

引文格式:柯玲玲,周欣,张元钟,刘雨露,仲路,孙化萍,等.驻景丸加减方对于干性年龄相关性黄斑变性模型小鼠视网膜的保护作用[J].眼科新进展,2021,41(9):812-816. doi:10.13389/j.cnki.rao.2021.0170

【实验研究】

驻景丸加减方对于干性年龄相关性黄斑变性模型小鼠视网膜的保护作用[△]

柯玲玲 周欣 张元钟 刘雨露 仲路 孙化萍 杭丽 金青子 徐新荣

作者简介:柯玲玲 (ORCID: 0000-0001-9359-6584),女,1993年5月出生,江西九江人,硕士研究生。研究方向:眼底病。E-mail:229526868@qq.com

通信作者:徐新荣 (ORCID: 0000-0003-2047-7298),男,江苏南京人,博士,教授,主任医师。研究方向:眼底病。E-mail:xinrong_xu@aliyun.com

收稿日期:2021-01-01

修回日期:2021-04-26

本文编辑:董建军

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:82074177);江苏省重点研发计划项目(编号:BE2018757)

作者单位:332000 江西省九江市,九江市中医院眼科(柯玲玲);210029 江苏省南京市,江苏省中医院(南京中医药大学附属医院)眼科(周欣,刘雨露,仲路,孙化萍,杭丽,金青子,徐新荣);210022 江苏省南京市,南京市中医院眼科(张元钟)

【摘要】 目的 探讨驻景丸加减方对于干性年龄相关性黄斑变性(AMD)模型小鼠视网膜的保护作用以及对核因子E2相关因子2(Nrf2)通路和自噬的影响。**方法** 取6月龄健康雄性C57BL/6小鼠90只,将小鼠随机分为:年龄对照组(正常饮食)、溶媒对照组(高脂饮食+氢醌)、对照药物组(高脂饮食+氢醌+莱视汀)及中药组(高脂饮食+氢醌+驻景丸加减方,分低、中、高三个剂量组)6组,每组15只。莱视汀主要成分:叶黄素、β-胡萝卜素、葡萄糖酸锌(每100g含叶黄素2.20g、β-胡萝卜素0.86g、锌1.50g)。各组小鼠灌胃给药,每天1次,持续3个月。动物观察期满后处死并摘取眼球,透射电镜观察视网膜组织,测量视网膜色素上皮(RPE)下沉积物面积及Bruch膜厚度,检测视网膜匀浆活性氧自由基(ROS)、丙二醛(MDA)含量,Western blot检测Nrf2、血红素加氧酶-1(HO-1)、醌氧化还原酶-1(NQO-1)、p62和LC3蛋白表达水平。**结果** 与年龄对照组相比,溶媒对照组RPE下沉积物面积显著增大、Bruch膜明显增厚,差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$);与溶媒对照组相比,中药中、高剂量组RPE下沉积物面积减小、Bruch膜厚度变薄,差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$);与溶媒对照组相比,中药低剂量组和对照药物组RPE下沉积物面积也均减小,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$),但Bruch膜厚度变化不明显。与溶媒对照组相比,中药中、高剂量组ROS、MDA含量显著降低(均为 $P<0.01$),中药低剂量组和对照药物组ROS、MDA含量也均降低(均为 $P<0.05$);与溶媒对照组相比,中药中、高剂量组细胞质Nrf2蛋白表达显著下调,细胞核Nrf2蛋白表达上调(均为 $P<0.01$),中药低剂量组和对照药物组细胞质Nrf2蛋白表达下调,细胞核Nrf2蛋白表达上调(均为 $P<0.05$);与溶媒对照组相比,中药中、高剂量组HO-1、NQO-1、p62和LC3 II蛋白表达均显著上调(均为 $P<0.01$),中药低剂量组HO-1、p62和LC3 II蛋白表达均上调(均为 $P<0.05$),对照药物组HO-1和LC3 II蛋白表达均上调(均为 $P<0.05$)。**结论** 驻景丸加减方可激活Nrf2通路,上调下游靶基因HO-1、NQO-1表达,快速清除ROS、MDA;增强自噬,加快清除氧化损伤的细胞器,对于干性AMD模型小鼠视网膜有保护作用。

【关键词】 年龄相关性黄斑变性;驻景丸加减方;氧化损伤;Nrf2通路;自噬

【中图分类号】 R774.5

年龄相关性黄斑变性(AMD)是老年人主要致盲性眼病之一。临床上,依据脉络膜新生血管的有无将AMD分为干性和湿性两类。湿性AMD的治疗由于抗血管内皮生长因子药物的广泛应用取得了显著疗效^[1],而干性AMD迄今尚无确切有效的治疗措施。

驻景丸加减方源自近代眼科专家陈达夫所著《中医眼科六经法要》^[2],是治疗肝肾亏虚内障眼病的代表方剂,用于治疗肝肾不足引起的多种眼疾,如糖尿病视网膜病变、原发性视网膜色素变性等^[3]。驻景丸加减方治疗干性AMD取得了良好的临床效果^[4],但其作用机制尚不清楚。有研究报道,核因子E2相关因子2(Nrf2)通路和自噬参与了干性AMD的发病过程^[5]。本研究探讨驻景丸加减方对于干性AMD模型小鼠视网膜的保护作用以及对Nrf2通路和自噬的影响,旨在阐明其作用机制,为临床推广应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 取6月龄健康雄性C57BL/6小鼠90只,体重27~32g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供。将小鼠随机分为:年龄对照组(正常饮食)、溶媒对照组(高脂饮食+氢醌)、对照药物组(高脂饮食+氢醌+莱视汀)及中药组(高脂饮食+氢醌+驻景丸加减方,分低、中、高三个剂量组)6组,每组15只。本研究动物处理遵循《实验动物管理条例》(2017修订版)的规定。

1.1.2 药物 驻景丸加减方处方:楮实子、菟丝子、枸杞子、茺蔚子、木瓜、车前子、五味子、紫河车粉、寒水石、生三七,药物为颗粒剂,购于江阴天江药业有限公司。对照药为莱视汀(国食健字G20150015),由湖北思维康生物工程有限公司生产(规格为每粒0.35g)。莱视汀主要成分:叶黄素、β-胡萝卜素、葡萄糖酸锌,每100g含叶黄素2.20g、β-胡萝卜素

0.86 g、锌 1.50 g。

1.1.3 主要试剂及仪器 氢醌购自英国 Alfa Aesar 公司,活性氧自由基(ROS)、丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物研究所,Nrf2、血红素加氧酶-1(HO-1)、醌氧化还原酶-1(NQO-1)、p62 一抗购自英国 Abcam 公司,LC3 一抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司,IgG/HRP 二抗购自英国 Abcam 公司。酶标仪(美国 Synergy 公司),电泳仪、凝胶成像仪(美国 Bio-RAD 公司),超薄切片机(美国 Power Tome XL 公司),透射电镜(美国 FEI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模及给药方法 采用高脂肪饮食喂养 C57BL/6 小鼠 3 个月后,饮水中加入氢醌至终浓度为 8 g · L⁻¹,继续饲养 3 个月完成造模。驻景丸加减方颗粒剂低、中、高剂量对应生药量分别为:0.165 g · kg⁻¹、0.330 g · kg⁻¹、0.660 g · kg⁻¹,莱视町给药量为 0.1 g · kg⁻¹。将药物用蒸馏水溶解后灌胃,每天 1 次,持续 3 个月。

1.2.2 透射电镜观察 观察期满各组随机取 5 只小鼠处死,摘取眼球,用 25 g · L⁻¹戊二醛固定 24 h,沿视盘两侧切取 2 mm × 4 mm 大小球壁,10 g · L⁻¹的锇酸固定,用磷酸缓冲液冲洗,梯度丙酮脱水,环氧丙烷树脂浸透包埋,半薄定位后制作超薄切片,柠檬酸铅避光染色。采用透射电镜观察视网膜超微结构、摄片。小鼠视网膜色素上皮(RPE)下沉积物面积采用 ImageJ 软件计算,Bruch 膜厚度从图片直接测定。

1.2.3 ROS、MDA 含量测定 观察期满各组随机取 5 只小鼠处死,提取视网膜,将小鼠视网膜组织匀浆,3000 r · min⁻¹、4 ℃离心 10 min,取上清液用于检测。ROS 含量检测用 DCFH-DA 法,MDA 含量检测用 TBA 比色法,按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达 各组将剩余 5 只小鼠处死,提取视网膜、脉络膜,将视网膜、脉络膜组织匀浆后提取蛋白(Nrf2 另提取核蛋白),采用 BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白变性后取 50 μg 上样,电泳、转膜后加一抗(1:1000)4 ℃孵育过夜,再加兔二抗(1:5000),β-actin 为内参(核蛋白内参为 Lamin B),加入化学发光剂显影后,采用 ImageJ 软件进行条带灰度值分析。

1.3 统计学分析 本研究数据采用 GraphPad Prism 7 软件进行分析。数据以均数 ± 标准差表示,采用单因素方差分析进行组间比较。检验水准:α = 0.05。

2 结果

2.1 各组小鼠透射电镜下视网膜超微结构 各组小鼠透射电镜下视网膜超微结构见图 1。年龄对照组小鼠 Bruch 膜厚度基本正常,RPE 下沉积物较少;与年龄对照组相比,溶媒对照组 RPE 下沉积物面积显著增大、Bruch 膜明显增厚,差异均有统计学意义

(均为 $P < 0.01$)。与溶媒对照组相比,中药中、高剂量组 RPE 下沉积物面积减小、Bruch 膜厚度变薄,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$);与溶媒对照组相比,中药低剂量组和对照药物组 RPE 下沉积物面积也均减小,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),但 Bruch 膜厚度变化不明显(见表 1)。

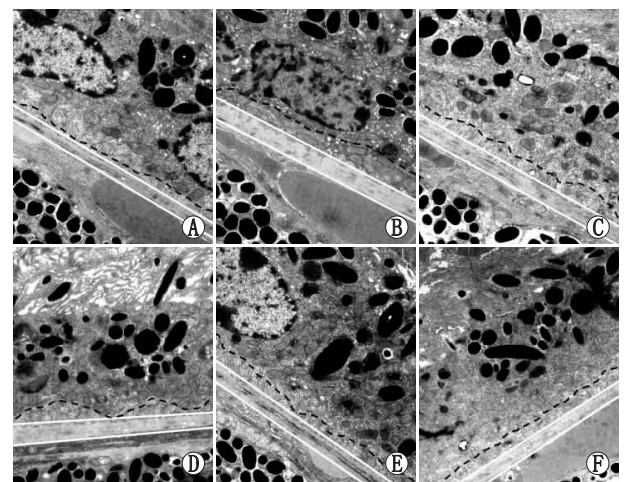


图 1 各组小鼠电镜下视网膜超微结构(×11 000)。A:年龄对照组;B:溶媒对照组;C:对照药物组;D:中药低剂量组;E:中药中剂量组;F:中药高剂量组。

表 1 各组小鼠 RPE 下沉积物面积和 Bruch 膜厚度比较

组别	RPE 下沉积物面积/(× 10 ³ μm ²)	Bruch 膜厚度/μm
年龄对照组	1.94 ± 0.22	0.40 ± 0.07
溶媒对照组	4.05 ± 0.47 ^{***}	0.64 ± 0.09 ^{***}
对照药物组	3.63 ± 0.42 [#]	0.61 ± 0.08
中药低剂量组	3.56 ± 0.38 [#]	0.59 ± 0.08
中药中剂量组	3.13 ± 0.35 ^{##}	0.54 ± 0.07 ^{##}
中药高剂量组	2.76 ± 0.29 ^{##}	0.49 ± 0.06 ^{##}

注:与年龄对照组相比,^{***} $P < 0.01$;与溶媒对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

2.2 各组小鼠视网膜 ROS、MDA 含量 各组小鼠视网膜 ROS、MDA 含量检测结果见表 2。与年龄对照组相比,溶媒对照组 ROS、MDA 含量明显升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$);与溶媒对照组相比,中药中、高剂量组 ROS、MDA 含量均显著降低(均为 $P < 0.01$),中药低剂量组和对照药物组 ROS、MDA 含量也均降低(均为 $P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠视网膜 ROS、MDA 含量比较

组别	ROS 含量/(fl · mg ⁻¹)	MDA 含量/(μmol · g ⁻¹)
年龄对照组	895.03 ± 31.76	5.76 ± 0.47
溶媒对照组	1375.41 ± 57.22 ^{***}	11.14 ± 0.99 ^{***}
对照药物组	1332.51 ± 44.06 [#]	10.63 ± 0.85 [#]
中药低剂量组	1301.74 ± 38.75 [#]	10.22 ± 0.78 [#]
中药中剂量组	1263.14 ± 33.26 ^{##}	9.16 ± 0.72 ^{##}
中药高剂量组	1216.78 ± 29.44 ^{##}	8.31 ± 0.67 ^{##}

注:与年龄对照组相比,^{***} $P < 0.01$;与溶媒对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;单位 fl · mg⁻¹表示每毫克蛋白的荧光强度。

2.3 Western blot 检测结果

2.3.1 各组小鼠视网膜细胞质、细胞核 Nrf2 蛋白表达情况 各组小鼠视网膜细胞质、细胞核 Nrf2 蛋白表达结果见图 2。与年龄对照组相比,溶媒对照组 Nrf2 蛋白在细胞质表达下调、细胞核表达上调(均为 $P < 0.05$);与溶媒对照组相比,中药中、高剂量组细胞质中 Nrf2 蛋白表达均显著下调,细胞核 Nrf2 蛋白表达均上调(均为 $P < 0.01$),中药低剂量组和对照药物组细胞质 Nrf2 蛋白表达下调,细胞核 Nrf2 蛋白表达上调(均为 $P < 0.05$)(见表 3)。

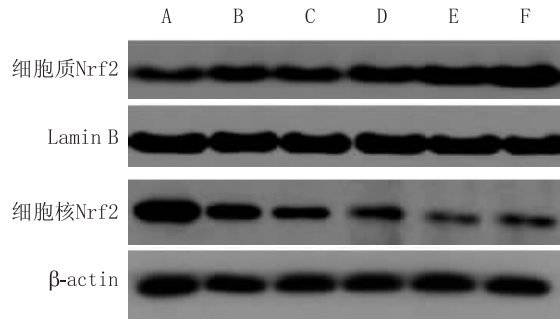


图 2 各组小鼠视网膜细胞质、细胞核中 Nrf2 蛋白表达情况 A: 年龄对照组;B: 溶媒对照组;C: 对照药物组;D: 中药低剂量组;E: 中药中剂量组;F: 中药高剂量组。

2.3.2 各组小鼠视网膜 HO-1、NQO-1、p62 和 LC3 II 蛋白表达情况 各组小鼠视网膜 HO-1、NQO-1、p62 和 LC3 II 蛋白表达结果见图 3。与年龄对照组相比,溶媒对照组 HO-1、LC3 II 蛋白表达均上调(均为 $P < 0.05$);与溶媒对照组相比,中药中、高剂量组 HO-1、NQO-1、p62 和 LC3 II 蛋白表达均显著上调(均为 $P < 0.01$),中药低剂量组 HO-1、p62 和 LC3 II

蛋白表达均上调(均为 $P < 0.05$),对照药物组 HO-1 和 LC3 II 蛋白表达均上调(均为 $P < 0.05$)(见表 4)。

表 3 各组小鼠视网膜细胞质、细胞核中 Nrf2 蛋白相对表达量比较

组别	相对表达量	
	细胞核中 Nrf2 蛋白	细胞质中 Nrf2 蛋白
年龄对照组	0.56 ± 0.03	1.08 ± 0.05
溶媒对照组	0.66 ± 0.04 [*]	0.77 ± 0.05 ^{**}
对照药物组	0.73 ± 0.04 [#]	0.70 ± 0.04 [#]
中药低剂量组	0.74 ± 0.04 [#]	0.68 ± 0.04 [#]
中药中剂量组	0.89 ± 0.05 ^{##}	0.43 ± 0.03 ^{##}
中药高剂量组	1.07 ± 0.06 ^{##}	0.35 ± 0.03 ^{##}

注:与年龄对照组相比,^{*} $P < 0.05$ 、^{**} $P < 0.01$;与溶媒对照组相比,[#] $P < 0.05$ 、^{##} $P < 0.01$ 。

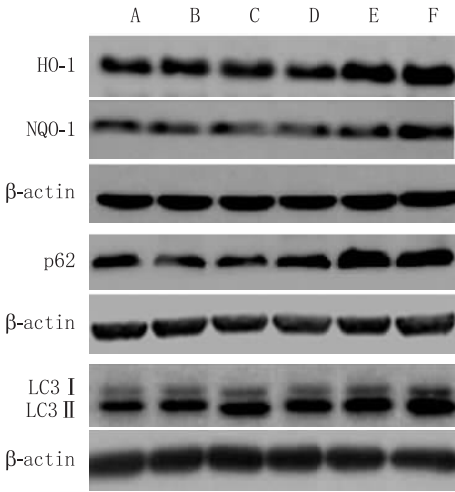


图 3 各组小鼠视网膜 HO-1、NQO-1、p62 和 LC3 II 蛋白表达情况 A: 年龄对照组;B: 溶媒对照组;C: 对照药物组;D: 中药低剂量组;E: 中药中剂量组;F: 中药高剂量组。

表 4 各组小鼠视网膜 HO-1、NQO-1、p62 和 LC3 II 蛋白相对表达量比较

组别	相对表达量			
	HO-1 蛋白	NQO-1 蛋白	p62 蛋白	LC3 II 蛋白
年龄对照组	0.66 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.55 ± 0.03	0.34 ± 0.02
溶媒对照组	0.75 ± 0.03 [*]	0.41 ± 0.02	0.53 ± 0.03	0.40 ± 0.02 [*]
对照药物组	0.83 ± 0.04 [#]	0.44 ± 0.03	0.54 ± 0.03	0.47 ± 0.03 [#]
中药低剂量组	0.84 ± 0.04 [#]	0.44 ± 0.03	0.65 ± 0.04 [#]	0.50 ± 0.04 [#]
中药中剂量组	0.96 ± 0.05 ^{##}	0.52 ± 0.04 ^{##}	0.88 ± 0.05 ^{##}	0.60 ± 0.04 ^{##}
中药高剂量组	1.03 ± 0.06 ^{##}	0.61 ± 0.04 ^{##}	0.90 ± 0.05 ^{##}	0.68 ± 0.04 ^{##}

注:与年龄对照组相比,^{*} $P < 0.05$;与溶媒对照组相比,[#] $P < 0.05$ 、^{##} $P < 0.01$ 。

3 讨论

大量研究表明,氧化损伤是 AMD 发病的关键始动因素,抗氧化治疗是防治干性 AMD 的主要研究方向。研究证实,药理剂量的抗氧化剂(含 β -胡萝卜素、维生素 C 和维生素 E 等)可阻止中、晚期 AMD 的进展^[6]。抗氧化维生素已被纳入了中国干性 AMD 治疗路径^[7]。

驻景丸加减方是临床治疗干性 AMD 的有效方

剂。本研究结果显示,驻景丸加减方能显著减少 RPE 下沉积物面积、抑制 Bruch 膜增厚,表明驻景丸加减方对干性 AMD 模型小鼠视网膜有保护作用。Nrf2 通路是人体重要的抗氧化防御性通路,在 AMD 的发病过程中起到重要作用。Nrf2 敲除小鼠视网膜出现了 AMD 样病理性改变^[8],激活 Nrf2 通路对氧化损伤的 ARPE-19 细胞和干性 AMD 模型动物视网膜有保护作用^[9-10]。现代药理学证实,子类中药多数有很强的抗氧化作用^[11-12],木瓜、山楂、三七的活

性成分也有抗氧化作用^[13-15],这些饮片都存在于驻景丸加减方中。人眼黄斑长时间接受光照,产生大量 ROS。ROS 可氧化 Keap1 上的半胱氨酸残基,促进 Nrf2 从 Keap1 上解离,Nrf2 进入细胞核内,与抗氧化反应元件结合,启动抗氧化酶和Ⅱ相解毒酶等基因的转录和翻译,增强细胞清除 ROS 的能力^[16]。

本研究结果显示,驻景丸加减方下调细胞质中 Nrf2 蛋白表达,上调细胞核中 Nrf2 蛋白表达,上调 HO-1、NQO-1 蛋白表达,减少 ROS、MDA 含量。研究表明,驻景丸加减方可促进 Nrf2 核转位,启动下游靶蛋白 HO-1、NQO-1 表达,增强抗氧化能力,减少视网膜 ROS、MDA 含量,从而起到保护 AMD 模型小鼠视网膜的作用。本研究采用的对照药物也有促进 Nrf2 核转位、上调 HO-1 蛋白表达和减少视网膜中 ROS、MDA 含量的作用,这与相关文献报道结果一致^[17]。

自噬在 RPE 细胞稳态中起着至关重要的作用,与 AMD 发病密切相关^[18]。ROS 是自噬重要的诱导剂^[19],抗氧化药物可减少 ROS 生成、增强自噬,对 ARPE-19 细胞起保护作用^[20]。本研究结果显示,驻景丸加减方可上调自噬调节蛋白 p62 和激活标志蛋白 LC3 II 的表达,表明驻景丸加减方可增强自噬,加快清除氧化损伤的细胞器,从而减轻 AMD 模型小鼠视网膜进一步损伤。

综上所述,驻景丸加减方可激活 Nrf2 通路,上调下游靶基因酶 HO-1、NQO-1 表达,快速清除 ROS、MDA;并可增强自噬,加快清除氧化损伤的细胞器。本研究证实,驻景丸加减方对干性 AMD 模型小鼠视网膜有保护作用。

参考文献

[1] BAKRI S J, THORNE J E, HO A C, EHLERS J P, SCHOENBERGER S D, YEH S, *et al.* Safety and efficacy of Anti-vascular endothelial growth factor therapies for neovascular Age-Related macular degeneration: a report by the American academy of ophthalmology[J]. *Ophthalmology*, 2019, 126(1): 55-63.

[2] 陈达夫. 中医眼科六经法要[M]. 成都:四川人民出版社,1978: 62-71.

[3] CHEN D F. The six meridians of traditional Chinese ophthalmology[M]. Chengdu: Sichuan People's Publishing House, 1978: 62-71.

[4] 侯艳杰,石方. 驻景丸加减在眼底病中的应用[J]. 中医学报, 2005, 23(3): 488, 490.

[5] HOU Y J, DAN F. Application of Zhujingwan-Jiajianfang in treatment of the ocular fundus disease[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2005, 23(3): 488, 490.

[6] 曹勤,阮瑞强,李恒. 中医治疗老年性黄斑变性的疗效观察[J]. 广西中医药, 2003, 26(2): 18-19.

[7] CAO Q, RUAN R Q, LI H. An observation on the curative effect of traditional Chinese medicine on age-related macular degeneration[J]. *Guangxi J Tradit Chin Med*, 2003, 26(2): 18-19.

[8] 邓亚平,谢学军. 驻景丸加减治疗老年性黄斑变性的临床初步观察[J]. 成都中医药大学学报, 1989, 12(2): 25.

[9] DENG Y P, XIE X J. A clinical observation on the treatment of age-related macular degeneration with Zhujingwan-jiajianfang[J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med*, 1989, 12(2): 25.

[10] Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supple-

mentation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8 [J]. *Arch Ophthalmol*, 2001, 119(10): 1417-1436.

[7] 中华医学会眼科学分会眼底病学组. 中国老年性黄斑变性临床诊断治疗路径[J]. 中华眼底病杂志, 2013, 29(4): 343-355.

[8] Chinese Ophthalmological Society Ocular Fundus Diseases Society. Clinical pathway of age-related macular degeneration in China[J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2013, 29(4): 343-355.

[9] ZHAO Z, CHEN Y, WANG J, STERNBERG P, FREEMAN M L, GROSSNIKLAUS H E, *et al.* Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19456.

[10] 杨艳,于海涛,杭丽,丁淑华,徐新荣. 槲皮素磷脂复合物激活 Nrf2 信号通道增强对氧化损伤 ARPE-19 细胞的保护作用[J]. 眼科新进展, 2016, 36(10): 923-927, 931.

[11] YANG Y, YU H T, HANG L, DING S H, XU X R. Protective effects of quercetin phospholipid complex on oxidative injury in ARPE-19 cells associated with activation of Nrf2 pathway[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2016, 36(10): 923-927, 931.

[12] SHAO Y, YU H, YANG Y, LI M, HANG L, XU X. A solid dispersion of quercetin shows enhanced Nrf2 activation and protective effects against oxidative injury in a mouse model of dry Age-Related macular degeneration[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1479571.

[13] 何志坚,施旻,刘海云. 菟丝子提取物对 D-半乳糖所致衰老小鼠的抗衰老作用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(19): 5444-5446.

[14] HE Z J, SHI M, LIU H Y. Anti-aging effects of Cuscuta chinensis extract in D-galactose induced aging mice[J]. *Chin J Gerontol*, 2015, 35(19): 5444-5446.

[15] 祁小妮,隋英,李振亮,党金宁,刘瑞林. 响应曲面优化菟丝子多糖提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国酿造, 2015, 34(8): 35-38.

[16] QI X N, SUI Y, LI Z L, DANG J N, LIU R L. Optimization of polysaccharide extraction technology from Cuscuta chinensis by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. *Chin Brew*, 2015, 34(8): 35-38.

[17] 胡华平,韩雅莉,张峰. 木瓜提取物抗氧化性质的初步研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 645-648.

[18] HU H P, HAN Y L, ZHANG F. Preliminary study on antioxidant effects of Chaenomeles sinensis fruit extracts[J]. *Food Sci*, 2008, 29(12): 645-648.

[19] 高鹏飞,尹爱武,田润,麻黎伟,陈婷. 山楂多酚类物质的提取及其抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(19): 10276-10278.

[20] GAO P F, YIN A W, TIAN R, MA L W, CHEN T. Extraction technology of polyphenols in Crataegus pinnatifida and its antioxidant activity[J]. *J Anhui Agric Sci*, 2012, 40(19): 10276-10278.

[21] 黄积武,李创军,杨敬芝,马洁,张东明. 三七叶的化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2017, 48(21): 4381-4386.

[22] HUANG J W, LI C J, YANG J Z, MA J, ZHANG D M. Chemical constituents from leaves of Panax notoginseng and anti-oxidant activity[J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2017, 48(21): 4381-4386.

[23] LI R, JIA Z, ZHU H. Regulation of Nrf2 signaling[J]. *React Oxyg Species (Apex)*, 2019, 8(24): 312-322.

[24] FREDE K, EBERT F, KIPP A P, SCHWERTLE T, BALDERMANN S. Lutein activates the transcription factor Nrf2 in human retinal pigment epithelial cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(29): 5944-5952.

[25] KAARNIRANTA K, TOKARZ P, KOSKELA A, PATERNO J, BLASIAK J. Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age-related macular degeneration[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2017, 33(2): 113-128.

[26] LI L L, TAN J, MIAO Y Y, LEI P, ZHANG Q. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(5): 615-621.

[27] CHANG C C, HUANG T Y, CHEN H Y, HUANG T C, LIN L C, CHANG Y J, *et al.* Protective effect of melatonin against oxidative stress-induced apoptosis and enhanced autophagy in human retinal pigment epithelium cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 9015765.

Protection of modified prescription of Zhujiangwan on the retina of mice with dry age-related macular degeneration

KE Lingling¹, ZHOU Xin², ZHANG Yuanzhong³, LIU Yulu², ZHONG Lu², SUN Huaping², HANG Li², JIN Qingzi², XU Xinrong²

1. Department of Ophthalmology, Jiujiang Hospital of Chinese Medicine, Jiujiang 332000, Jiangxi Province, China

2. Department of Ophthalmology, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine (the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine), Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

3. Department of Ophthalmology, Nanjing Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210022, Jiangsu Province, China

Corresponding author: XU Xinrong, E-mail: xinrong_xu@aliyun.com

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of modified prescription of Zhujiangwan on the retina of mice with dry age-related macular degeneration (AMD) and the involvements of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) pathway and autophagy. **Methods** Ninety 6-month-old male C57BL/6 mice were randomly divided into 6 groups: aging control group (normal diet), vehicle control group (high-fat diet + hydroquinone), drug control group (high-fat diet + hydroquinone + Laishiding), and Chinese herbs groups (high-fat diet + hydroquinone + low, medium and high dose of modified prescription of Zhujiangwan), with 15 mice in each group. Main ingredients of Laishiding included 2.20 g lutein, 0.86 g β -carotene, and 1.50 g zinc gluconate per 100 g. Drugs were given once daily through intragastric administration for 3 months. At the end of the experimental period, animals were sacrificed for collecting eyeballs. The sediment area under RPE and Bruch membrane (BrM) thickness were evaluated by electron microscopy. ROS and MDA levels of mouse retina were measured. In addition, protein expressions of Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), quinone oxidoreductase-1 (NQO-1), p62 and LC3 of mouse retina were detected by Western blot. **Results** Compared with the aging control group, significantly increased sediment area under RPE and BrM were detected in the vehicle control group (both $P < 0.01$). Compared with the vehicle control group, the sediment area under RPE reduced and the BrM thickness were significantly lower in Chinese herbs groups with the medium and high dose of modified prescription of Zhujiangwan (all $P < 0.01$). In addition, the sediment area under RPE also significantly decreased in Chinese herbs group with the low dose of modified prescription of Zhujiangwan ($P < 0.05$), while the change of BrM thickness was not obvious. Compared with the vehicle control group, ROS and MDA levels significantly decreased in Chinese herbs group with three doses of modified prescription of Zhujiangwan (low dose group: $P < 0.05$, medium and high dose groups: $P < 0.01$). Compared with the vehicle control group, the protein level of Nrf2 was significantly down-regulated in cytoplasm and up-regulated in nucleus in Chinese herbs group with the medium and high doses of modified prescription of Zhujiangwan (all $P < 0.01$), and the same trends were observed in the low dose group and positive drug group as well ($P < 0.05$). Protein expressions of HO-1, NQO-1, p62 and LC3 II were up-regulated in Chinese herbs group with the medium and high doses of modified prescription of Zhujiangwan (all $P < 0.01$), and those of HO-1, p62 and LC3 II were up-regulated in the low dose group (all $P < 0.05$). Meanwhile, protein levels of HO-1 and LC3 II were up-regulated in positive drug group ($P < 0.05$). **Conclusion** The modified prescription of Zhujiangwan can activate the Nrf2 pathway and up-regulate target genes HO-1 and NQO-1, thus quickly eliminating ROS and MDA. In addition, it also enhances autophagy and accelerates the removal of oxidative damage organelles, and thus plays a protective role in retina of mice with dry age-related macular degeneration.

[Key words] age-related macular degeneration; modified prescription of Zhujiangwan; oxidative damage; Nrf2 pathway; autophagy