·实验论著·

决明子提取物减轻糖皮质激素性高眼压大鼠视网膜神经节细胞损伤的机制研究

张丽阳,闫海波,曹 慧,李 彦,杨 华,李新民,王琰琛,王保君

引用:张丽阳,闫海波,曹慧,等. 决明子提取物减轻糖皮质激素性高眼压大鼠视网膜神经节细胞损伤的机制研究. 国际眼科杂志, 2026,26(12):2085-2091.

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(No.LHGJ20230515);新乡市科技攻关计划项目(No.GG2021030)

作者单位:(453100)中国河南省卫辉市,河南医药大学第一附属医院眼科
作者简介:张丽阳,女,在读硕士研究生,研究方向:青光眼、屈光不正的发病机制及临床研究。
通讯作者:王保君,女,硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:青光眼、屈光不正的发病机制及临床研究. drwbj@163.com

收稿日期: 2026-06-17 修回日期: 2026-10-09

摘要

目的:探讨决明子提取物(CSE)对糖皮质激素性高眼压(GIOH)大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)损伤的保护作用,并观察视网膜组织 NLRP3 相关炎症-焦亡指标的变化。

方法:将 36 只成年雄性 SD 大鼠随机分为对照组、GIOH 组、低 CSE 组[50 mg/(kg·d)]和高 CSE 组[450 mg/(kg·d)],每组 9 只 9 眼。除对照组外,其余各组采用结膜下注射糖皮质激素建立 GIOH 模型。造模后 14 d 完成 IOP 测量后,低 CSE 组和高 CSE 组分别给予相应剂量 CSE 灌胃,连续 14 d。于造模前及造模后 7、14、21、28 d 测量眼压(IOP);采用 Brn3a 免疫荧光染色检测 RGCs 数量;免疫组织化学染色观察视网膜组织中 NLRP3、Cleaved Caspase-1 (p20)和 GSDMD-N 的表达与定位;Western blot 检测视网膜组织中 NLRP3、Cleaved Caspase-1 (p20)和 GSDMD-N 蛋白相对表达水平;ELISA 检测 IL-1β 和 IL-18 水平。

结果:与对照组相比,GIOH 组大鼠 IOP 显著升高,Brn3a 阳性 RGCs 数量明显减少,视网膜组织中 NLRP3、Cleaved Caspase-1 (p20)和 GSDMD-N 表达增强,IL-1β 和 IL-18 水平升高(均 $P<0.05$)。与 GIOH 组相比,低 CSE 组和高 CSE 组大鼠 IOP 显著降低,Brn3a 阳性 RGCs 数量明显增加,视网膜组织中 NLRP3、Cleaved Caspase-1 (p20)和 GSDMD-N 表达下降,IL-1β 和 IL-18 水平降低(均 $P<0.05$)。与低 CSE 组相比,高 CSE 组 IOP 更低,Brn3a 阳性 RGCs 数量更多,NLRP3 相关炎症-焦亡指标水平更低(均 $P<0.05$)。

结论:CSE 可降低 GIOH 大鼠 IOP 并减轻 RGCs 损伤,其作用可能与视网膜组织中 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 相关焦亡信号下调有关。

关键词:决明子提取物;糖皮质激素性高眼压;视网膜神经节细胞;NLRP3;细胞焦亡;神经保护
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2026.12.04

Mechanism of cassia seed extract in alleviating retinal ganglion cell injury in rats with glucocorticoid - induced ocular hypertension

Zhang Liyang, Yan Haibo, Cao Hui, Li Yan, Yang Hua, Li Xinmin, Wang Yanchen, Wang Baojun

Foundation items: Henan Provincial Medical Science and Technology Tackling Program (No. LHGJ20230515); Xinxiang Science and Technology Tackling Program (No.GG2021030)
Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Henan Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China
Correspondence to: Wang Baojun. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Henan Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China. drwbj@163.com
Received:2026-06-17 Accepted:2026-10-09

Abstract

• AIM: To investigate the protective effect of cassia seed extract (CSE) against retinal ganglion cells (RGCs) injury in rats with glucocorticoid-induced ocular hypertension (GIOH) and to evaluate changes in retinal NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3)-related inflammation and pyroptosis markers.

• METHODS: Thirty-six adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into the control, GIOH, low-dose CSE [50 mg/(kg·d)], and high-dose CSE [450 mg/(kg·d)] groups, with 9 rats (9 eyes) in each group. GIOH was induced by subconjunctival glucocorticoid injection in all groups except the control group. After intraocular pressure (IOP) measurement on day 14 after modeling, rats in the low- and high-dose CSE groups received the corresponding doses of CSE by gavage for 14 consecutive days. IOP was measured before modeling and on days 7, 14, 21, and 28 after modeling. RGCs were quantified by Brn3a immunofluorescence staining. The expression and localization of NLRP3, Cleaved Caspase-1 (p20), and GSDMD-N in the retina were examined by immunohistochemistry, and their relative protein expression levels were determined by Western blot. Retinal interleukin (IL)-1β and IL-18 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

• RESULTS: Compared with the control group, the GIOH group showed significantly increased IOP, a reduced number of Brn3a-positive RGCs, increased retinal expression of NLRP3, Cleaved Caspase-1 (p20), and

GSDMD-N, and elevated IL-1β and IL-18 levels (all $P<0.05$). Compared with the GIOH group, both the low- and high-dose CSE groups showed significantly decreased IOP, increased numbers of Brn3a-positive RGCs, decreased retinal expression of NLRP3, Cleaved Caspase-1 (p20), and GSDMD-N, and reduced IL-1β and IL-18 levels (all $P<0.05$). Compared with the low-dose CSE group, the high-dose CSE group showed lower IOP, a greater number of Brn3a-positive RGCs, and lower levels of NLRP3-related inflammation and pyroptosis markers (all $P<0.05$).

• CONCLUSION: CSE reduces IOP and attenuates RGCs injury in rats with GIOH. These protective effects may be associated with the downregulation of NLRP3/Caspase-1/GSDMD-related pyroptotic signaling in retinal tissue.

• KEYWORDS: cassia seed extract; glucocorticoid-induced ocular hypertension; retinal ganglion cells; NLRP3; pyroptosis; neuroprotection

Citation: Zhang LY, Yan HB, Cao H, et al. Mechanism of cassia seed extract in alleviating retinal ganglion cell injury in rats with glucocorticoid-induced ocular hypertension. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2026, 26(12): 2085-2091.

0 引言

糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)被广泛应用于眼科及全身的多种炎症性、免疫性疾病的治疗,但其长期或不规范使用可导致眼压(intraocular pressure, IOP)升高,部分患者可进展为糖皮质激素性高眼压(glucocorticoid-induced ocular hypertension, GIOH),甚至继发激素性青光眼[1]。GIOH 的发生主要与糖皮质激素诱导的小梁网细胞功能异常、细胞外基质沉积及房水流出通道改变有关,导致房水流出阻力增加和 IOP 升高[1-3]。持续升高的 IOP 可进一步增加视神经损伤风险,而视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)及其轴突损伤是青光眼性视神经损害的重要病理基础[4]。因此,在控制 IOP 的同时关注 RGCs 损伤,对于 GIOH 向激素性青光眼进展的防治具有重要意义。

IOP 升高是 GIOH 导致视网膜神经损伤的重要危险因素。既往青光眼相关研究表明,RGCs 损伤除与机械应力、轴浆运输障碍及缺血缺氧有关外[5-6],还涉及氧化应激、神经炎症和程序性细胞死亡等过程[7-9]。细胞焦亡(pyroptosis)是一种炎症性程序性细胞死亡,其典型过程包括炎症小体活化、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Cysteine-aspartic protease-1, Caspase-1)激活、消皮素 D(gasdermin D, GSDMD)裂解及白细胞介素-1β(interleukin-1 β, IL-1β)和白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)成熟释放[10]。其中,活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 p20 亚基[cleaved cysteine-aspartic protease-1 p20 subunit, Cleaved Caspase-1 (p20)]是 Caspase-1 经剪切活化后形成的 p20 亚基,可反映 Caspase-1 的活化状态;Gasdermin D N 端片段(N-terminal fragment of gasdermin D, GSDMD-N)是 GSDMD 被活化 Caspase-1 裂解后释放的 N 端片段,可介导细胞膜孔形成并执行细胞焦亡。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症小体是介导焦亡反应的重要分子平台,已有研究提示其在青光眼及高 IOP 相关视网膜损伤中参与局部炎症放大和 RGCs 损伤[11-12]。然而,该炎症-焦亡相关信号在 GIOH 相关视网膜损伤中的变化及其干预价值仍有待进一步研究。

决明子提取物(cassia seed extract, CSE)含有蒽醌类、萘并吡喃酮类、多糖、脂肪酸等多种活性成分,并具有抗炎、抗氧化、调脂、改善糖脂代谢和神经保护等药理作用[13]。既往研究发现,CSE 可降低 DBA/2J 青光眼小鼠 IOP[14]。但其在 GIOH 中的作用及对高 IOP 相关 RGCs 损伤的影响尚缺乏研究。因此,本研究建立 GIOH 大鼠模型,观察不同剂量 CSE 干预后 IOP、RGCs 数量以及视网膜组织 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 相关炎症-焦亡指标的变化,以评价 CSE 对 GIOH 的干预作用,并探索其与 RGCs 损伤改善之间的可能关联。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(8 周龄,体质量 180-220 g)由斯贝福生物技术有限公司提供。实验动物生产许可证:SCXK(京)2019-0010。动物饲养于河南医药大学第一附属医院实验动物中心,饲养环境温度 22-25 ℃,相对湿度 50%-70%,采用 12 h 光/暗循环(8:00-20:00 光照),自由摄食标准啮齿类饲料和饮用纯净水。所有动物适应性饲养 1 wk,期间每日监测其体质量及一般状态,确认健康且无不良反应后即可纳入实验。动物处理遵守《实验动物管理条例》(2017 修订版)的规定。动物实验经河南医药大学第一附属医院伦理委员会审核批准(批号:EC-025-62)。

1.1.2 主要试剂与仪器 地塞米松磷酸钠注射液(规格:1 mL:5 mg)购自遂成药业股份有限公司。CSE 购自西安聚生原生物科技有限公司(批号:20250311)。厂家质量检测报告显示,该批次 CSE 总蒽醌含量为 4.06%,其中大黄素含量为 0.68%;大黄素属于蒽醌类化合物,是总蒽醌中的代表性成分之一,约占总蒽醌含量的 16.7%。铅、汞等重金属检测结果符合质量标准。实验前根据大鼠体质量以蒸馏水配制成相应浓度,现配现用。兔源抗 Brn3a 抗体购自英国 Abcam 公司;NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)、GSDMD-N、GAPDH 抗体及相应二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;Alexa Fluor 488 标记驴抗兔 IgG 购自美国 Invitrogen 公司;DAPI 购自德国 Sigma 公司;IL-1β、IL-18 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。主要仪器包括眼压计(芬兰 Icare 公司)、动物呼吸麻醉机(中国瑞沃德公司)、倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)和冰冻切片机(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型建立及给药 采用随机数字表法将 36 只 SD 大鼠分为对照组、GIOH 组、低 CSE 组和高 CSE 组,每组 9 只 9 眼,均以右眼作为实验眼。除对照组外,其余各组参考既往糖皮质激素诱导高 IOP 动物模型研究,采用右眼结膜下注射地塞米松磷酸钠注射液的方法建立 GIOH 模型[15-16]。具体操作为:大鼠经异氟烷吸入麻醉后,眼部常规消毒,于右眼结膜下注射 5 g/L 地塞米松磷酸钠注射液 0.03 mL,隔日 1 次,连续 28 d;对照组右眼结膜下注射等体积生理盐水。参考既往激素性高 IOP 动物

模型判定标准,并结合本实验预实验结果,以造模 7 d 后右眼 IOP>20 mmHg 且较基线明显升高作为造模成功标准[17]。CSE 给药剂量参考 Wang 等[18]在大鼠模型中采用 50、150、450 mg/kg CSE 灌胃的研究,并结合本研究预实验结果,选择 50、450 mg/(kg·d)分别作为低、高剂量。造模后 14 d 完成 IOP 测量后,低、高 CSE 组开始相应剂量灌胃,每日 1 次,连续 14 d;对照组和 GIOH 组同期给予等体积溶剂。

1.2.2 IOP 测量 采用回弹式眼压计测量各组大鼠右眼 IOP 值。测量时间点为造模前及造模后 7、14、21、28 d。其中,造模后 14 d IOP 测量完成后开始 CSE 干预,造模后 21、28 d 分别对应 CSE 干预 7、14 d。为减少昼夜节律对 IOP 结果的影响,每次检测均安排在相同时间段进行。测量时轻柔固定大鼠,避免压迫眼球及眼睑。每只眼连续测量 6 次,仪器显示可信结果后取平均值作为该时间点 IOP 值。

1.2.3 取材及组织处理 末次 IOP 检测结束后,大鼠经腹腔注射过量戊巴比妥钠处死,迅速摘除右眼眼球。每组 9 只眼球随机分为 3 份,每份 3 只;3 只眼球置于 4%多聚甲醛中固定,用于免疫组织化学染色;3 只眼球用于免疫荧光染色;其余 3 只于冰上分离视网膜组织,液氮速冻后保存于-80 ℃,用于 Western blot 和 ELISA 检测。各终点检测均以单只动物作为独立生物学重复(每组$n=3$)。

1.2.4 Brn3a 免疫荧光染色检测 RGCs 数量 取 4%多聚甲醛固定后的眼球,依次置于 15%和 30%蔗糖溶液中梯度脱水,最佳切割温度包埋剂(optimal cutting temperature compound,OCT)包埋后制备 10 μm 厚视网膜冰冻切片。为减少取样偏倚,所有眼球均尽量按照统一方向进行 OCT 包埋和冰冻切片,并选取经过视神经乳头区域的中央连续切片用于后续分析。切片室温复温后,经 0.3% Triton X-100通透处理,5%驴血清室温封闭,加入兔源抗 Brn3a 抗体(1∶200),4 ℃孵育过夜。次日磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)洗涤后,加入 Alexa Fluor 488 标记二抗(1∶1 000)避光孵育 2 h,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)复染细胞核,抗荧光淬灭封片剂封片。以神经节细胞层(ganglion cell layer,GCL)为观察区域,在相同放大倍数下采集图像。每张切片选取 5 个非重叠视野,采用 ImageJ 软件计数 Brn3a 阳性细胞并取平均值作为该动物的 RGCs 计数。为便于组间比较,以对照组平均计数为 1,对各动物 Brn3a 阳性 RGCs 计数进行归一化,以相对数量表示。

1.2.5 免疫组织化学染色 取 4%多聚甲醛固定后的右眼眼球,经常规脱水、石蜡包埋后制备厚度为 4 μm 的连续切片。切片经脱蜡、水化后进行抗原修复,随后以 3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性,血清封闭后分别加入 NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)和 GSDMD-N 一抗(稀释比例均为 1∶200),4 ℃孵育过夜。次日经 PBS 洗涤后加入相应二抗孵育,3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine,DAB)显色,苏木精复染,脱水透明后中性树胶封片。采用普通光学显微镜观察视网膜组织中 NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)及 GSDMD-N 的表达情况,阳性染色呈棕黄色。各组在相同放大倍数下采集 GCL 及邻近内层视网膜区域图像,每只动物选取 3 张结构完整的切片,每张切片选取 5 个非重叠视野进行分析。采用 Image J 软件在统一阈值条件下测定阳性染色平均光密度值(average optical density,AOD),取平均值作为该样本结果。图像采集及定量分析由不知晓分组信息的研究者完成。

1.2.6 Western blot 取各组大鼠右眼视网膜组织,加入含蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀裂解液(radioimmunoprecipitation assay buffer,RIPA)充分裂解,离心后收集上清。采用 BCA 法测定总蛋白浓度。取等量蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离,并转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜经 5%脱脂奶粉或牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)封闭后,分别加入 NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)、GSDMD-N 一抗(均1∶1 000)及 GAPDH 一抗(1∶5 000),4 ℃孵育过夜。次日加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记二抗孵育,增强化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL)显影。采用 ImageJ 软件分析目的蛋白条带灰度值,并以 GAPDH 作为内参进行归一化处理。

1.2.7 ELISA 检测 取各组大鼠右眼视网膜组织,加入预冷 PBS 制备组织匀浆,4 ℃离心后收集上清。按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1β 和 IL-18 含量。各样本设复孔,使用酶标仪于 450 nm 波长处读取吸光度值,并根据标准曲线计算样本浓度。同期采用 BCA 法测定样本总蛋白浓度,IL-1β 和 IL-18 水平以 pg/mg 蛋白表示。

统计学分析:采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较前先进行正态性和方差齐性检验;符合正态分布且方差齐者采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。不同时间点 IOP 变化采用重复测量数据的方差分析。若不满足球形假设,则采用 Greenhouse-Geisser 法校正。存在显著效应时,进一步采用 LSD-t 检验进行两两比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CSE 降低 GIOH 大鼠 IOP 重复测量方差分析显示,Mauchly 球形度检验不满足球形假设($W=0.530$,$P=0.023$),经 Greenhouse-Geisser 法校正后,各组 IOP 存在显著时间效应($F_{时间}=2463.116$,$P<0.001$)、组间效应($F_{组间}=2292.378$,$P<0.001$)及时间×组间交互效应($F_{交互}=323.598$,$P<0.001$)。造模前,各组大鼠 IOP 比较差异无统计学意义($P>0.05$);造模后 7、14 d,各造模组 IOP 均显著高于对照组(均 $P<0.05$),且所有造模大鼠均达到预设模型判定标准,造模成功率为 100%。造模后 14 d 完成 IOP 测量后开始 CSE 干预;造模后 21、28 d,与 GIOH 组相比,低 CSE 组和高 CSE 组 IOP 均显著降低,且高 CSE 组低于低 CSE 组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 1。

2.2 CSE 减轻 GIOH 大鼠 RGCs 损伤 Brn3a 免疫荧光染色显示,对照组大鼠视网膜 GCL 中 Brn3a 阳性 RGCs 排列较整齐,细胞数量较多;GIOH 组 Brn3a 阳性细胞明显减少,排列稀疏,提示高 IOP 可导致 RGCs 损伤。与 GIOH 组相比,低 CSE 组和高 CSE 组 Brn3a 阳性 RGCs 数量均有所增加,其中高 CSE 组改善更为明显。定量分析显示,与对照组相比,GIOH 组 Brn3a 阳性 RGCs 数量显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$);与 GIOH 组相比,低 CSE 组和高

CSE 组 Brn3a 阳性 RGCs 数量明显增加,且高 CSE 组高于低 CSE 组,差异有统计学意义(均 $P<0.01$),见表 2,图 1。

2.3 CSE 减弱 GIOH 大鼠视网膜 NLRP3 相关细胞焦亡蛋白免疫阳性表达　免疫组织化学染色显示,NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)和 GSDMD-N 阳性表达主要分布于视网膜 GCL 及邻近内层视网膜区域,阳性染色呈棕黄色。对照组上述蛋白表达较弱;GIOH 组阳性染色明显增强,提示 GIOH 大鼠视网膜中焦亡相关蛋白表达增加。CSE 干预后,NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)和 GSDMD-N阳性染色均较 GIOH 组减弱。定量分析显示,与对照组相比,GIOH 组 NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)和 GSDMD-N 平均光密度值显著升高(均 $P<0.01$);与 GIOH 组相比,低 CSE 组和高 CSE 组上述指标均明显降低,且高 CSE 组低于低 CSE 组(均 $P<0.05$),见表 3,图 2。

2.4 CSE 下调 GIOH 大鼠视网膜 NLRP3 相关细胞焦亡蛋白表达　Western blot 结果显示,与对照组相比,GIOH 组大鼠视网膜组织中 NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)和 GSDMD-N 蛋白表达水平均显著升高,差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。与 GIOH 组相比,低 CSE 组和高 CSE 组大鼠视网膜组织中 NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)及 GSDMD-N 蛋白表达水平明显下降,且高 CSE 组低于低 CSE 组,差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。上述结果提示,GIOH 大鼠视网膜组织中 NLRP3 相关细胞焦亡蛋白表达上调,而 CSE 干预可下调相关蛋白表达,见表 4,图 3。

2.5 CSE 降低 GIOH 大鼠视网膜焦亡相关炎症因子水平　ELISA 检测结果显示,与对照组相比,GIOH 组大鼠视网膜组织中 IL-1β 和 IL-18 水平显著升高(均 $P<0.05$),提示 GIOH 可诱导视网膜局部炎症反应增强。与 GIOH 组相比,低 CSE 组和高 CSE 组 IL-1β、IL-18 水平均明显降低,且高 CSE 组低于低 CSE 组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。结果提示,CSE 可减轻 GIOH 大鼠视网膜焦亡相关炎症因子释放,见表 5。

3 讨论

本研究采用结膜下注射糖皮质激素建立 GIOH 大鼠模型,结果显示,GIOH 组 IOP 持续升高,Brn3a 阳性 RGCs 数量减少,视网膜组织 NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)、GSDMD-N 表达及 IL-1β、IL-18 水平均升高;CSE 干预后上述改变均得到不同程度改善,且高剂量组作用更明显。上述结果提示,CSE 干预后 GIOH 相关 RGCs 损伤减轻,同时伴随 IOP 降低及视网膜组织 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 相关炎症-焦亡指标下降。

既往研究已提示 CSE 具有一定抗青光眼潜力。Horng 等[14]在 DBA/2J 小鼠青光眼模型中发现,CSE 可降低 IOP,并改善房水乳酸脱氢酶等损伤相关指标。另有研究采用 50、150、450 mg/kg CSE 干预糖尿病大鼠,观察到氧化应激及代谢异常改善[18]。本研究中,低、高剂量 CSE 均

表 1　各组大鼠造模及 CSE 干预期间 IOP 比较　($\bar{x}\pm s$,mmHg)

组别	n	造模前	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 21 d	造模后 28 d
对照组	9	15.33±0.87	14.67±0.71	14.78±0.83	15.33±0.71	15.33±0.71
GIOH 组	9	14.67±0.71	36.89±1.27[a]	36.89±1.05[a]	35.56±0.73[a]	36.44±0.88[a]
低 CSE 组	9	14.78±0.83	36.11±1.05[a]	36.44±1.13[a]	33.67±0.50[a,c]	30.44±0.53[a,c]
高 CSE 组	9	15.00±1.00	36.33±0.87[a]	36.67±1.23[a]	30.78±0.83[a,c,e]	28.22±0.67[a,c,e]

注:[a]$P<0.05$ *vs* 对照组;[c]$P<0.05$ *vs* GIOH 组;[e]$P<0.05$ *vs* 低 CSE 组。

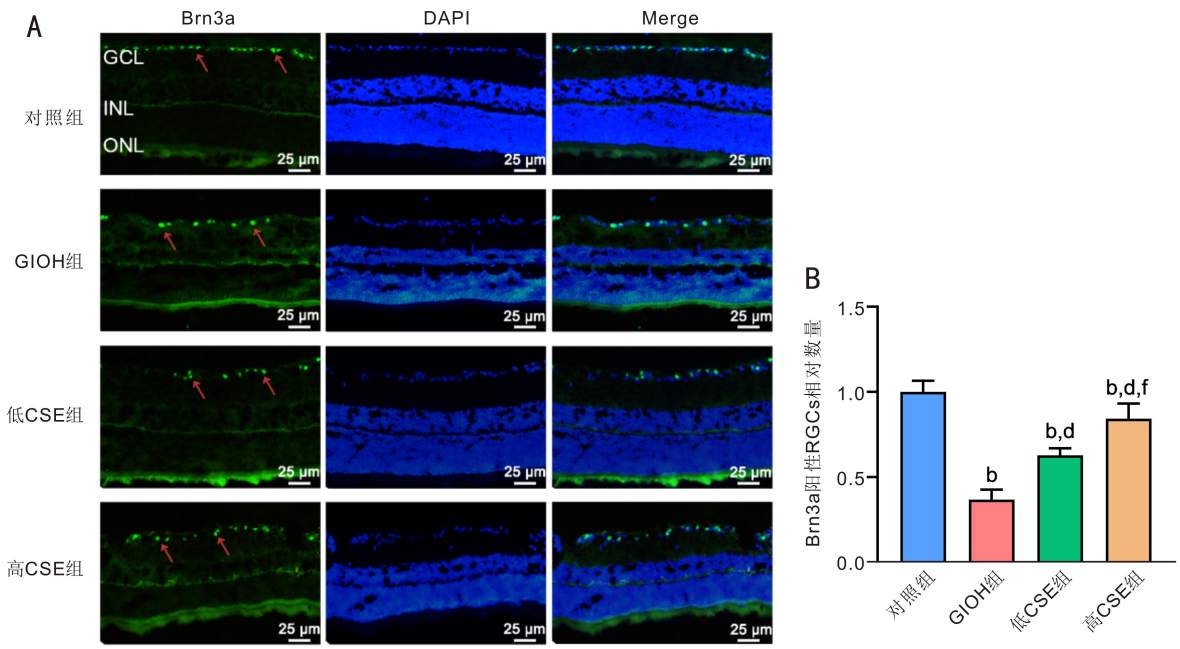


图 1　各组大鼠视网膜 Brn3a 免疫荧光染色结果　A:免疫荧光染色图,Brn3a 标记 RGCs(绿色),DAPI 染色细胞核(蓝色),红色箭头指向 Brn3a 阳性 RGCs;GCL:神经节细胞层;INL:内核层;ONL:外核层;B:Brn3a 阳性 RGCs 相对数量统计图;[b]$P<0.01$ *vs* 对照组;[d]$P<0.01$ *vs* GIOH 组;[f]$P<0.01$ *vs* 低 CSE 组。

可降低 GIOH 大鼠 IOP，且高剂量作用更明显，与 Horng 等[14]的研究结果基本一致。尽管两项研究所采用的动物种属和模型不同，但均观察到了 CSE 干预后的 IOP 下降，进一步支持其潜在的降 IOP 作用。本研究所用 CSE 总蒽醌含量为 4.06%，其中大黄素含量为 0.68%。大黄素具有抗炎、抗氧化等药理活性[19]，但由于本研究未进行大黄素单体及成分-效应验证，尚不能将 CSE 的上述作用直接归因于该成分。

RGCs 及其轴突的进行性丢失是青光眼性视神经损伤和不可逆视功能损害的重要病理基础[20]。Brn3a 是 RGCs 识别和定量的常用核标志物，可用于评价视神经损伤、高 IOP 或青光眼模型中 RGCs 的存活情况[21]。既往研究在实验性高 IOP 模型中发现，大豆异黄酮干预后 IOP 下降，同时伴随 RGCs 损伤及视网膜炎症相关指标改善[22]。本研究中，GIOH 组 Brn3a 阳性 RGCs 数量明显减少，CSE 干预后增加，与上述研究中植物来源活性成分干预后 RGCs 损伤改善的结果相似。不同的是，既往大豆异黄酮研究主要关注 PI3K/Akt/Caspase-3 相关凋亡信号，而本研究进一步观察了 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 相关炎症-焦亡指标的变化。鉴于氧化应激、神经炎症及程序性细胞死亡等过程均参与青光眼性 RGCs 损伤[23]，本研究从炎症-焦亡相关信号角度进一步分析 CSE 干预后视网膜组织的变化，以探讨其与 RGCs 损伤改善之间的可能关联。

表 2 各组大鼠视网膜 Brn3a 阳性 RGCs 相对数量比较 $\bar{x}\pm s$

组别	RGCs 相对数量
对照组	1.000±0.066
GIOH 组	0.368±0.059[b]
低 CSE 组	0.628±0.042[b,d]
高 CSE 组	0.844±0.088[b,d,f]
F	52.11
P	<0.001

注：[b]*P*<0.01 *vs* 对照组；[d]*P*<0.01 *vs* GIOH 组；[f]*P*<0.01 *vs* 低 CSE 组。

表 3 各组大鼠视网膜焦亡相关蛋白平均光密度值比较 $\bar{x}\pm s$

组别	NLRP3	Cleaved Caspase-1(p20)	GSDMD-N
对照组	0.022±0.003	0.001±0.000	0.020±0.004
GIOH 组	0.089±0.010[b]	0.024±0.004[b]	0.077±0.008[b]
低 CSE 组	0.061±0.008[b,d]	0.015±0.003[b,d]	0.061±0.009[b,c]
高 CSE 组	0.042±0.005[b,d,e]	0.006±0.001[b,d,f]	0.045±0.007[b,d,e]
F	47.63	43.86	35.50
P	<0.001	<0.001	<0.001

注：[b]*P*<0.01 *vs* 对照组；[c]*P*<0.05，[d]*P*<0.01 *vs* GIOH 组；[e]*P*<0.05，[f]*P*<0.01 *vs* 低 CSE 组。

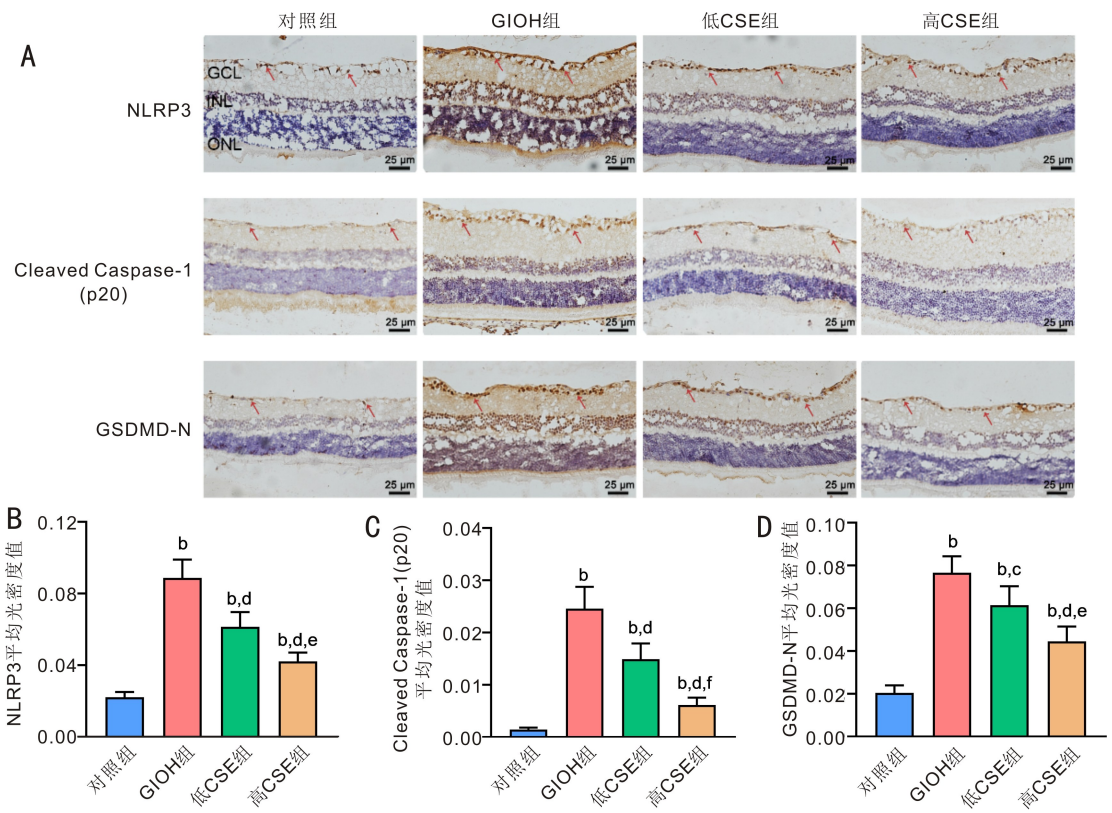


图 2 各组大鼠视网膜 NLRP3 相关细胞焦亡蛋白免疫组织化学染色结果及平均光密度值比较 A：各组大鼠视网膜免疫组织化学染色，棕黄色染色为 NLRP3 相关细胞焦亡蛋白阳性信号，红色箭头示阳性表达区域；GCL：神经节细胞层；INL：内核层；ONL：外核层；B：NLRP3 平均光密度值；C：Cleaved Caspase-1(p20)平均光密度值；D：GSDMD-N 平均光密度值；[b]*P*<0.01 *vs* 对照组；[c]*P*<0.05，[d]*P*<0.01 *vs* GIOH 组；[e]*P*<0.05，[f]*P*<0.01 *vs* 低 CSE 组。

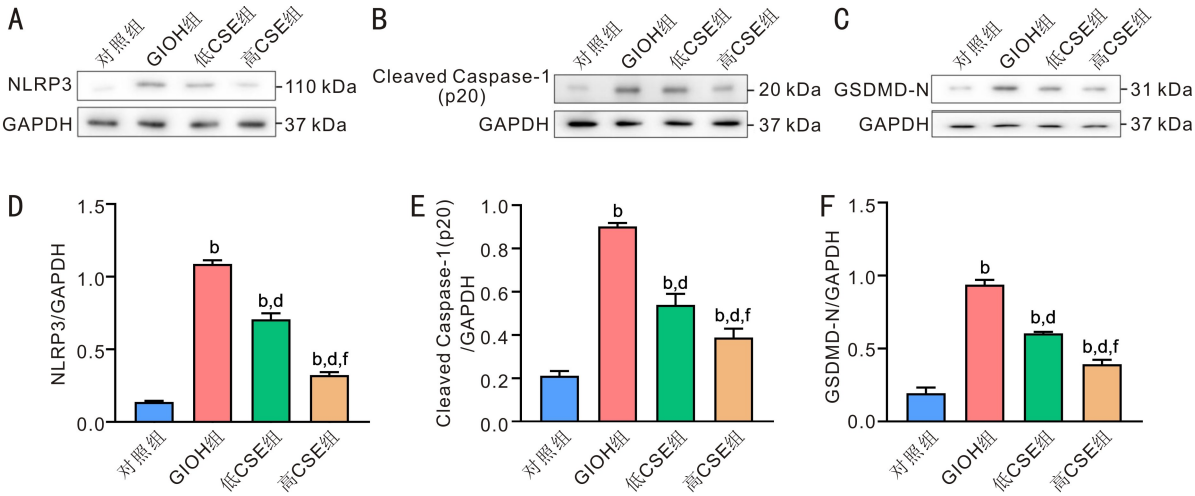


图 3　各组大鼠视网膜 NLRP3 相关细胞焦亡蛋白 Western blot 结果　A:Western blot 检测各组大鼠视网膜 NLRP3 蛋白表达;B:Western blot 检测各组大鼠视网膜 Cleaved Caspase-1(p20)蛋白表达;C:Western blot 检测各组大鼠视网膜 GSDMD-N 蛋白表达;D:NLRP3 蛋白定量分析;E:Cleaved Caspase-1(p20)蛋白定量分析;F:GSDMD-N 蛋白定量分析;[b]P<0.01 *vs* 对照组;[d]P<0.01 *vs* GIOH 组;[f]P<0.01 *vs* 低 CSE 组。

表 4　各组大鼠视网膜焦亡相关蛋白表达量比较　$\bar{x}\pm s$

组别	NLRP3	Cleaved Caspase-1(p20)	GSDMD-N
对照组	0.138±0.007	0.212±0.021	0.195±0.030
GIOH 组	1.088±0.024[b]	0.902±0.016[b]	0.938±0.033[b]
低 CSE 组	0.707±0.042[b,d]	0.539±0.051[b,d]	0.604±0.011[b,d]
高 CSE 组	0.323±0.020[b,d,f]	0.389±0.041[b,d,f]	0.394±0.030[b,d,f]
F	756.7	207.8	333.3
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:[b]P<0.01 *vs* 对照组;[d]P<0.01 *vs* GIOH 组;[f]P<0.01 *vs* 低 CSE 组。

表 5　各组大鼠视网膜焦亡相关炎症因子水平比较　($\bar{x}\pm s$,pg/mg)

组别	IL-1β	IL-18
对照组	62.00±3.00	5.33±0.67
GIOH 组	154.30±5.03[a]	15.37±0.90[a]
低 CSE 组	134.30±4.04[c]	11.37±0.85[c]
高 CSE 组	111.00±5.67[c,e]	8.20±0.40[c,e]
F	232.4	104.1
P	<0.001	<0.001

注:[a]P<0.05 *vs* 对照组;[c]P<0.05 *vs* GIOH 组;[e]P<0.05 *vs* 低 CSE 组。

NLRP3 炎症小体是介导炎症反应和细胞焦亡的重要分子平台。NLRP3 活化后可促进 Caspase-1 剪切,进而诱导 IL-1β 和 IL-18 成熟释放,并通过 GSDMD 裂解形成 GSDMD-N 片段,最终参与细胞焦亡和炎症反应[24-25]。既往研究表明,NLRP3/Caspase-1/GSDMD 相关信号参与青光眼神经炎症及 RGCs 损伤[9,11,26]。Guan 等[27]在高 IOP 青光眼模型中发现,调控胶质细胞反应性在改善 RGCs 存活的同时,可伴随 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 及 IL-1β 等炎症相关指标下调;Huang 等[28]亦发现,青光安Ⅱ号方可通过调控瞬时受体电位香草酸亚型 4(transient receptor potential vanilloid 4,TRPV4)/核因子-κB(nuclear factor kappa B,NF-κB)信号及 GSDMD 依赖性焦亡减轻青光眼 RGC 损伤,提示调控炎症-焦亡相关信号可能是中药干预青光眼性神经损伤的潜在作用途径。本研究中,GIOH 组 NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)、GSDMD-N 及 IL-1β、IL-18均升高,CSE 干预后同步下降。IL-1β 和 IL-18 作为 NLRP3/Caspase-1 下游重要促炎细胞因子[29],其变化与上述焦亡相关蛋白一致,从不同环节提示 CSE 干预与视网膜组织 NLRP3 相关炎症-焦亡反应减轻具有一致性。但由于相关指标基于全视网膜组织检测,目前尚不能确定其具体细胞来源,也不能据此证明 RGCs 本身发生焦亡或 CSE 与该通路存在直接因果关系。

本研究在既往 CSE 降 IOP 研究基础上,进一步观察了 GIOH 状态下 RGCs 损伤及 NLRP3 相关炎症-焦亡指标的变化,从视网膜神经损伤角度拓展了对 CSE 药理作用的认识。研究结果为进一步评价 CSE 在 GIOH 辅助干预及视网膜神经保护中的潜在价值提供了实验依据。但本研究尚处于动物实验阶段,其有效成分、剂量-效应关系、长期安全性及与标准降 IOP 药物相比的药效优势尚未明确,因此目前尚不能直接推论其临床治疗价值。未来仍需通过标准化质量控制、阳性药物对照及进一步的药效学和安全性研究验证其临床转化潜力。

本研究仍存在一定局限性:(1)本研究主要观察 CSE 干预后 IOP、RGCs 数量及 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 相关指标的变化,现有结果主要反映相关性,尚不能明确 CSE 对该通路的直接调控作用,也不能完全区分其降 IOP 效应与潜在的独立神经保护效应;(2)本研究采用视网膜切片评价 RGCs 数量,并基于全视网膜组织检测焦亡相关

指标,在 RGCs 整体定量及相关信号细胞来源判定方面存在一定局限;(3)CSE 作为多成分中药提取物,其质量控制体系、关键活性成分及剂量-效应关系仍需进一步完善。后续可结合阳性药物对照、视网膜铺片、细胞特异性共定位及通路干预实验进一步验证。

综上所述,CSE 可降低 GIOH 大鼠 IOP,增加 Brn3a 阳性 RGCs 数量,并下调视网膜组织 NLRP3、Cleaved Caspase-1(p20)和 GSDMD-N 蛋白表达及 IL-1β、IL-18 水平,提示 CSE 可能对 GIOH 相关 RGCs 损伤具有一定保护作用,并与 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 相关炎症-焦亡反应减轻有关,但其具体机制仍需进一步验证。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。
作者贡献声明:张丽阳、闫海波、曹慧论文选题设计,实验实施,数据整理及初稿撰写;李彦、杨华数据采集及论文审阅;李新民、王琰琛统计分析;王保君课题指导,论文审阅和最终修改。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] Fini ME, Schwartz SG, Gao XY, et al. Steroid-induced ocular hypertension/glaucoma: Focus on pharmacogenomics and implications for precision medicine. Prog Retin Eye Res, 2017,56:58-83.
[2] Harvey DH, Sugali CK, Mao WM. Glucocorticoid-induced ocular hypertension and glaucoma. Clin Ophthalmol, 2024,18:481-505.
[3] Stein JD, Khawaja AP, Weizer JS. Glaucoma in adults-screening, diagnosis, and management: a review. JAMA, 2021,325(2):164-174.
[4] Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, et al. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(2):152-181.
[5] Qu J, Wang DY, Grosskreutz CL. Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. Exp Eye Res, 2010,91(1):48-53.
[6] Kim YW, Jeoung JW, Kim YK, et al. Clinical implications of *in vivo* Lamina cribrosa imaging in glaucoma. J Glaucoma, 2017,26(9): 753-761.
[7] Liu Q, Ju WK, Crowston JG, et al. Oxidative stress is an early event in hydrostatic pressure induced retinal ganglion cell damage. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007,48(10):4580-4589.
[8] Russo R, Varano GP, Adornetto A, et al. Retinal ganglion cell death in glaucoma: Exploring the role of neuroinflammation. Eur J Pharmacol, 2016,787:134-142.
[9] 宋诗易, 梁亮. 程序性细胞死亡在青光眼视网膜神经节细胞中的研究进展. 国际眼科杂志, 2024,24(9):1416-1420.
[10] Hsu SK, Li CY, Lin IL, et al. Inflammation-related pyroptosis, a novel programmed cell death pathway, and its crosstalk with immune therapy in cancer treatment. Theranostics, 2021,11(18):8813-8835.
[11] Chen H, Deng Y, Gan XL, et al. NLRP12 collaborates with NLRP3 and NLRC4 to promote pyroptosis inducing ganglion cell death of acute glaucoma. Mol Neurodegener, 2020,15(1):26.
[12] Zhao WJ, Fan CL, Hu XM, et al. Regulated cell death of retinal ganglion cells in glaucoma: molecular insights and therapeutic potentials. Cell Mol Neurobiol, 2023,43(7):3161-3178.
[13] Dong X, Fu J, Yin XB, et al. Cassiae semen: a review of its phytochemistry and pharmacology. Mol Med Rep, 2017, 16(3): 2331-2346.
[14] Horng CT, Tsai ML, Chien ST, et al. The activity of lowering intraocular pressure of cassiae seed extract in a DBA/2J mouse glaucoma model. J Ocul Pharmacol Ther, 2013,29(1):48-54.
[15] Horng CT, Yang YL, Chen CC, et al. Intraocular pressure-lowering effect of Cordyceps cicadae mycelia extract in a glaucoma rat model. Int J Med Sci, 2021,18(4):1007-1014.
[16] 闫海波, 王松涛, 杨华, 等. 雌二醇在高眼压大鼠视网膜细胞损伤及焦亡通路中的作用. 眼科新进展, 2025,45(1):27-32.
[17] 赵静, 张琦. 糖皮质激素性青光眼小梁细胞超微结构的改变. 眼科学报, 2010,25(2):119-124.
[18] Wang QY, Tong AH, Pan YY, et al. The effect of Cassia seed extract on the regulation of the LKB1-AMPK-GLUT4 signaling pathway in the skeletal muscle of diabetic rats to improve the insulin sensitivity of the skeletal muscle. Diabetol Metab Syndr, 2019,11:108.
[19] Sharifi-Rad J, Herrera-Bravo J, Kamiloglu S, et al. Recent advances in the therapeutic potential of emodin for human health. Biomed Pharmacother, 2022,154:113555.
[20] Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. JAMA, 2014,311(18):1901-1911.
[21] Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009,50(8):3860-3868.
[22] 曹慧, 闫海波, 张丽阳, 等. 大豆异黄酮对激素性青光眼 RGCs 的保护作用研究. 国际眼科杂志, 2026,26(2):202-207.
[23] Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: Mechanisms and consequences. Prog Retin Eye Res, 2006, 25(5): 490-513.
[24] Xu J, Núñez G. The NLRP3 inflammasome: activation and regulation. Trends Biochem Sci, 2023,48(4):331-344.
[25] Burdette BE, Esparza AN, Zhu H, et al. Gasdermin D in pyroptosis. Acta Pharm Sin B, 2021,11(9):2768-2782.
[26] Zhao M, Li SQ, Matsubara JA. Targeting pyroptotic cell death pathways in retinal disease. Front Med, 2021,8:802063.
[27] Guan CQ, Zhang LL, Fomo KN, et al. Targeting glial fibrillary acidic protein in glaucoma: a monoclonal antibody approach to modulate glial reactivity and neuroinflammation for neuroprotection. J Neuroinflammation, 2025,22(1):159.
[28] Huang Y, Xia X, Li DY, et al. Qingguang'An II decoction attenuates retinal ganglion cell pyroptosis in glaucoma *via* inhibition of the TRPV4/NF-κB signaling pathway. J Ethnopharmacol, 2026, 355:120576.
[29] Zheng XQ, Wan J, Tan G. The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in diabetic retinopathy. Front Immunol, 2023,14:1151185.