

## 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

王玉丽<sup>1,2,3</sup>, 林娟<sup>4#</sup>, 李新<sup>1,2</sup>, 郭海彪<sup>4</sup>, 徐旭<sup>1,2</sup>, 许浚<sup>1,2,5</sup>, 李楚源<sup>4\*</sup>, 张铁军<sup>1,2\*</sup>

1. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462
2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300462
3. 天津大学化工学院, 天津 300350
4. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515
5. 天津药物研究院 中国医学科学院药物代谢新技术创新单元, 天津 300462

**摘要:** **目的** 研究丹红化瘀口服液对视网膜缺血再灌注损伤大鼠模型视网膜中央静脉阻塞症的保护作用及机制。**方法** 通过对前房加压建立大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型, 给予阿司匹林和丹红化瘀口服液干预 30 d。采用苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠视网膜组织病理变化; 采用 ELISA 法检测大鼠血清中白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性; 采用免疫组化法检测大鼠视网膜组织缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、血管内皮生长因子(vascular endothelial grown factor, VEGF)和核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) p65 蛋白表达情况。**结果** 模型组大鼠视网膜结构紊乱, 神经节细胞层细胞减少, 视网膜萎缩变薄; 丹红化瘀口服液组大鼠视网膜组织结构及神经节细胞变性程度均有所改善。与模型组比较, 丹红化瘀口服液组大鼠血清 SOD、GSH-Px 及 CAT 活性明显升高( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 血清 MDA 水平显著降低( $P < 0.05$ ); 血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著降低( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), IL-10 水平显著升高( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 视网膜组织 HIF-1、Caspase-3、NF- $\kappa$ B p65 和 VEGF 阳性表达均显著降低( $P < 0.05$ )。**结论** 丹红化瘀口服液对视网膜缺血再灌注损伤大鼠的视网膜结构具有改善作用, 对神经节细胞具有保护作用, 其作用机制可能与抑制视网膜组织细胞凋亡、抗炎和抑制新生血管生成有关。

**关键词:** 丹红化瘀口服液; 视网膜缺血再灌注; 氧化应激; 炎症; 新生血管生成

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)06-1621-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.003

## Protective effect and mechanism of Danhong Huayu Oral Liquid on central retinal vein occlusion of rats with retinal ischemia-reperfusion injury

WANG Yu-li<sup>1,2,3</sup>, LIN Juan<sup>4</sup>, LI Xin<sup>1,2</sup>, GUO Hai-biao<sup>4</sup>, XU Xu<sup>1,2</sup>, XU Jun<sup>1,2,5</sup>, LI Chu-yuan<sup>4</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>1,2</sup>

1. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
3. Institute of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300350, China
4. Guangzhou Baiyunshan Hutchison Whampoa Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China
5. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

收稿日期: 2021-09-07

基金项目: 国家重大新药创制专项(2017ZX0910001); 广州市科学技术协会 2019 年“广州市院士专家工作站”建设项目资助(600180); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目资助(2019-I2M-5-020)

作者简介: 王玉丽(1980—), 女, 博士, 研究方向为中药药理。E-mail: yuliwang6@163.com

\*通信作者: 李楚源, 正高级工程师, 研究方向为中药大品种二次开发。E-mail: 1226976234@qq.com

张铁军, 研究员, 研究方向为中药新药研发及中药大品种二次开发。Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjpr.com

#共同第一作者: 林娟(1986—), 女, 硕士, 研究方向为中成药药理与临床研究。Tel: (020)66282359 E-mail: 578045600@qq.com

**Abstract: Objective** To study the protective effect and mechanism of Danhong Huayu Oral Liquid (丹红化瘀口服液) on central retinal vein occlusion of rats with retinal ischemia-reperfusion injury. **Methods** A rat model of retinal ischemia-reperfusion injury was established by pressurizing the anterior chamber, and rats were given aspirin and Danhong Huayu Oral Liquid for 30 d. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of retina in rats; ELISA method was used to detect interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), malondialdehyde (MDA) levels and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in serum; Immunohistochemistry was used to detect hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), cystein-aspartate protease-3 (Caspase-3), vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 protein expressions in retinal tissue of rats. **Results** The retinal structure of rats in model group was disordered, cells of ganglion cell layer were reduced, and retina was atrophied and thinned; The retinal tissue structure and degree of ganglion cell degeneration were improved in Danhong Huayu Oral Liquid group. Compared with model group, activities of SOD, GSH-Px and CAT in serum of rats in Danhong Huayu Oral Liquid group were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ), and MDA level was decreased ( $P < 0.05$ ); IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  levels were significantly decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ), and IL-10 level was increased ( $P < 0.05, 0.01$ ); HIF-1, Caspase-3, NF- $\kappa$ B p65 and VEGF positive expressions in retinal tissue were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Danhong Huayu Oral Liquid can improve the retinal structure in rats with retinal ischemia-reperfusion injury, and has a protective effect on ganglion cells, and its mechanism may be related to the inhibition of retinal tissue apoptosis, anti-inflammation and angiogenesis. **Key words:** Danhong Huayu Oral Liquid; retinal ischemia-reperfusion injury; oxidative stress; inflammation; angiogenesis

视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是临床常见的视网膜病变眼科疾病, 在糖尿病视网膜病变、高血压视网膜病变、老年性黄斑变性、青光眼、视网膜中央静脉阻塞症 (central retinal vein occlusion, CRVO) 等严重眼病的病理中起着重要作用, 常导致视网膜细胞死亡, 对患者视功能造成不可逆损伤, 是目前国内外临床眼科研究的重点<sup>[1-2]</sup>。RIRI 的发生机制尚不完全清楚, 但研究表明与氧化应激、炎症密切相关<sup>[3]</sup>。

丹红化瘀口服液由丹参、当归、川芎、桃仁、红花、柴胡和枳壳 7 味药材组成, 具有活血化瘀、行气通络的功效, 用于气滞血瘀引起的视物不清、突然不见症; CRVO 的吸收期见上述证候者<sup>[4-5]</sup>。临床研究发现, 丹红化瘀口服液联合激光治疗 CRVO, 可提高患者视力水平, 改善眼底出血吸收和静脉充盈, 降低血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 水平<sup>[6]</sup>; 与雷珠单抗联合可提高黄斑水肿疗效总有效率, 减少血管渗漏面积和毛细血管无灌注区面积, 提高视力, 并能调节房水 VEGF 及血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 等细胞因子水平<sup>[7]</sup>。然而其作用机制尚不明确, 因此本研究通过对前房加压建立大鼠 RIRI 模型, 探讨丹红化瘀口服液对 RIRI 的作用及其机制,

为其临床应用提供更多理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 9 周龄, 体质量 280~310 g, 购自中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所实验动物中心, 许可证号 SCXK (军) 2014-0001。动物饲养于天津药物研究院有限公司实验动物屏障系统, 合格证 SYXK (津) 2016-0013, 温度、湿度、换气次数由中央系统自动控制, 温度 20~26  $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~70%, 通风次数为 10~15 次/h 全新风, 光照为 12 h 明/12 h 暗, 自由进食饮水。动物实验经天津药物研究院实验动物伦理委员会批准 (批准号 2017110301)。

### 1.2 药品与试剂

丹红化瘀口服液 (批号 20170427, 10 mL/支) 由广州白云山和记黄埔中药有限公司提供; 阿司匹林肠溶片 (批号 BJ34680, 100 mg/片) 购自德国 Bayer 公司; 水合氯醛 (批号 BJ34680) 购自天津市凯信化学工业有限公司; 大鼠血清白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (批号 20170218)、大鼠血清 IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 20170126)、大鼠血清 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (批号 20170118)、大鼠血清 IL-10 ELISA 试剂盒 (批号 20170223) 购自南京建成生物工程研究所; 大鼠血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20170210)、大鼠血清丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20170111)、

大鼠血清过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒 (批号 20170116)、大鼠血清谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒 (批号 20170215)、苏木素 (批号 20170220) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 二甲苯 (批号 20150618)、柠檬酸钠 (批号 20170630) 购自天津市凯信化学工业有限公司;  $H_2O_2$  (批号 20170116) 购自天津政成化学制品有限公司; 缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 抗体 (批号 20960-1-AP) 购自美国 CST 公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine-aspartate protease-3, Caspase-3) 抗体 (批号 BA0588)、DAB 显色试剂盒 (批号 K163323C) 购自美国 Boster 公司; VEGF 抗体 (批号 ab46154) 购自英国 Abcam 公司; 核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 抗体 (批号 20170526) 购自美国 Proteintech 公司; 免疫组化染色试剂盒 SP9001 (批号 K172424C) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 仪器

UV-574 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂); KHWUC6U00 型电热恒温水箱 (上海医疗器械厂); TD24-1SA 型多管架自动平衡离心机 (湖南天创仪器制造公司); Multiskan FC 型多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); IS0 型倒置荧光显微镜 (日本 NiKon 公司); 免疫组化笔 (上海鑫乐生物科技有限公司); RM2235 型切片机 (德国 Leica 公司)。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组及给药

50 只 SD 大鼠禁食 16 h 后, ip 10%水合氯醛 (3 mg/kg) 麻醉, 散瞳后, 采用输液器连接 30 G 针头自大鼠颞侧角膜缘穿刺进前房并固定, 然后升高输液瓶 (250 mL 盐水) 至 1.0 m 形成 110 mm Hg (1 mm Hg=133 Pa) 的眼压, 观察球结膜苍白、眼底血管断流, 表明已经形成视网膜缺血性改变。持续 1 h 后缓慢降低输液瓶, 使输液瓶高度与动物水平, 拔出前房灌注针头, 以眼结膜颜色变红、视网膜血管血流恢复为再灌注模型构建成功。取 10 只 SD 大鼠只穿刺眼球前房不灌注, 作为对照组。

将模型大鼠随机分为模型组、阿司匹林 (10 mg/kg) 组和丹红化瘀口服液低、中、高剂量 (3.25、6.50、13.00 mL/kg, 分别相当于临床剂量的 0.5、1、2 倍) 组, 每组 10 只。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积无菌饮用水, 1

次/d, 连续 30 d。

### 2.2 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠血清炎症因子及氧化应激相关因子水平的影响

采血前 1 日晚, 大鼠禁食, 末次给药后 1 h 麻醉, 腹主动脉取血, 制备血清, 采用 ELISA 法检测血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 和 TNF- $\alpha$  水平, 比色法测定血清 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量。

### 2.3 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠视网膜病理变化的影响

取各组大鼠视网膜, 用 10%甲醛溶液固定, 经常规石蜡包埋、切片、脱蜡后, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于光镜下观察观察视网膜结构变化。

### 2.4 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠视网膜 HIF-1、Caspase-3、VEGF 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响

取各组大鼠视网膜, 立即放入液氮冷冻后切片, 经 EDTA 抗原修复, 并以 3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶, 封闭后分别加入 HIF-1、Caspase-3、VEGF 和 NF- $\kappa$ B p65 抗体孵育, 然后加入二抗孵育, DAB 显色后, 梯度乙醇及二甲苯梯度脱水, 中性树脂封片, 于显微镜下观察并拍照。

### 2.5 统计分析

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异性采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠视网膜病理变化的影响

如图 1 所示, 对照组大鼠视网膜结构正常, 各层细胞排列整齐, 未见水肿或萎缩; 模型组大鼠视网膜结构相对紊乱, 神经节细胞层细胞减少, 视网膜萎缩变薄, 以神经节细胞层、内网层、内核层变薄更为显著; 各给药组大鼠视网膜结构相对完整, 萎缩程度减轻, 丹红化瘀口服液中、高剂量组改善较明显, 且丹红化瘀口服液高剂量在改善视网膜内网层结构方面明显优于阿司匹林, 可将视网膜整体结构恢复至近正常水平。

### 3.2 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠血清氧化应激相关因子水平的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清 SOD、GSH-Px 及 CAT 活性均明显下降 ( $P < 0.05$ 、0.01), MDA 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 丹红化瘀口服液各剂量组大鼠血清 SOD、GSH-Px 及 CAT 活性均明显升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), 丹红化瘀口服液高剂量组大鼠血清 MDA 水平显著降低

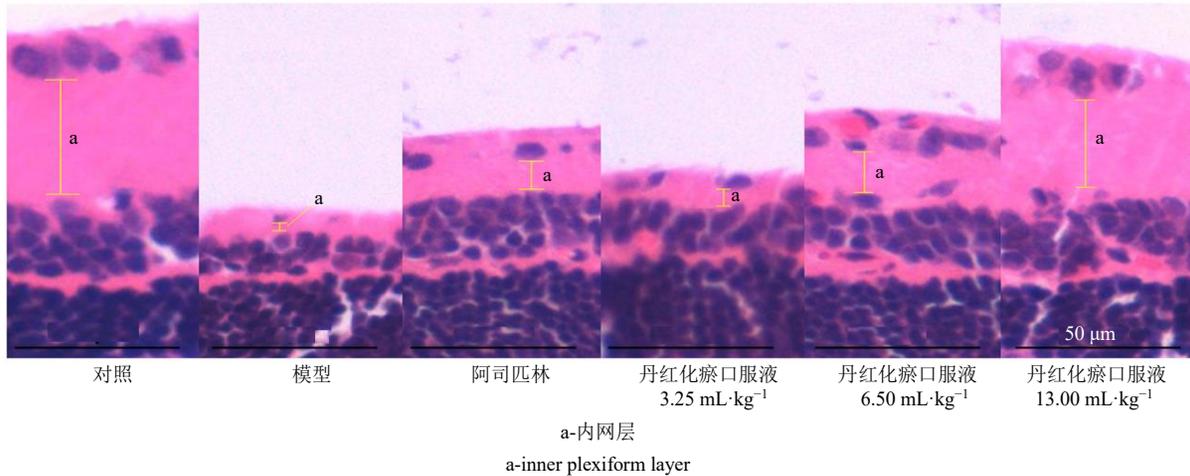


图1 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠视网膜病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Danhong Huayu Oral Liquid on pathological changes of retinal tissue in rats with RIRI (HE, × 100)

表1 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠血清氧化应激相关因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of Danhong Huayu Oral Liquid on levels of oxidative stress-related factors in serum of rats with RIRI ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	GSH-Px/(U·mL <sup>-1</sup> )	CAT/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	10.8 ± 0.9	0.40 ± 0.02	211.5 ± 10.5	13.3 ± 1.2
模型	—	9.0 ± 0.8 <sup>△</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>△</sup>	70.6 ± 6.9 <sup>△△</sup>	22.6 ± 2.5 <sup>△</sup>
阿司匹林	10 mg·kg <sup>-1</sup>	10.8 ± 1.0*	0.37 ± 0.04*	129.0 ± 10.3**	15.1 ± 1.6*
丹红化瘀口服液	3.25 mL·kg <sup>-1</sup>	9.8 ± 0.9*	0.33 ± 0.04*	154.4 ± 14.3**	23.2 ± 2.6
	6.50 mL·kg <sup>-1</sup>	10.4 ± 0.9*	0.40 ± 0.03*	198.9 ± 18.6**	20.9 ± 2.3
	13.00 mL·kg <sup>-1</sup>	11.1 ± 0.8**	0.43 ± 0.04**	223.3 ± 17.4**	17.1 ± 1.9*

与对照组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$  <sup>△△</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下表同

<sup>△</sup> $P < 0.05$  <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group, same as below tables

( $P < 0.05$ )。

### 3.3 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠血清炎症因子水平的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 丹红化瘀口服液各剂量组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), IL-10 水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01); 丹红化瘀口服液中、高剂量组大鼠血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01)。提示丹

红化瘀口服液对 RIRI 大鼠具有明显的抗炎作用。

### 3.4 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠视网膜 HIF-1、Caspase-3、VEGF 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响

如图 2 和表 3 所示, 对照组大鼠视网膜组织 HIF-1、Caspase-3、NF- $\kappa$ B p65 和 VEGF 阳性表达较少; 与对照组比较, 模型组大鼠视网膜组织 HIF-1、Caspase-3、NF- $\kappa$ B p65 和 VEGF 阳性表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组大鼠视网膜组织 HIF-1、Caspase-3、NF- $\kappa$ B p65 和 VEGF 阳性表达均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

表2 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠血清炎症因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of Danhong Huayu Oral Liquid on levels of inflammatory factors in serum of rats with RIRI ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量	IL-1 $\beta$ /(ng·L <sup>-1</sup> )	IL-6/(ng·L <sup>-1</sup> )	IL-10/(ng·L <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ /(ng·L <sup>-1</sup> )
对照	—	15.7 ± 3.5	100.2 ± 13.2	579.5 ± 60.3	302.1 ± 20.6
模型	—	57.1 ± 10.2 <sup>△△</sup>	203.6 ± 16.5 <sup>△△</sup>	269.3 ± 27.2 <sup>△△</sup>	1 484.2 ± 98.5 <sup>△△</sup>
阿司匹林	10 mg·kg <sup>-1</sup>	19.6 ± 2.9**	138.5 ± 14.1*	540.8 ± 56.4**	942.2 ± 62.3*
丹红化瘀口服液	3.25 mL·kg <sup>-1</sup>	32.2 ± 5.8*	268.7 ± 29.3	397.7 ± 45.6*	1 508.6 ± 59.8
	6.50 mL·kg <sup>-1</sup>	17.8 ± 3.0**	160.2 ± 17.2*	471.2 ± 50.5**	781.7 ± 22.5*
	13.00 mL·kg <sup>-1</sup>	15.5 ± 2.9**	126.9 ± 18.3*	597.2 ± 60.7**	565.5 ± 30.6**

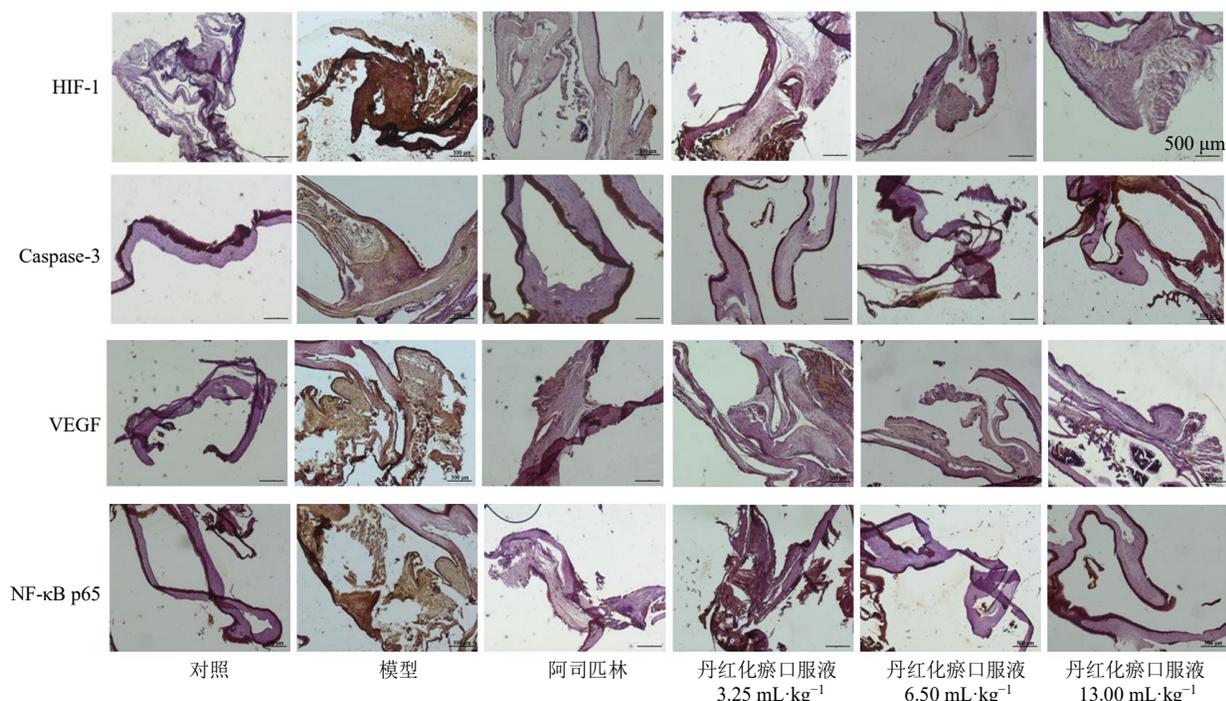


图 2 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠视网膜 HIF-1、Caspase-3、VEGF 和 NF-κB p65 蛋白表达的影响 (×40)

Fig. 2 Effect of Danhong Huayu Oral Liquid on HIF-1, Caspase-3, VEGF and NF-κB p65 protein expressions in retinal tissue of rats with RIRI (× 40)

表 3 丹红化瘀口服液对 RIRI 大鼠视网膜 HIF-1、Caspase-3、VEGF 和 NF-κB p65 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Danhong Huayu Oral Liquid on HIF-1, Caspase-3, VEGF and NF-κB p65 protein expressions in retinal tissue of rats with RIRI ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量	A 值			
		HIF-1	Caspase-3	NF-κB p65	VEGF
对照	—	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
模型	—	0.15 ± 0.01 <sup>△△</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>△△</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>△△</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>△△</sup>
阿司匹林	10 mg·kg <sup>-1</sup>	0.12 ± 0.01*	0.10 ± 0.01*	0.12 ± 0.01*	0.12 ± 0.01*
丹红化瘀口服液	3.25 mL·kg <sup>-1</sup>	0.12 ± 0.01*	0.11 ± 0.01*	0.13 ± 0.01*	0.12 ± 0.01*
	6.50 mL·kg <sup>-1</sup>	0.11 ± 0.01*	0.10 ± 0.01*	0.11 ± 0.01*	0.12 ± 0.01*
	13.00 mL·kg <sup>-1</sup>	0.09 ± 0.02*	0.10 ± 0.01**	0.11 ± 0.01*	0.11 ± 0.01*

#### 4 讨论

高代谢的视网膜在体内耗氧量非常高，对氧的反应灵敏，所以更易受到缺血损伤，视网膜被视为中枢神经系统的延伸，这也使得视网膜成为一种理想的模型系统<sup>[8]</sup>。基于高眼压的视网膜缺血建立的 RIRI 模型是一个非常成熟的模型。眼压升高会改变视网膜血管，导致眼内不足或血液供应完全阻塞。血液供应的收缩导致视网膜的多层组织缺氧和营养缺乏。血流恢复可导致线粒体、氧化应激和内质网应激，继而导致氧自由基大量生成和泄漏。过量的自由基使生物膜中的不饱和脂肪酸过氧化，形成脂质过氧化物，破坏了细胞膜的完整性，损害了视网膜组织结构和功能<sup>[1]</sup>。SOD、GSH-Px 及 CAT 均是

机体抗氧化防御系统中最重要自由基清除酶类，可灭活氧自由基，减轻组织的氧化应激损伤。MDA 作为自由基与不饱和脂肪酸发生脂质过氧化时的主要代谢产物，其含量的高低间接反映了组织受自由基攻击的严重程度<sup>[9]</sup>。本研究首先采用 HE 染色观察到模型大鼠视网膜结构相对紊乱，神经节细胞层细胞减少，视网膜萎缩变薄，以神经节细胞层、内网层、内核层变薄更为显著；而丹红化瘀口服液可明显改善视网膜结构，减轻其萎缩程度。进一步研究发现丹红化瘀口服液可明显提高 RIRI 大鼠血清 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性，降低血清 MDA 水平，具有明显的抗氧化作用。

缺血区出现炎症细胞因子的积聚是缺血再灌注

最早期的反应,炎症反应在缺血再灌注发病机制中起着重要作用。RIRI 后可使内源性 IL-1 $\beta$  和 IL-6 表达增加,改变血流动力学,诱导白细胞向缺血组织浸润,活化血管内皮细胞产生自由基、一氧化氮,刺激中性粒细胞释放炎症反应蛋白和炎症介质,从而加剧炎症反应导致迟发神经元损伤。IL-10 作为一种炎症抑制因子,可通过抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-6 等受体的表达来减轻炎症反应,从而减轻组织损伤<sup>[10]</sup>。许多学者认为 NF- $\kappa$ B 是介导缺血再灌注损伤的核心环节。NF- $\kappa$ B 作为重要的转录因子,调控细胞因子、趋化因子、黏附分子、氧化应激相关酶等,因此在炎症反应中发挥着重要作用。NF- $\kappa$ B 通常以同源或异源二聚体存在,最常见的二聚体是 p65 和 p50 组成的异源二聚体,但在二聚体形成及与相应 DNA 的  $\kappa$ B 位点结合方面, p50 仅发挥着“帮助”亚单位的作用,而 p65 包括 2 个有效的反式激活结构域,所以基因转录活性最强。氧自由基作为 NF- $\kappa$ B 的重要激活剂,通过抑制氧自由基的生成,导致 NF- $\kappa$ B 活化也相应被抑制,从而不能形成信号通路正反馈调控机制而发生放大生物效应,故减轻了对组织的损伤<sup>[11]</sup>。本研究发现丹红化瘀口服液能够降低 RIRI 大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平,升高血清 IL-10 水平,具有显著的抗炎作用,其机制可能与降低 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达有关。

HIF-1 是细胞核提取物中存在的 DNA 结合蛋白,是能够反映缺氧调节的重要因子,并能抑制细胞生长,在缺氧的条件下可诱导相关细胞凋亡<sup>[12]</sup>。HIF-1 $\alpha$  在哺乳动物细胞中结构性表达,在低氧条件下不能被羟基化,从而表达明显增多。HIF-1 $\alpha$  增多与视网膜神经节细胞的凋亡有密切关系,可能是通过调控其下游基因 p53 的表达而促进细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本研究发现丹红化瘀口服液可显著降低 RIRI 大鼠视网膜组织中 HIF-1 表达。RIRI 由炎症和氧化应激触发的细胞凋亡引起,主要由死亡受体或线粒体介导的信号通路激活参与<sup>[14]</sup>。Caspase-3 常作为 2 种凋亡通路的标志物。在细胞死亡通路中,Caspase-3 表达上调,酶被随后的裂解迅速激活,随即触发细胞死亡的最后反应<sup>[15]</sup>。本研究发现丹红化瘀口服液可明显减少 RIRI 大鼠视网膜 Caspase-3 表达。新血管形成是许多慢性眼病的共同特征,也是世界上致盲的主要原因。这种血管形成被认为是继发于缺血或缺氧诱导的扩散性生长因子(如 VEGF)的刺激,促进视网膜和视神经头的血管形成<sup>[16]</sup>。VEGF 是目

前所知最强的血管生成因子,它能增加血管内皮细胞的通透性,促进内皮细胞的迁移和增生,调控其他内皮细胞基因的表达,使其产生蛋白酶,降解细胞外基质,从而诱导视网膜新生血管的形成<sup>[17]</sup>。本研究发现丹红化瘀口服液可减少 RIRI 大鼠视网膜 VEGF 表达,从而减少疾病发生过程中新生血管的生成。

阿司匹林是一个经典的抗血小板功能的药物,研究发现小剂量的阿司匹林几乎不影响血管内皮细胞的前列腺素产生,只通过诱导血小板环氧酶 2 酰化,抑制血栓素 B<sub>2</sub> 的合成抗血栓的形成,使得阻塞的毛细血管得以通畅,但属于病因治疗<sup>[18]</sup>,而本研究初步表明,丹红化瘀口服液能够明显改善 RIRI 大鼠视网膜结构,提高血清 GSH-Px、SOD 和 CAT 活性,降低 MDA 含量,明显抑制炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平,升高炎症抑制因子 IL-10 水平,其作用机制可能为通过降低 Caspase-3、NF- $\kappa$ B p65、HIF-1、VEGF 表达发挥抗氧化、抗炎和抑制新血管生成等作用,从而减轻 RIRI 造成的损伤,治疗 CRVO。此外,丹红化瘀口服液抗氧化的活性优于阿司匹林,这可能是在视网膜结构的改善方面最终表现出优于阿司匹林的作用基础之一。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Seong H, Ryu J, Yoo W S, *et al.* Resveratrol ameliorates retinal ischemia/reperfusion injury in C57BL/6J mice via downregulation of caspase-3 [J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42(12): 1650-1658.
- [2] 苏畅, 周海生, 郭淑玲, 等. 白藜芦醇对大鼠视网膜缺血再灌注损伤后视网膜组织中 Caspase-3 和 Bcl-2 表达的影响 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2018, 44(2): 321-326.
- [3] Hartsock M J, Cho H, Wu L J, *et al.* A mouse model of retinal ischemia-reperfusion injury through elevation of intraocular pressure [J]. *J Vis Exp*, 2016(113): 54065.
- [4] 李海威, 靖鹏举, 孙晓萍, 等. 丹红化瘀口服液联合卵磷脂络合碘治疗视网膜静脉阻塞的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(4): 655-658.
- [5] 李鹏, 林娟, 唐萍, 等. 丹红化瘀口服液药理作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1616-1620.
- [6] 贾洪亮, 万琦. 丹红化瘀口服液联合激光治疗视网膜中央静脉阻塞临床研究 [J]. 河南中医, 2015, 35(8): 1897-1899.
- [7] 符郁, 郭翠玲. 丹红化瘀口服液对视网膜中央静脉阻塞细胞因子网络的调节作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 210-215.

- [8] Minhas G, Sharma J, Khan N. Cellular stress response and immune signaling in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 444.
- [9] 杨赞章, 张越, 张铭连, 等. 活血通络利水合剂对视网膜缺血再灌注损伤兔视网膜组织氧化应激的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(11): 2585-2588.
- [10] 吕昊琴, 吴维霖, 刘艳芳, 等. 去水淫羊藿素对大鼠视网膜缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. 海南医学, 2017, 28(18): 2932-2935.
- [11] 刘花, 高卉. 银杏叶提取物对肝缺血再灌注 NF- $\kappa$ B p65 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(12): 2865-2867.
- [12] 贾茜钰, 刘勤, 白慧玲, 等. 黄芪对大鼠视网膜缺血再灌注损伤中 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达的影响 [J]. 甘肃医药, 2016, 35(2): 105-108.
- [13] Osborne N N, Casson R J, Wood J P, *et al.* Retinal ischemia: Mechanisms of damage and potential therapeutic strategies [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2004, 23(1): 91-147.
- [14] Ulbrich F, Schallner N, Coburn M, *et al.* Argon inhalation attenuates retinal apoptosis after ischemia/reperfusion injury in a time- and dose-dependent manner in rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115984.
- [15] Broughton B R, Reutens D C, Sobey C G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2009, 40(5): e331-e339.
- [16] Ghiardi G J, Giddy J M, Roth S. The purine nucleoside adenosine in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Vision Res*, 1999, 39(15): 2519-2535.
- [17] 吴鹏程, 张文芳, 张书. VEGF 和 MMP-9 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中表达及相关性研究 [J]. 国际眼科杂志, 2014, 14(5): 815-818.
- [18] 郑松泉. 迈之灵联合肠溶阿司匹林治疗视网膜静脉阻塞 [J]. 中国实用眼科杂志, 2003(4): 258.

[责任编辑 李亚楠]