

# 基于转录组学和网络药理学探究清眩润目饮治疗干眼的作用机制

刘颖<sup>1</sup>, 赵珊珊<sup>1</sup>, 黄佳宇<sup>2</sup>, 姚靖<sup>3</sup>

引用: 刘颖, 赵珊珊, 黄佳宇, 等. 基于转录组学和网络药理学探究清眩润目饮治疗干眼的作用机制. 国际眼科杂志, 2024, 24(10): 1529-1535.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81973908); 黑龙江中医药大学研究生创新科研项目 (No.2023yjsx018)

作者单位: <sup>1</sup>(150000) 中国黑龙江省哈尔滨市, 黑龙江中医药大学; <sup>2</sup>(215000) 中国江苏省张家港市中医医院神经内科; <sup>3</sup>(150000) 中国黑龙江省哈尔滨市, 黑龙江中医药大学附属第一医院眼科

作者简介: 刘颖, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗眼表及眼底疾病。

通讯作者: 姚靖, 女, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 中西医结合治疗眼表及眼底疾病. 1273830946@qq.com

收稿日期: 2023-12-13 修回日期: 2024-09-02

## 摘要

**目的:** 基于转录组学和网络药理学探究清眩润目饮 (QRY) 治疗干眼 (DE) 的作用机制, 并通过干眼动物模型对 QRY 的药效和关键靶点进行实验验证。

**方法:** 运用 RNA 高通量测序 (RNA-seq) 技术检测干眼小鼠与正常小鼠的差异表达基因 (DEGs), 通过数据库筛选 QRY 有效成分及作用靶点, 将二者重叠获取关键靶点后, 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 构建“药物-成分-靶点-信号通路”网络并分析蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI); 自动物实验开始每 7 d 对小鼠行 Schirmer I 试验 (S I t)、泪膜破裂时间检测 (BUT)、角膜荧光染色试验 (FL) 检查; HE 染色观察小鼠角膜组织病理变化; ELISA、Western blot、qRT-PCR 验证小鼠角膜组织中核心靶点的蛋白和 mRNA 表达水平。

**结果:** 获得 DEGs 共 2 234 个、QRY 有效成分 233 个及相关靶点 457 个, 获得关键靶点 64 个, GO 与 KEGG 分析结果提示 QRY 与炎症反应密切相关, 通过 PPI 网络筛选出白介素-6 (IL-6) 等 19 个核心靶点; QRY 组的 S I t、BUT、FL 结果与模型组相比有差异 (均  $P < 0.05$ ); HE 染色结果示模型组角膜上皮细胞分层紊乱且角膜形态发生改变, QRY 组可以改善角膜粗糙及分层紊乱的情况, 形态接近空白组; ELISA、Western blot、qRT-PCR 结果示 QRY 组的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的蛋白和 mRNA 表达对比模型组都呈现出下降趋势。

**结论:** 清眩润目饮通过多成分、多靶点、多通路联合发挥作用, 利用槲皮素等主要成分对 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF 等靶点进行调控, 从而抑制 AGE-RAGE/TNF/IL-17 等信号通路以实现对于干眼的治疗作用。

**关键词:** 清眩润目饮; 干眼; 转录组学; 网络药理学; 炎症

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.10.03

## Mechanism of Qingxuan Runmu Yin in the treatment of dry eye based on transcriptomics and network pharmacology

Liu Ying<sup>1</sup>, Zhao Shanshan<sup>1</sup>, Huang Jiayu<sup>2</sup>, Yao Jing<sup>3</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81973908); Postgraduate Innovation Fund of Heilongjiang University of Chinese Medicine (No.2023yjsx018)

<sup>1</sup>Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China; <sup>2</sup>Department of Neurology, Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangjiagang 215000, Jiangsu Province, China; <sup>3</sup>First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China

**Correspondence to:** Yao Jing. First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China. 1273830946@qq.com

Received: 2023-12-13 Accepted: 2024-09-02

## Abstract

• **AIM:** To investigate the mechanism of action of Qingxuan Runmu Yin (QRY) in the treatment of dry eye (DE) based on transcriptomics and network pharmacology, and to validate the efficacy and key targets of QRY through a animal model of DE.

• **METHODS:** RNA-seq technology was used to detect differentially expressed genes (DEGs) between mice in the DE group and mice in the normal control group, the active ingredients and potential targets of QRY were screened through database, and gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis were carried out after overlapping the results and obtaining key targets. Additionally, “drug-component-target signaling pathways” network was built and the protein-protein interaction (PPI) was analyzed. Mice were examined for Schirmer I test (S I t), tear film breakup time (BUT), and corneal fluorescein staining (FL) every 7 d from the beginning of the animal experiments. Hematoxylin-eosin staining (HE) was performed to observe pathologic changes in mouse corneal tissues. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were performed to verify the mRNA and protein

expression levels of the core targets in mouse corneal tissues.

• **RESULTS:** Totally 2 234 DEGs, 233 active ingredients and 457 related targets of QRY were collected, with a total of 64 key targets obtained. GO function and KEGG pathway results showed that QRY was closely related to inflammatory mediators, and 19 core targets such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were screened by PPI network construction; S I t, BUT and FL results in the QRY group were statistically significantly different compared with the model group (all  $P < 0.05$ ); HE staining showed that corneal epithelial cell stratification was disordered and the corneal morphology was changed in the model group. However, QRY treatment significantly improved corneal morphology and disordered stratification, with a close morphology to the blank group; ELISA, Western blot and qRT-PCR results showed that the protein expression and RNA levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in the QRY group showed a decreasing trend compared with the model group.

• **CONCLUSION:** Through the combination of multiple components, multiple targets and multiple pathways, QRY regulated the targets such as IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF through quercetin and other main components, thereby inhibiting AGE-RAGE/TNF/IL-17 and other signaling pathways, thus achieving the treatment on DE.

• **KEYWORDS:** Qingxuan Runmu Yin; dry eye; transcriptomics; network pharmacology; inflammation

**Citation:** Liu Y, Zhao SS, Huang JY, et al. Mechanism of Qingxuan Runmu Yin in the treatment of dry eye based on transcriptomics and network pharmacology. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(10):1529-1535.

## 0 引言

泪液的质和量以及其动力学异常导致的泪膜稳态失衡是导致干眼(DE)产生的主要原因,干眼患者常呈现眼部干涩疼痛、畏光流泪及异物感等临床表现,且多伴有眼表组织、神经异常及局部炎症反应<sup>[1]</sup>。我国干眼的发病率为21%-30%<sup>[2]</sup>,并且呈逐年增高趋势。泪液代替药物和抗炎是当下西医在干眼治疗中的主要方法,但这些药物临床需长期使用、持续时间短且易导致不良反应<sup>[3-4]</sup>。越来越多的临床报道表明,中医药疗法在治疗干眼方面具有疗效时间长、复发率降低且安全性高的优势,已经成为治疗干眼的重要方法<sup>[5]</sup>。清眩润目饮(qingxuan runmu yin, QRY)是姚靖教授基于“肺脾同治”理论指导下总结出治疗干眼的经验方<sup>[6]</sup>,可减轻眼表炎症反应<sup>[7]</sup>、增加泪液分泌及维持眼表环境稳态,有效改善干眼患者的症状及预后<sup>[8]</sup>。但其治疗干眼的具体作用靶点和作用机制尚不清楚。不同于当下泪液代替药物和抗炎药物,中药方剂具有有效成分多,对应靶点多及作用方式多的特点,网络药理学可将成分、靶点、疾病间的复杂关系进行网络构建<sup>[9-10]</sup>。RNA高通量测序(RNA-sequencing, RNA-seq)是一种强大的转录筛选技术,可以通过比较不同的条件,如正常和疾病状态来识别差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)<sup>[11-12]</sup>。本研究将网络药理学与转录组学相

结合的方法,探索QRY治疗苯扎氯铵(benzalkonium chloride, BAC)诱导的干眼模型小鼠的潜在有效成分和作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 **动物选取** 8周龄C57BL/6J小鼠,雌性,体质量18-20 g,辽宁长生生物技术股份有限公司提供,动物合格证号SCXK(辽)2020-0001,本实验由黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准(No.2023092203),小鼠饲养于黑龙江中医药大学SPF级实验动物中心,自由饮水和进食,环境湿度控制为22-25 $^{\circ}$ C,湿度控制为50%-60%,12h/12h明暗交替。

1.1.2 **药物** QRY由白术10 g、麦冬10 g、玄参10 g、生地黄10 g、防风10 g、甘草10 g、金银花10 g、苦参10 g、桔梗10 g、茯苓10 g组成,饮片购自黑龙江德顺长中药饮片有限公司,由黑龙江中医药大学中药鉴定学教研室鉴定合格,由黑龙江中医药大学附属第一医院药剂科制备,质量浓度为1 g/mL。

1.1.3 **主要试剂及仪器** BAC(上海阿拉丁生化科技有限公司);苏木素染液(武汉赛维尔生物科技有限公司);小鼠TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6 ELISA检测试剂盒(上海江莱生物科技有限公司);All-in-one First Strand cDNA Synthesis Kit II for qRT-PCR(with dsDNase),2 $\times$ SYBR Green qRT-PCR MasterMix II(Universal)(赛文创新(北京)生物科技有限公司);IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 抗体(proteintech);IL-6抗体(affinity)。FQD-96C实时荧光定量PCR分析仪(杭州博日科技股份有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及给药

1.2.1.1 **干眼动物模型制备** 根据文献[13]报道,制备干眼小鼠模型。双眼均滴入5 $\mu$ L的0.2% BAC溶液,每天2次,连续14 d。第15 d行Schirmer I试验(S I t)、泪膜破裂时间检测(BUT)、角膜荧光染色试验(FL)检测。以双眼S I t $<$ 3 mm/5 min, BUT $<$ 10 s且FL阳性为干眼动物模型制备成功标准。

1.2.1.2 **RNA-seq小鼠制备** 40只8周龄C57BL/6J小鼠随机分为正常组和干眼组,每组20只,正常组小鼠每天2次双眼均滴入5 $\mu$ L的磷酸盐缓冲液滴眼,连续14 d;干眼组小鼠按1.2.1.1进行动物模型制备。

1.2.1.3 **实验验证小鼠分组及给药** 将60只8周龄C57BL/6J小鼠随机分为空白组(20只)和BAC组(40只),空白组双眼均滴入5 $\mu$ L的磷酸盐缓冲液滴眼,每天2次,连续14 d;BAC组按1.2.1.1进行动物模型制备。第15 d将模型制备成功的BAC组小鼠随机分为模型组和QRY组,每组20只。空白组和模型组按照31.5 g/(kg $\cdot$ d)的剂量给予生理盐水灌胃<sup>[14]</sup>,每天2次,连续14 d;QRY组按照31.5 g/(kg $\cdot$ d)的剂量给予QRY灌胃,每天2次,连续14 d。

#### 1.2.2 RNA-seq检测正常组小鼠与干眼组小鼠的DEGs

RNA-seq小鼠制备成功后,收集正常组与干眼组用于RNA-seq的角膜组织样本,从2组样本中各提取3个RNA样品经检验合格后构建cDNA文库,使用Illumina NovaSeq 6000型测序平台进行RNA-seq,以 $|\log_2 FC| \geq 1.0$ 且 $P \leq 0.05$ 为阈值筛选DEGs。

### 1.2.3 QRY 治疗干眼的潜在分子靶点预测

**1.2.3.1 药物-疾病-差异表达基因交集靶点的筛选** 在 TCMSP 数据库 (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>) 查询 QRY 中十味中药的有效成分,以口服生物利用度  $\geq 30\%$  及类药性  $\geq 0.18$  为筛选条件<sup>[15]</sup>,并在 TCMIP 数据库 (<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php>) 检索 TCMSP 数据库中尚未收录的中草药,以类药性权重 (druglikeness weight)  $\geq 0.49$  为筛选条件<sup>[16]</sup>,将筛选出的具有良好吸收、代谢和分布的中药成分作为 QRY 的有效成分。通过 RNA-seq 获取 DEGs 后运用 Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/>) 提取 QRY 有效成分相关靶点和 DEGs 的共同靶基因作为 QRY 治疗干眼的关键靶点。

**1.2.3.2 基因本体功能富集和京都基因与基因组百科全书富集分析** 上传获取的关键靶点到 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行基因本体 (GO) 功能分析和基因组百科全书 (KEGG) 通路分析,依据  $P < 0.05$  进行筛选<sup>[17]</sup>。利用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制柱状图、富集气泡图对结果数据进行可视化分析。

**1.2.3.3 “药物-成分-靶点-信号通路”网络及蛋白质-蛋白质相互作用网络构建** 利用 Cytoscape 3.7.2 软件将获取的关键靶点、QRY 有效成分及 KEGG 预测的信号通路相连接,构建“药物-成分-靶点-信号通路”网络。通过 String 数据库 (<https://string-db.org/>) 分析关键靶基因的蛋白质相互作用并利用 Cytoscape 3.7.2 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络,计算 PPI 网络中每个节点的度值 (degree, D)、中介中心度 (betweenness centrality, BC) 及接近中心度 (closeness centrality, CC) 三个拓扑参数,选择均大于等于中位数值值的靶点作为 QRY 治疗干眼的核心靶点。

**1.2.4 干眼相关临床检测** 分别于灌胃开始后第 0、7、14 d 行 SIt、BUT、FL 检测。

**1.2.5 HE 染色观察角膜组织病理变化** 各组取 1 只小鼠角膜组织,按照标准方案用苏木精和伊红 (HE) 染色,光镜下分析病理变化。

**1.2.6 Western blot 与 ELISA 检测角膜组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  及 IL-6 的蛋白表达** 每组各取 9 只小鼠角膜组织,裂解离心取上清,SDS-PAGE 分离蛋白,NC 膜三明治法湿转,室温下摇床封闭 1 h 后加入 1:1 500 的 TNF- $\alpha$ 、

IL-6 及 1:2 000 的 IL-1 $\beta$  一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,洗膜后二抗孵育 1 h,再次洗膜后加入 ECL 显色液利用化学发光成像分析系统曝光,利用 ImageJ 软件分析条带。

每组各取 5 只小鼠角膜组织,根据 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA 检测试剂盒说明书制备标准品,加样后将微孔板封盖温育 1 h,洗板后加入一抗,再次温育 1 h 后洗板,每孔中加入酶标抗体工作液 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min,洗板后加入底物避光温育 15 min,加入终止液后 10 min 内用酶标仪在 450 nm 处检测各孔吸光值。

**1.2.7 qRT-PCR 检测角膜组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  及 IL-6 的 mRNA 表达** 每组各取 5 只小鼠角膜组织,根据制造商的说明,将角膜组织样本加入试剂盒中按步骤操作获取 cDNA 样本进行 qRT-PCR 扩增反应。qRT-PCR 基因引物序列见表 1。每个样品的 qRT-PCR 分析一式三份,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  方法。对照基因 GAPDH 进行表达水平归一化。

统计学分析:使用 SPSS 25.0 软件进行分析。对于生物信息学分析,通过超几何分布检验和 Fisher 精确检验进行数据分析。采用 Benjamini-Hochberg 方法校正错误发现率 (FDR)。数据以均数  $\pm$  标准差表示,多组均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- $t$  检验;若不符合正态分布,以中位数 (四分位数) 表示,重复测量资料采用广义估计方程。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 RNA-seq 检测 DEGs 结果** 利用 RNA-seq 技术,获得符合筛选条件的干眼小鼠与正常小鼠 DEGs 共 2 234 个,其中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、MMP-9 等 1 391 个 mRNA 表达上调,MAPK8、LSS、ALB 等 843 个 mRNA 表达下降,见图 1A。干眼组与正常组 DEGs 表达水平热图表明,干眼组小鼠与正常组小鼠存在明显的基因表达差异,见图 1B。

表 1 qRT-PCR 基因引物序列

名称	序列
TNF- $\alpha$ F	CTCAAGCCCTGGTATGAGCC
TNF- $\alpha$ R	GGCTGGGTAGAGAACGGATG
IL-6 F	CCTACCCCAACTTCCAATGCT
IL-6 R	CATAGCACACTAGTTTGCCG
IL-1 $\beta$ F	GAGTCTGCACAGTCCCCAA
IL-1 $\beta$ R	TCCTGGGGAAGGCATTAGGA

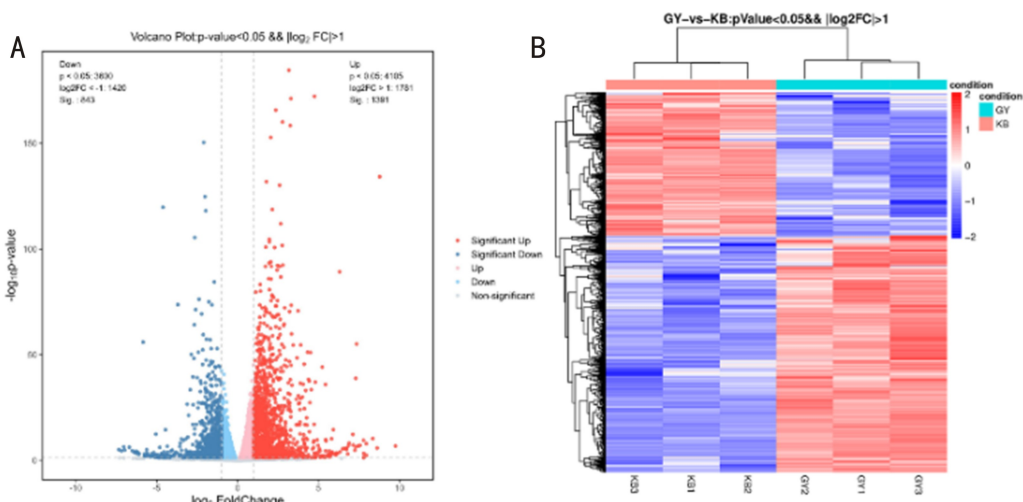


图 1 RNA-seq 检测干眼组与正常组 DEGs 结果 A:DEGs 火山图;B:DEGs 表达水平热图。

## 2.2 QRY 治疗干眼的潜在分子靶点预测结果

**2.2.1 药物-疾病-差异表达基因交集靶点的筛选** 通过 TCMSIP 及 TCMIP 数据库对白术、麦冬、玄参、生地黄、防风、甘草、金银花、苦参、桔梗、茯苓进行检索,获得符合筛选条件的 QRY 有效成分 233 个,并获得 MMP-9、IL-6、NOS2 等有效成分相关靶点 457 个。将 457 个 QRY 潜在靶点和 2 234 个 DEGs 通过 Venny 得到 64 个关键靶点,见图 2A。

**2.2.2 GO 和 KEGG 富集分析** 将 64 个关键靶点通过 David 数据库进行 GO 功能和富集分析,获得符合筛选条件的 GO 条目,选取 GO 条目中生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 的前 5 条途径进行条形图绘制,富集分析结果提示,QRY 对干眼的治疗在生物学过程中主要涉及对外源性刺激的反应、细胞对脂多糖的反应、炎症反应等;细胞组分主要涉及质膜的组成成分、细胞质膜、细胞外空间等;分子功能主要涉及同种蛋白结合、酶结合、蛋白质结合等,见图 2B。KEGG 富集分析根据 *P* 值选取结果前 15 条途径进行

气泡图绘制,富集结果显示,QRY 治疗干眼主要涉及的信号通路包括糖尿病并发症的 AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、TLR 信号通路和 Relaxin 信号通路,见图 2C。

**2.2.3 “药物-成分-靶点-疾病-信号通路”网络构建** 将筛选得到的 233 个 QRY 有效成分、64 个关键靶点、KEGG 富集分析获取的 15 条信号通路以及 QRY 的十味中药导入 Cytoscape3.7.2 中,删除无连接的独立节点后生成“药物-成分-靶点-疾病-信号通路”网络模型,节点图形越大表示其 degree 值越大,见图 2D。

**2.2.4 PPI 网络构建** 将 64 个关键靶点导入 String 数据库,构建蛋白质相互作用网络,并将结果导入 Cytoscape 3.7.2 中进行可视化处理,获得 60 个靶点和 357 条边的 PPI 网络图,圆形面积越大,颜色越深表示其 degree 值越大,见图 2E。选取 D、BC、CC 三个拓扑参数均大于等于中位数的靶点,共获得 19 个核心靶点,见图 2F。结果提示 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF 等靶点可能在 QRY 治疗干眼的过程中发挥核心作用。

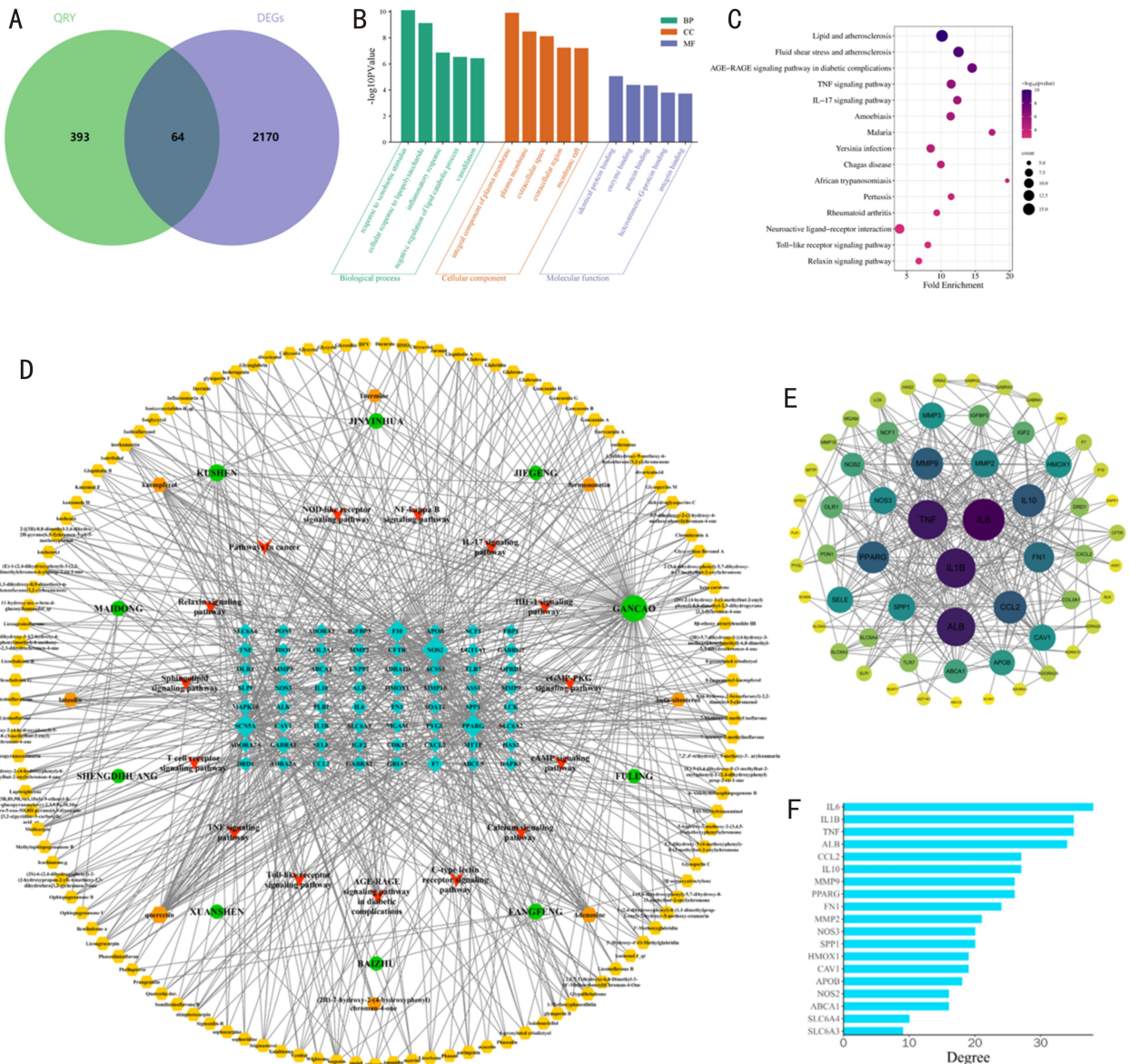


图 2 QRY 治疗干眼的潜在分子靶点预测结果 A: QRY 有效成分相关靶点与 DEGs 共同靶点韦恩图; B: GO 分析各项结果; C: KEGG 分析结果前 15 条途径气泡图; D: 药物-成分-靶点-信号通路网络图; E: 关键靶点蛋白质相互作用网络图; F: 核心靶点 Degree 排序图。

## 2.3 动物实验验证结果

**2.3.1 干眼相关临床检测** 治疗前后不同时间,三组 S I t、BUT 及 FL 比较,差异有统计学意义(S I t: Wald  $\chi^2_{\text{分组}} = 221.877$ , Wald  $\chi^2_{\text{时间}} = 58.360$ , Wald  $\chi^2_{\text{分组} \times \text{时间}} = 251.734$ , 均  $P < 0.01$ ; BUT: Wald  $\chi^2_{\text{分组}} = 216.875$ , Wald  $\chi^2_{\text{时间}} = 131.403$ , Wald  $\chi^2_{\text{分组} \times \text{时间}} = 125.444$ , 均  $P < 0.01$ ; FL: Wald  $\chi^2_{\text{分组}} = 258.557$ , Wald  $\chi^2_{\text{时间}} = 133.632$ , Wald  $\chi^2_{\text{分组} \times \text{时间}} = 149.054$ , 均  $P < 0.01$ )。小鼠开始灌胃前,与空白组相比,模型组和 QRY 组的 S I t、BUT 显著降低,FL 显著升高(均  $P < 0.05$ ),提示干眼小鼠造模成功。治疗 14 d 后,QRY 组的 S I t 结果与模型组比较,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 QRY 干预后,泪液分泌情况有所改善;QRY 组的 BUT 结果与模型组比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),提示 QRY 的干预可以有效延长泪膜破裂时间;QRY 组的 FL 评分与模型组比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。QRY 组 S I t、BUT 及 FL 整体改善优于模型组,见表 2-4。

**2.3.2 HE 染色** 模型组小鼠角膜上皮细胞分层紊乱且角膜形态发生改变,QRY 组能有效改善 BAC 诱导的角膜粗糙及分层紊乱的情况,治疗后形态接近空白组,见图 3A。

**2.3.3 Western blot 检测及 ELISA 检测** Western blot 实验结果表明,空白组、模型组、QRY 组 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  蛋白表达差异具统计学意义( $F = 75.12, 44.50, 26.55$ , 均  $P < 0.01$ );其中与空白组相比,模型组和 QRY 组 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  显著升高( $P < 0.01$ ),与模型组比,QRY 组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 显著降低( $P < 0.01$ ),TNF- $\alpha$  降低但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 3B。

ELISA 检测结果显示,空白组、模型组、QRY 组 IL-1 $\beta$  蛋白表达差异具有统计学意义( $F = 84.48, P < 0.01$ ),IL-6 表达量差异具有统计学意义( $F = 7.57, P < 0.05$ ),TNF- $\alpha$  表达量差异具有统计学意义( $F = 11.92, P < 0.01$ );与空白组相比,模型组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  显著升高(均  $P < 0.01$ ),模型组 IL-6 升高( $P < 0.05$ ),QRY 组 IL-1 $\beta$  显著升高( $P <$

$0.01$ );与模型组比,QRY 组 IL-1 $\beta$  显著降低( $P < 0.01$ ),TNF- $\alpha$  及 IL-6 降低(均  $P < 0.05$ ),见图 3C。

**2.3.4 qRT-PCR 检测** 通过 qRT-PCR 分析,空白组、模型组、QRY 组 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达量差异有统计学意义( $F = 29.09, 64.83, 165.40$ , 均  $P < 0.01$ );与空白组比,模型组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  显著升高(均  $P < 0.01$ ),QRY 组 IL-1 $\beta$  升高( $P < 0.05$ );与模型组比,QRY 组 IL-1 $\beta$  降低( $P < 0.05$ ),TNF- $\alpha$  及 IL-6 显著降低(均  $P < 0.01$ ),见图 3D。

## 3 讨论

《灵枢·五癯津液别》：“五脏六腑之津液，尽上渗于目”，中医学认为津液在目为泪，润泽目珠，故而津液的紊乱是干眼的核心病机。津液的生成，来源于水谷，经脾的升清、胃的腐熟而成；肺为“水之上源”，通过宣发肃降和通调水道，调节水液代谢；肺脾功能失调，津液代谢紊乱，则无法上润于目；故肺脾同调，使泪液化生有源，输布有途，共奏增加泪液，润泽目珠之效。姚靖教授经多年临床实践，在肺脾同治理论指导下，以津液代谢为视角总结出为治疗干眼的经验方清眩润目饮，其具体方药为白术、麦冬、生地黄、玄参、防风、金银花、苦参、桔梗、甘草、茯苓。其中白术健脾化湿，麦冬润肺生津，二者共为君药，肺脾同治，使津液生成有源，输布有序；生地黄养阴生津，玄参滋阴补肾，又与麦冬组增液汤之方，行津液的化生和输布之功；防风为脾经引经药，祛风胜湿，桔梗为肺经引经药，宣肺，载药上行，二者相配，津液上能行于头面部，润泽目珠，下能通利小便，维持津液正常代谢；金银花解毒疏风热，祛头目之邪，苦参凉血止痒，缓白涩之标，茯苓性平归脾，与白术为伍，增健脾之功，甘草入脾补中，调和药性。诸药合用，肺脾同治，调津液以润目珠。多项现代研究<sup>[18-19]</sup>表明，QRY 可以改善泪膜稳定，减轻眼表炎症，打破干眼恶性循环，达到治疗目的。由于 QRY 包含上百种的化学成分，故其对干眼的治疗机制尚不清楚。

表 2 三组治疗前后 S I t 结果比较

[ $M(P_{25}, P_{75})$ , mm/5 min]

组别	n	治疗前	治疗 7 d	治疗 14 d
空白组	40	4.80(4.73, 5.50)	5.50(4.80, 5.90)	5.00(4.60, 5.20)
模型组	40	2.60(2.20, 2.95) <sup>a</sup>	2.40(2.00, 2.80) <sup>a</sup>	2.60(2.00, 2.80) <sup>a</sup>
QRY 组	40	2.50(2.23, 2.90) <sup>a</sup>	3.10(2.60, 3.40) <sup>a</sup>	4.30(3.80, 4.90) <sup>a,c</sup>

注：<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白组；<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 模型组。

表 3 三组治疗前后 BUT 结果比较

[ $M(P_{25}, P_{75})$ , s]

组别	n	治疗前	治疗 7 d	治疗 14 d
空白组	40	14.00(12.00, 14.00)	13.00(11.00, 14.00)	14.00(12.00, 15.00)
模型组	40	5.00(3.25, 6.00) <sup>b</sup>	5.00(3.25, 7.00) <sup>b</sup>	5.00(3.25, 7.00) <sup>b</sup>
QRY 组	40	5.00(4.00, 6.00) <sup>b</sup>	6.00(7.00, 8.00) <sup>b</sup>	10.00(8.25, 11.00) <sup>b,d</sup>

注：<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组；<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 模型组。

表 4 三组治疗前后 FL 结果比较

[ $M(P_{25}, P_{75})$ , 分]

组别	n	治疗前	治疗 7 d	治疗 14 d
空白组	40	0.00(0.00, 1.00)	0.00(0.00, 1.00)	0.00(0.00, 1.00)
模型组	40	9.00(8.00, 11.75) <sup>b</sup>	10.00(8.00, 12.00) <sup>b</sup>	9.00(8.00, 12.00) <sup>b</sup>
QRY 组	40	10.50(8.25, 12.00) <sup>b</sup>	7.00(5.25, 9.00) <sup>b,c</sup>	2.00(1.00, 4.00) <sup>b,d</sup>

注：<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组；<sup>c</sup> $P < 0.05$ ，<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 模型组。

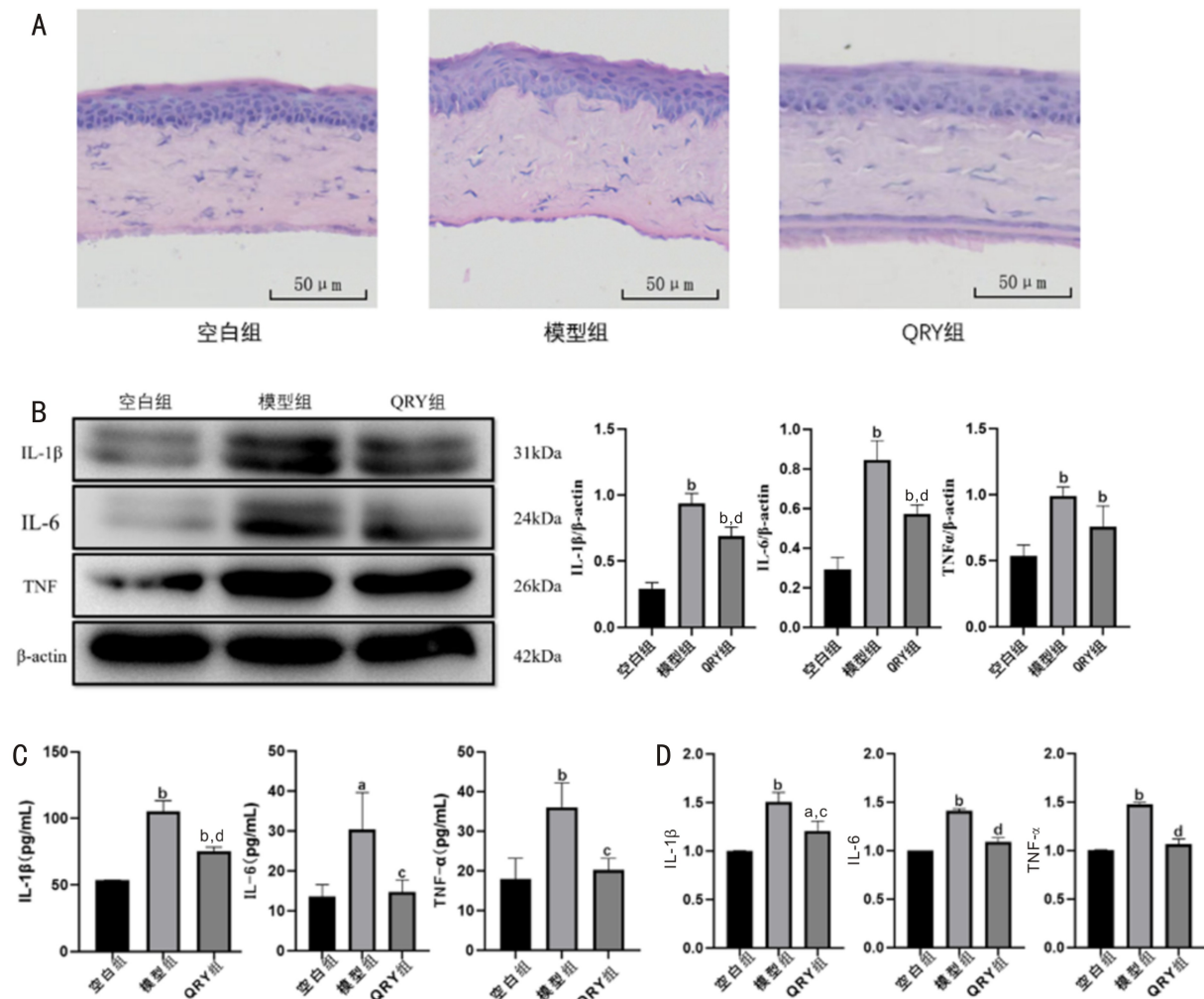


图3 动物实验验证检测结果 A:小鼠角膜 HE 染色结果;B:小鼠角膜 Western blot 检测结果;C:小鼠角膜 ELISA 检测结果;D:小鼠角膜 qRT-PCR 检测结果。<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组;<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 模型组。

研究<sup>[20]</sup>表明,转录组学和网络药理学能够有效地从中药复方化合物与疾病治疗的大量基因中寻找出关键靶点,因此,我们应用 RNA-seq 技术结合网络药理学对 QRY 治疗干眼的具体机制进行探索。对干眼小鼠角膜组织进行 RNA-seq 分析,得到 2 234 个 DEGs,通过网络药理学获得了 233 个有效成分和 457 个相关靶点,重叠后获得了 64 个关键靶点。

通过 KEGG 分析发现 AGE-RAGE、TNF、IL-17、TLR 和 Relaxin 等多条信号通路参与其中。AGE-RAGE 信号通路由蛋白质糖基化产物(AGEs)与其受体(RAGE)相互作用影响下游信号通路的启动和激活,导致包括 IL-1β、IL-6、TNF 在内的多种炎症细胞因子的启动<sup>[21]</sup>,并影响内皮屏障的通透性<sup>[22]</sup>,从而导致多种炎症疾病的发生;多项研究表明 TNF<sup>[23]</sup>、IL-17<sup>[24]</sup>、TLR<sup>[25]</sup>及 Relaxin<sup>[26]</sup>信号通路对炎症具有激活作用,这些通路受体结合后可以激活炎症反应的发生发展。GO 分析生物学过程结果显示 QRY 与炎症反应高度相关,与 KEGG 分析结论相符。利用 PPI 技术,得到相互作用的 60 个靶点并根据 D、BC、CC 值选出包括 IL-1β、IL-6、TNF 等 19 个核心靶点,表明对这些靶点的调控可能是 QRY 治疗干眼过程中的核心环节。

通过上述研究结果构建的“药物-成分-靶点-信号通路”网络模型分析得知,大多数的有效成分影响了多个靶点,例如 quercetin(槲皮素)、kaempferol(山奈酚)、luteolin

(木犀草素)分别影响了 29、14、9 个关键靶点;Inaba 等<sup>[27]</sup>研究表明槲皮素可通过影响泪腺改善泪液分泌,并抑制 ROS 产生并促进细胞存活;Chen 等<sup>[28]</sup>证明添加山奈酚的缓冲液可增加泪液分泌量并促进受损角膜恢复;Xie 等<sup>[29]</sup>研究发现木犀草素可以通过信号通路 Sirt1/NF-κB/NLRP3 改善小鼠干眼抑郁症的症状;上述研究结论与本研究结果相符合,证明槲皮素等化合物可能是 QRY 治疗干眼的关键成分。

IL-1β 等炎症介质的分泌是干眼恶性循环中的重要一环<sup>[30]</sup>,本次实验结果发现 QRY 使角膜组织中促炎细胞因子(IL-1β、IL-6、TNF-α)的 mRNA 水平与蛋白质表达呈现相似的下降趋势,与既往研究相符<sup>[31]</sup>,表明 QRY 能够抑制干眼眼表炎症反应,打破干眼恶性循环。动物实验证实,QRY 能够有效改善泪液分泌,增加泪膜破裂时间,促进小鼠角膜上皮损伤恢复,使角膜组织形态接近正常,从而有效治疗干眼。

网络药理学现已逐渐成为中药及中药组方研究中的一门指导性理论科学,但其无法分辨出化合物对靶点的作用是激活还是抑制,RNA-seq 技术通过鉴定基因的差异表达情况完善了网络药理学的不足之处,而网络药理学又可以在样本量有限的条件下从成千上万种差异表达基因中预测筛选出更为重要的目标靶点。目前,本次研究仍存在一些局限性,如中药数据库对有效成分及其靶点以及疾

病数据库中对干眼相关基因的收录可能存在一定程度的缺失,本次实验中 RNA-seq 技术检测的样本数量也较为有限,有望后续通过扩大样本量及进一步研究加以完善。

综上所述,清眩润目饮可能是利用槲皮素等主要成分对 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF 等核心靶点进行调控,从而抑制 AGE-RAGE/TNF/IL-17 等信号通路以实现对于眼的有效治疗作用。

#### 参考文献

[1] 亚洲干眼协会中国分会, 海峡两岸医药卫生交流协会眼科学专业委员会眼表与泪液病学组, 中国医师协会眼科医师分会眼表与干眼学组. 中国干眼专家共识: 定义和分类(2020年). 中华眼科杂志, 2020,56(6):418-422.

[2] 韩德雄, 施园, 田鸿芳, 等. 基于脏腑精气“上注于目出于项”从颈论治干眼症 32 例. 中国针灸, 2019,39(1):91-93.

[3] Jones L, Downie LE, Korb D, et al. TFOS DEWS II management and therapy report. Ocul Surf, 2017,15(3):575-628.

[4] O'Neil EC, Henderson M, Massaro-Giordano M, et al. Advances in dry eye disease treatment. Curr Opin Ophthalmol, 2019, 30(3):166-178.

[5] 张霞, 李香妤, 张雄伟, 等. 中医药治疗干燥综合征的研究进展. 中国中药杂志, 2023,48(12):3235-3245.

[6] 王佳娣, 安百平, 刘悦, 等. 清眩润目饮颗粒治疗糖尿病干眼患者的临床研究. 中国临床药理学杂志, 2023,39(22):3257-3261.

[7] 于珂鑫, 姚靖, 王佳娣, 等. 清眩润目饮治疗兔蒸发过强型干眼的作用机制. 国际眼科杂志, 2018,18(7):1192-1196.

[8] 姚靖, 王佳娣, 谢广芳. 中药清眩润目饮治疗睑板腺功能障碍致蒸发过强型干眼 60 例的临床观察. 中医药学报, 2014,42(5):51-53.

[9] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇. 药理学报, 2012,47(6):696-703.

[10] Jiang YF, Zhu YH, Zhen TM, et al. Transcriptomic analysis of the mechanisms of alleviating renal interstitial fibrosis using the traditional Chinese medicine Kangxianling in a rat model. Sci Rep, 2020,10:10682.

[11] Finotello F, di Camillo B. Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis. Brief Funct Genomics, 2015,14(2):130-142.

[12] Luo TT, Lu Y, Yan SK, et al. Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: methodology, application and prospective. Chin J Integr Med, 2020,26(1):72-80.

[13] 干眼动物模型制备规范(草案). 中国实验方剂学杂志, 2018,24(19):6-9.

[14] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算. 中国临床药理学与治疗学, 2004,9:1069-1072.

[15] 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.

[16] Xu HY, Zhang YQ, Liu ZM, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine. Nucleic Acids Res, 2019,47(D1):D976-D982.

[17] Zhu HH, Wang S, Shan C, et al. Mechanism of protective effect of Xuan-Bai-Cheng-qi decoction on LPS-induced acute lung injury based on an integrated network pharmacology and RNA-sequencing approach. Respir Res, 2021,22(1):188.

[18] 张婷, 张娟, 余琴. 清眩润目饮结合角膜吸氧对自身免疫性干眼症的治疗效果. 吉林中医药, 2023,43(9):1059-1062.

[19] 于珂鑫. 清眩润目饮对水液缺乏型干眼兔角、结膜 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  表达影响的实验研究. 黑龙江中医药大学, 2019.

[20] Liu C, Yin ZG, Feng TT, et al. An integrated network pharmacology and RNA-Seq approach for exploring the preventive effect of Lonicerae japonicae Flos on LPS-induced acute lung injury. J Ethnopharmacol, 2021,264:113364.

[21] Ahmad S, Khan H, Siddiqui Z, et al. AGEs, RAGEs and s-RAGE; friend or foe for cancer. Semin Cancer Biol, 2018,49:44-55.

[22] Zhou HH, Jin CL, Cui LL, et al. HMGB1 contributes to the irradiation-induced endothelial barrier injury through receptor for advanced glycation endproducts (RAGE). J Cell Physiol, 2018,233(9):6714-6721.

[23] van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. Nat Rev Immunol, 2023,23:289-303.

[24] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. Nat Rev Drug Discov, 2012,11(10):763-776.

[25] 李宝花, 宁博彪, 魏宇娇, 等. TLRs 信号通路在干眼发病机制中的研究进展. 国际眼科杂志, 2021,21(5):827-831.

[26] Zhou HF, Ren K, Zhao GJ. Relaxin inhibits macrophage inflammation by repressing NLRP3. Int J Cardiol, 2020,299:254.

[27] Inaba T, Ohnishi-Kameyama M, Liu Y, et al. Quercetin improves lacrimal gland function through its anti-oxidant actions: Evidence from animal studies, and a pilot study in healthy human volunteers. Front Nutr, 2022,9:974530.

[28] Chen HC, Chen ZY, Wang TJ, et al. Herbal supplement in a buffer for dry eye syndrome treatment. Int J Mol Sci, 2017,18(8):1697.

[29] Xie MX, Wang HQ, Gao TT, et al. The protective effect of luteolin on the depression-related dry eye disorder through Sirt1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 pathway. Aging, 2023,15(1):261-275.

[30] Walter K. What is dry eye disease? JAMA, 2022,328(1):84.

[31] 王佳娣, 姚靖, 曹丛红, 等. 清眩润目饮对蒸发过强型干眼模型鼠角结膜炎症因子表达的影响. 中国中医眼科杂志, 2018,28(5):286-291.