

基于网络药理学及实验验证探讨枸杞子治疗干眼的作用机制

穆玉雪^{1*}, 胡名状^{2*}, 危冬昱¹, 许馨月¹, 姚李凌莹³, 张作明¹, 陈涛^{1,4}

引用:穆玉雪,胡名状,危冬昱,等. 基于网络药理学及实验验证探讨枸杞子治疗干眼的作用机制. 国际眼科杂志 2023; 23(5): 738-746

基金项目:全军实验动物专项课题{No.SYDW[2020]22};陕西省重点研发计划一般项目(No.2022SF-236)

作者单位:¹(710032)中国陕西省西安市,空军军医大学航空航天医学系航空航天临床医学中心;²(044500)中国山西省永济市,中国人民解放军93413部队;³(710032)中国陕西省西安市,空军军医大学基础医学院学员三大队;⁴(710032)中国陕西省西安市,空军军医大学西京医院空勤科

*:穆玉雪和胡名状对本文贡献一致。

作者简介:穆玉雪,女,硕士研究生,实验师;胡名状,男,学士,医师。

通讯作者:陈涛,男,博士,副教授,硕士研究生导师. ct1988@fmmu.edu.cn

收稿日期:2022-05-30 修回日期:2023-04-12

摘要

目的:基于网络药理学及实验验证探讨枸杞子治疗干眼(DE)的作用机制。

方法:以“枸杞子”为关键词,通过采用TCMSP数据库与分析平台,搜索枸杞子的药物活性成分及作用靶点,以GeneCards和OMIM数据库搜索Dry eye(DE)相关的基因靶点,将枸杞子与DE的靶点基因导入Venn软件,可获得两者交集的靶点图,后将数据导入String数据库获得PPI蛋白与蛋白相互作用网络图,借助于Cytoscape3.7.2软件构建枸杞子活性成分-作用靶点-相关疾病的网络图;再利用Bioconductor平台及R语言GO富集分析、KEGG富集分析;通过实验验证干眼发病机制中的关键靶标。

结果:通过TCMSP数据库与分析平台筛选得到枸杞子的有效化学成分45种,活性成分对应的靶点基因174个,与DE共同的靶点基因131个,根据“药物-成分-疾病-靶点”网络拓扑图,枸杞子治疗DE的主要有效成分27个。分析PPI网络,根据度值较高,即枸杞子治疗DE的关键靶点主要包括AKT1、VEGFA、CASP3、IL1B、JUN、PTGS2、CXCL8等,根据GO富集分析获得枸杞子治疗DE的166种生物学功能与过程,KEGG富集分析显示涉及31条信号通路,此外,通过实验验证发现DE模型组的结膜组织中AKT1、IL-6、TNF- α 及IL-17蛋白表达量显著升高。

结论:枸杞子治疗DE是多成分-多靶点-多途径的复杂过程,且枸杞子治疗DE主要通过抗炎及抑制细胞凋亡相关分子参与调控。

关键词:枸杞子;干眼;网络药理学;AKT1;白细胞介素-6;肿瘤坏死因子- α

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.5.05

Mechanism of Fructus Lycii against dry eye: an analysis based on network pharmacology and experimental verification

Yu-Xue Mu^{1*}, Ming-Zhuang Hu^{2*}, Dong-Yu Wei¹, Xin-Yue Xu¹, Ling-Xuan Yaoli³, Zuo-Ming Zhang¹, Tao Chen^{1,4}

Foundation items: The Army Laboratory Animal Foundation of China {No.SYDW[2020]22}; Shaanxi Provincial Key R&D Plan General Project (No.2022SF-236)

¹Aerospace Clinical Medical Center, School of Aerospace Medicine, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China; ²No. 93413 of PLA, Yongji 044500, Shanxi Province, China; ³The Third Regiment of Basic Medical Science, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China; ⁴Department of Aviation Medicine, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Co-first authors: Yu-Xue Mu and Ming-Zhuang Hu

Correspondence to: Tao Chen. Aerospace Clinical Medical Center, School of Aerospace Medicine, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China; Department of Aviation Medicine, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. ct1988@fmmu.edu.cn

Received:2022-05-30 Accepted:2023-04-12

Abstract

• **AIM:** To explore the mechanism of fructus lycii in treating dry eye based on network pharmacology and experimental verification.

• **METHODS:** Taking “fructus lycii” as key words, the active ingredients and target of fructus lycii were searched by using Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). Gene targets related to dry eye (DE) were searched by GeneCards and OMIM databases. The target genes of fructus lycii and DE were imported into Venn software to obtain the intersection target map of them. After that, the data were imported into the String database to obtain the PPI protein-protein interaction network diagram. Using Cytoscape3.7.2 software, the PPI protein-protein interaction network diagram was constructed for active ingredients, target sites and related diseases of fructus lycii. The Bioconductor platform and R language were used for gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. And

the key targets in the pathogenesis of DE were verified by experiments.

• **RESULTS:** Through TCMSp, 45 types of effective chemical components of fructus lycii, 174 target genes corresponding to active components and 131 common target genes with DE were screened out. In accordance with the network topology of “drug - composition - disease - target”, 27 main effective components of fructus lycii were found in the treatment of DE. The PPI network was analyzed according to the high degree value, which is the key targets of fructus lycii for DE treatment, mainly including AKT1, VEGFA, CASP3, IL1B, JUN, PTGS2, CXCL8, etc. According to GO enrichment analysis, 166 biological functions and processes of fructus lycii for DE treatment were obtained. KEGG enrichment analysis showed that 31 signaling pathways were involved. Additionally, experimental verification displayed that the protein expressions of AKT1, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF- α) and IL-17 in conjunctiva tissue of the DE model group were significantly increased.

• **CONCLUSIONS:** Through network pharmacology, this study confirmed that the treatment of DE by fructus lycii is a complex process involving multi-components, multi-targets and multi-pathways, and that the treatment of DE by fructus lycii is mainly regulated by anti-inflammatory and apoptosis-related molecules.

• **KEYWORDS:** Fructus Lycii; dry eye; network pharmacology; AKT1; IL-6; tumor necrosis factor- α

Citation: Mu YX, Hu MZ, Wei DY, et al. Mechanism of Fructus Lycii against dry eye: an analysis based on network pharmacology and experimental verification. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023; 23(5):738-746

0 引言

干眼 (dry eye, DE) 已成为眼科疾病当中除屈光不正以外最常见的疾病,有文献报道,国外 DE 的发病率为 5.5%~33.7%,而我国 DE 的发病率为 21.0%~30.0%,发病率较高^[1-2]。近年来,我国军人 DE 的发病率也渐增加,成为我军非战斗减员因素之一^[3]。DE 主要是由于泪液功能障碍而导致的角膜屏障破坏的一类眼科疾病,主要表现为眼部的刺痛、干涩、畏光、异物感等眼表损害、视觉功能紊乱现象,并且常有眼疲劳的症状出现,严重者可导致失明,治愈后易复发。在流行病学上,全世界约有 5%~30% 的人会受到 DE 的影响^[4]。目前西医在治疗 DE 方面多以缓解症状、改善体征为主,且临床在治疗 DE 方面常用的药物主要以促进泪液分泌、泪液成分的替代治疗及抗炎与免疫抑制药物进行治疗,对于症状较重的患者,会考虑给予手术治疗,研究发现促进泪液分泌类的药物及人工泪液的作用机制尚不明确,且局部使用类固醇类药物可能引起眼压升高和晶状体囊下混浊的副作用^[5]。DE 在中医上属于“神水将枯”的范畴,主要基于“肝开窍于目,泪乃肝之液”的理论,若是肝血亏虚,津液分泌不足,则两目干涩^[6]。枸杞子属茄科植物,来源于其果实,枸杞子味甘、性平,归肝肾经,具有明目、滋补肝肾的功效,因此在治疗由肝肾亏虚所致的眼部疾病方面具有较好的疗效^[7]。药理学研究表明枸杞子具有抗氧化、抗衰老的功效,及在阿尔

茨海默症的治疗方面具有较好的疗效^[8],除此之外,研究发现枸杞子提取物在防治视网膜疾病,及抗视疲劳等方面具有较好的疗效^[9]。因此采用网络药理学的方法来探讨枸杞子治疗 DE 的活性成分及作用靶点,分析枸杞子治疗 DE 的作用机制,从而为枸杞子在临床治疗 DE 方面提供科学依据,具有重要的意义。

1 网络药理学研究和动物实验

1.1 网络药理学研究

1.1.1 枸杞子的活性成分及相应靶点 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSp) 搜索中药“枸杞子”,并设置口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 作为筛选条件,搜索枸杞子相关的药物活性成分及靶点等。

1.1.2 枸杞子靶点基因的预测及 DE 靶点基因的筛选 借助于 Uniprot 数据库 (<http://www.Uniprot.org/>) 将 TCMSp 数据库中筛选得到的枸杞子关键化学成分信息转换成相应的靶点,然后借助于 GeneCards 数据库 (<https://www.Genecards.org/>) 和 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 搜索“Dry eye (DE)”相关基因,并导出“DE”相关基因。

1.1.3 枸杞子和 DE 靶点交集的筛选 为了获得“枸杞子”与“DE”共同靶点基因,借助于“R”语言程序软件进行筛选,并以韦恩图的形式展示。

1.1.4 枸杞子活性成分-靶点基因-DE 网络调控构建 通过借助于 perl 程序软件,获得 DE 与枸杞子共同作用靶点,然后通过 Cytoscape 3.7.2 软件来绘制枸杞子活性成分-靶点基因-DE 可视化网络图。

1.1.5 蛋白与蛋白相互作用网络构建 通过将枸杞子和 DE 共同靶点输入到 String 数据库 (<https://stringdb.org/>),物种选择“Homo sapiens”,得到蛋白与蛋白相互作用 (PPI) 网络图,并且为了更准确地获得数据分析结果,通过高级设置筛选得分 ≥ 0.4 来隐藏网络图中游离的蛋白质,其余参数均设置为默认,最后导出枸杞子和 DE 相互作用网络图,将 String 数据库导出的结果转换制作成 PPI 条形图。

1.1.6 GO 功能与 KEGG 通路的富集分析 通过 Bioconductor (<http://bioconductor.org/bioc.Lite.R>) 数据库,借助于 R 软件 (colorspace、stringi、DOSE、clusterProfiler、pathview) 安装包获得枸杞子治疗 DE 的关键靶点,用 R 软件安装包进行 GO (gene ontology) 功能富集和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 生物功能富集,并设定 $P < 0.05$, $Q < 0.05$,最终输出结果以 R 语言作图来展示。

1.2 动物实验

1.2.1 材料和主要试剂 蛋白激酶 (AKT1) 多克隆抗体、白细胞介素-6 (IL-6) 多克隆抗体、白细胞介素-17 (IL-17) 多克隆抗体、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及 GAPDH 多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司),荧光素钠购自美国 Sigma 公司 (批号 46960-100G-F)、泪液检查酚红棉线购自天津晶明新技术开发有限公司 (批号 20211201)。

1.2.2 动物分组和造模 雄性 C57 小鼠 (20 \pm 2g, 8 周龄),由空军军医大学实验动物中心提供。实验动物的饲养和使用符合视觉与眼科研究协会制定的科研动物使用规范

(许可证号:SYXK-BIT-20200107001),小鼠领回后先在动物室内饲养1wk(12h明暗循环,自由饮水和进食),动物房内温度控制在(23±1)℃,相对湿度约50%。1wk后随机分为对照组和实验组。对照组不做任何处理,实验组小鼠每天给予2%苯扎氯胺溶液滴眼,每天2次,每次5μL,两次造模时间间隔8~10h,连续给药1~4wk,每组6只。

1.2.3 泪液分泌测定及角膜上皮荧光素钠染色 泪液分泌测定:分别在造模1、2、3、4wk时检测小鼠泪液分泌量,小鼠腹腔注射10g/L戊巴比妥钠,使其麻醉固定,用眼科显微镊夹持酚红棉线,将其置于小鼠下结膜囊中外1/3处,停留60s取出,用游标卡尺测量棉线湿润长度,检测泪液分泌量。角膜上皮荧光素钠染色:将荧光素钠溶液滴至小鼠右眼结膜囊内进行角膜荧光素染色,用裂隙灯显微镜在钴蓝光下观察角膜变化,角膜损伤部位可见嫩绿色着色,即为角膜上皮荧光素钠染色。

1.2.4 蛋白免疫印迹检测结膜组织中 AKT1、IL-6、TNF-α 及 IL-17 蛋白表达 分别在造模时间点结束时,给小鼠腹腔注射10g/L戊巴比妥钠进行麻醉,处死小鼠,取小鼠结膜组织,蛋白提取,BCA法测定蛋白浓度,每管上清液中分别加入50μL 5× Loading Buffer,100℃煮沸15min,使蛋白变性。按照SDS-PAGE凝胶电泳说明书进行电泳,PVDF转膜90min。在封闭液中室温静置2h,加入稀释好的一抗AKT1(1:1000)、IL-6(1:1000)、TNF-α(1:800)及IL-17(1:1000)4℃孵育过夜,Tween-PBS洗3遍一抗,每次10min,加入二抗,在室温条件下摇动1~2h,Tween-PBS洗3遍二抗,每次10min,显色。使用Quantity one软件进行分析,测定各条带的平均光密度值(OD值),将待测蛋白质表达量与内参照GAPDH表达量进行对比,用以表示蛋白质的相对表达水平。

统计学分析:采用SPSS22.0统计学软件进行数据处理,实验数据以均数±标准差表示,组间比较采用独立样本t检验,组内不同时间比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD-t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 枸杞子的活性成分及对应靶点 通过TCMSP数据库获得枸杞子有效化学成分188个,设置OB≥30%及DL≥0.18筛选获得45种有效活性成分,主要包括,甾醇类:如Sitosterol alpha1(谷甾醇α1)、Cycloartenol(环戊烯醇)、LAN[4,4,14α-三甲基-5α-胆甾醇-9(11),24-二亚乙基三胺-3β-醇]、Stigmasterol(豆甾醇)、beta-sitosterol(β-谷甾醇)、24-ethylcholest-22-enol(24-乙基胆甾-22-烯醇)、campesterol(菜油甾醇)、24-ethylcholesta-5,22-dienol(24-乙基胆甾5,22-二烯醇)、24-methyl-31-norlanost-9(11)-enol(24-乙基胆甾5,22-二烯醇)、24-methylenelanost-8-enol(24-亚甲基-8-烯醇)、31-Norcyclolaudenol(31-去甲甾醇)、31-norlanost-9(11)-enol(31-去甲甾醇)、31-norlanosterol(31-去甲甾醇)、6-Fluoroindole-7-Dehydrocholesterol(6-氟吲哚-7-脱氢胆固醇 Obtusifoliol 钝叶醇)等;多糖类:如Physcion-8-O-beta-D-gentiobioside(大黄素-8-β-D-龙胆二糖苷)、7-O-Methyluteolin-6-C-beta-glucoside_qt(7-O-甲基木犀草素-6-C-β-葡萄糖苷)等;生物碱类:如atropine(消旋莨菪碱)等,见表1,将枸杞子45个活性成分与Uniport数据库进行基因校对,删除重复,剩余对应靶点有174个,见图1。

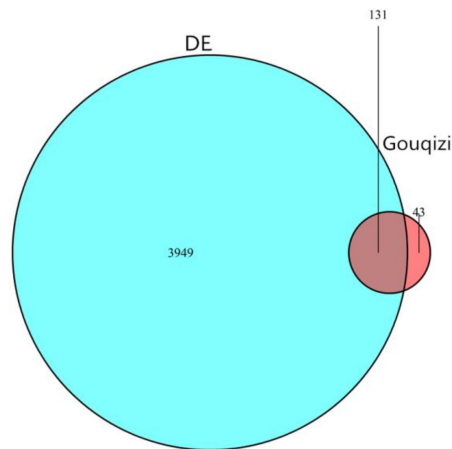


图1 枸杞子成分靶点作用于DE靶点的韦恩图。

2.2 枸杞子与DE的共同靶点 通过Genecards和OMIM数据库搜索DE的基因靶点,并且设置相关性评分大于5,最终得到DE的靶点基因共4080个,将枸杞子与DE靶点基因通过采用R软件安装包进行基因映射,得到枸杞子与DE的共同靶点131个(图1)。

2.3 药物活性成分-作用靶点-相关疾病网络构建 利用Cytoscape3.7.2软件将枸杞子化学成分及交集靶点构建化合物-靶点相互作用网络图,发现共有节点154个,枸杞子治疗DE的活性成分27个,协同作用于DE的靶点有131个,节点与节点之间的作用关系,即边(edge)570条(图2)。

2.4 PPI网络构建 为了更进一步地分析枸杞子治疗DE的作用机制,在String数据库中输入48个共同靶点基因,研究物种选择为“Homo sapiens”,将筛选得分设置为≥0.4,通过隐藏游离的节点,得到PPI网络图,见图3。图中节点有120个,边有2119条,通过PPI网络图我们可以看出枸杞子对DE的治疗是通过多途径多靶点的方式。利用R软件对String数据库中获取关联数据进行排序,得到连线数最多的30个关键节点,即核心靶点,绘制成图。推测这些靶点可能是枸杞子治疗DE的关键靶点,从图中可以看出与AKT1连线的有95条,与IL-6连线的有87条,依次是VEGFA、CASP3、JUN、PTGS2、CXCL8、IL1B等,由此可以说明这些是最为关键的核心靶点并且各靶点之间存在较密切的关系,见图4。

2.5 GO功能富集分析与KEGG富集分析

2.5.1 GO功能富集分析 用R软件colorspace、stringi、DOSE、clusterProfiler、pathview安装包对枸杞子-DE的131个共同靶点进行GO生物富集分析,其中所涉及166种生物学功能与过程,根据富集p值最小的前20位包括了核受体活性、配体激活的转录因子活性、DNA结合转录因子结合、G蛋白偶联受体活性、细胞因子受体结合、RNA聚合酶II特异性DNA结合转录因子结合、转录共激活因子结合、细胞因子活性、转录辅因子结合等,见图5,展示了前20位GO分析结果。

2.5.2 KEGG富集分析 对枸杞子治疗DE的131个关键靶点进行KEGG富集分析,根据P≤0.05的结果,共富集到154条信号通路,绘制排名前20位的KEGG气泡图,主要涉及TNF-α、IL-17及HIF-1等信号通路,见图6。

表 1 枸杞子活性成分

MoL ID	活性成分	OB(%)	DL
MOL001323	Sitosterol alpha1	43.28	0.78
MOL003578	Cycloartenol	38.69	0.78
MOL001494	Mandenol	42	0.19
MOL001495	Ethyl linolenate	46.1	0.2
MOL001979	LAN	42.12	0.75
MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL005406	atropine	45.97	0.19
MOL005438	campesterol	37.58	0.71
MOL006209	cyenin	47.42	0.76
MOL007449	24-methylidenelophenol	44.19	0.75
MOL008173	daucoesterol qt	36.91	0.75
MOL008400	glycitein	50.48	0.24
MOL010234	delta-Carotene	31.8	0.55
MOL000953	CLR	37.87	0.68
MOL009604	14b-pregnane	34.78	0.34
MOL009612	(24R)-4alpha-Methyl-24-ethylcholesta-7,25-dien-3beta-ylacetate	46.36	0.84
MOL009615	24-Methylenecycloartan-3beta,21-diol	37.32	0.8
MOL009617	24-ethylcholest-22-enol	37.09	0.75
MOL009618	24-ethylcholesta-5,22-dienol	43.83	0.76
MOL009620	24-methyl-31-norlanost-9(11)-enol	38	0.75
MOL009621	24-methylenelanost-8-enol	42.37	0.77
MOL009622	Fucoesterol	43.78	0.76
MOL009631	31-Norcyclolaudenol	38.68	0.81
MOL009633	31-norlanost-9(11)-enol	38.35	0.72
MOL009634	31-norlanosterol	42.2	0.73
MOL009635	4,24-methyllophenol	37.83	0.75
MOL009639	Lophenol	38.13	0.71
MOL009640	4alpha,14alpha,24-trimethylcholesta-8,24-dienol	38.91	0.76
MOL009641	4alpha,24-dimethylcholesta-7,24-dienol	42.65	0.75
MOL009642	4alpha-methyl-24-ethylcholesta-7,24-dienol	42.3	0.78
MOL009644	6-Fluoroindole-7-Dehydrocholesterol	43.73	0.72
MOL009646	7-O-Methyllyuteolin-6-C-beta-glucoside qt	40.77	0.3
MOL009650	Atropine	42.16	0.19
MOL009651	Cryptoxanthin monoepoxide	46.95	0.56
MOL009653	Cycloeucaenol	39.73	0.79
MOL009656	(E,E)-1-ethyl octadeca-3,13-dienoate	42	0.19
MOL009660	methyl (1R,4aS,7R,7aS)-4a,7-dihydroxy-7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,5,6,7a-tetrahydrocyclopenta[d]pyran-4-carboxylate	39.43	0.47
MOL009662	Lantadene A	38.68	0.57
MOL009664	Physalin A	91.71	0.27
MOL009665	Physson-8-O-beta-D-gentiobioside	43.9	0.62
MOL009677	lanost-8-en-3beta-ol	34.23	0.74
MOL009678	lanost-8-enol	34.23	0.74
MOL009681	Obtusifoliol	42.55	0.76
MOL000098	quercetin	46.43	0.28

2.6 动物实验

2.6.1 小鼠泪液分泌测定 在造模 1wk 时两组小鼠泪液分泌量差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与对照组比较, 模型组小鼠泪液分泌量在造模 2、3、4wk 泪液分泌量减少, 差异有

统计学意义 ($t=19.083, 16.485, 29.734$, 均 $P<0.05$), 见表 2。

2.6.2 角膜荧光素钠染色 与对照组相比较, 用苯扎氯胺溶液滴眼 1wk 后, 模型组小鼠角膜上皮出现少量细点状荧光素钠着色; 造模 2wk 后, 模型组小鼠荧光素钠着色明显,

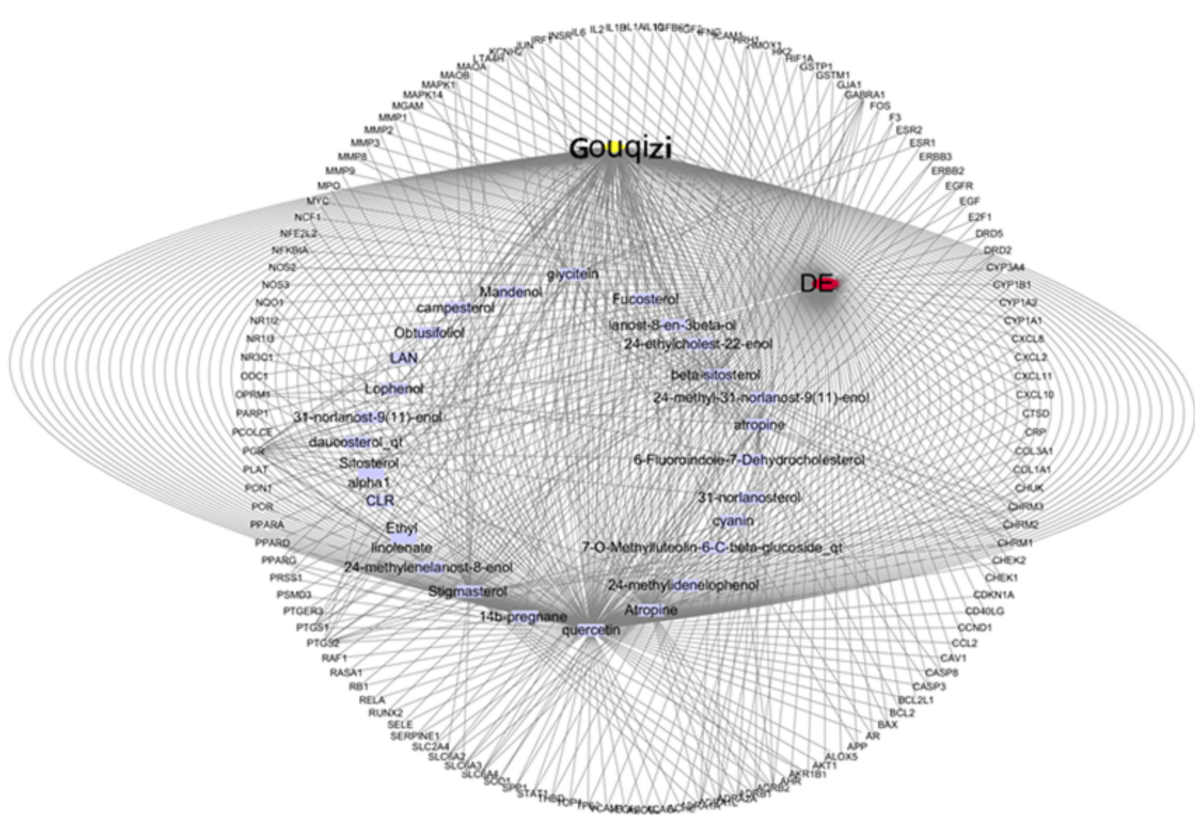


图2 枸杞子治疗DE的“药物-成分-疾病-靶点”网络图。

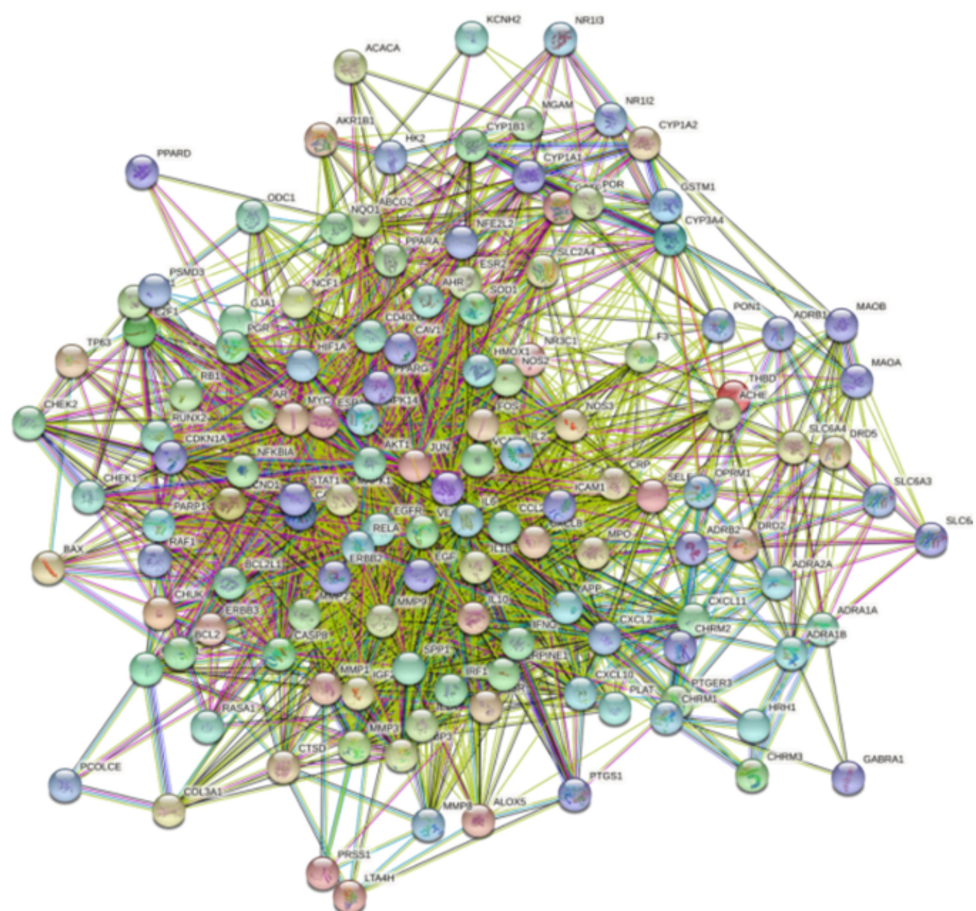


图3 DE-枸杞子PPI蛋白相互作用网络靶点图。

少量片状;造模3wk后,模型组小鼠角膜上皮出现不同程度的点状、片状侵损;造模4wk后,模型组小鼠出现明显的角膜混浊(图7)。

2.6.3 各组结膜组织中 AKT1、IL-6、TNF- α 及 IL-17 的蛋白表达水平 基于网络药理学分析结果,我们选择 AKT1、IL-6、TNF- α 及 IL-17 作 DE 疾病蛋白表达标志物,以探

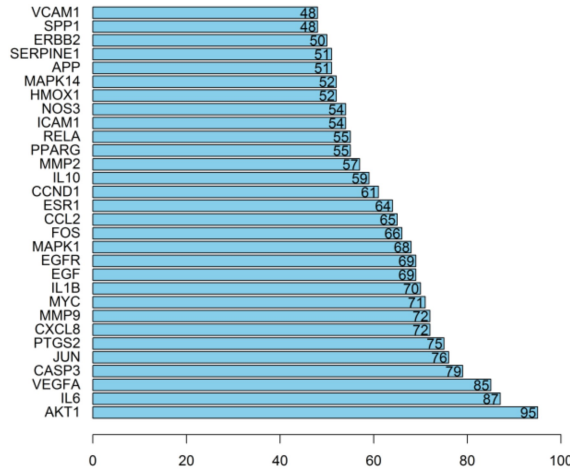


图 4 枸杞子治疗 DE 的核心靶点图。

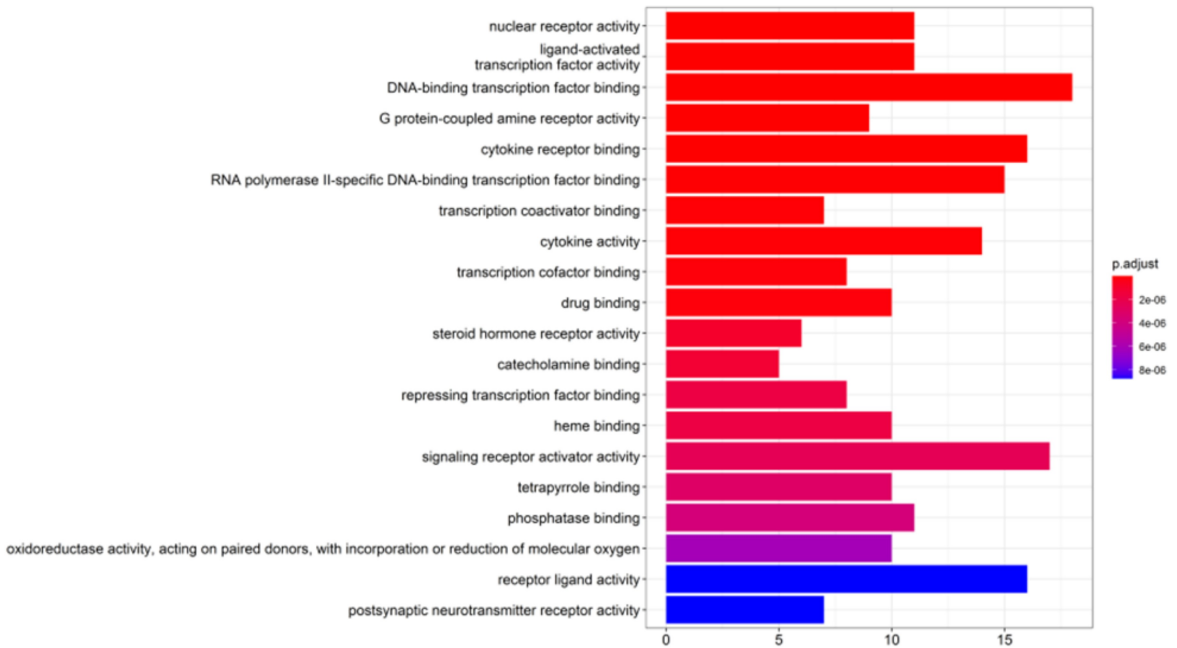


图 5 前 20 位 GO 功能富集分析生物学过程。

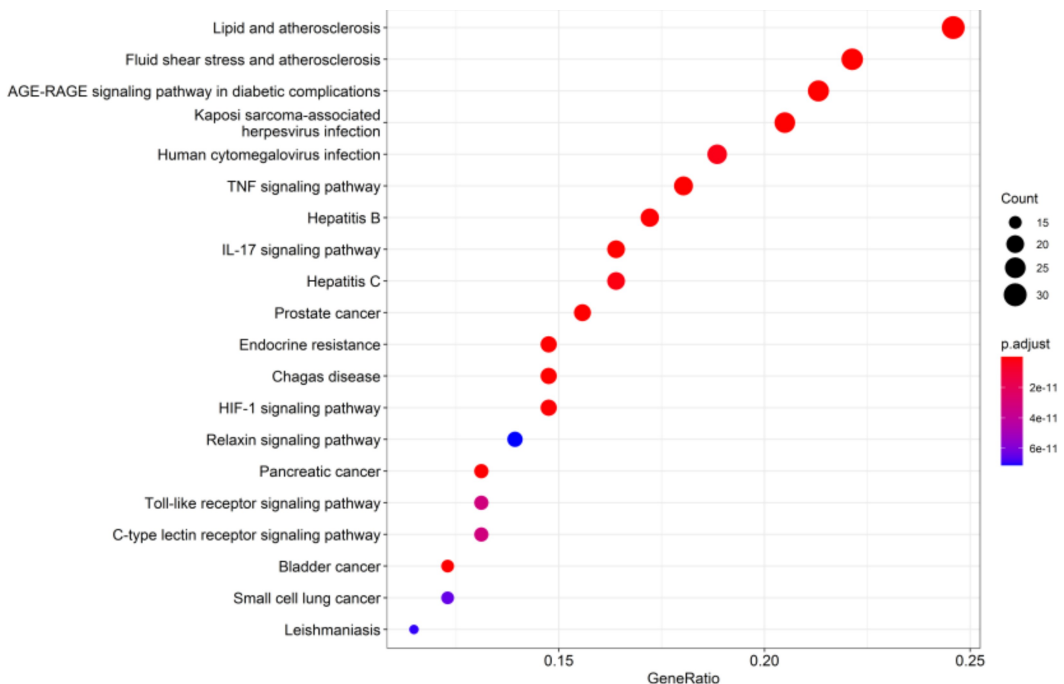


图 6 前 20 位的 KEGG 气泡图。

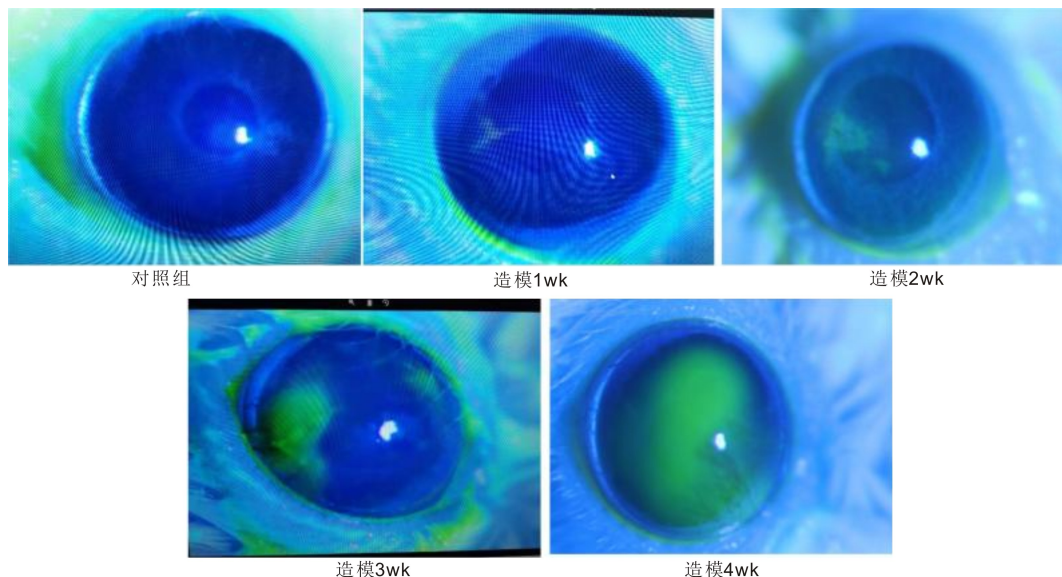


图7 各组小鼠荧光素钠染色图像。

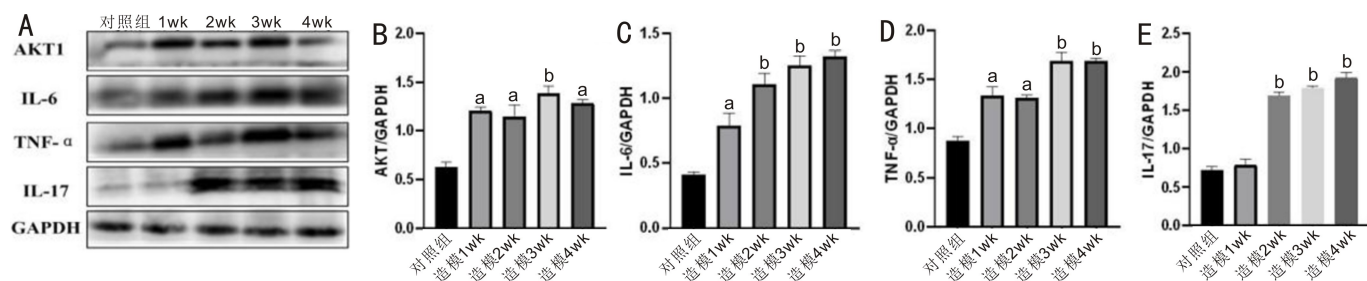


图8 各组小鼠结膜组织中 AKT1、IL-6、TNF- α 及 IL-17 蛋白表达比较 A: Western blot 蛋白印记结果; B~E: 各蛋白灰度值统计分析。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表2 两组小鼠不同时间泪液分泌量比较

组别	造模 1wk	造模 2wk	造模 3wk	造模 4wk
对照组	6.05 \pm 0.35	6.11 \pm 0.33	6.05 \pm 0.21	6.23 \pm 0.23
模型组	5.89 \pm 0.25	3.87 \pm 0.31 ^{a,c}	3.77 \pm 0.29 ^{a,c}	3.24 \pm 0.41 ^{a,d}

($\bar{x} \pm s$, mm)

注: ^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 同组造模 1wk。

究相关因子在 DE 疾病中的作用机制。与对照组相比,随着时间增加,模型组小鼠各相关蛋白的表达随着造模时间的延长 AKT1、IL-6、TNF- α 及 IL-17 表达量增加,其中 AKT1、IL-6 及 TNF- α 在造模 1wk 时蛋白表达量显著升高(均 $P < 0.05$); IL-17 在造模 2wk 时蛋白表达量显著升高($P < 0.01$),见图 8。

3 讨论

DE 发病机制较为复杂,受内、外影响因素较多。临床研究及实验研究发现,枸杞子在治疗眼底病方面具有较好的疗效,但是枸杞子及提取物治疗眼部疾病的机制尚不明确。本研究主要是通过采用网络药理学的方法,探讨枸杞子治疗 DE 的活性成分及其作用靶点。通过 TCSP 数据库平台检索分析发现枸杞子主要的活性成分有 45 种,其中主要包括了自由度较高的槲皮素、 β -谷甾醇、阿托品、谷甾醇 $\alpha 1$ 等主要成分,表明这几种成分在治疗 DE 中起着重要的作用。其中槲皮素是自由度值最高的,现代药理学研究发现槲皮素在抗炎^[10]、抗菌^[11]、抗氧化^[12]、抗肿瘤^[13]及心血管保护^[14]等方面具有较好的药理作用。在

治疗眼科疾病方面,研究发现槲皮素可对自身免疫性葡萄膜炎^[15]及氧化导致的视网膜损伤^[16]具有较好的治疗作用,并且有研究发现其可抑制脉络膜-视网膜新生血管的形成^[17]、大鼠晶状体上皮细胞的凋亡及视网膜退行性变^[18]等。 β -谷甾醇具有显著的抗炎作用,研究发现 β -谷甾醇主要是抑制了 NF- κ B/NLRP3 炎症反应途径,从而抑制 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 炎症因子介导的炎症反应^[19-20]。

PPI 分析发现, AKT1、IL-6、VEGFA、CASP3、JUN、PTGS2、CXCL8 等靶点是枸杞子治疗 DE 的核心靶点,通过采用 GO 生物学富集分析,上述核心靶点主要是通过影响核受体活性、配体激活的转录因子活性、DNA 结合转录因子结合等对干眼进行调控的。AKT1 作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的一种,在调控细胞的增殖、凋亡及血管生成方面起着重要作用^[21]。研究发现其在增殖性玻璃体视网膜病变的形成中起着重要作用。IL-6 在损伤修复及炎症免疫反应中起着重要的调控作用,研究发现在 DE 患者中 IL-6 表达水平升高,参与 DE 的炎症反应。VEGFA 作为

VEGF的一种,在促进内皮细胞分裂增殖和细胞迁移方面起着重要的调控作用,除此外,该因子也可增加血管的通透性。在DE的发病机制当中,其中VEGF在调节内皮细胞反应当中起着重要的作用^[22]。c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)是应激诱导的丝裂原活化蛋白激酶家族的成员,研究发现其可参与视网膜细胞的凋亡调控及视网膜退行性变,并且可参与多种疾病的炎症反应,研究发现DE的发病与炎症因素密切相关,c-Jun可能参与DE疾病的发生发展^[23]。半胱氨酸天冬氨酸激酶-3(cysteine aspartic acid specific protease-3, Caspase-3)的表达与活化在细胞凋亡的过程中起着最终的执行作用,导致细胞凋亡。研究发现,缺血再灌注的小鼠视网膜中、糖尿病大鼠及高眼压大鼠视网膜神经节细胞中,Caspase-3的表达含量升高^[24]。PTGS2是环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的编码基因,可被促炎细胞因子、生长因子等诱导激活,从而参与炎症反应、细胞增殖、细胞凋亡等多种病理过程,研究发现IL-1 β 、IL-6等炎性细胞因子参与DE的炎症反应,可参与激活PTGS2介导DE疾病的发生发展^[25]。CXCL8是重要的炎症介质,研究发现在DE患者泪液及血液中处于高表达,因此证实了DE是由炎症介导的发病机制,从而对DE的严重程度产生一定的影响^[26]。

根据KEGG富集分析发现,枸杞子治疗DE涉及了多条信号通路,是通过多途径、多靶点进行治疗的,其中TNF- α 、IL-17及HIF-1等信号通路显著性较高,可能是枸杞子治疗DE的关键信号通路。研究发现DE患者眼睑内面,如TNF- α 等促炎因子含量是高表达的,且TNF- α 表达越高,DE患者的泪液分泌就越少,患者的病情就越重^[27-28]。IL-17是自身免疫疾病和许多炎症性疾病的重要促炎因子,研究发现DE患者泪液中IL-17的浓度显著高于非DE患者,并且通过采用抗IL-17抗体可抑制Th17细胞,从而减轻DE的严重程度^[29-30]。HIF-1为缺氧诱导因子,研究发现HIF-1 α 的激活可防止DE诱导的泪腺腺泡细胞死亡,从而对DE起着重要的调控作用,影响着泪腺细胞的增殖凋亡等生理过程^[31]。

目前DE常用的动物模型为大鼠、小鼠及兔等,而有文献报道小鼠在DE模型中使用较为普遍^[32],为此我们选择C57小鼠,采用苯扎氯铵药物进行造模,苯扎氯铵是制作DE常用的药物,大、小鼠均可以进行造模,连续给药14d就可以造模完成,并且模型持续时间不少于14d,其可以导致与人类DE临床表现及病理症状相类似的现象,主要表现为泪膜不稳定、眼表炎症、角膜上皮细胞凋亡与眼表损害等^[33],并且通过实验我们发现在造模14d后,泪液分泌显著减少($P<0.05$)。基于网络药理学分析结果,我们选择了在DE发病中起着重要调控的蛋白分子AKT1、IL-6、TNF- α 及IL-17,作为DE疾病蛋白表达标志物,通过实验探究相关因子在DE疾病中的作用机制。通过实验验证发现,与对照组相比,随着造模时间的增加,模型组小鼠各相关蛋白的表达也随时间的延长表达量逐渐增加,从而可以明确基于网络药理学数据库所获得的相关靶点基因与DE疾病存在密切的联系,在调控DE疾病中起着重要的作用。

综上所述,本文通过网络药理学分析发现枸杞子的主要活性成分为槲皮素、 β -谷甾醇、阿托品、谷甾醇 α 等主要成分,涉及治疗DE的关键靶点主要包括AKT1、IL-6、VEGFA、CASP3、JUN、PTGS2、CXCL8等,枸杞子治疗DE的关键途径为TNF- α 、IL-17及HIF-1 α 等信号通路,枸杞子治疗DE的发病机制主要是通过调控炎症反应及细胞凋亡等相关的信号通路来达到抗炎及抑制细胞凋亡的,从而抑制DE的发生发展,起到治疗作用^[34]。通过网络药理学分析充分说明枸杞子是通过多成分、多靶点、多途径治疗DE的,并且枸杞子的药理学数据分析表明枸杞子对DE的治疗存在一定的可行性,实验验证后确实与相关的靶点基因存在密切关系,可对后续的科研研究及临床新型药物的研发提供一定的理论、实验依据及研发思路。

参考文献

- 1 Jain N, Sharma P, Chouhan JK. A study of the association between Vitamin D deficiency and Dry Eye Syndrome (DES) in the Indian population. *Indian J Ophthalmol* 2022;70(2):500-504
- 2 Rouen PA, White ML. Dry eye disease: prevalence, assessment, and management. *Home Healthc Now* 2018;36(2):74-83
- 3 党宽荣, 吴桐, 陶梦璋, 等. 新时期我国军人干眼患病情况及危险因素研究现状. *临床军医杂志* 2021;49(7):836-839
- 4 Zemanová M. Dry eye disease. a review. *Cesk Slov Oftalmol* 2021;77(3):107-119
- 5 O'Neil EC, Henderson M, Massaro-Giordano M, et al. Advances in dry eye disease treatment. *Curr Opin Ophthalmol* 2019;30(3):166-178
- 6 梁子钰, 何萍. 干眼流行病学调查及中医辨证分型研究进展. *世界中西医结合杂志* 2019;14(1):138-141
- 7 诸凤娇, 陆燕英, 周伟. 干眼症的中医治疗研究. *医学信息* 2022;35(14):172-175
- 8 Sun WL, Shahrajabian MH, Cheng Q. Health benefits of wolfberry (Gou Qi Zi, Fructus barbarum L.) on the basis of ancient Chineseherbalism and Western modern medicine. *Avicenna J Phytomed* 2021;11(2):109-119
- 9 王莎莎, 张钊, 陈乃宏. 枸杞子主要活性成分及药理作用研究进展. *神经药理学报* 2018;8(6):53
- 10 Carullo G, Cappello AR, Frattaruolo L, et al. Quercetin and derivatives: useful tools in inflammation and pain management. *Future Med Chem* 2017;9(1):79-93
- 11 Li Y, Yao JY, Han CY, et al. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* 2016;8(3):167
- 12 Sharma A, Kashyap D, Sak K, et al. Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: a review of research and patents. *Pharm Pat Anal* 2018;7(1):15-32
- 13 Reyes - Farias M, Carrasco - Pozo C. The anti - cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism. *Int J Mol Sci* 2019;20(13):3177
- 14 Patel RV, Mistry BM, Shinde SK, et al. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *Eur J Med Chem* 2018;155:889-904
- 15 杨颖, 王芸芸, 蒋琦辰. 槲皮素药理作用的研究进展. *特种经济动植物* 2020;23(5):24-28
- 16 徐新荣, 于海涛, 李敏, 等. 槲皮素磷脂复合物固体分散体增强对氧化损伤小鼠视网膜的保护作用. *中华中医药学刊* 2018;36(4):775-778
- 17 李敏. 槲皮素对氧化损伤小鼠视网膜的保护作用研究. 南京中医药大学 2017
- 18 刘鹃, 康刚劲. 槲皮素对晶状体保护作用的研究进展. *国际眼科杂志* 2015;15(1):49-51

19 Liu R, Hao DL, Xu WY, *et al.* β -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice. *Pharm Biol* 2019;57(1):161-168

20 Yang Q, Yu DL, Zhang Y. β -sitosterol attenuates the intracranial aneurysm growth by suppressing TNF- α -mediated mechanism. *Pharmacology* 2019;104(5-6):303-311

21 McKenna M, Balasuriya N, Zhong SS, *et al.* Phospho-form specific substrates of protein kinase B (AKT1). *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:619252

22 刘朝辉, 高晓虹. 血管内皮生长因子及其受体的研究进展. *中国药物与临床* 2017;17(8):1162-1164

23 Xu JX, Liu XL, Zhang XY, *et al.* Retinal and choroidal pathologies in aged BALB/c mice following systemic neonatal murine cytomegalovirus infection. *Am J Pathol* 2021;191(10):1787-1804

24 Wang M, Hayashi H, Horinokita I, *et al.* Neuroprotective effects of Senkyunolide I against glutamate-induced cells death by attenuating JNK/caspase-3 activation and apoptosis. *Biomedicine Pharmacother* 2021;140:111696

25 Echizen K, Hirose O, Maeda Y, *et al.* Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. *Cancer Sci* 2016;107(4):391-397

26 Pinto-Fraga J, Enríquez-de-Salamanca A, Calonge M, *et al.* Severity, therapeutic, and activity tear biomarkers in dry eye disease: an

analysis from a phase III clinical trial. *Ocular Surf* 2018;16(3):368-376

27 Zhao SJ, Song N, Gong L. Changes of dry eye related markers and tear inflammatory cytokines after upper blepharoplasty. *Front Med (Lausanne)* 2021;8:763611

28 Choi W, Noh H, Yeo A, *et al.* The effect of TNF- α blocker HL036337 and its best concentration to inhibit dry eye inflammation. *Korean J Ophthalmol* 2016;30(4):302-308

29 Garbutcheon-Singh KB, Carnt N, Pattamatta U, *et al.* A review of the cytokine IL-17 in ocular surface and corneal disease. *Curr Eye Res* 2019;44(1):1-10

30 Wang JL, Gong J, Yang QG, *et al.* Interleukin-17 receptor E and C-C motif chemokine receptor 10 identify heterogeneous T helper 17 subsets in a mouse dry eye disease model. *Am J Pathol* 2022;192(2):332-343

31 Seo Y, Ji YW, Lee SM, *et al.* Activation of HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) prevents dry eye-induced acinar cell death in the lacrimal gland. *Cell Death Dis* 2014;5(6):e1309

32 胡海兰, 顾丰华. 干眼症的动物模型研究进展. *世界临床药物* 2019;40(2):119-122

33 张佳月, 陈卓, 葛红岩. 多种干眼动物模型建立方法研究进展. *国际免疫学杂志* 2022;45(2):184-189

34 Şimşek C, Doğru M, Kojima T, *et al.* Current Management and Treatment of Dry Eye Disease. *Turk J Ophthalmol* 2018;48(6):309-313