

贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变的网络药理学机制分析

边云¹, 白海龙¹, 孟晓峰², 刘晓¹, 薛超¹, 刘瑞雪¹,
常洪坤³, 田凤胜¹, 崔荣岗¹, 苏阳¹, 刘梅⁴

(河北省沧州中西医结合医院, 1. 糖尿病三科, 2. 治未病中心, 3. 超声二科, 4. 眼科, 河北 沧州, 061001)

摘要: **目的** 探讨贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变的作用机制。**方法** 利用网络药理学筛选贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变关键靶点,并通过分子对接预测活性成分的结合部位。结合网络药理学结果,构建糖尿病视网膜病变大鼠模型。将60只大鼠随机分为正常组、模型组、羟苯磺酸钙片组和贞莲明目胶囊组,每组15只。正常组、模型组给予2 mL生理盐水,每日1次灌胃;羟苯磺酸钙片组、贞莲明目胶囊组分别给予相应浓度的治疗药物(2 mL),每日1次灌胃。给药4周后,取大鼠视网膜进行检测,比较视网膜厚度、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平和血管内皮生长因子(VEGF)、核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达水平。**结果** 网络药理学共筛选出贞莲明目胶囊有效成分2 367种,作用靶点248个,糖尿病视网膜病变相关靶点3 943个,其交集靶点153个。基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析得出主要涉及信号转导、炎症反应、细胞凋亡等生物学反应过程,主要参与IL-1 β 、EGF/EGFR/P13K/AKT、IL-6/STAT3、肿瘤蛋白P53(TP53)和胱天蛋白酶3(CASP3)等信号通路的调控。分子对接结果表明,筛选得到的主要活性成分与靶点有较强的结合。与正常组比较,模型组大鼠视网膜厚度降低,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VEGF、NF- κ B升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,羟苯磺酸钙片组大鼠视网膜厚度升高,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VEGF、NF- κ B降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与羟苯磺酸钙片组比较,贞莲明目胶囊组大鼠视网膜厚度升高,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VEGF、NF- κ B降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 贞莲明目胶囊对糖尿病视网膜病变的治疗或许具有积极作用,其作用机制可能与调节IL-1 β 、EGF/EGFR/P13K/AKT、IL6/STAT3、TP53和CASP3信号通路有关。

关键词: 贞莲明目胶囊;糖尿病视网膜病变;网络药理学;作用机制

中图分类号: R 587.1; R 285 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2023)18-075-08 DOI: 10.7619/jcmp.20232153

Analysis of network pharmacological mechanism of Zhenlian Mingmu Capsule in treatment of diabetic retinopathy

BIAN Yun¹, BAI Hailong¹, MENG Xiaofeng², LIU Xiao¹, XUE Chao¹,
LIU Ruixue¹, CHANG Hongkun³, TIAN Fengsheng¹, CUI Ronggang¹,
SU Yang¹, LIU mei⁴

(1. the Third Department of Diabetes, 2. Center of Preventive Treatment of Disease, 3. the Second Department of Ultrasound, 4. Department of Ophthalmology, Cangzhou Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine in Hebei Province, Cangzhou, Hebei, 061001)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of Zhenlian Mingmu Capsule in the treatment of diabetic retinopathy. **Methods** The key targets of Zhenlian Mingmu Capsule in the treatment of diabetic retinopathy were screened by network pharmacology, and the binding sites of active ingredients were predicted by molecular docking. Combined with the results of network pharmacology, a rat model of diabetic retinopathy was established. Sixty rats were randomly divided into normal group, model group, calcium hydroxybenzene sulfonate tablet group and Zhenlian Mingmu Capsule group, with 15 rats in each group. The normal group and the model group were given 2 mL normal saline and gavage once a day; the calcium hydroxybenzene sulfonate tablet group and Zhenlian Mingmu Capsule

group were respectively given the corresponding concentration of therapeutic drugs (2 mL), once a day. After 4 weeks of administration, retinal thickness, interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels, and protein expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) were measured. **Results** A total of 2 367 active ingredients of Zhenlian Mingmu Capsule were identified by network pharmacology, with 248 targets, 3 943 targets related to diabetic retinopathy, and 153 intersection targets. According to the analysis of Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), it was mainly involved in biological reaction processes such as signal transduction, inflammation and apoptosis, and mainly involved in the regulation of IL-1 β , EGF/EGFR/P13K/AKT, IL-6/STAT3, TP53 and CASP3 signal pathways. The results of molecular docking showed that the main active ingredients obtained by screening had strong binding with the target. Compared with the normal group, retinal thickness in the model group was significantly decreased, and IL-1 β , IL-6, TNF- α , VEGF, NF- κ B were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the retinal thickness of rats in the calcium hydroxybenzene sulfonate tablet group was significantly increased, and IL-1 β , IL-6, TNF- α , VEGF, NF- κ B were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the calcium hydroxybenzene sulfonate tablet group, retinal thickness in the Zhenlian Mingmu Capsule group was significantly increased, and IL-1 β , IL-6, TNF- α , VEGF, NF- κ B were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Zhenlian Mingmu Capsule may have a positive effect in the treatment of diabetic retinopathy, and its mechanism may be related to the regulation of IL-1 β , EGF/EGFR/P13K/AKT, IL6/STAT3, TP53 and CASP3 signaling pathways.

Key words: Zhenlian Mingmu Capsule; diabetic retinopathy; network pharmacology; mechanism of action

糖尿病视网膜病变是糖尿病常见的微血管并发症^[1]。一项全球荟萃分析^[2]报告,近 1/3 的糖尿病患者被诊断出患有糖尿病视网膜病变,1/10 的糖尿病视网膜病变患者会发展为影响视力的疾病。预防和治疗糖尿病视网膜病变主要通过规范使用肠激肽酶、羟苯磺酸钙等药物,尽管部分患者视力有所改善,但仍有 46% 的患者需要激光和(或)手术治疗^[3]。中医药治疗糖尿病视网膜病变历史悠久,积累了丰富的实践经验,具有多成分、多靶点、多途径的优势。现代药理学研究^[4]发现,中药可以改善眼底局部的血液循环,促进眼底渗出物的吸收,减少血管瘤的数量,从而起到治疗作用。贞莲明目胶囊^[4]由女贞子、墨旱莲、黄精、决明子、枸杞子、地黄、三七、丹参、白茅根、白术、泽泻、车前子组成,具有滋补肝肾、凉血止血、活血利水的功效,主治肝肾亏虚夹瘀证,目前临床上主要用于治疗糖尿病或多种眼部疾病。贞莲明目胶囊可提高糖尿病视网膜病变患者的视力水平,并改善其视网膜血管病变^[5]。目前对贞莲明目胶囊有效成分、作用靶点等药理机制的研究较少。网络药理学以网络的形式表达药物成分与其

作用靶点之间的关系,通过对网络节点的分析,获得中药复方的主要活性成分和作用靶点,构建药物-靶点-疾病的网络关系,可为活性化合物筛选和其机制探索提供新方法。

1 资料与方法

1.1 网络药理学及分子对接探讨贞莲明目胶囊的作用机制

1.1.1 主要成分检索、筛选和作用靶点确定:通过 SymMap (<http://symmap.org/>) 和中国天然产物化学成分库 (<http://pharmdata.ncmi.cn/cnpc/>), 分别以贞莲明目胶囊中女贞子、墨旱莲、黄精、决明子、枸杞子、地黄、三七、丹参、白茅根、白术、泽泻、车前子为关键词检索各味中药的化学成分。以口服利用率 $\geq 30\%$ 且类药性 $\geq 10\%$ 作为筛选条件,对检索到的化学成分进行筛选。使用 TCSPS 数据库和已发表文献对筛选出的化学成分对应的靶点进行查询,并将靶点与 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行匹配和规范。

1.1.2 糖尿病视网膜病变相关靶点搜集、筛选和匹配:通过 GeneCards (<https://www.genecards>).

org/), 以糖尿病视网膜病变为关键词检索相关基因, 筛选与糖尿病视网膜病变相关性高的基因靶点。

1.1.3 药物-有效成分-靶点网络绘制: 应用 R4.0.3 软件对贞莲明目胶囊和糖尿病视网膜病变的相同靶点进行整合, 并结合上述关键靶点, 依托 Cytoscape3.7.0 软件构建中药-靶点-疾病的网络信息图。

1.1.4 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路和基因本体 (GO) 功能分析: 利用 R4.0.3 软件对所有的关键靶点进行 KEGG 和 GO 分析, 根据 P 值筛选出前 10 位的生物过程、细胞组分、分子功能的数据, 绘制柱形图、气泡图和信号通路图。

1.1.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建及核心靶点筛选: 利用 STING (<http://sting-db.org/>) 数据平台建立 PPI 网络图, 将贞莲明目胶囊和糖尿病视网膜病变共有的关键靶点导入, 设置最高互作分值为 0.9, 去除隐藏的游离节点后共得到 153 个关键靶点, 构建 PPI 图。

1.1.6 药物主要活性成分-核心靶点分子对接验证: 在 RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>) 数据库检索和下载潜在靶蛋白的 PDB ID, 活性化合物的结构在中药系统药理学数据库和分析平台数据库中以 * mol2 格式下载。通过 AutoDock 软件将化合物配体和蛋白质转化为 "PDBQT" 格式, 应用 SYBYL-X2.0 软件进行模拟分子对接, 绘制模拟对接图像, 并计算有效成分与靶蛋白对接的结合能, 结合能越低可以认为结合效果越好。

1.2 实验验证

1.2.1 药物: 贞莲明目胶囊由女贞子、墨旱莲、黄精、决明子、枸杞子、地黄、三七、丹参、白茅根、白术、泽泻、车前子组成, 链脲佐菌素 (南京沃博生物科技有限公司, 货号 M5721), 羧苯磺酸钙片组 (南京长澳制药有限公司, 国药准字 H20030087)。

1.2.2 动物: 选取 60 只 SPF 级 Wistar 大鼠, 月龄 3 个月, 体质量为 (200 ± 20) g, 由动物中心提供。造模后 72 h 进行检测, 血糖均不低于 16.7 mmol/L, 荧光素血管造影检查发现眼底新血管形成和微血管荧光素渗出即为造模成功。

1.2.3 动物分组、模型制备、给药与取样: 将所购 SPF 级 Wistar 大鼠, 按照随机数字表法分为正常组、模型组、羧苯磺酸钙片组、贞莲明目胶囊组, 每组 15 只, 于实验室内适应性饲养 1 周, 未见不

良反应。参照糖尿病视网膜病变动物模型制备规范^[6]制备糖尿病视网膜病变大鼠模型, 除正常组大鼠, 其余大鼠均予高糖高脂饮食喂养 4 周后, 腹腔注射链脲佐菌素溶液 (42 mg/kg), 注射 72 h 后抽取尾间血进行检测, 血糖均不低于 16.7 mmol/L, 荧光素血管造影检查发现眼底新血管形成和微血管荧光素渗出提示造模成功。造模结束后, 正常组和模型组大鼠予 0.9% 氯化钠注射液, 每次 2.0 mL, 每日 1 次灌胃。羧苯磺酸钙片组予羧苯磺酸钙片溶液, 参照人和大鼠换算比例制备成 0.83 mg/mL 溶液, 每次 2.0 mL, 每日 1 次灌胃。贞莲明目胶囊组予贞莲明目胶囊溶液, 浓度 0.83 mg/mL, 每次 2.0 mL, 每日 1 次灌胃。所有大鼠均连续灌胃治疗 4 周。最后 1 次给药结束后, 予 3% 浓度的戊巴比妥钠, 按照 40 mg/kg 剂量对大鼠进行麻醉, 采用光学相干断层扫描 (OCT) 测量视网膜厚度, 快速切取各组大鼠视网膜, 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片。同时腹主动脉取血, 快速离心后 -80°C 保存。

1.3 观察指标

大鼠视网膜厚度、视网膜炎症指标情况: 记录大鼠视网膜厚度和白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的水平。采用蛋白质印迹法检测视网膜中蛋白 [血管内皮生长因子 (VEGF)、核转录因子- κ B (NF- κ B)] 表达: 取子宫内膜组织约 10 mg, 加入组织裂解液后匀浆, 12 000 转/min 离心 10 min, 分离上清后进行蛋白质印迹实验, 在聚丙烯酰胺凝胶中分离出不同分子量的蛋白, 电转移至硝酸纤维素膜后, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 添加一抗 (1:1 000) 4°C 孵育过夜, 次日添加二抗 1 h 后, 定量分析蛋白表达水平。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析, 计数资料以 $[n(\%)]$ 表示, 行 χ^2 检验; 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 贞莲明目胶囊活性成分及其靶点

通过 SymMap 数据库初步提取 2 367 种化学成分, 经过口服利用度和类药性筛选后获得三七 119 种, 丹参 202 种, 决明子 68 种, 地黄 76 种, 墨旱莲 48 种, 女贞子 119 种, 枸杞子 188 种, 泽泻

46 种,白术 55 种,白茅根 33 种,车前子 55 种,黄精 38 种。再将上述化学成分输入 TCMSP 数据库,搜索与之相对应的成分作用靶点,合并以后删除重复值,共得到有效成分作用靶点 248 个。贞莲明目胶囊药物-有效成分-靶点网络内重要性前 10 位的有效成分见图 1、表 1。

2.2 贞莲明目胶囊治疗的核心靶点及蛋白质相互作用关系

通过 Drugbank 和 Uniprot 等数据库检索,共收集到 3 943 个糖尿病视网膜病变相关靶点。将贞莲明目胶囊有效成分靶点和糖尿病视网膜病变相关基因进行匹配后,得到 153 个贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变的潜在靶点基因,见图 2。

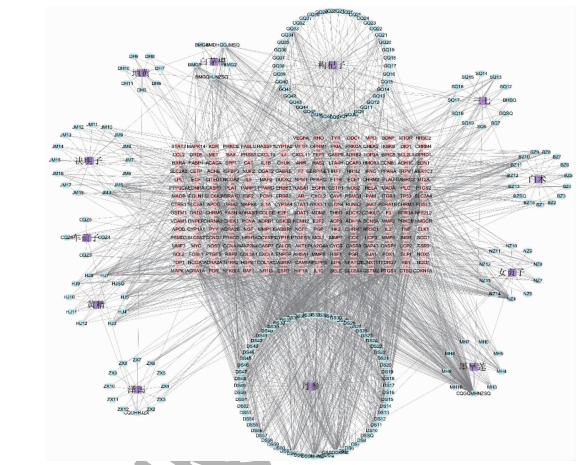


图 1 贞莲明目胶囊药物-有效成分-靶点网络

表 1 贞莲明目胶囊重要性前 10 位有效成分

序号	代号	分子标识	英文名	口服利用率/%	类药性	涉及药物
1	CQCGMHNZSQ	MOL000098	quercetin	46.43	0.28	车前子、枸杞子、墨旱莲、女贞子、三七
2	DSSQGQNZ	MOL000675	oleic acid	33.13	0.14	丹参、三七、枸杞子、女贞子
3	DSMHNZ	MOL000006	luteolin	36.16	0.25	丹参、墨旱莲、女贞子
4	NZ4	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	女贞子
5	DS62	MOL007154	tanshinone iia	49.89	0.40	丹参
6	BMGQHJNZSQ	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	白茅根、枸杞子、黄精、女贞子、三七
7	BMDHGQJMSQ	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76	白茅根、地黄、枸杞子、决明子、三七
8	GQ33	MOL009637	4-methoxyphenyl	43.47	0.15	枸杞子
9	HJ7	MOL002714	baicalein	33.52	0.21	黄精
10	DS57	MOL007145	salviolone	31.72	0.24	丹参

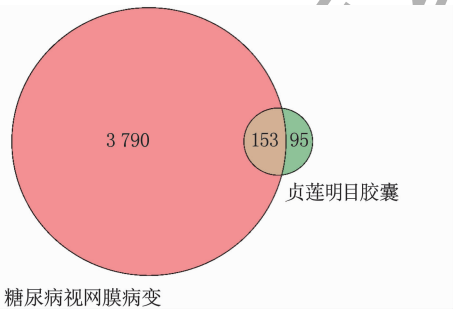


图 2 贞莲明目胶囊靶基因与糖尿病视网膜病变相关基因的维恩图

2.3 贞莲明目胶囊有效成分治疗糖尿病视网膜病变核心靶点的 KEGG 信号通路

KEGG 富集分析显示,胰岛素信号通路、MAPK 信号通路、黏着斑、神经营养因子信号通路、细胞衰老、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、细胞周期、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、细胞凋亡、内分泌抵抗与 153 个核心靶点密切相关,见图 3。

2.4 贞莲明目胶囊有效成分治疗糖尿病视网膜病变核心靶点的 GO 功能分析

GO 功能富集分析包括生物过程、细胞组分、分子功能共 3 个部分,生物过程分析显示,蛋白质

修饰过程的调控、细胞蛋白质代谢过程的调节、蛋白质代谢过程的调节、分子功能的调节、催化活性的调节、细胞内信号转导、蛋白质修饰过程的正向调控、蛋白质代谢过程的正向调控、细胞蛋白质代谢过程的正向调控、程序性细胞死亡的调节在贞莲明目胶囊对糖尿病视网膜病变的治疗过程中具有重要作用;细胞组分分析显示,胞质溶胶、核质、细胞器腔、膜封闭内腔、核腔、核部分、蛋白质复合物、高分子复合物、膜筏、核染色体在贞莲明目胶囊对糖尿病视网膜病变的治疗过程中具有重要作用;分子功能分析显示,酶结合、激酶结合、蛋白激酶结合、转录的正调控(依赖于 DNA)、蛋白质复合物结合、ATP 结合、腺苷酸核苷酸结合、腺苷酸结合、嘌呤核糖核苷酸结合、嘌呤核苷酸结合酶结合在贞莲明目胶囊对糖尿病视网膜病变的治疗过程中具有重要作用,见图 4。

2.5 PPI 网络构建及核心靶点的筛选

使用 Cytoscape 对 PPI 网络进行拓扑分析,得到包含 10 个节点的核心网络,其中白细胞介素-1 β (IL1 β)、白细胞介素-6 (IL6)、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)、人表皮生长因子受体 (EGFR)、表

皮生长因子(*EGF*)、*RAC* α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(*AKT1*)、肿瘤蛋白 P53 (*TP53*)、胱天蛋白酶 3 (*CASP3*)、环状素受体 1 (*ESR1*) 和环加氧酶 2 (*PTGS2*)基因是核心靶点,见图 5。

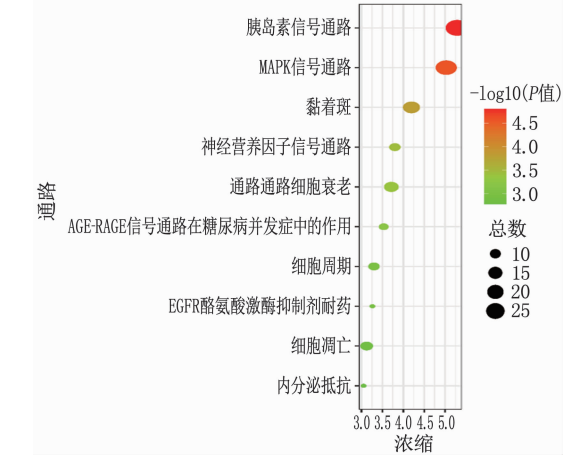


图 3 贞莲明目胶囊有效成分治疗糖尿病视网膜病变核心靶点的 KEGG 分析气泡图

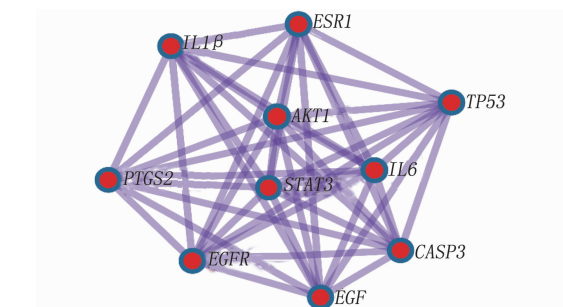


图 5 贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变靶点的核心 PPI 网络

2.6 分子对接验证

由以上分析结果选取贞莲明目胶囊中药化合物为槲皮素、油酸、木犀草素、山奈酚和丹参酮ⅡA 以及靶点 IL-1 β 、AKT1、TP53、CASP3、EGF 进行分子对接,对接总分表明成分靶点结合的稳定性较好,碰撞参数均小于 0,表明小分子配体与蛋白结合的构象稳定,见表 2、图 6。

2.7 大鼠视网膜厚度、视网膜炎症指标情况

与正常组比较,模型组大鼠视网膜厚度降低,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,羟苯磺酸钙片组大鼠视网膜厚度升高,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与羟苯磺酸钙片组比较,贞莲明目胶囊组大鼠视网膜厚度升高,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

2.8 大鼠视网膜中蛋白表达

与正常组比较,模型组大鼠 VEGF、NF- κ B 表达水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,羟苯磺酸钙片组大鼠 VEGF、

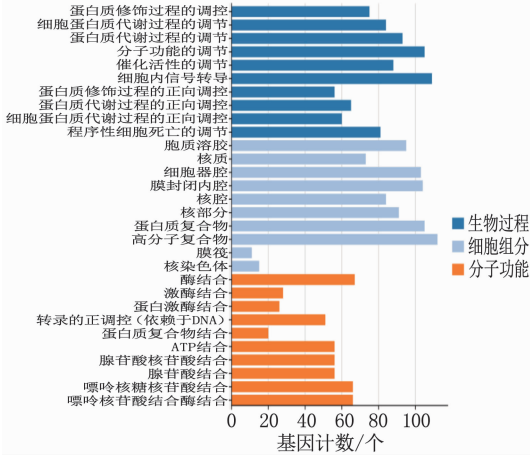
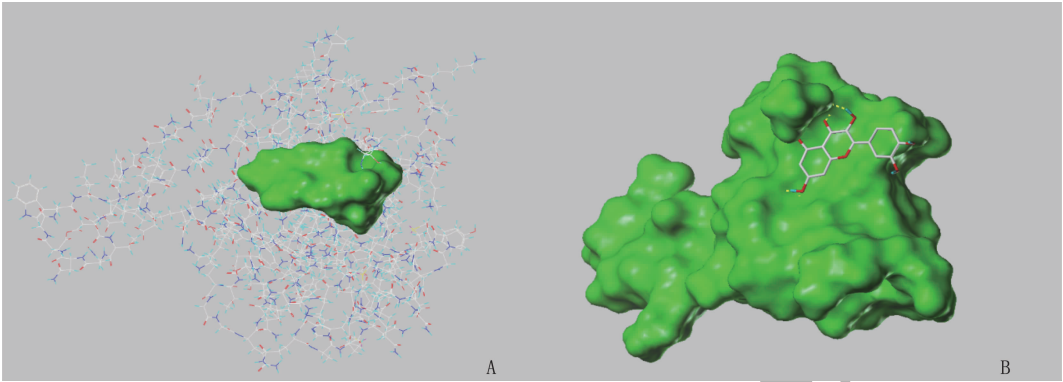


图 4 贞莲明目胶囊有效成分治疗糖尿病视网膜病变核心靶点的 GO 功能分析

NF- κ B 表达水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与羟苯磺酸钙片组比较,贞莲明目胶囊组大鼠 VEGF、NF- κ B 表达水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

表 2 核心靶点与贞莲明目胶囊主要成分模拟对接参数			
靶蛋白	主要成分	对接总分	碰撞参数
IL-1 β	槲皮素	6.022	-3.466
	油酸	7.081	-1.898
	木犀草素	5.826	-2.603
	山奈酚	5.752	-2.575
	丹参酮ⅡA	8.011	-1.994
AKT1	槲皮素	5.263	-3.359
	油酸	7.375	-3.230
	木犀草素	7.318	-1.511
	山奈酚	6.216	-2.049
	丹参酮ⅡA	5.143	-2.691
TP53	槲皮素	6.645	-3.105
	油酸	6.731	-2.979
	木犀草素	7.780	-2.761
	山奈酚	6.326	-3.469
	丹参酮ⅡA	6.810	-1.648
CASP3	槲皮素	8.090	-2.511
	油酸	5.190	-1.968
	木犀草素	5.443	-3.400
	山奈酚	5.768	-1.595
	丹参酮ⅡA	6.859	-1.558
EGF	槲皮素	7.622	-3.209
	油酸	6.875	-2.330
	木犀草素	7.779	-1.879
	山奈酚	6.417	-1.720
	丹参酮ⅡA	5.020	-2.558

IL-1 β : 白细胞介素-1 β ; AKT1: *RAC* α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; TP53: 肿瘤蛋白 P53; CASP3: 胱天蛋白酶 3; EGF: 表皮生长因子。



A: 靶蛋白 IL-1β 的分子结构,绿色部分为 IL-1β 的三维结构活性口袋; B: 五羟黄酮与 IL-1β 活性口袋的模拟对接图像,其中未被绿色覆盖部分为五羟黄酮分子结构,黄色虚线为五羟黄酮与 IL-1β 模拟对接的作用点。

图 6 贞莲明目胶囊主要成分与核心靶点的典型分子对接图

表 3 各组大鼠视网膜厚度、视网膜炎症指标情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	视网膜厚度/ μm	IL-1 β /(ng/L)	IL-6/(ng/L)	TNF- α /(ng/L)
正常组($n=15$)	184.72 $\pm$ 16.57	26.24 $\pm$ 3.15	37.09 $\pm$ 3.07	273.18 $\pm$ 35.57
模型组($n=15$)	115.07 $\pm$ 10.48*	58.09 $\pm$ 7.48*	78.14 $\pm$ 9.32*	806.36 $\pm$ 106.25*
羟苯磺酸钙片组($n=15$)	136.50 $\pm$ 11.27 [#]	42.73 $\pm$ 6.95 [#]	56.18 $\pm$ 7.29 [#]	503.49 $\pm$ 62.63 [#]
贞莲明目胶囊组($n=15$)	161.97 $\pm$ 15.43 Δ	31.02 $\pm$ 5.65 Δ	44.68 $\pm$ 6.71 Δ	361.49 $\pm$ 44.06 Δ

IL-1 β : 白细胞介素-1 β ; IL-6: 白细胞介素-6; TNF- α : 肿瘤坏死因子- α 。与正常组比较, * $P<0.05$;
与模型组比较, [#] $P<0.05$; 与羟苯磺酸钙片组比较, $\Delta P<0.05$ 。

表 4 各组大鼠视网膜中 VEGF、NF- κ B 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF	NF- κ B
正常组($n=15$)	1.02 $\pm$ 0.17	1.11 $\pm$ 0.28
模型组($n=15$)	4.39 $\pm$ 0.38*	6.52 $\pm$ 1.26*
羟苯磺酸钙片组($n=15$)	3.06 $\pm$ 0.41 [#]	4.13 $\pm$ 0.95 [#]
贞莲明目胶囊组($n=15$)	1.71 $\pm$ 0.32 Δ	1.53 $\pm$ 0.34 Δ

VEGF: 血管内皮生长因子; NF- κ B: 核转录因子- κ B。
与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$;
与羟苯磺酸钙片组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3 讨论

糖尿病视网膜病变是糖尿病患者的主要并发症,会导致视力丧失^[7-8]。在全球范围内,有 9 500 万例糖尿病患者患有糖尿病视网膜病变,而糖尿病患者数量的增加将导致未来糖尿病视网膜病变患者数量的增加^[9]。相关研究^[10]发现,患糖尿病 20 年后,几乎所有 1 型糖尿病患者和 60% 的 2 型糖尿病患者都发展为糖尿病视网膜病变,已然成为了全球的公共健康问题。调查^[11]显示,经常规西医治疗后,仅有部分患者的视力有所改善,仍有 46% 的患者需要激光或手术治疗。为了实现和控制糖尿病患者视网膜内的血管病变,通常需要多种治疗途径,故本研究结合糖尿病视网膜病变的病因特点,预测贞莲明目胶囊可能对糖尿病视

网膜病变起到一定的治疗作用,并基于网络药理学,将贞莲明目胶囊的有效成分和疾病的靶点进行对接,建立药物-靶点-疾病的网络关系,最后应用分子对接确定结果的有效程度。

通过对贞莲明目胶囊的有效化学成分与糖尿病视网膜病变关键靶点的网络药理学研究发现,贞莲明目胶囊中 153 种活性成分作用于糖尿病视网膜病变的关键靶点,其中主要成分为丹参酮、槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇等, QIAN S H 等^[12]发现丹参酮可通过提高 GLO1 水平来改善晚期糖基化终产物诱导的线粒体功能障碍和有丝分裂,可抑制高糖诱导的人视网膜内皮细胞增殖、迁移和血管化。CHAI G R 等^[13]发现槲皮素可通过诱导 HO-1 的表达抑制 VEGF 和 sICAM-1 的分泌,以达到治疗糖尿病视网膜病变的目的。SAFARPOUR S 等^[14]发现山柰酚可激活肝脏内 Akt 和 GCK 活性,通过增强肝脏葡萄糖摄取和代谢来改善葡萄糖稳态,另外还可通过 ERK 和 VASH1 信号通路保护视网膜神经节细胞免受高糖损伤,有助于治疗糖尿病视网膜病变。AFIFI S M 等^[15]发现, β -谷甾醇通过激活糖尿病大鼠脂肪组织中的胰岛素受体和葡萄糖转运蛋白来控制胰岛素抵抗和高血糖,同时还通过调节脂肪组织中的炎症事件来减轻视网膜损伤。从上述研究中可以看出丹参

酮、槲皮素、山柰酚和 β -谷甾醇等成分具有抑制糖尿病视网膜病变的作用。

PPI 网络图分析表明,贞莲明目胶囊的有效成分主要作用于 IL-1 β 、IL-6、STAT3、EGFR、EGF、AKT1、TP53、CASP3、ESR1 和 PTGS2 多个核心靶点,其中 IL-1 β 、EGF/EGFR/PI3K/AKT、IL6/STAT3 通路介导的炎症反应可能是贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变的关键靶点。相关研究^[16]发现,高血糖会引起线粒体活性氧增加,在活性氧诱导下的白细胞介素刺激细胞黏附分子的表达上调,导致内皮细胞损伤和视网膜内血管病变。另一项研究^[17]发现,IL-1 β 可通过激活 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路使 IL-6 的表达上调,进一步激活 STAT3 信号通路,降低紧密连接蛋白 occludin、ZO-1 的表达,从而降低了视网膜血管内皮的通透性,导致视网膜病变。张金峰等^[18]发现,丹参酮可通过抑制 IL-1 β 、IL-6 等细胞因子的释放和 AKT、NF- κ B 等蛋白的表达,从而减轻了炎症反应对视网膜的损伤。HAN X J 等^[19]发现槲皮素是细胞中 NLRP3 炎症体激活的天然抑制剂,可通过抑制 NLRP3/IL-1 β 途径,减轻促炎因子释放,起到保护视网膜的作用。另外,相关实验研究^[20-21]发现,山柰酚、 β -谷甾醇均可抑制 IL-1 β 、IL6 等细胞因子表达,使 VEGF 水平降低,从而改善视网膜内皮血管的形成和细胞增殖。由上述研究可知,IL-1 β 、EGF/EGFR/PI3K/AKT、IL6/STAT3 信号通路可能是贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变的关键靶点。

此外,KEGG 通路分析发现,TP53 信号通路和 CASP3 信号通路可能是贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变的相关靶点。相关研究^[22]发现,TP53 信号通路在调节细胞周期方面具有核心作用,其中 TP53 为关键基因,可干扰 Bcl-2 等促凋亡因子和 Bcl-xl 等抗凋亡因子的结合,使线粒体内的凋亡相关蛋白释放,导致视网膜内细胞凋亡。实验研究^[23]发现,TP53 还整合了影响胰岛素敏感性和肝脏对葡萄糖稳态方面的反调节激素反应的信号通路,对于调节血糖的稳态具有关键作用。研究^[24]发现,TP53 诱导 caspase-3 活化,激活 CASP3 触发凋亡的级联反应,加速细胞凋亡。米倚林等^[25]发现,山柰酚可调节组织内 TP53 和 CASP3 蛋白的表达,抑制细胞的凋亡,从而延缓糖尿病视网膜病变的进程。LIU R 等^[26]发现, β -谷甾醇可调节 CASP3 基因的表达,抑制视网膜内细胞的凋亡,从而缓解患者症状。由上述研究可知,

TP53 信号通路和 CASP3 信号通路可能是贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变的相关靶点。

本研究发现,ESR1、PTGS2 可能是贞莲明目胶囊治疗糖尿病的潜在靶点。一项回顾性研究^[27]发现,ESR1 作为转录因子,可以调节 SLC2A4 基因的表达,改变组织 GLUT4 含量,以控制血糖水平,避免了高血糖对视网膜的损害。另一项研究^[28]发现,PTGS2 作为一种重要的免疫调节因子,可通过调节 NF- κ B 通路,从而减轻视网膜损害。研究^[29-31]发现,丹参酮、槲皮素、 β -谷甾醇均可作用于 ESR1 或 PTGS2 靶点,以维持血糖稳定,从而避免了高血糖对视网膜的损伤。由上述研究可知,ESR1、PTGS2 可能是贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变的潜在靶点。

综上所述,贞莲明目胶囊具有滋补肝肾、凉血活血的功效,其对糖尿病视网膜病变的治疗或许具有积极作用,其作用机制可能与调节 IL-1 β 、EGF/EGFR/PI3K/AKT、IL-6/STAT3、TP53 和 CASP3 信号通路有关。

参考文献

- [1] RODRÍGUEZ M L, PÉREZ S, MENA-MOLLÁ S, *et al.* Oxidative stress and microvascular alterations in diabetic retinopathy: future therapies [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4940825.
- [2] GROENEVELD Y, TAVENIER D, BLOM J W, *et al.* Incidence of sight-threatening diabetic retinopathy in people with Type 2 diabetes mellitus and numbers needed to screen: a systematic review [J]. *Diabet Med*, 2019, 36 (10): 1199 - 1208.
- [3] ZHANG Y H, AN X D, DUAN L Y, *et al.* Effect of Chinese patent medicines on ocular fundus signs and vision in calcium dobesilate-treated persons with non-proliferative diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 799337.
- [4] 赵旭芳. 贞莲明目胶囊治疗肝肾阴虚、痰湿瘀阻型 NPDR 临床疗效观察 [D]. 唐山: 华北理工大学, 2021.
- [5] 李国建, 尹瑞生, 任崇禧, 等. 贞莲明目胶囊治疗糖尿病视网膜黄斑水肿 55 例临床观察 [J]. *光明中医*, 2007, 22 (7): 39 - 42.
- [6] 孙鹏, 孟岩, 张剑, 等. NGF 联合抗 VEGF 对糖尿病模型大鼠视网膜组织中氧化应激和 VEGF 表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42 (11): 2773 - 2776.
- [7] 戴淑香, 王广梅, 黄德莲, 等. 中药联合全视网膜光凝治疗糖尿病视网膜病变的观察及护理 [J]. *实用临床医药杂志*, 2017, 21 (6): 49 - 51.
- [8] 程梅, 方朝晖, 盛风霞, 等. 盐酸川芎嗪眼部雾化联合耳尖放血对气阴两虚型糖尿病视网膜病变的疗效观察 [J].

实用临床医药杂志, 2021, 25(10): 71-75.

- [9] OSHITARI T. Neurovascular impairment and therapeutic strategies in diabetic retinopathy[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 19(1): 439.
- [10] BHATWADEKAR A D, SHUGHOURY A, BELAMKAR A, *et al.* Genetics of diabetic retinopathy, a leading cause of irreversible blindness in the industrialized world[J]. *Genes*, 2021, 12(8): 1200.
- [11] AN X D, JIN D, DUAN L Y, *et al.* Direct and indirect therapeutic effect of traditional Chinese medicine as an add-on for non-proliferative diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Chin Med*, 2020, 15: 99.
- [12] QIAN S H, QIAN Y J, HUO D X, *et al.* Tanshinone IIA protects retinal endothelial cells against mitochondrial fission induced by methylglyoxal through glyoxalase I[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 857: 172419.
- [13] CHAI G R, LIU S, YANG H W, *et al.* Quercetin protects against diabetic retinopathy in rats by inducing heme oxygenase-1 expression[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(7): 1344-1350.
- [14] SAFARPOUR S, PIRZADEH M, EBRAHIMPOUR A, *et al.* Protective effect of kaempferol and its nanoparticles on 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity in rats[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 2273000.
- [15] AFIFI S M, AMMAR N M, KAMEL R, *et al.* β -sitosterol glucoside-loaded nanosystem ameliorates insulin resistance and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(5): 1023.
- [16] HE J B, WANG H, LIU Y, *et al.* Blockade of vascular endothelial growth factor receptor 1 prevents inflammation and vascular leakage in diabetic retinopathy[J]. *J Ophthalmol*, 2015, 2015: 605946.
- [17] ELEKOFEHINTI O O, OYEDOKUN V O, IWALOYE O, *et al.* Momordica charantia silver nanoparticles modulate SOCS/JAK/STAT and PI3K/Akt/PTEN signalling pathways in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2021, 20(1): 245-260.
- [18] 张金锋, 徐志龙, 吴梦, 等. 丹参酮IIA通过抑制信号通路延缓膝关节炎大鼠软骨退变及抑制局部炎症的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(23): 1918-1926.
- [19] HAN X J, XU T S, FANG Q J, *et al.* Quercetin hinders microglial activation to alleviate neurotoxicity via the interplay between NLRP3 inflammasome and mitophagy[J]. *Redox Biol*, 2021, 44: 102010.
- [20] LIU C, LIU H, LU C, *et al.* Kaempferol attenuates imiquimod-induced psoriatic skin inflammation in a mouse model[J]. *Clin Exp Immunol*, 2019, 198(3): 403-415.
- [21] JAYARAMAN S, DEVARAJAN N, RAJAGOPAL P, *et al.* β -sitosterol circumvents obesity induced inflammation and insulin resistance by down-regulating IKK β /NF- κ B and JNK signaling pathway in adipocytes of type 2 diabetic rats[J]. *Molecules*, 2021, 26(7): 2101.
- [22] CHOI S H, KOH D I, CHO S Y, *et al.* Temporal and differential regulation of KAISO-controlled transcription by phosphorylated and acetylated p53 highlights a crucial regulatory role of apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(35): 12957-12974.
- [23] GONZALEZ-RELLAN M J, FONDEVILA M F, FERNANDEZ U, *et al.* O-GlcNAcylated p53 in the liver modulates hepatic glucose production[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5068.
- [24] KANAMORI Y, FINOTTI A, MAGNO L D, *et al.* Enzymatic spermine metabolites induce apoptosis associated with increase of p53, caspase-3 and miR-34a in both neuroblastoma cells, SJNKp and the N-myc-amplified form IMR5[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1950.
- [25] 米倚林, 易南星, 许晓彤, 等. 山奈酚抑制软骨凋亡延缓小鼠膝关节炎的实验研究[J]. *海南医学院学报*, 2022, 28(17): 1299-1306.
- [26] LIU R, HAO D L, XU W Y, *et al.* β -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice[J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 161-168.
- [27] GREGORIO K C R, LAURINDO C P, MACHADO U F. Estrogen and glycemic homeostasis: the fundamental role of nuclear estrogen receptors ESR1/ESR2 in glucose transporter GLUT4 regulation[J]. *Cells*, 2021, 10(1): 99.
- [28] CHEN Q, HE Y, WANG X F, *et al.* LncRNA PTGS2 regulates islet β -cell function through the miR-146a-5p/RBP4 axis and its diagnostic value in type 2 diabetes mellitus[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(10): 11316-11328.
- [29] 张辛宁, 王乐琪, 李莎莎, 等. 丹参从瘀论治抑郁症的潜在靶点及作用机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(9): 1300-1308.
- [30] YI H, PENG H Y, WU X Y, *et al.* The therapeutic effects and mechanisms of quercetin on metabolic diseases: pharmacological data and clinical evidence[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6678662.
- [31] XIA H T, LIU J Y, YANG W L, *et al.* Integrated strategy of network pharmacological prediction and experimental validation elucidate possible mechanism of bu-Yang herbs in treating postmenopausal osteoporosis via ESR1[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 654714.

(本文编辑: 周娟 钱锋)