

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.23.001

基于网络药理学研究丹红化瘀汤治疗视网膜病变的潜在作用机制

吴 坚¹, 张锡洪¹, 徐文坚²

(1. 广东省汕头市中心医院·中山大学附属汕头医院, 广东 汕头 515000; 2. 广东省中山市小榄人民医院, 广东 中山 528400)

摘要:目的 探讨丹红化瘀汤治疗视网膜病变的潜在分子作用机制。方法 采用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)获取丹红化瘀汤7味中药的化合物成分和作用靶点,在TTD,OMIM, GeneCards, DiseaseGene Network数据库遴选视网膜病变的潜在靶点。基于String数据库构建高置信度的丹红化瘀汤治疗视网膜病变预测靶点相互作用网络,通过拓扑分析筛选丹红化瘀汤治疗视网膜病变的核心靶点,并采用Autodock_vina软件进行分子对接验证。基于生物信息注释数据库(David)对治疗预测靶点进行GO生物富集分析和KEGG通路分析。结果 丹红化瘀汤组方中的7味中药共收集到109种化合物及260个作用靶点信息,共227个靶点可作为丹红化瘀汤治疗视网膜病变的潜在靶点,AKT1,TP53,MAPK8,MAPK1,VEGFA,EGF等41个靶点可作为核心靶点;富集分析共获得761个GO条目和58条视网膜病变相关通路,主要涉及肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶-蛋白激酶(P13K-AKT)信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路等。结论 丹红化瘀汤可能通过多成分、多靶点、多通路发挥对视网膜病变的治疗作用,预测丹红化瘀汤治疗视网膜病变的潜在机制,可为进一步研究提供参考依据。

关键词:丹红化瘀汤;视网膜病变;网络药理学;分子对接;作用机制

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)23-0001-08

Potential Mechanism of Danhong Huayu Decoction in the Treatment of Retinopathy Based on Network Pharmacology

WU Jian¹, ZHANG Xihong¹, XU Wenjian²

(1. Shantou Central Hospital · Affiliated Shantou Hospital of Sun Yat-sen University, Shantou, Guangdong, China 515000; 2. Xiaolan People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan, Guangdong, China 528400)

Abstract: Objective To investigate the potential molecular mechanism of Danhong Huayu Decoction in the treatment of retinopathy. **Methods** The compound composition and targets of Danhong Huayu Decoction were obtained by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform(TCMSP). The potential targets for retinopathy were selected from TTD, OMIM, GeneCards and DiseaseGene Network databases. The high confidence interaction network of the predicted target points of Danhong Huayu Decoction in the treatment of retinopathy was constructed based on the String database, the core target points of Danhong Huayu Decoction in the treatment of retinopathy were screened by the topological analysis, and the molecular docking was verified by the Autodock_vina software. The GO bioaccumulation analysis and KEGG pathway analysis were conducted for the treatment prediction targets based on the bio-information annotation database(David). **Results** A total of 109 compounds and 260 target information were collected from the 7 traditional Chinese medicines of Danhong Huayu Decoction, and 227 targets could be used as potential targets of Danhong Huayu Decoction in the treatment of retinopathy. A total of 41 targets such as AKT1, TP53, MAPK8, MAPK1, VEGFA and EGF could be used as core targets. A total of 761 GO entries and 58 retinopathy related pathways were obtained by enrichment analysis, mainly involving tumor necrosis factor(TNF) signaling pathway, hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) signaling pathway, and phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase(P13K-AKT) signaling pathway, and vascular endothelial growth factor(VEGF) signaling pathway. **Conclusion** Danhong Huayu Decoction may play a role in the treatment of retinopathy through multi-component, multi-target and multi-channel, and predict the potential mechanism of Danhong Huayu Decoction in the treatment of retinopathy, so as to provide a basis for further experimental research.

Key words: Danhong Huayu Decoction; retinopathy; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action

丹红化瘀口服液由陈达夫教授血府逐瘀汤加减化裁并通过特殊工艺研制而成,方中丹参(DS)、当归(DG)活血祛瘀、养血润燥,消目中之瘀血,为君药;川芎(CX)、桃仁(HR)、红花(HH)活血散瘀、疏肝行气,为臣药,助君药行消目中瘀血积滞之效;柴胡(CH)、枳壳(ZQ)疏肝理气开郁,使气机条畅、气血调和,为佐药。诸

药合用,共奏活血化瘀、行气通络之功效,适用于气滞血瘀引起的视物模糊等症。常见视网膜病变包括糖尿病性视网膜病变、视网膜静脉阻塞、黄斑病变、新生儿视网膜病变等,以视力变化、眼底出血、渗出、水肿、增殖等为常见临床表现,属中医“视瞻昏渺”“云雾移睛”“暴盲”等范畴,临床辨证包括气滞血瘀、络脉瘀阻、肝肾亏虚等。丹

红化瘀口服液对糖尿病性视网膜病变(DR)、视网膜静脉阻塞(RVO)等视网膜病变有较好疗效,尤其对视网膜血管病变引起的多种疾病有良好疗效,临床应用前景广阔。研究表明,丹红化瘀口服液对DR有效率达82.75%,可明显降低血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)水平,同时改善血液流变学指标,减轻眼底出血情况,改善眼底的循环障碍,减少微血管瘤形成,促进视力恢复,减缓DR病情进展^[1-4]。另有试验表明,丹红化瘀口服液可下调RVO患者房水中VEGF和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,下调血清VEGF、TNF- α 、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)和炎症因子细胞间黏附分子-1(ICAM-1)水平,抑制新生血管形成,促进眼底出血吸收和消退,减轻炎症损伤,改善视力^[5-7]。网络药理学是在系统生物学与计算机技术高速发展的基础上发展起来的,基于疾病基因-靶点-药物交互作用网络的基础上,通过网络分析,系统综合地观察药物对疾病网络的干预与影响^[8]。本研究中基于丹红化瘀汤多成分、多靶点作用的特点,遵循网络药理学理论与技术,通过筛选丹红化瘀汤药物活性成分、预测丹红化瘀汤治疗视网膜病变的靶点及靶点的生物功能和通路分析,构建化合物-靶点-通路网络,预测和阐述丹红化瘀汤治疗视网膜病变的分子作用机制,为药物的试验研究及临床应用提供科学依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 丹红化瘀汤的活性成分及靶点收集与筛选

在中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/index.php>)上设定参数口服利用度(OB) $\geq 30\%$ 且类药性(DL) ≥ 0.18 ^[9],筛选丹红化瘀汤组方中7味中药在人体内生物活性较高的化合物成分及其靶点,通过Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)验证获取化合物分子机构,通过String数据库(<https://string-db.org/>)搜索TCMSP平台所获取靶点蛋白,设定物种为人(homosapiens),获得靶点采用官方名称。

1.2 视网膜病变相关靶点的收集及筛选

在OMIM数据库(<https://omim.org/>)、TTD数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>)和GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)检索“RetinalDiseases”获取视网膜病变相关靶点,并通过String数据库,设定物种为人(homosapiens),获得靶点采用官方名称。

1.3 丹红化瘀汤治疗视网膜病变靶点的预测及网络构建

通过比对丹红化瘀汤化合物靶点及视网膜病变相关靶点,预测丹红化瘀汤治疗视网膜病变的靶点,将药物、化合物、治疗靶点、疾病信息导入Cytoscape_v3.7.2软件(<http://www.cytoscape.org/>),构建药物-化合

物-靶点-疾病网络并进行拓扑分析,根据介度(BC)、紧密度(CC)的中位数及连接度(Degree)中位数的2倍值卡值筛选丹红化瘀汤治疗视网膜病变的关键药效分子。将预测靶点信息导入String数据库,设定物种为人(homosapiens),选择高置信度,获得丹红化瘀汤治疗视网膜病变靶点的交互作用关系信息,在Cytoscape中构建靶点间的交互作用网络,并进行拓扑分析,根据BC和CC的中位数及Degree中位数的2倍值卡值筛选核心靶点,并构建核心靶点交互作用网络。

1.4 丹红化瘀汤治疗视网膜病变关键靶点的验证

以阳性药物羟苯磺酸钙作为对照,使用分子对接模拟软件Autodock_vina对Degree值前10的核心靶点与Degree值前10的关键药效分子进行分子对接验证。

1.5 生物功能与通路富集分析及药物-化合物-靶点-通路网络构建

将丹红化瘀汤治疗视网膜病变靶点导入David6.8数据库(<https://david.ncicrf.gov/>),设定物种为人(homosapiens),进行GO生物学富集分析及KEGG通路富集分析,收集 $P < 0.05$ 的结果。在Cytoscape中构建药物-化合物-靶点-通路网络。

2 结果

2.1 丹红化瘀汤的活性成分及靶点

在TCMSP平台上根据口服利用度(OB) $\geq 30\%$ 且类药性(DL) ≥ 0.18 ^[8],剔除重复化合物及缺少靶点预测的化合物,通过Pubchem验证分子结构,共收集到丹红化瘀汤组方中7味中药的109种活性成分,其中丹参含有49种,当归含有2种,红花含有17种,桃仁含有18种,柴胡含有13种,川芎含有6种,枳壳含有5种。OB和DL排名前30的活性成分信息见表1。根据活性成分TCMSP平台收集靶点信息,经String数据库校正后,共获得260个靶点。

2.2 药物-化合物-靶点-疾病网络构建及关键药效分子分析

从OMIM数据库、TTD数据库、GeneCards数据库收集筛选到8030个视网膜病变相关靶点,在与丹红化瘀汤靶点对比后,结果丹红化瘀汤的106种活性成分的227个靶点可作为治疗视网膜病变的潜在靶点。在Cytoscape中构建丹红化瘀汤治疗视网膜病变的药物-化合物-靶点-疾病网络并进行拓扑分析,结果BC中位数为0.000544245,CC中位数为0.36534216,Degree中位数2倍值为10,根据该结果筛选出关键药效分子32个,如槲皮素(MOL000098)、山柰酚(MOL000422)、木犀草素(MOL000006)、柚皮素(MOL004328)等,度值越高,活性成分相关治疗靶点越多,关键药效分子可能在丹红化瘀汤治疗视网膜病变的过程中起到了重要作

表 1 OB 和 DL 排名前 30 的丹红化瘀汤活性成分信息

成分编码	成分名称	OB(%)	DL	来源
MOL007064	Przewalskin b	110.32	0.44	DS
MOL007132	(2 <i>R</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(<i>Z</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl]oxy-propionic acid	109.38	0.35	DS
MOL001351	Gibberellin A44	101.61	0.54	TR
MOL001353	GA60	93.17	0.53	TR
MOL001349	4a-formyl-7alpha-hydroxy-1-methyl-8-methylidene-4aalpha,4bbeta-gibbane-1alpha,10beta-dicarboxylic acid	88.60	0.46	TR
MOL001344	GA122-isolactone	88.11	0.54	TR
MOL001329	2,3-didehydro GA77	88.08	0.53	TR
MOL001360	GA77	87.89	0.53	TR
MOL001340	GA120	84.85	0.45	TR
MOL007150	(6 <i>S</i>)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8,9-dihydro-7 <i>H</i> -naphtho[8,7- <i>g</i>]benzofuran-10,11-quinone	75.39	0.46	DS
MOL001358	Gibberellin 7	73.80	0.50	TR
MOL007058	Formyltanshinone	73.44	0.42	DS
MOL001342	GA121-isolactone	72.70	0.54	TR
MOL007120	Miltionone II	71.03	0.44	DS
MOL002341	Hesperetin	70.31	0.27	ZQ
MOL000433	FA	68.96	0.71	CX
MOL001361	GA87	68.85	0.57	TR
MOL007105	Epidanshenspiroketallactone	68.27	0.31	DS
MOL002140	Perlolyrine	65.95	0.27	CX
MOL001355	GA63	65.54	0.54	TR
MOL007150	(6 <i>S</i>)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7 <i>H</i> -naphtho[8,7- <i>g</i>]benzofuran-10,11-dione	65.26	0.45	DS
MOL007130	Prolithospermic acid	64.37	0.31	DS
MOL001352	GA54	64.21	0.53	TR
MOL001328	2,3-didehydro GA70	63.29	0.50	TR
MOL007050	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde	62.78	0.40	DS
MOL007068	Przewaquinone B	62.24	0.41	DS
MOL002712	6-Hydroxykaempferol	62.13	0.27	HH
MOL000569	Digallate	61.85	0.26	DS
MOL005828	Nobiletin	61.67	0.52	ZQ
MOL004328	Naringenin	59.29	0.21	ZQ

表 2 丹红化瘀汤治疗视网膜病变的关键药效分子信息

成分编码	成分名称	度值	来源
MOL000098	Quercetin	128	HH
MOL000006	Luteolin	49	DS, HH
MOL000422	Laempferol	49	HH, CH
MOL004328	Naringenin	32	ZQ
MOL007154	Tanshinoneii	30	DS
MOL005828	Nobiletin	26	ZQ
MOL000354	Isorhamnetin	25	CH
MOL000358	β -sitosterol	25	DC, HH, TR, ZQ
MOL002714	Baicalin	25	HH
MOL007049	4-methylenemiltirone	23	DS
MOL007145	Salviolone	23	DS
MOL000449	Stigmasterol	22	DC, HH, CH
MOL002773	β -carotene	21	HH
MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	21	DS
MOL007088	Cryptotanshinone	21	DS
MOL007100	Dihydrotanshinlactone	21	DS
MOL007124	Neocryptotanshinoneii	21	DS
MOL007093	Dan-shexinkumd	20	DS
MOL007108	Isocryptotanshi-none	20	DS
MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	19	DS
MOL007111	Isotanshinone II	18	DS
MOL007119	Miltionone I	18	DS
MOL007122	Miltirone	18	DS
MOL002135	Myricanone	17	CX
MOL007098	Deoxyneocryptotanshinone	17	DS
MOL007105	Epidanshenspiroketallactone	17	DS
MOL007094	Danshenspiroketallactone	16	DS
MOL000296	Hederagenin	14	TR
MOL007061	Methylenetanshinquinone	14	DS
MOL002651	Dehydrotanshinone II ₁	13	DS
MOL007069	Przewaquinonec	13	DS
MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	11	DS

用,其信息及度值见表 2。药物-化合物-靶点-疾病网络见图 1,其中深绿色节点为关键药效分子。

2.3 靶点交互作用网络构建及核心靶点分析

基于 String 数据库分析 227 个靶点间的交互作用,获取高置信度结果,在 Cytoscape 中构建丹红化瘀汤治疗视网膜病变靶点的交互作用网络并进行拓扑分析,结果 BC 中位数为 0.001 6,CC 中位数为 0.42,Degree 中位数 2 倍值为 28,以上数值卡值筛选获得 41 个核心靶点,其信息与拓扑参数见表 3。经 String 数据库分析后,在 Cytoscape 中构建丹红化瘀汤治疗视网膜病变的

核心靶点高置信度交互作用网络图,详见图 2,网络图共有 41 个节点,507 条边,节点 Degree 值越高,颜色越深,直径越大。

2.4 分子对接模拟验证结果

应用分子对接模拟软件 Autodock_vina 对 Degree 值前 10 的活性成分与靶点进行分子对接验证,10 个靶点蛋白信息见表 3,槲皮素(MOL000098)与 MAPK3 的分子对接模拟可视化图见图 3。可见,槲皮素与周围分子之间存在氢键、芳环堆积作用、范德华力等不同分子间交互作用,与受体分子能较好地结合。应用 Autodock_vina 计算药效分子与受体间的最低结合能并制作热图,详见图 4。可见,所有药效分子与靶点蛋白受体

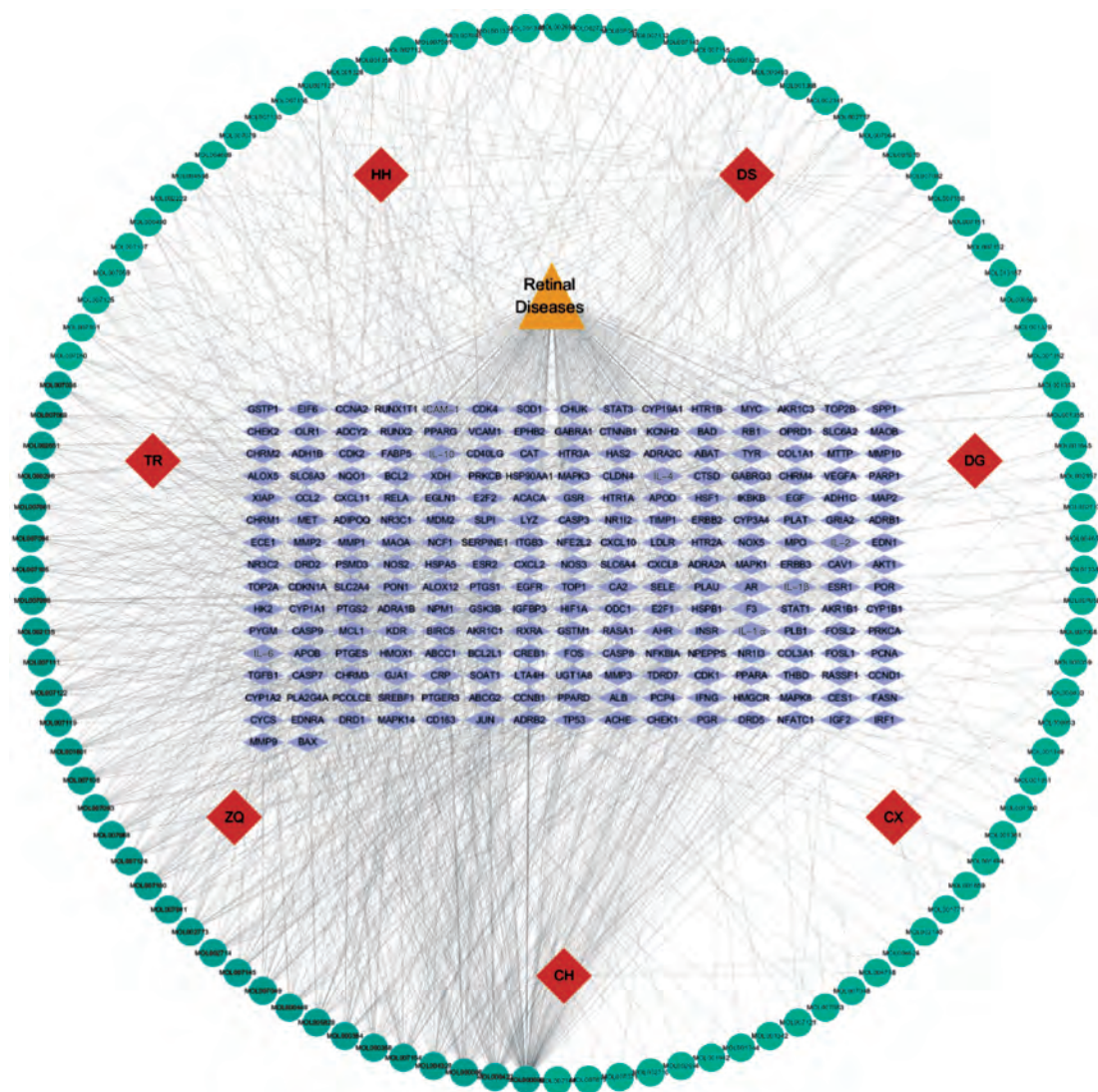


图1 丹红化瘀汤治疗视网膜病变的药材-成分-靶点-疾病网络图

的最低结合能都小于 0,两者可自发结合,靶点蛋白 AKT1, TP53, MAPK8, MAPK1, JUN, VEGFA, EGF, MAPK3,STAT3 与 10 个关键药效分子最低结合能均小于 -5.0 kJ/mol ,提示上述靶点蛋白与药效分子结合较好^[10],且阳性对照药物羧苯磺酸钙与靶点蛋白分子对接的最低结合能均在 -5.0 kJ/mol ,验证了靶点蛋白晶体及配体选择的合理性。

2.5 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

应用 David 数据库对 221 个丹红化瘀汤治疗视网膜病变的靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析,取 $P < 0.05$ 的结果,共收集到 761 个 GO 条目,572 个生物过程条目,67 个细胞组分条目,122 个分子功能条目。筛选与视网膜病变有关的 P 值最小的前 20 个 GO 条目作图,详见图 5。其中,炎症反应、细胞老化、血管生成、血管生成的正调控、平滑肌细胞增殖的正调控等富集程度高,且与视网膜病变关系密切。KEGG 通路分析共富集到 58 条与视网膜病变的通路,取 P 值最小的前

20 个作图,详见图 6,其中 TNF 信号通路、低氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 (PI3K-AKT) 信号通路、VEGF 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路等富集度高且与视网膜病变关系密切。

2.6 药物-化合物-靶点-通路网络构建

在 Cytoscape 中构建药材-成分-靶点-通路网络,详见图 7,其中同类颜色深者为关键药效分子或核心靶点。网络图中共有 343 个点和 1 404 条边,丹红化瘀汤组方中的 7 味中药、206 种化合物、227 个靶点与 20 条不同的通路相关,共同调节机体的生理基础与代谢功能,提示丹红化瘀汤对视网膜病变的治疗作用机制有着多成分、多靶点、多通路的特点。

3 讨论

丹红化瘀汤有活血化瘀、行气通络的功效,对 DR 和 RVO 等视网膜病变有良好疗效。本研究中基于多成分、多靶点作用的研究思路,应用网络药理学技术对

表3 丹红化瘀汤治疗视网膜病变的核心靶点及其拓扑参数

基因名称	蛋白名称	BC	CC	度值
AKT1	RAC - alpha serine/threonine - protein kinase	0.093	0.59	87
TP53	Cellular tumor antigen p53	0.091	0.57	81
IL - 6	Interleukin - 6	0.046	0.56	69
MAPK1	Mitogen - activated protein kinase 1	0.057	0.56	69
MAPK8	Mitogen - activated protein kinase 8	0.054	0.57	69
JUN	Transcription factor AP - 1	0.037	0.54	63
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	0.031	0.54	61
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	0.022	0.54	59
EGF	Pro - epidermal growth factor	0.048	0.54	57
MAPK3	Mitogen - activated protein kinase 3	0.023	0.54	57
CXCL8	Interleukin - 8	0.054	0.51	53
EGFR	Epidermal growth factor receptor	0.037	0.54	53
MYC	Myc proto - oncogene protein	0.021	0.52	51
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90	0.042	0.51	50
MMP9	Matrix metalloproteinase - 9	0.049	0.52	49
CCND1	G1/S - specific cyclin - D1	0.026	0.50	48
CASP3	Caspase - 3	0.024	0.50	47
IL - 1 β	Interleukin - 1 β	0.023	0.50	46
PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2	0.038	0.51	46
FOS	Proto - oncogene c - Fos	0.034	0.52	43
MAPK14	Mitogen - activated protein kinase 14	0.016	0.51	43
ESR1	Estrogen receptor	0.013	0.50	41
RELA	Transcription factor p65	0.015	0.50	41
CCL2	C - C motif chemokine 2	0.014	0.50	40
IL - 10	Interleukin - 10	0.014	0.50	39
ICAM - 1	Intercellular adhesion molecule 1	0.015	0.50	37
AR	Androgen receptor	0.028	0.49	36
MMP2	72 kDa type IV collagenase	0.011	0.50	36
CTNN β 1	Catenin β - 1	0.025	0.48	35
ALB	Serum albumin	0.017	0.48	34
EDN - 1	Endothelin - 1	0.033	0.49	34
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1 - alpha/beta	0.005 2	0.49	34
HMOX1	Heme oxygenase 1	0.013	0.50	33
CREB1	Cyclic AMP - responsive element - binding protein 1	0.015	0.49	30
BCL2L1	Bcl - 2 - like protein 1	0.013	0.48	29
IL - 2	Interleukin - 2	0.008 5	0.48	29
PPARG	Peroxisome proliferator - activated receptor gamma	0.003 4	0.48	29
CDK1	Cell division control protein 2 homolog	0.015	0.43	28
ERBB - 2	Receptor tyrosine - protein kinase erbB - 2	0.017	0.48	28
IL - 4	Interleukin - 4	0.013	0.47	28
NOS3	Nitric oxide synthase, endothelial	0.017	0.48	28

丹红化瘀汤治疗视网膜病变的靶点进行分析,构建药物 - 化合物 - 靶点 - 通路网络,阐述丹红化瘀汤治疗视网膜病变的分子作用机制,为丹红化瘀汤的试验研究和临床应用提供依据。

在筛选出的关键药效分子中,多为黄酮类化合物及



图2 丹红化瘀汤治疗视网膜病变的核心靶点高置信度交互作用网络

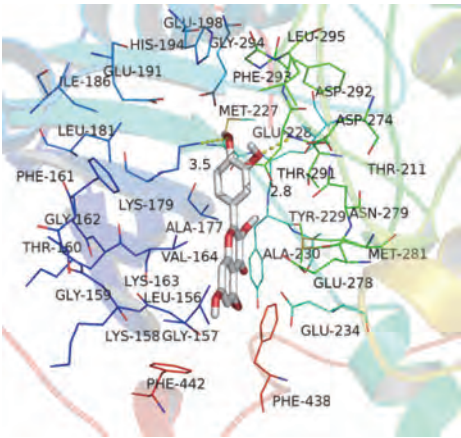


图3 槲皮素(MOL000098)与 MAPK3 的分子对接模拟可视化图
其衍生物,如槲皮素、柚皮苷、黄芩苷、丹参酮、毛地黄黄酮等。黄酮类化合物在中草药及天然产物中分布广泛,并有抗炎、抗菌和抗氧化活性^[11]。研究表明,黄酮类化合物对氧化诱导的在体和离体视网膜色素上皮细胞均有保护作用^[12];柚皮苷能减轻糖尿病性视网膜病变试验模型中的炎症反应、氧化应激和核因子 κ B(NF - κ B)活化^[13];槲皮素可通过抑制自噬而对高糖诱导的脉络膜和视网膜血管生成发挥抑制作用^[14],从而延缓 DR 进程;黄芩苷有明显抑制视网膜细胞外炎性水肿的作用^[15];丹参酮 II_A 会明显抑制高糖环境下人视网膜血管内皮细胞的增殖、迁移、血管成形方面的体外生物学作用,对于防治 DR 的发生,延缓其病理进程,可起到一定作用^[16]。此外,天然类黄酮化合物可影响眼球血流量,其中毛地黄黄酮等含有多个羟基基团的黄酮分子,可显著提高眼球血流量和促进视网膜功能的恢复。可见,以黄酮类化合物为主的关键药效分子在丹红化瘀汤治疗视网膜病

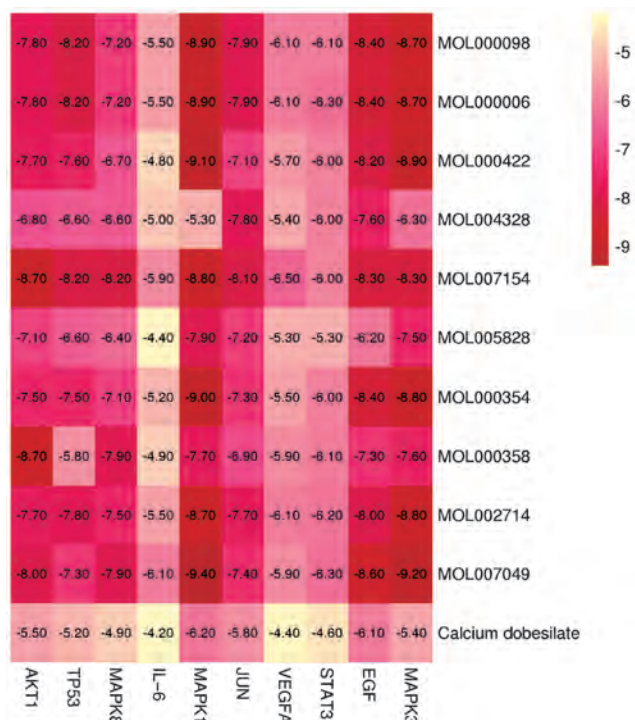


图4 Degree值前10的关键药效分子与核心靶点分子对接最低结合能热图

表4 Degree值前10靶点的受体蛋白信息

基因名称	靶点名称	蛋白数据库编码	原配体编码
AKT1	RAC - alphaserine/threonine - protein kinase	6CCY	EX4
TP53	Cellular tumor antigen p53	6CGA	EY2
MAPK8	Mitogen - activated protein kinase 8	4IZY	IJ2
IL - 6	Interleukin - 6	1ALU	TLA
MAPK1	Mitogen - activated protein kinase 1	3W8Q	AGS
JUN	Transcription factor AP - 1	5T01	5CM
VEGFA	Vascular endothelial growth factorA	5T89	NAG
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	6NJS	KQV
EGF	Pro - epidermal growth factor	1HLT	OG6
MAPK3	Mitogen - activated protein kinase 3	3FHR	P40

变的生物学过程中发挥着重要作用。

基于丹红化瘀汤治疗视网膜病变靶点的交互作用,网络分析共收集到41个核心靶点,结合分子对接验证结果分析发现,AKT1,TP53,MAPK8,MAPK1,JUN,VEGFA,STAT3,EGF,MAPK3可能是丹红化瘀汤治疗视网膜病变的关键靶点,分别从炎症反应、氧化应激、新血管生成、细胞增生与凋亡等生物过程发挥治疗作用。这9个靶点与所选的10个关键药效分子最低结合能均小于 -5.0 kJ/mol ,表明上述靶点与活性成分有结合活性,从分子与靶点的作用角度验证了核心靶点筛选结果的合理性。

VEGF是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素,能刺激血管内皮细胞的有丝分裂与迁移,增加血管

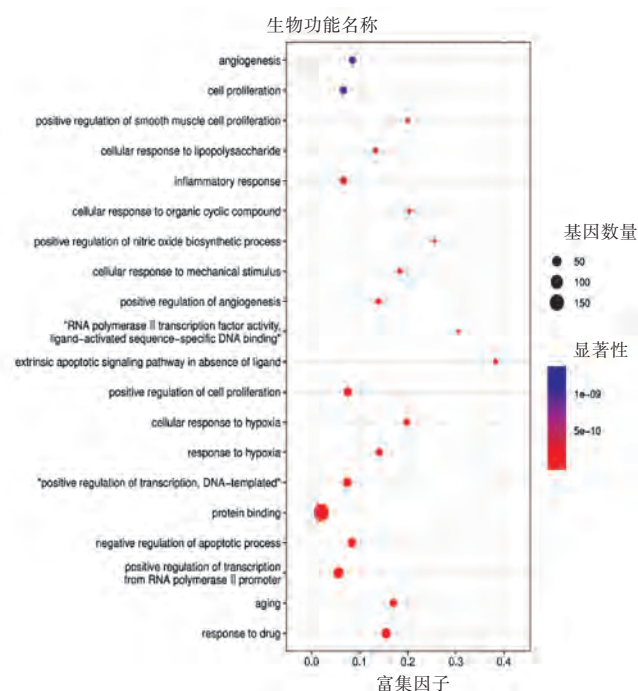


图5 GO生物富集分析气泡图

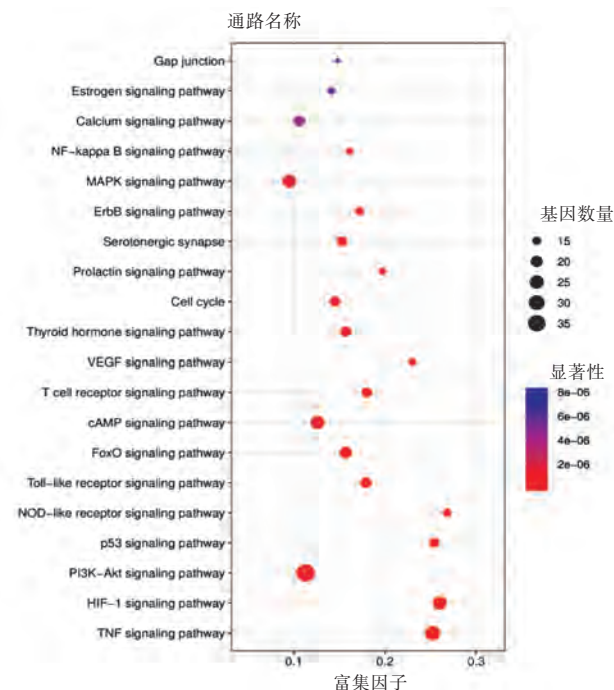


图6 KEGG通路富集分析气泡图

的通透性,诱导毛细血管腔的形成,在新生血管性视网膜病变中可发挥重要作用。视网膜静脉阻塞、增生型糖尿病视网膜病变和早产儿视网膜病变等疾病有类似的发病机制^[17],即在视网膜缺氧、缺血环境下,多种细胞分泌VEGF,其高表达可导致视网膜新生血管形成^[18]。此外,VEGF还可通过影响其他细胞因子和通路活性导致视网膜新生血管生成;上调视网膜血管的ICAM-1表达水平,增强血小板聚集功能,促进白细胞黏附,使视

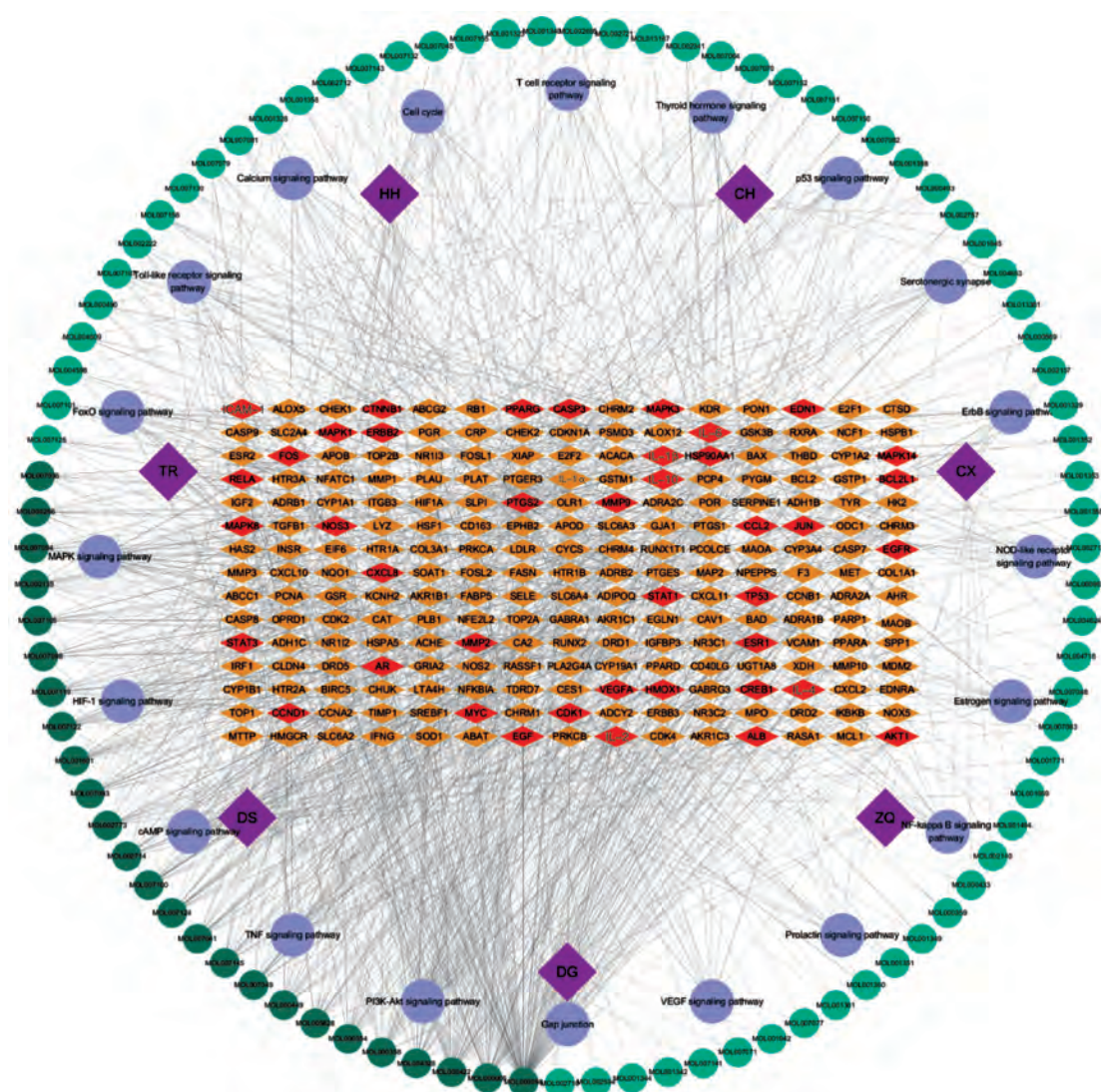


图 7 丹红化瘀汤治疗视网膜病变的药材-成分-靶点-通路网络

网膜缺血缺氧情况持续加重,加速新生血管形成^[19]。低氧和高糖环境下,VEGF 过度表达,通过受体 KDR 和 FIT-1,能诱导下游 PI3K-AKT 信号通路的激活,可加速内皮细胞发生迁移、增殖,形成新生微血管腔^[20],加速病情发展。丹红化瘀汤中丹参的活性成分丹参酮 I、丹参酮 II_A、隐丹参酮、异丹参酮等能调节 VEGF 表达,抑制血管新生成,能起到减缓 DR 病情进展的作用。丹参、红花、柴胡中的黄芩苷能通过抑制氧化应激,增强缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)降解,降低 VEGF 分泌,表现出抗血管生成作用^[21]。研究表明,丹参化瘀汤能调节 VEGF 表达,降低血管通透性,减少新生血管生成,改善血液流变学指标,预防纤维增生,延缓病情发展^[15-71]。

蛋白激酶 B(AKT)属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,控制增殖、凋亡、代谢、转导等重要的细胞功能,其与新生血管的形成密切相关^[22],被视为病理性血管形成治疗的有效方法^[23]。研究表明,缺氧环境下对氧诱导的视网膜病变模型小鼠玻璃体腔内注射 AKT 抑制剂后,

能明显减少视网膜新生血管的形成^[24],提示 AKT 活性会影响新生血管性视网膜病变的产生与发展。AKT 是 PI3K 下游的直接作用靶点,PI3K-AKT 通路在 KEGG 通路分析中富集基因较多,且与 VEGF 信号通路、mTOR 信号通路等通路密切相关。增生性玻璃体视网膜病变(PVR)的增殖期中,激活 PI3K-AKT 信号通路及其下游的 mTOR 信号通路会使眼内细胞增殖与凋亡平衡失调,导致 PVR 的形成^[25]。槲皮素可直接与 PI3K 的 ATP 结合位点结合抑制其活性,并能竞争性抑制 AKT 活性^[26],通过抑制 AKT 和 MAPKs 家族,使 NF- κ B 信号失活,从而抑制 VEGF 诱导的视网膜光感受器细胞过度炎症反应^[27]。可见,丹红化瘀汤可能通过抑制 AKT 的磷酸化与 PI3K-AKT 通路的激活,调控细胞增殖与凋亡及新生血管的生成,达到治疗视网膜病变的效果。

表皮生长因子(EGF)是促视网膜色素上皮细胞(RPE)增生最强的生长因子,EGF 及其受体 EGFR 能诱导 RPE 细胞增生、移行,并可引起其形态改变^[28],进而

促进PVR的发生、发展。EGF与EGFR结合后能激活MAPK信号通路和PI3K/AKT信号通路,调节EGF、VEGF等细胞因子的表达,并共同参与RPE细胞的增生与迁移^[29]。研究表明,槲皮素对由EGF刺激引起的RPE细胞增生抑制作用很强^[26],丹红化瘀汤可通过抑制EGF引起的RPE细胞增生达到缓解PVR病情的效果。

综上所述,本研究中应用网络药理学方法对丹红化瘀汤治疗视网膜病变的分子作用机制进行了研究,分析了丹红化瘀汤治疗视网膜病变的关键药效分子核心靶点,并应用分子对接模拟技术对核心靶点进行了验证,构建了丹红化瘀汤治疗视网膜病变的靶点交互作用网络和药物-化合物-靶点-通路网络,主要阐述了丹红化瘀汤通过多靶点、多通路作用从抗炎、抗氧化、调节细胞增生、细胞凋亡及新血管生成等方面发挥治疗视网膜病变的潜在机制,为丹红化瘀汤治疗视网膜病变的临床应用及作用机制的研究提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 孙建国,张玉明,王芳芳. 丹红化瘀口服液对非增生性糖尿病视网膜病变血管生成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(3):170-174.
- [2] 柴键. 丹红化瘀口服液和密蒙花对糖尿病视网膜病变的防治效果比较[J]. 河北医药, 2016,38(7):1034-1036.
- [3] 朱惠明,江玉,李玲,等. 丹红化瘀口服液治疗单纯型糖尿病视网膜病变[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(17):320-323.
- [4] 王梅. 和血明目片联合丹红化瘀口服液对糖尿病视网膜病变出血的临床观察[J]. 陕西中医, 2016,37(7):876-877.
- [5] 符郁,郭翠玲. 丹红化瘀口服液对视网膜中央静脉阻塞细胞因子网络的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(18):210-215.
- [6] 贾洪亮,万琦. 丹红化瘀口服液联合激光治疗视网膜中央静脉阻塞临床研究[J]. 河南中医, 2015,35(8):1897-1899.
- [7] 王峰,杨志艳,苏颖,等. 丹红化瘀口服液治疗视网膜静脉阻塞临床研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001,8(3):178.
- [8] 潘家祜. 基于网络药理学的药物研发新模式[J]. 中国新药与临床杂志, 2009,28(10):721-726.
- [9] 刘梦,吴凤芝,张蔚,等. 基于网络药理学的四逆散与酸枣仁汤治疗失眠分子机制的比较研究[J]. 北京中医药大学学报, 2019,42(1):44-51.
- [10] 刘福和,陈少军,倪文娟. 川芎中抗血栓活性成分的计算机虚拟筛选研究[J]. 中国药房, 2017,28(16):2182-2186.
- [11] ZHAO RJ, ZHOU HY, SU SB. A critical role for interleukin-1 β in the progression of autoimmune diseases[J]. International Immunopharmacology, 2013,17(3):658-669.
- [12] 庄佩,沈轶,CHIOU GCY. 黄酮对视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用(英文)[J]. 国际眼科杂志, 2010,10(9):1641-1644.
- [13] LIU LH, ZUO ZF, LU SJ, et al. Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and NF- κ B activation *in vivo* and *in vitro*[J]. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2017,20(7):814-822.
- [14] 李小珩,李蓉,朱巧平. 槲皮素对高糖诱导的脉络膜和视网膜细胞血管生成的影响及其与细胞自噬的关系[J]. 山西医科大学学报, 2019,50(12):1732-1737.
- [15] 宋昊刚,崔浩,赵君,等. 黄芩苷对家兔视网膜炎症性水肿厚度影响的研究[J]. 国际眼科杂志, 2010,10(7):1274-1276.
- [16] 杨明明,王君. 丹参对糖尿病视网膜病变的防治作用研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2011,45(6):553-555.
- [17] 赵世红. 血管内皮生长因子及其受体与眼内新生血管性疾病[J]. 眼科研究, 2003,21(1):103-106.
- [18] FERRARA N, DAVIS-SMYTH T. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. Endocrine Reviews, 1997,18(1):4-25.
- [19] 杨敏,罗向霞,康莉,等. PI3K/Akt信号转导通路 with 增殖期糖尿病视网膜病变的关联性及“补肾活血法”的调节作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2018,36(6):1388-1391.
- [20] 孙晶丽. 糖尿病视网膜病变的激光治疗临床疗效观察[J]. 中国现代药物应用, 2016,10(16):113-114.
- [21] WANG DF, WANG L, GU JQ, et al. Scutellarin inhibits high glucose-induced and hypoxia-mimetic agent-induced angiogenic effects in human retinal endothelial cells through reactive oxygen species/hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor pathway[J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2014,64(3):218-227.
- [22] 汪澎,谭浅. Akt抑制剂对氧诱导视网膜新生血管形成的作用[J]. 重庆医科大学学报, 2015,40(4):619-623.
- [23] CHEN JH, SOMANATH PR, RAZORENOVA O, et al. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability *in vivo*[J]. Nat Med, 2005,11(11):1188-1196.
- [24] 汪澎. 蛋白激酶B(Akt)促进氧诱导的鼠视网膜新生血管形成的初步研究[D]. 长沙:中南大学, 2011.
- [25] 才娜. PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制剂在视网膜色素上皮细胞增殖机制中的作用研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2018.
- [26] 张培霖,罗清礼,陈立新. 槲皮素对培养人视网膜色素上皮细胞增生及DNA合成的影响[J]. 中华眼底病杂志, 1999,15(1):30-32.
- [27] LEE M, YUN S, LEE H, et al. Quercetin Mitigates Inflammatory Responses Induced by Vascular Endothelial Growth Factor in Mouse Retinal Photoreceptor Cells through Suppression of Nuclear Factor Kappa B[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017,18(11):2497.
- [28] 张磊,孙晓东. 表皮生长因子及受体与增生性玻璃体视网膜病变[J]. 国际眼科杂志, 2009,9(1):132-134.
- [29] DEFDE DM, GRINDSTAFF RD. Epidermal growth factor stimulation of RPE cell survival: contribution of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways[J]. Experimental Eye Research, 2004,79(1):51-59.

(收稿日期:2020-03-17;修回日期:2020-05-15)