5 μm)。按说明书步骤进行苏木素染色 10 min, 流水冲洗后, 伊红染色 5 min, 冲洗后, 进行脱水, 二甲苯透明, 封片, 显微镜观察各组豚鼠视网膜组织病理变化, 使用 Image J 软件分析全视网膜厚度、内核层厚度、外核层厚度。

1.2.4 免疫组化 眼球组织切片经脱蜡水化后, 加入柠檬酸钠抗原修复液, 微波加热 5 min, 4 次。3% H₂O₂ 阻断过氧化物酶, 5% 的 BSA 封闭 30 min, 滴加 p-AMPK 与 p-mTOR 一抗(1:100), 4 ℃ 下孵育过夜, 滴加二抗, 37 ℃ 孵育 30 min, DAB 显色后经苏木素染核, 脱水透明后封片, 光学显微镜下拍照, 采用 Image J 软件分析豚鼠视网膜 p-AMPK 与 p-mTOR 相对光密度。

1.2.5 免疫荧光检测豚鼠视网膜 p62 与 LC3 表达 按上述免疫组化方法进行常规组织切片处理, 加入 p62 与 LC3 一抗(1:50), 4 ℃ 过夜; 滴加荧光标记二抗, 37 ℃ 避光孵育 1 h, 滴加 DAPI 染核, 37 ℃ 避光孵育 15 min, 加入抗荧光淬灭剂, 封片, 荧光显微镜采集图像, Image J 软件分析 p62 与 LC3 相对荧光强度。

1.2.6 TUNEL 染色 使用 TUNEL 染色检测豚鼠视网膜细胞凋亡情况, 取眼球组织切片常规脱蜡、水化、洗涤后, 用 PBS 稀释 Proteinase K 工作液, 使其终浓度为 20 μg/mL。每个切片滴加 100 μL 的 Proteinase K 于 37 ℃ 孵育 10 min 进行通透。避光配置 TUNEL 染色工作液滴加于切片上, 37 ℃ 孵育 30 min, DAPI 复染细胞核, 室温避光反应 10 min, 加入抗荧光淬灭剂, 封片, 荧光显微镜拍摄, 通过 Image J 软件分析计算细胞凋亡率。

1.2.7 Western blot 使用 Western blot 技术检测豚鼠视网膜中 AMPK/Wnt/β-catenin 通路、自噬蛋白、凋亡蛋白表达情况, 取液氮中眼球分离出视网膜组织, 按说明书比例加入 RIPA 裂解液, 冰上均匀研磨后, 超声破碎 3 次, 0 ℃ 静置 30 min, 低温 12 500 r/min 离心 10 min 后取上清液, BCA 测定蛋白含量, 计算每孔上样量为 15 μg。进行 SDS-

PAGE 电泳, 电压 100 V, 电泳 120 min 后转移至 PVDF 膜上, 5% BSA 于 37 ℃ 封闭 1 h, 按说明书稀释比例滴加 AMPK、p-AMPK、Wnt、β-catenin、mTOR、p-mTOR、p62、Beclin1、LC3、Bax、Bcl-2、Caspase3、Cleaved-Caspase3、β-actin 一抗, 孵育过夜后回收一抗, TBST 洗膜 3 次, 滴加对应二抗(1:10000), 37 ℃ 摇床孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 显影; 每组随机选取 3 个样本进行检测, 采用软件 Image J 对条带进行光密度分析。

统计学分析: 用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。所有数据均为计量资料, 表示为平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 两组间比较采用 Student's *t* 检验, 多组间采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 多组间存在差异, 采用 LSD-*t* 检验进行两两比较, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组豚鼠屈光度与眼轴长度比较 造模前各组豚鼠屈光度与眼轴长度差异无统计学意义(均 *P* > 0.05), 见表 1。造模 6 wk 后, 与正常对照组相比, 近视模型组豚鼠屈光度显著下降(*P* < 0.05), 眼轴长度显著增加(*P* < 0.05), 表明近视模型造模成功。与近视模型组相比, 原花青素各剂量组均可显著抑制近视模型的屈光度下降与眼轴长度增加(均 *P* < 0.05), 减轻近视程度, 其中原花青素高剂量组抑制效果更为明显。

2.2 HE 染色分析各组豚鼠视网膜病理变化 正常对照组豚鼠视网膜组织结构清晰, 排列整齐, 未见明显病变。与正常对照组相比, 近视模型组视网膜组织结构出现异常, 全视网膜、内核层、外核层厚度均显著变薄(均 *P* < 0.05), 且伴随水肿与细胞核肿大。原花青素各剂量组豚鼠视网膜结构层次趋于正常, 组织结构排列有序, 有效抑制视网膜厚度变薄(均 *P* < 0.05), 组织水肿减轻, 其中原花青素高剂量组效果最为显著, 见表 2, 图 1。

2.3 各组豚鼠视网膜 p-AMPK 和 p-mTOR 免疫组化及 AMPK/Wnt/β-catenin 通路比较 免疫组化结果见表 3, 图 2A、B, p-AMPK 与 p-mTOR 阳性表达主要集中在视网膜细胞质与细胞核中(图 2 中箭头所示)。与正常对照组相比, 近视模型组视网膜细胞中 p-AMPK 阳性表达显著降低, p-mTOR 阳性表达显著增加(均 *P* < 0.05); 与近视模型组相比, 原花青素各剂量组均可显著增加 p-AMPK 阳性表达, 抑制 p-mTOR 阳性表达(均 *P* < 0.05), 其中原花青素高剂量组效果最为显著。进一步对 AMPK/Wnt/β-catenin 通路检测, Western blot 结果见图 2C, 表 4, 与对照组相比, 近视模型组中 p-AMPK/AMPK、Wnt、β-catenin 蛋白表达显著降低(均 *P* < 0.05), p-mTOR/mTOR 蛋白表达显著增加(均 *P* < 0.05), 表明模型中 AMPK/Wnt/β-catenin 通路被抑制; 与近视模型组相比, 原花青素各剂量组均可显著激活 AMPK/Wnt/β-catenin 通路(均 *P* < 0.05), 原花青素高剂量组激活作用优于原花青素低、中剂量组(均 *P* < 0.05)。

2.4 原花青素对近视豚鼠视网膜自噬的影响 免疫荧光结果见表 5, 图 3A、B, p62 阳性表达主要集中在视网膜细胞质与细胞核中, LC3 阳性表达主要集中在视网膜细胞质中(图 3 中箭头所示)。与正常对照组相比, 近视模型组视网膜细胞中 p62 阳性表达显著增加, LC3 阳性表达显著降低; 与近视模型组相比, 原花青素各剂量组均可显著抑制 p62 阳性表达, 增加 LC3 阳性表达(*P* < 0.05), 其中原花青素高剂量组效果最为显著。Western blot 结果见图 3C,

表 6,与正常对照组相比,近视模型组视网膜中 p62 蛋白显著增加,Beclin1 与 LC3-II/LC3-I 蛋白显著降低(均 $P<0.05$),表明近视豚鼠视网膜自噬水平降低。与近视模型

组相比,原花青素各剂量组均可显著逆转这一变化(均 $P<0.05$),增加视网膜自噬水平,其中原花青素高剂量组效果优于原花青素低、中剂量组(均 $P<0.05$)。

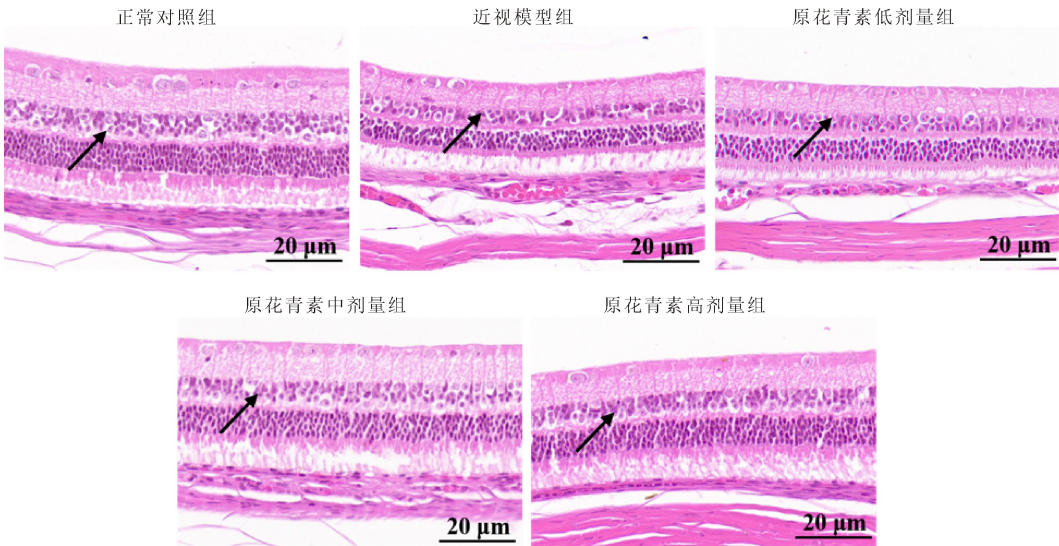


图 1 各组豚鼠视网膜 HE 染色结果 图中黑色箭头表示视网膜层。

表 1 各组豚鼠屈光度与眼轴长度比较 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	屈光度 (D)		眼轴长度 (mm)	
	造模前	造模 6 wk	造模前	造模 6 wk
正常对照组	3.66±0.08	1.56±0.19	7.36±0.18	7.71±0.16
近视模型组	3.61±0.14	-2.48±0.29 ^a	7.39±0.13	8.26±0.14 ^a
原花青素低剂量组	3.59±0.16	-1.73±0.11 ^{a,c}	7.38±0.16	8.09±0.22 ^a
原花青素中剂量组	3.62±0.11	-0.67±0.15 ^{a,c,e}	7.33±0.24	7.86±0.14 ^{a,c}
原花青素高剂量组	3.65±0.12	-0.29±0.07 ^{a,c,e,g}	7.36±0.19	7.82±0.17 ^{a,c}
F	0.16	221.80	0.11	5.96
P	0.95	<0.001	0.97	0.010

注:^a $P<0.05$ vs 正常对照组;^c $P<0.05$ vs 近视模型组;^e $P<0.05$ vs 原花青素低剂量组;^g $P<0.05$ vs 原花青素中剂量组。

表 2 各组豚鼠视网膜组织全视网膜和内核层及外核层厚度比较 (n=3, $\bar{x}\pm s$, μm)

组别	全视网膜厚度	内核层厚度	外核层厚度
正常对照组	257.54±5.42	44.14±3.52	55.74±3.19
近视模型组	129.35±6.04 ^a	25.21±3.99 ^a	34.24±3.35 ^a
原花青素低剂量组	154.46±3.68 ^{a,c}	27.46±3.52 ^{a,c}	37.62±3.87 ^{a,c}
原花青素中剂量组	216.37±9.64 ^{a,c,e}	35.41±3.12 ^{a,c,e}	46.67±5.77 ^{c,e}
原花青素高剂量组	236.81±6.13 ^{a,c,e,g}	37.29±3.83 ^{c,e,g}	50.03±7.56 ^{c,e,g}
F	11.96	13.37	9.24
P	<0.001	<0.001	0.002

注:^a $P<0.05$ vs 正常对照组;^c $P<0.05$ vs 近视模型组;^e $P<0.05$ vs 原花青素低剂量组;^g $P<0.05$ vs 原花青素中剂量组。

表 3 各组豚鼠视网膜 p-AMPK 和 p-mTOR 免疫组化相对光密度分析 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	p-AMPK 相对光密度	p-mTOR 相对光密度
正常对照组	0.97±0.03	0.98±0.11
近视模型组	0.29±0.05 ^a	1.68±0.07 ^a
原花青素低剂量组	0.39±0.04 ^{a,c}	1.44±0.09 ^{a,c}
原花青素中剂量组	0.55±0.04 ^{a,c,e}	1.32±0.10 ^{a,c,e}
原花青素高剂量组	0.67±0.05 ^{a,c,e,g}	1.11±0.06 ^{c,e,g}
F	100.61	26.15
P	<0.001	<0.001

注:^a $P<0.05$ vs 正常对照组;^c $P<0.05$ vs 近视模型组;^e $P<0.05$ vs 原花青素低剂量组;^g $P<0.05$ vs 原花青素中剂量组。

2.5 原花青素对近视豚鼠视网膜凋亡的影响 TUNEL 染色与 Western blot 结果见表 7,图 4,TUNEL 染色阳性表达为绿色荧光,主要表达在细胞核中(图 4 中箭头所示),阳性表达代表细胞凋亡程度。与正常对照组相比,近视模型组视网膜 TUNEL 阳性表达增加,细胞凋亡率升高($P<0.05$),Bax 与 Cleaved-Caspase3/Caspase3 蛋白表达增加,

Bcl-2 蛋白降低(均 $P<0.05$);表明近视豚鼠视网膜凋亡损失加重。与近视模型组相比,原花青素各剂量组均可显著抑制 TUNEL 阳性表达,抑制 Bax 与 Cleaved-Caspase3/Caspase3 蛋白表达,增加 Bcl-2 蛋白表达(均 $P<0.05$),降低视网膜凋亡水平。其中原花青素高剂量组抑制视网膜细胞凋亡效果优于原花青素低、中剂量组(均 $P<0.05$)。

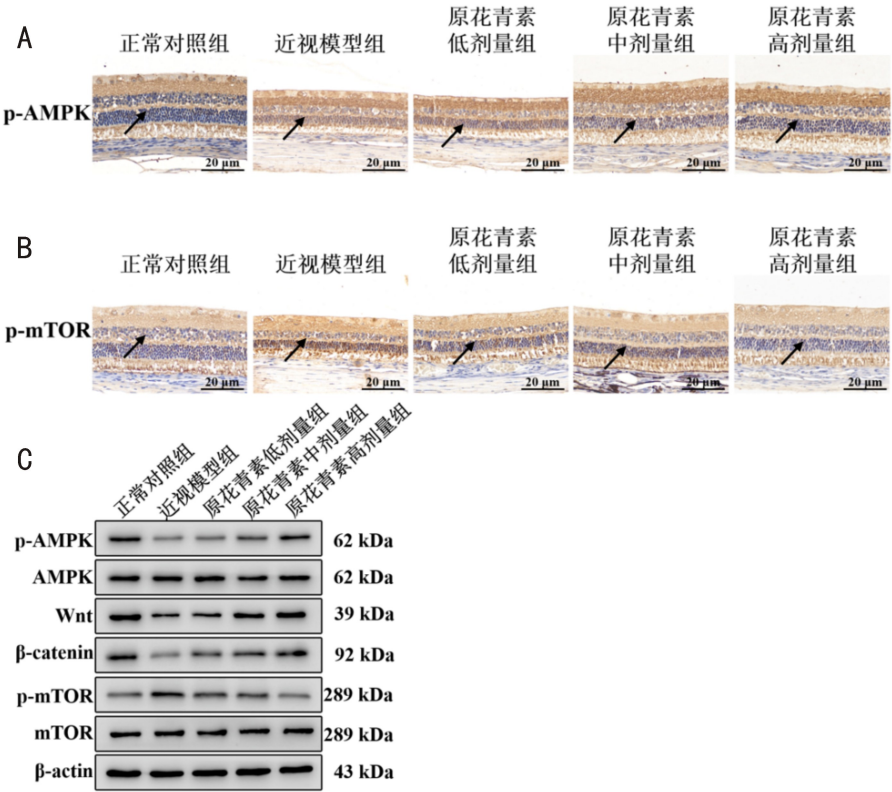


图 2 各组豚鼠视网膜中 p-AMPK 及 p-mTOR 免疫组化及 AMPK/Wnt/β-catenin 通路比较 A:各组豚鼠视网膜 p-AMPK 免疫组化结果;B:各组豚鼠视网膜 p-mTOR 免疫组化结果;C:Western blot 检测视网膜 AMPK/Wnt/β-catenin 通路表达。图中黑色箭头表示 p-AMPK 与 p-mTOR 阳性表达。

表 4 各组豚鼠视网膜 AMPK/Wnt/β-catenin 通路蛋白相对表达量 (n=3, $\bar{x}\pm s$)				
组别	p-AMPK/AMPK	Wnt/β-actin	β-catenin/β-actin	p-mTOR/mTOR
正常对照组	0.81±0.05	0.83±0.12	0.66±0.06	0.41±0.04
近视模型组	0.31±0.04 ^a	0.51±0.05 ^a	0.22±0.06 ^a	0.99±0.09 ^a
原花青素低剂量组	0.46±0.05 ^{a,c}	0.57±0.07 ^a	0.45±0.04 ^{a,c}	0.81±0.06 ^{a,c}
原花青素中剂量组	0.57±0.07 ^{a,c,e}	0.68±0.03 ^{c,e}	0.52±0.08 ^{c,e}	0.56±0.05 ^{c,e}
原花青素高剂量组	0.63±0.09 ^{a,c,e,g}	0.76±0.04 ^{c,e,g}	0.61±0.08 ^{c,e,g}	0.43±0.07 ^{c,e,g}
F	24.42	11.98	19.33	42.38
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a $P<0.05$ vs 正常对照组;^c $P<0.05$ vs 近视模型组;^e $P<0.05$ vs 原花青素低剂量组;^g $P<0.05$ vs 原花青素中剂量组。

表 5 各组豚鼠视网膜中 p62 和 LC3 免疫荧光相对荧光强度分析 (n=3, $\bar{x}\pm s$)		
组别	p62 相对荧光强度	LC3 相对荧光强度
正常对照组	1.01±0.07	0.99±0.12
近视模型组	2.91±0.27 ^a	0.23±0.04 ^a
原花青素低剂量组	2.05±0.19 ^{a,c}	0.30±0.05 ^{a,c}
原花青素中剂量组	1.68±0.09 ^{a,c,e}	0.48±0.04 ^{a,c,e}
原花青素高剂量组	1.23±0.11 ^{c,e,g}	0.61±0.06 ^{a,c,e,g}
F	79.33	56.34
P	<0.001	<0.001

注:^a $P<0.05$ vs 正常对照组;^c $P<0.05$ vs 近视模型组;^e $P<0.05$ vs 原花青素低剂量组;^g $P<0.05$ vs 原花青素中剂量组。

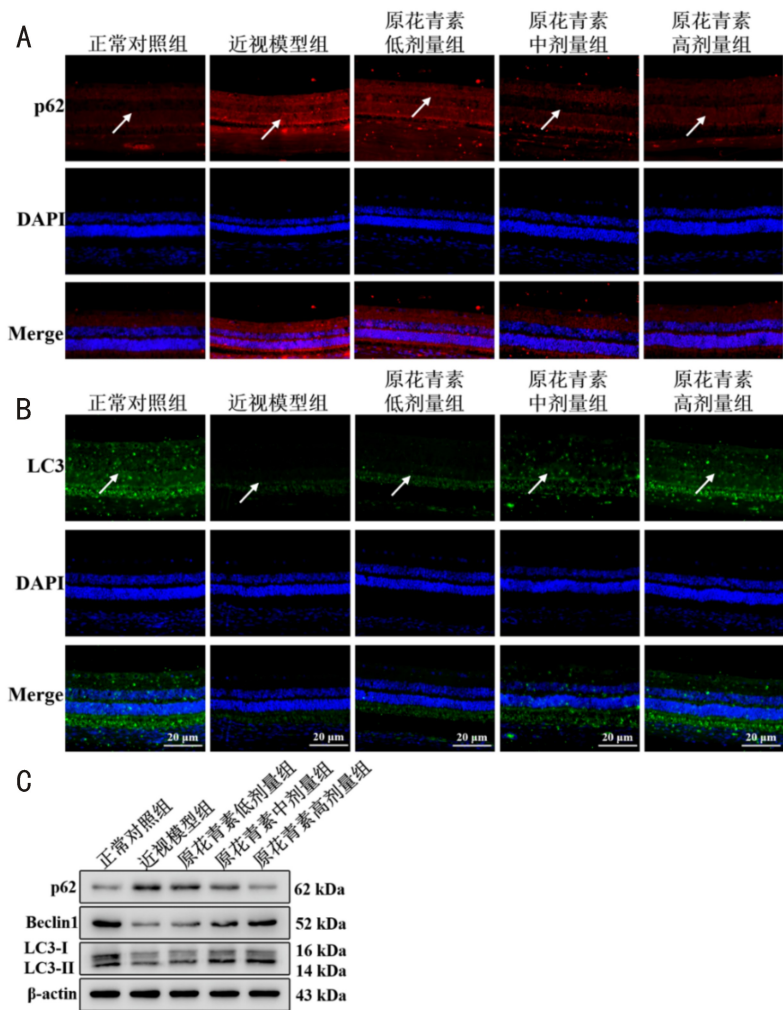


图 3 各组豚鼠视网膜中 p62 及 LC3 免疫荧光及自噬相关蛋白检测 A:视网膜 p62 免疫荧光结果;B:视网膜 LC3 免疫荧光结果; C:Western Blot 检测视网膜自噬相关蛋白表达;图中白色箭头表示集中在视网膜细胞核与细胞质中的 p62 阳性表达及 LC3 阳性表达。

表 6 各组豚鼠视网膜中自噬相关蛋白相对表达量				(n=3, $\bar{x}\pm s$)
组别	p62/β-actin	Beclin1/β-actin	LC3-II/LC3-I	
正常对照组	0.21±0.05	1.08±0.13	1.01±0.07	
近视模型组	0.74±0.06 ^a	0.26±0.05 ^a	0.53±0.02 ^a	
原花青素低剂量组	0.58±0.06 ^{a,c}	0.46±0.04 ^{a,c}	0.71±0.07 ^{a,c}	
原花青素中剂量组	0.44±0.05 ^{a,c,e}	0.57±0.04 ^{a,c,e}	0.89±0.09 ^{a,c,e}	
原花青素高剂量组	0.26±0.07 ^{c,e,g}	0.77±0.05 ^{a,c,e,g}	1.33±0.12 ^{a,c,e,g}	
F	36.51	59.40	45.23	
P	<0.001	<0.001	0.001	

注:^aP<0.05 vs 正常对照组;^cP<0.05 vs 近视模型组;^eP<0.05 vs 原花青素低剂量组;^gP<0.05 vs 原花青素中剂量组。

表 7 各组豚鼠视网膜中细胞凋亡率及凋亡相关蛋白相对表达量					(n=3, $\bar{x}\pm s$)
组别	细胞凋亡率(%)	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	Cleaved-Caspase3/Caspase3	
正常对照组	4.22±0.99	0.49±0.08	0.81±0.07	0.15±0.02	
近视模型组	18.42±3.11 ^a	1.08±0.12 ^a	0.27±0.04 ^a	1.06±0.17 ^a	
原花青素低剂量组	13.42±2.15 ^{a,c}	0.98±0.10 ^{a,c}	0.39±0.05 ^{a,c}	0.71±0.03 ^{a,c}	
原花青素中剂量组	7.63±1.21 ^{a,c,e}	0.78±0.06 ^{a,c,e}	0.54±0.04 ^{a,c,e}	0.58±0.09 ^{a,c,e}	
原花青素高剂量组	6.32±1.03 ^{c,e,g}	0.59±0.04 ^{c,e,g}	0.65±0.04 ^{a,c,e,g}	0.21±0.05 ^{c,e,g}	
F	28.54	23.91	49.75	45.88	
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

注:^aP<0.05 vs 正常对照组;^cP<0.05 vs 近视模型组;^eP<0.05 vs 原花青素低剂量组;^gP<0.05 vs 原花青素中剂量组。

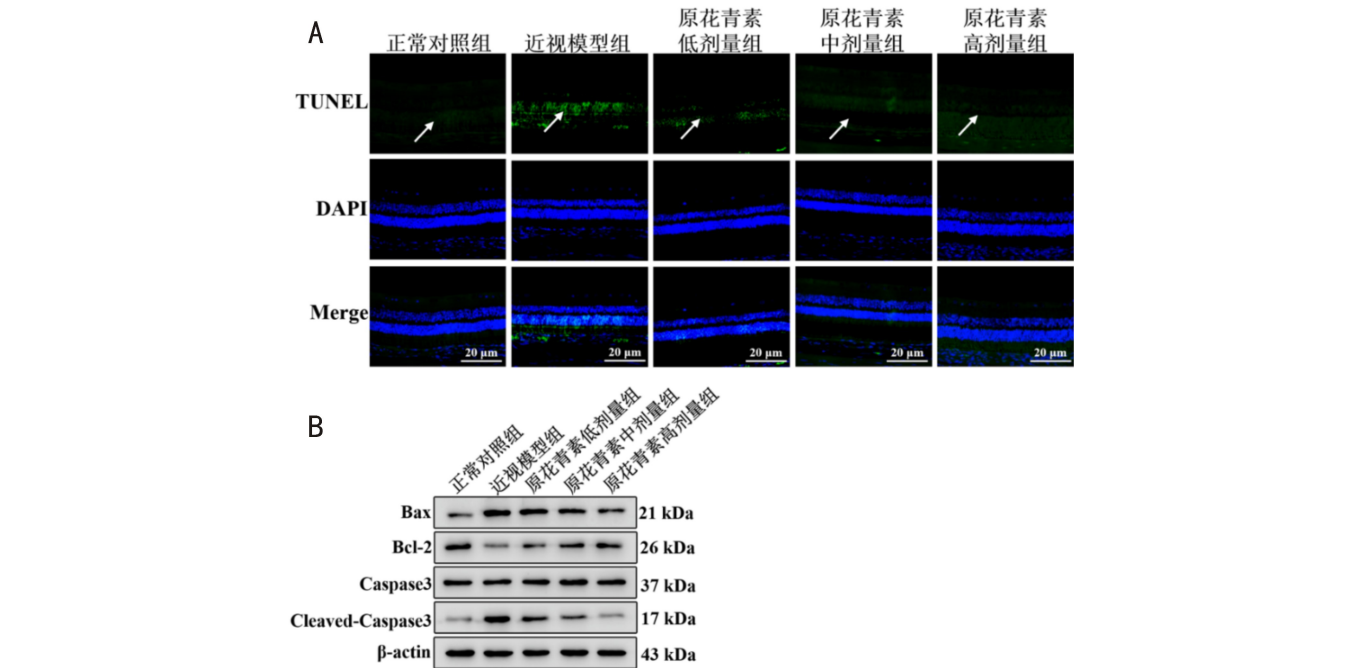


图4 各组豚鼠视网膜中TUNEL染色及凋亡相关蛋白检测结果 A:TUNEL染色结果,白色箭头表示细胞核中TUNEL染色阳性表达;B:Western Blot检测凋亡相关蛋白表达。

3 讨论

近视是由种族、环境、遗传等多种因素导致屈光不正与眼轴增长的眼部疾病,视网膜的结构和功能与近视的发展密切相关,高度近视是引发一系列视网膜病变的主要原因^[16]。自噬是一种调节细胞内物质平衡的机制,视网膜依赖自噬功能维持正常的结构和生理功能,多数学者认为近视的发病机制与炎症、氧化应激、能量代谢异常及自噬等有关,自噬参与多种视网膜疾病的调节,有效的调节自噬水平可能是延缓近视的有效途径之一^[17]。

原花青素是一类天然的抗氧化剂,具有良好的改善视觉健康作用。鉴于此,本研究通过半透明眼罩建立豚鼠形觉剥夺性近视模型,给予原花青素进行干预,探究其具体保护近视的作用途径。结果发现,在近视豚鼠视网膜中AMPK/Wnt/ β -catenin通路被抑制,mTOR磷酸化水平升高,抑制下游自噬蛋白表达,具体表现为LC3-II/LC3-I比值降低,Becn1蛋白表达下降,p62蛋白表达升高,视网膜自噬水平下降。同时凋亡相关蛋白被激活,Bax与Cleaved-Caspase3/Caspase3蛋白表达增加,Bcl-2蛋白降低,导致视网膜细胞凋亡损伤加重。既往的研究表明,高水平的自噬是维持视觉系统兴奋的关键,同时也为视网膜提供必须的能量与物质需求^[18]。自噬是一个多环节的调控过程,受上游调节因子mTOR与AMPK调控,AMPK通过磷酸化调控AMPK/Wnt/ β -catenin通路中的Wnt与 β -catenin蛋白活性, β -catenin可调节mTOR的磷酸化水平,mTOR磷酸化后通过调控下游自噬相关蛋白LC3、Becn1、p62等调节自噬水平^[19]。LC3是反映自噬水平的标志物,自噬水平升高时,表现为LC3-II/LC3-I比值增大,反之则降低^[20]。Becn1蛋白反映自噬的诱导水平,Becn1表达与诱导自噬的水平呈正相关^[21]。自噬激活后优先降解p62蛋白,其表达量与自噬水平呈负相关^[22]。在近视中自噬与细胞凋亡相互影响,低水平的自噬可诱导凋亡相关蛋白(Bax、Bcl-2、Caspase3)表达异常,引起视网

膜受损或凋亡,破坏视网膜正常结构与生理功能,加重近视的发展^[23]。本研究发现,原花青素可有效地抑制近视豚鼠屈光度降低与眼轴增长,改善视网膜变薄与结构排列紊乱等病理变化,降低近视发生的风险。原花青素可有效激活AMPK/Wnt/ β -catenin通路,增加p-AMPK/AMPK、Wnt/ β -catenin蛋白表达,抑制p-mTOR/mTOR蛋白表达,提高LC3-II/LC3-I比值,增加视网膜自噬水平,抑制凋亡蛋白表达,减轻视网膜细胞凋亡损伤,发挥保护视网膜结构与功能的作用。此外,原花青素低剂量组(25 mg/kg)对近视豚鼠的保护作用并不显著,而原花青素高剂量组(100 mg/kg)具有良好的改善视网膜自噬与损伤作用,提示原花青素保护视网膜损伤,延缓近视发生的作用存在一定的剂量依赖性。本研究结果与先前的研究理论一致,有效激活自噬可改善视网膜神经退行性疾病、视网膜炎症反应、视网膜感光细胞凋亡等^[24]。原花青素可提高自噬水平保护视网膜损伤,同时明确了原花青素主要通过激活AMPK/Wnt/ β -catenin通路提高自噬水平,抑制凋亡相关蛋白表达,保护视网膜损伤,干预近视的发展。相对先前的研究,本研究补充说明了原花青素保护近视的作用机制与途径^[25]。本研究仍存在一定的局限性,体内实验发现原花青素可通过激活自噬延缓近视的发展,但其临床应用的转化潜力、稳定性、安全性还有待进一步验证。同时原花青素激活AMPK/Wnt/ β -catenin通路的靶点有待完善,因此未来的研究可通过体外细胞实验对潜在靶点进行验证,完善其作用机制。此外,近视发病机制复杂,原花青素能否通过其它途径改善近视有待进一步探究。

综上所述,原花青素通过激活AMPK/Wnt/ β -catenin通路提高视网膜自噬水平,进一步减轻视网膜细胞损伤,改善视网膜结构与生理功能,发挥延缓与预防近视发生的作用,为临床防控近视的发展提供实验基础与理论依据。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

作者贡献声明:刘及福论文选题与修改,动物实验实施,初稿撰写,数据分析;郑波纹、叶辰、方美琪参与部分实验,文献检索;杨笑天选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] Jonas JB, Ang M, Cho P, et al. IMI prevention of myopia and its progression. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021,62(5):6.

[2] 赵怡, 蒋诗超, 沈一菁, 等. 中西医防控儿童轻度近视的研究进展. 中国中医眼科杂志, 2024,34(10):985-988.

[3] Walline JJ, Lindsley KB, Vedula SS, et al. Interventions to slow progression of myopia in children. Cochrane Database Syst Rev, 2020,1(1):CD004916.

[4] 訾迎新, 金明. 氧化应激在高度近视发病机制中的作用研究进展. 眼科新进展, 2020,40(4):388-391.

[5] Zhang YJ, Zhu Y, Li F, et al. A decrease in autophagy increases the level of collagen type I expression in scleral fibroblasts. Curr Eye Res, 2025,50(1):58-65.

[6] Lyu N, Zhang J, Dai YQ, et al. Calcitriol inhibits apoptosis via activation of autophagy in hyperosmotic stress stimulated corneal epithelial cells *in vivo* and *in vitro*. Exp Eye Res, 2020,200:108210.

[7] Ding J, Yang N, Yan YY, et al. Rapamycin inhibited photoreceptor necroptosis and protected the retina by activation of autophagy in experimental retinal detachment. Curr Eye Res, 2019,44(7):739-745.

[8] 安啟超. 何首乌饮通过 AMPK-Wnt/ β -catenin 信号通路影响 mTOR 调控肾精亏虚大鼠睾丸间质细胞自噬. 河北大学, 2024.

[9] 杨瑜, 吴洁, 高晓. 高良姜素调节 SIRT1/AMPK/mTOR 信号通路对脂多糖诱导的大鼠关节软骨细胞自噬和凋亡的影响. 中药新药与临床药理, 2024,35(9):1299-1305.

[10] 李光云, 周霖, 李鹏, 等. 地榆皂苷 II 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路在体内外减轻糖尿病视网膜病变的作用机制研究. 现代药物与临床, 2024,39(10):2470-2476.

[11] 张媛雯, 赵琳, 谭伟. 植物原花青素的应用研究进展. 中国果菜, 2023,43(7):24-28,41.

[12] Liu YD, Liu XX, Chen XH, et al. Senolytic and senomorphic agent procyanidin C1 alleviates structural and functional decline in the aged retina. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024,121(18):e2311028121.

[13] Li LL, Geng X, Tian LL, et al. Grape seed proanthocyanidins protect retinal ganglion cells by inhibiting oxidative stress and mitochondrial alteration. Arch Pharm Res, 2020,43(10):1056-1066.

[14] Wang Y, Zhao L, Huo YZ, et al. Protective effect of proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed against visible light-induced retinal degeneration *in vivo*. Nutrients, 2016,8(5):245.

[15] 全文彬, 纪昊垚, 麦梓锋, 等. 花青素对眼部保护作用及其机制的研究进展. 食品与发酵工业, 2022,48(19):304-312.

[16] Medina A. The cause of myopia development and progression: Theory, evidence, and treatment. Surv Ophthalmol, 2022, 67(2):488-509.

[17] Shu ZH, Chen KJ, Wang QS, et al. The role of retinal dopamine D1 receptors in ocular growth and myopia development in mice. J Neurosci, 2023,43(48):8231-8242.

[18] 毕鸿昊, 郭惠怡, 刘新宇, 等. 基于自噬途径探讨补肾益精方对 RPE 细胞氧化应激损伤的保护机制研究. 中国中医眼科杂志, 2024,34(8):706-712.

[19] Lin W, Xu GX. Autophagy: a role in the apoptosis, survival, inflammation, and development of the retina. Ophthalmic Res, 2019, 61(2):65-72.

[20] 高佳, 刘红估, 张丹, 等. 驻景丸加减方含药血清调控 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬对加压诱导大鼠 RGCs 损伤模型的影响. 眼科新进展, 2025,45(5):342-347,364.

[21] Prerna K, Dubey VK. Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding. Int J Biol Macromol, 2022,204:258-273.

[22] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. Essays Biochem, 2017,61(6):609-624.

[23] Kaarniranta K, Uusitalo H, Blasiak J, et al. Mechanisms of mitochondrial dysfunction and their impact on age-related macular degeneration. Prog Retin Eye Res, 2020,79:100858.

[24] 韩易言, 郑曲, 赵磊, 等. 青葙苷 I 通过调节 ROS 介导的 JNK/c-Jun 信号通路增强视神经损伤模型视网膜神经节细胞的线粒体自噬. 中国病理生理杂志, 2024,40(10):1898-1905.

[25] 曾思雨, 杜磊, 邢怡桥. 自噬在视网膜和眼部疾病中的研究进展. 国际眼科杂志, 2023,23(10):1662-1666.