

赤芍治疗糖尿病视网膜病变的网络药理学研究

张玉荣¹, 花胤², 张玉超¹, 左丹¹, 刘元涛^{3*}

¹青岛大学附属青岛市市立医院内分泌科, 山东 青岛

²南京医科大学青岛医学院, 山东 青岛

³山东齐鲁医院(青岛)内分泌科, 山东 青岛

收稿日期: 2023年2月27日; 录用日期: 2023年3月23日; 发布日期: 2023年3月31日

摘要

目的: 应用网络药理学研究赤芍治疗糖尿病视网膜病变(diabetes retinopathy, DR)的潜在作用机制。方法: 通过中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP)筛选出赤芍的活性成分及潜在靶点, 通过GeneCards、OMIM、TTD、PharmGKB、DrugBank数据库挖掘糖尿病视网膜病变的相关靶点。应用Cytoscape 3.9.1软件构建赤芍成分 - 靶点相互作用网络图。应用韦恩图获取药物和疾病的交集靶点。将交集靶点上传至metascape, 对交集靶点进行GO和KEGG富集分析。对交集靶点进行网络拓扑分析, 并应用Cytoscape 3.9.1软件的centiscape插件筛选出关键靶点。结果: 共查找到符合筛选条件的药物成分29种, 获得潜在靶点99个, 共获得疾病相关靶点859个, 药物 - 疾病交集靶点32个; 利用网络拓扑分析最终筛选出CASP3、ESR1、AR、TP53、VEGFA、CAT、TNF、AKT1、IL6共9个关键靶点。分析得出赤芍治疗糖尿病视网膜病变的关键靶点主要被富集在AGE-RAGE、HIF-1、PI3K-Akt、Fluid shear stress and atherosclerosis、NF-κB等信号通路。结论: 本研究结果初步验证和预测了赤芍对治疗DR的作用机制, 为进一步临床验证及药理实验提供参考。

关键词

赤芍, 糖尿病视网膜病变, 网络药理学, 分子对接, 作用机制

Network Pharmacologic Study of Radix Paeoniae Rubra in the Treatment of Diabetes Retinopathy

Yurong Zhang¹, Yin Hua², Yuchao Zhang¹, Dan Zuo¹, Yuantao Liu^{3*}

¹Department of Endocrinology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao Shandong

²Qingdao Clinical Medical College Affiliated to Nanjing Medical University, Qingdao Shandong

³Department of Endocrinology, Qilu Hospital of Shandong University (Qingdao), Qingdao Shandong

*通讯作者。

Received: Feb. 27th, 2023; accepted: Mar. 23rd, 2023; published: Mar. 31st, 2023

Abstract

Objective: To investigate the potential mechanism of network pharmacology in the treatment of diabetes retinopathy (DR). **Methods:** The active constituents and potential targets of Radix Paeoniae Rubra were screened out by the Chinese Traditional Medicine System Pharmacology (TCMSP) database. The related targets of DR were mined through GeneCards, OMIM, TTD, PharmGKB, and DrugBank databases. The drug composition-target interaction network diagram was constructed by using Cytoscape 3.9.1 software. The intersection targets of drugs and diseases were obtained by the Venn diagrams. The intersection targets were uploaded to metascape for GO and KEGG enrichment analysis. Network topology analysis was carried out on intersection targets and the key targets were screened by using centiscape plug-in of Cytoscape 3.9.1. **Results:** A total of 29 drug ingredients meeting the screening conditions were identified; 99 potential targets and a total of 859 disease-related targets were obtained. There were 32 drug-disease intersection targets. Nine key targets including CASP3, ESR1, AR, TP53, VEGFA, CAT, TNF, AKT1, and IL6 were selected by network topology analysis. The analysis results indicated that the key targets of Radix Paeoniae Rubra in DR were mainly concentrated in AGE-RAGE, HIF-1, PI3K-Akt, Fluid shear stress and atherosclerosis, and NF-κB signaling pathways. **Conclusions:** The results of this study preliminarily verify and predict the mechanism of action of Radix Paeoniae Rubra in the treatment of DR, and provide a reference for further clinical validation and pharmacological experiments.

Keywords

Radix Paeoniae Rubra, Diabetes Retinopathy, Network Pharmacologic, Molecular Docking, Mechanism Research

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着人们生活水平的提高，糖尿患者的人数逐年增长[1]。作为糖尿病常见的微血管并发症，DR 是全世界成人和老年人群最常见的失明原因之一[2]，对糖尿病患者的视力产生了严重的影响。研究表明，亚洲人群中糖尿病患者 DR 的患病率约为 28%，我国糖尿病患者 DR 的患病率约为 25% [3]。作为临幊上常用的糖尿病患者视力下降的一线治疗方法，激光疗法或者玻璃体内注射血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体治疗主要针对晚期 DR 患者，并且存在不良反应多、疗效不确定、成本高昂等弊端。因此我们迫切需要开发安全有效的药物，用以早期控制 DR 病情，延缓 DR 进展。

中医药在 DR 的防治中受到了越来越多的关注。赤芍是我国传统野生中药材，具有清热凉血、活血、祛瘀止痛的功效。现代药理学研究表明，赤芍具有广泛的药理作用，包括抗氧化、抗炎、护肝、神经保护、心血管保护等[4]，并且在治疗糖尿病及其并发症方面也被证实发挥着一定的作用。赤芍的主要成分之一芍药苷已被证明可以通过 HSP70/TLR4/NF-κB 通路改善 DR [5]，对糖尿病大鼠视网膜 Müller 细胞也具有保护作用 [6]。但由于中药具有多成分、多靶点的特点，赤芍治疗 DR 的作用机制尚不清晰，本研究应用网络药理学的方法，筛选出赤芍主要作用成分及靶点，探究赤芍治疗 DR 的潜在作用机制，为临床应用提供进一步参考。

2. 材料和方法

2.1. 赤芍活性成分筛选

利用中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP) [7] (<https://old.tcmsp-e.com/index.php>)查找赤芍所有相关化学成分，综合文献报道，根据药代动力学(ADME) [8]参数，将药物口服生物利用度(Oral bioavailability OB) $\geq 30\%$ ，药物相似性(Drug likeness DL) ≥ 0.18 [9] [10]作为赤芍活性成分筛选条件。

2.2. 赤芍活性成分作用的靶点筛选

利用 TCMSP 数据库筛选出赤芍活性成分潜在靶点，在 Uniprot 数据库[11] (<https://www.uniprot.org/>)中将筛选出的潜在靶点名称规范为官方名称(Gene Symbol)，并获取其 Uniprot id。

2.3. 赤芍“活性成分 - 靶点”网络构建

将赤芍活性成分及靶点信息导入 Cytoscape 3.9.1 软件[12]，构建活性成分 - 靶点网络图。

2.4. DR 相关靶点检索

应用检索关键词“Diabetic retinopathy”在 GeneCards 数据库[13] (<https://www.genecards.org>)中将筛选条件设置为 Relevance score ≥ 1 ，获得 DR 相关靶点 499 个，在 OMIM [14] (<https://omim.org/>)、TTD [15] (<https://db.idrblab.net/ttd/>)、PharmGKB [16] (<https://www.pharmgkb.org/>)、DrugBank [17] (<https://go.drugbank.com/>)数据库中得到相关靶点分别为 232 个、30 个、187 个、3 个，对 5 个数据库中获得的所有靶点信息进行整合，并删去重复值。

2.5. 交集蛋白筛选

将检索出的的赤芍活性成分作用靶点和 DR 相关靶点利用 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)绘制韦恩图，获取交集靶点。

2.6. 交集蛋白相互作用(PPI)网络构建及关键靶点的筛选

将所获得的交集靶点导入 STRING 数据库[18] (<https://cn.string-db.org/>)，物种限定为“Homo sapiens”，设置信度为 0.4 并隐藏游离节点，得到交集靶点相互作用网络，并导出 tsv 文件。将该 tsv 文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件中，并利用 centiscape 插件对相互作用网络进行分析，根据中介性 Betweenness、接近度 Closeness、自由度 Degree 筛选出高分靶点，即赤芍治疗 DR 的关键靶点。

2.7. 交集靶点功能及生物通路分析

将交集靶点上传至 Metascape 数据库[19] (<http://metascape.org/gp/index>)，选择物种为“智人”，Min Overlap 设置为 3，P Value Cutoff 设置为 0.01，Min Enrichment 设置为 1.5，分别进行基因本体(Gene ontology GO)功能和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes KEGG)信号通路富集分析。利用微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)在线作图工具将 GO 富集分析得到的生物学进程(Biological Processes BP)、细胞构成(Cellular Components CC)、分子功能(Molecular Functions MF)结果以及 KEGG 富集分析结果进行可视化呈现。

2.8. 构建成分 - 靶点 - 信号通路网络

应用 Cytoscape 3.9.1 软件，将赤芍活性成分、交集蛋白与信号通路信息导入，构建赤芍治疗 DR 的成分 - 靶点 - 信号通路网络。

2.9. 分子对接

将 2.1 小结和 2.6 小结中排名靠前的活性成分与核心靶点进行分子对接。在 pubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载赤芍活性成分的小分子结构式，再通过 Chem3D 软件获得稳定分子构象，保存为 mol2 格式。对于核心靶点的处理是利用 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 查找并获得对应 pdb 格式文件，导入 PyMol 软件进行蛋白受体的初步理，接着在 AutoDOck 软件中将初步处理后的蛋白受体进行加氢等操作，保存为处理完的受体蛋白。最终的分子对接是用 Autodock 软件将前面处理好的赤芍活性成分与核心靶点受体进行处理，接着可视化分析的图片是 PyMol 生成。

3. 结果

3.1. 活性成分筛选

利用 TCMSP 数据库查找出赤芍化学成分共 120 种，共筛选出 29 种满足 $OB \geq 30\%$ 并且 $DL \geq 0.18$ 的活性成分。赤芍活性成分见表 1。

Table 1. Bioactive ingredients of Radix Paeoniae Rubra

表 1. 赤芍生物活性成分

编号	MOL ID	有效成分	OB (%)	DL
1	MOL001002	ellagic acid	43.06	0.43
2	MOL001918	paeoniflorgenone	87.59	0.37
3	MOL001921	Lactiflorin	49.12	0.80
4	MOL001924	paeoniflorin	53.87	0.79
5	MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40
6	MOL002714	baicalein	33.52	0.21
7	MOL002776	Baicalin	40.12	0.75
8	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
9	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
10	MOL004355	Spinasterol	42.98	0.76
11	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
12	MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24
13	MOL006990	(1S,2S,4R)-trans-2-hydroxy-1,8-cineole-B-D-glucopyranoside	30.25	0.27
14	MOL006992	(2R,3R)-4-methoxyl-distylin	59.98	0.30
15	MOL006994	1-o-beta-d-glucopyranosyl-8-o-benzoylpaeonisuffrone_qt	36.01	0.30
16	MOL006996	1-o-beta-d-glucopyranosylpaeonisuffrone_qt	65.08	0.35
17	MOL006999	stigmast-7-en-3-ol	37.42	0.75
18	MOL007003	benzoyl paeoniflorin	31.14	0.54
19	MOL007004	Albiflorin	30.25	0.77
20	MOL007005	Albiflorin_qt	48.70	0.33
21	MOL007008	4-ethyl-paeoniflorin_qt	56.87	0.44
22	MOL007012	4-o-methyl-paeoniflorin_qt	56.70	0.43
23	MOL007014	8-debenzoylpaeonidanin	31.74	0.45
24	MOL007016	Paeoniflorgenone	65.33	0.37
25	MOL007018	9-ethyl-neo-paeoniaflorin A_qt	64.42	0.30
26	MOL007022	evofolinB	64.74	0.22
27	MOL007025	isobenzoylpaeoniflorin	31.14	0.54
28	MOL002883	Ethyl oleate (NF)	32.40	0.19
29	MOL005043	campest-5-en-3beta-ol	37.58	0.71

3.2. 赤芍潜在靶点预测及“活性成分 - 靶点”网络构建

应用TCMSP数据库查找赤芍29个活性成分对应的潜在靶点，删除TCMSP数据库中找不到潜在靶点的药物成分15个，用Uniprot (<https://www.uniprot.org>)数据库中的Uniprot KB功能，输入潜在靶点名称，将物种设定为人，并筛选经过校验的(Reviewed/swissprot)的靶点，将潜在靶点名称校正为官方名称(Gene Symbol)。其中有3个靶点(Chitin synthase 2, Cytochrome P450-cam, Beta-lactamase)在Uniprot数据库中查找不到符合条件的基因信息，将其删除。利用Cytoscape3.9.1软件构建出“赤芍活性成分-靶点相互作用网络图”，见图1。图中赤芍活性成分和靶点用节点表示，用边连接活性成分与其对应的靶点。赤芍活性成分节点共14个，靶点节点共99个。

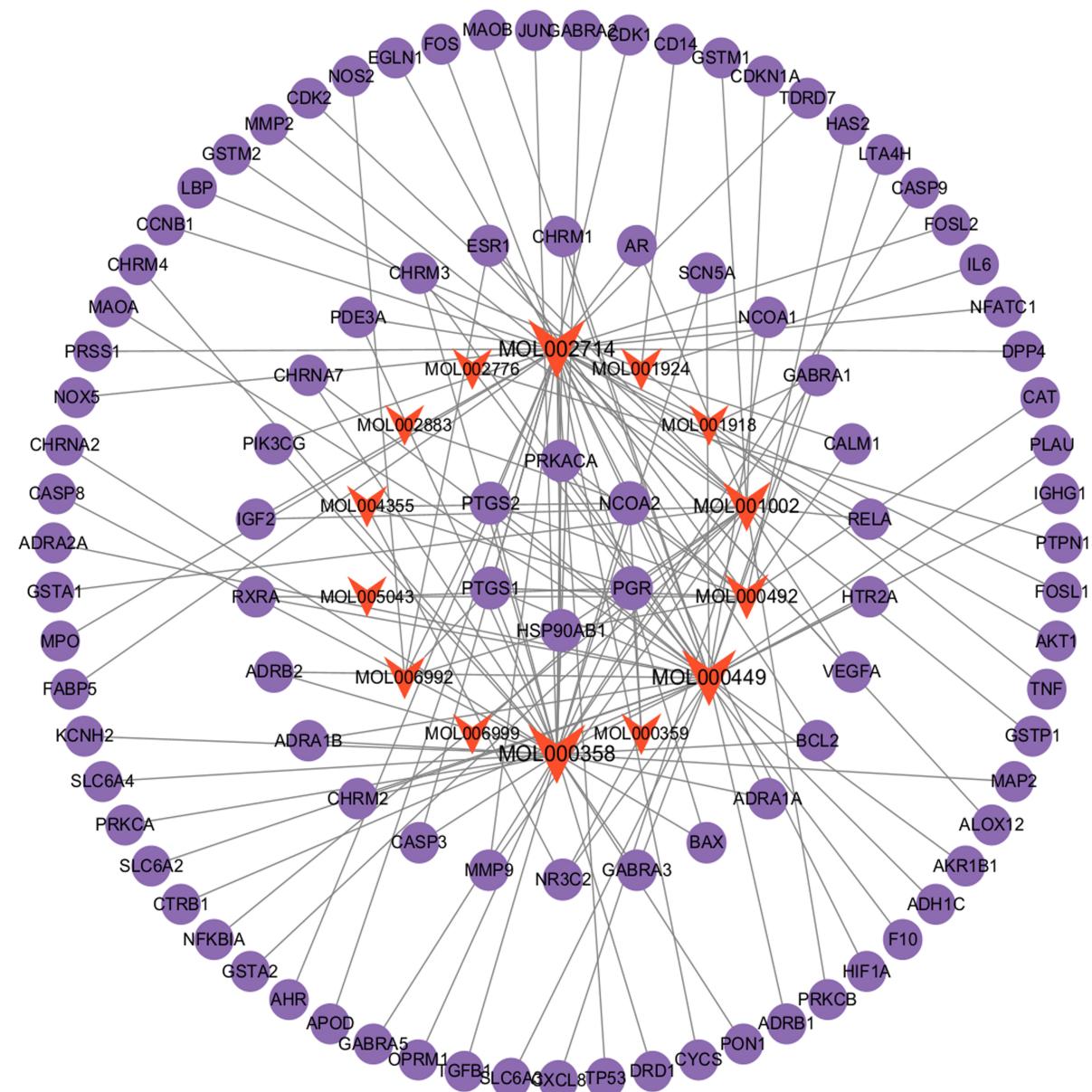


Figure 1. The active ingredient-target figure of *Radix Paeoniae Rubra*

图 1. 赤芍活性成分 - 靶点相互作用网络图

3.3. 赤芍 - 糖尿病视网膜病变交集靶点

应用 GeneCards、OMIM、TTD、PharmGKB、DrugBank 数据库筛选出符合条件的 DR 相关靶点 859 个，应用 Venny2.1.0 绘制出“赤芍-DR 交集靶点韦恩图”，如图 2。结果示，赤芍与 DR 之间共存在 32 个交集靶点。将这 32 个靶点视为赤芍治疗糖 DR 的潜在靶点。交集靶点信息见表 2。

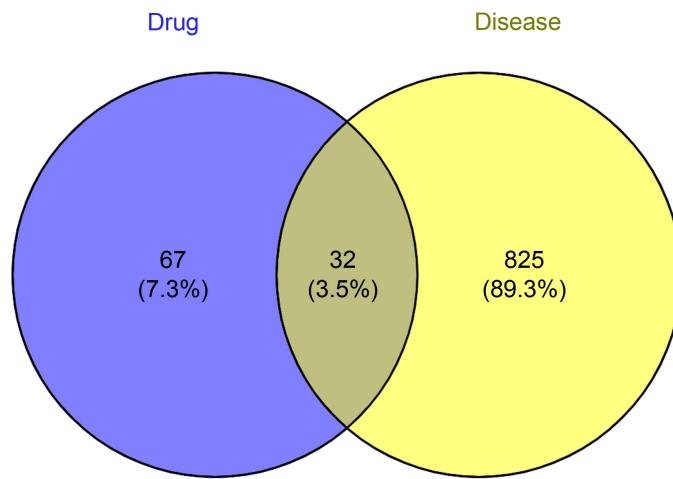


Figure 2. Venn plot of Radix Paeoniae Rubra targets and DR targets in olibanum

图 2. 赤芍-DR 交集靶点韦恩图

Table 2. The information of 32 intersection targets

表 2. 32 个交集靶点信息

序号	靶点	序号	靶点
1	ESR1	17	FOS
2	AR	18	CASP3
3	VEGFA	19	TP53
4	MMP2	20	HIF1A
5	MMP9	21	AHR
6	CXCL8	22	APOD
7	PRKCB	23	PTPN1
8	IGF2	24	ADRB2
9	GSTM1	25	JUN
10	TNF	26	TGFB1
11	IL6	27	PON1
12	PTGS2	28	NR3C2
13	DPP4	29	RXRA
14	PIK3CG	30	AKR1B1
15	AKT1	31	CAT
16	BCL2	32	NOS2

3.4. 赤芍 - 糖尿病视网膜病变交集靶点的相互作用(PPI)网络

将 32 个交集靶点上传至 String 数据库, 得到“交集靶点蛋白互作(PPI)网络图”, 见图 3。图中交集靶点用节点表示, 用边表示交集靶点间的相互作用。

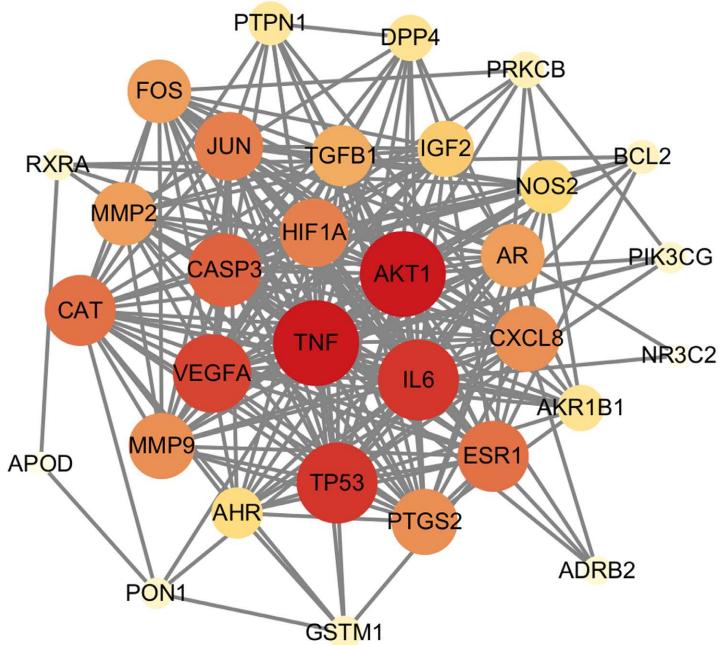


Figure 3. The protein interaction network of intersection targets
图 3. 交集靶点 PPI 网络图

3.5. 筛选核心靶点

利用 Cytoscape 3.9.1 软件中的 centiscape 插件对 PPI 图中的靶点进行拓扑挖掘, 根据 Betweenness、Degree 等参数进行计算并作图, 筛选出 CASP3、ESR1、AR、TP53、VEGFA、CAT、TNF、AKT1、IL6 共 9 个具有显著作用的节点, 这些节点可能是赤芍作用于 DR 的核心靶点。见图 4。

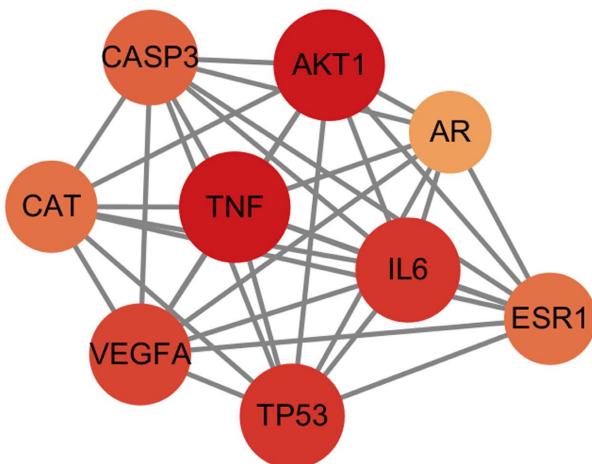


Figure 4. The protein interaction network of core targets
图 4. 核心靶点 PPI 网络图

3.6. GO 富集分析

应用 Metascape 数据库对赤芍与 DR 的交集靶点进行 GO 富集分析。筛选 p 值最小的前 20 个富集结果进行展示, 见图 5。其中 BP 条目共 20 个, 主要包括: 细胞对化学应激的反应(cellular response to chemical stress)、对激素的反应(response to hormone)、蛋白质的磷酸化的正调控(positive regulation of phosphorylation)、细胞对氮化合物的反应(cellular response to nitrogen compound)、管形态发生(tube morphogenesis)、miRNA 的转录调控(regulation of miRNA transcription)、腺体发育(gland development)、对类固醇激素的反应(response to steroid hormone)、腺体形态发生(gland morphogenesis)、对伤害的反应(response to wounding)等, CC 条目共 4 个, 包括转录调节复合物(transcription regulator complex)、血小板 α 颗粒(platelet alpha granule lumen)、受体复合物(receptor complex)、膜筏(membrane raft), MF 条目共 9 个, 包括 DNA 结合转录因子结合(DNA-binding transcription factor binding)、蛋白质同二聚化活性(protein homodimerization activity)、蛋白酶结合(protease binding)、细胞因子受体结合(cytokine receptor binding)、核类固醇受体活性(nuclear steroid receptor activity)、通路调节器活性(channel regulator activity)、丝氨酸型内肽酶活性(serine-type endopeptidase activity)、蛋白激酶调节剂活性(protein kinase regulator activity)、肽结合(peptide binding)。上述结果说明赤芍对 DR 的治疗作用可以通过多种生物学进程、细胞构成及分子功能达到治疗 DR 的作用。

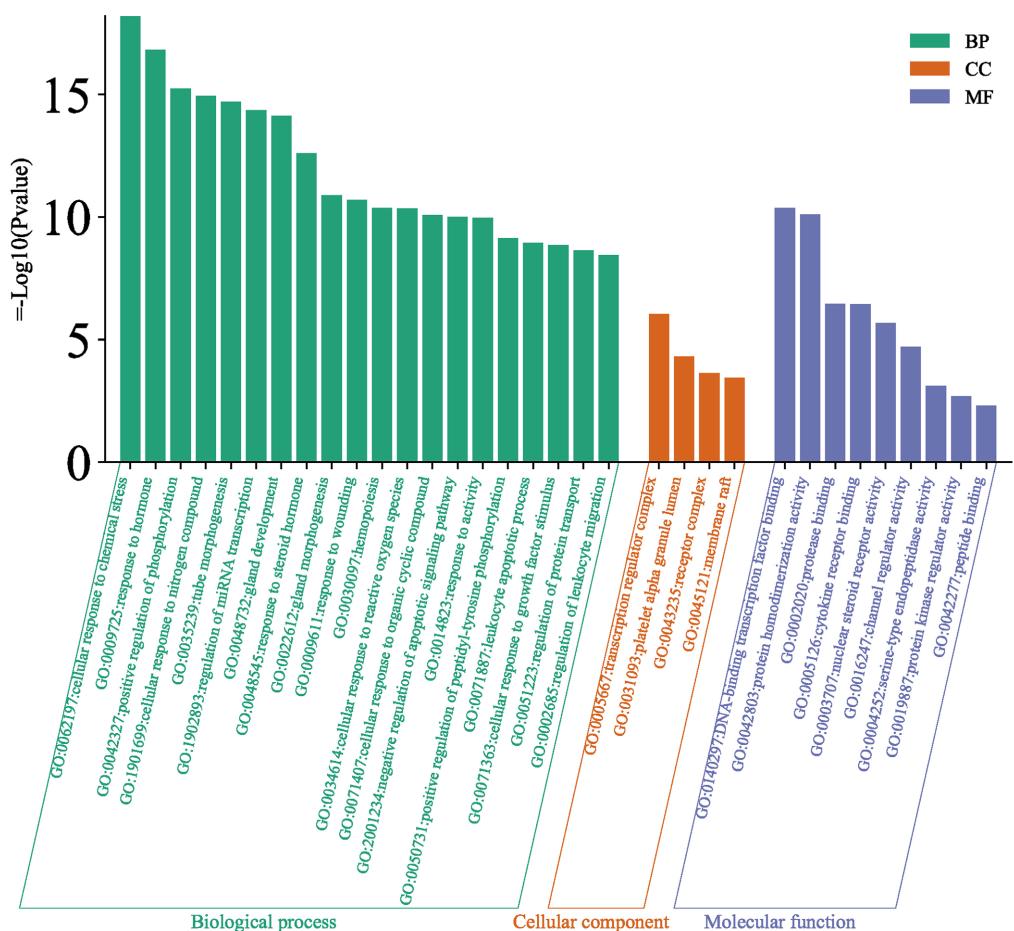


Figure 5. The histogram of GO analysis

图 5. GO 富集分析柱状图

3.7. KEGG 富集分析

应用 Metascape 数据库对交集靶点进行 KEGG 富集分析, 将 P 值最小的前 20 条富集结果进行可视化呈现, 见图 6, 涉及糖尿病并发症中晚期糖基化产物 - 晚期糖基化终末产物受体信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、流体剪应力和动脉粥样硬化通路(Fluid shear stress and atherosclerosis)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、磷脂酰肌醇 3-蛋白激酶 B 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、NF- κ B 信号通路等。其中 AGE-RAGE 信号通路与 DR 相关性最强, 核心靶点在 AGE-RAGE 信号通路中的作用见图 7。上述结果提示赤芍可以通过多通路干预 DR 的病程进展。

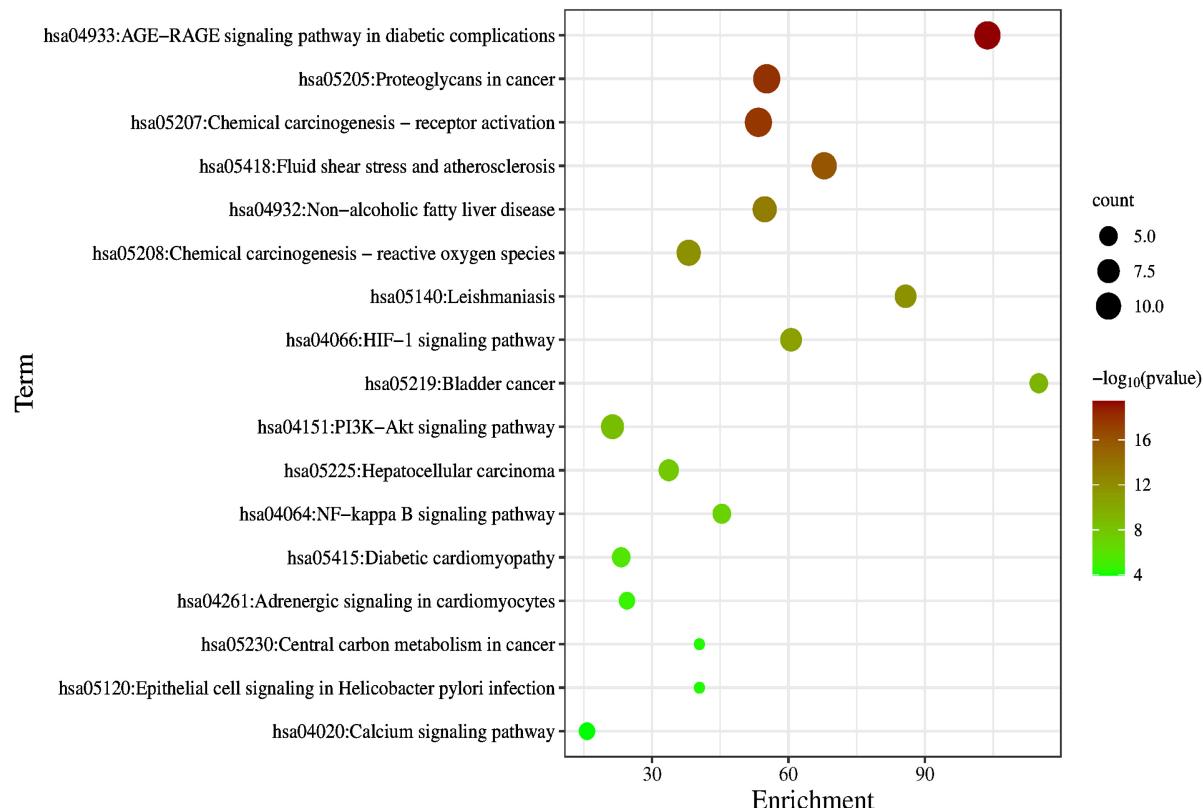


Figure 6. The bubble chart of KEGG analysis
图 6. KEGG 富集分析气泡图

3.8. 成分 - 靶点 - 信号通路网络图

应用 Cytoscape 3.9.1 软件构建出赤芍治疗 DR 的“成分 - 靶点 - 信号通路”网络图, 见图 8, 图中包括 14 个药物活性成分, 32 个潜在靶点, 涉及 18 条信号通路, 由此可见, 赤芍通过多个成分、靶点以及信号通路干预 DR 的发生和发展。

3.9. 分子对接验证

“成分 - 靶点 - 信号通路”网络图提示核心靶点 CASP3、VEGFA 在关键通路中起着核心作用, 选取与之对应的排名靠前的活性成分: 黄芩素、鞣花酸、进行分子对接验证, 结果显示黄芩素、鞣花酸均能与核心靶点蛋白 CASP3、VEGFA 形成稳定对接, 其结合能均低于-7.0 kcal/mol, 表示其结合构型具有强烈的活性, 结果见表 3, 图 9。

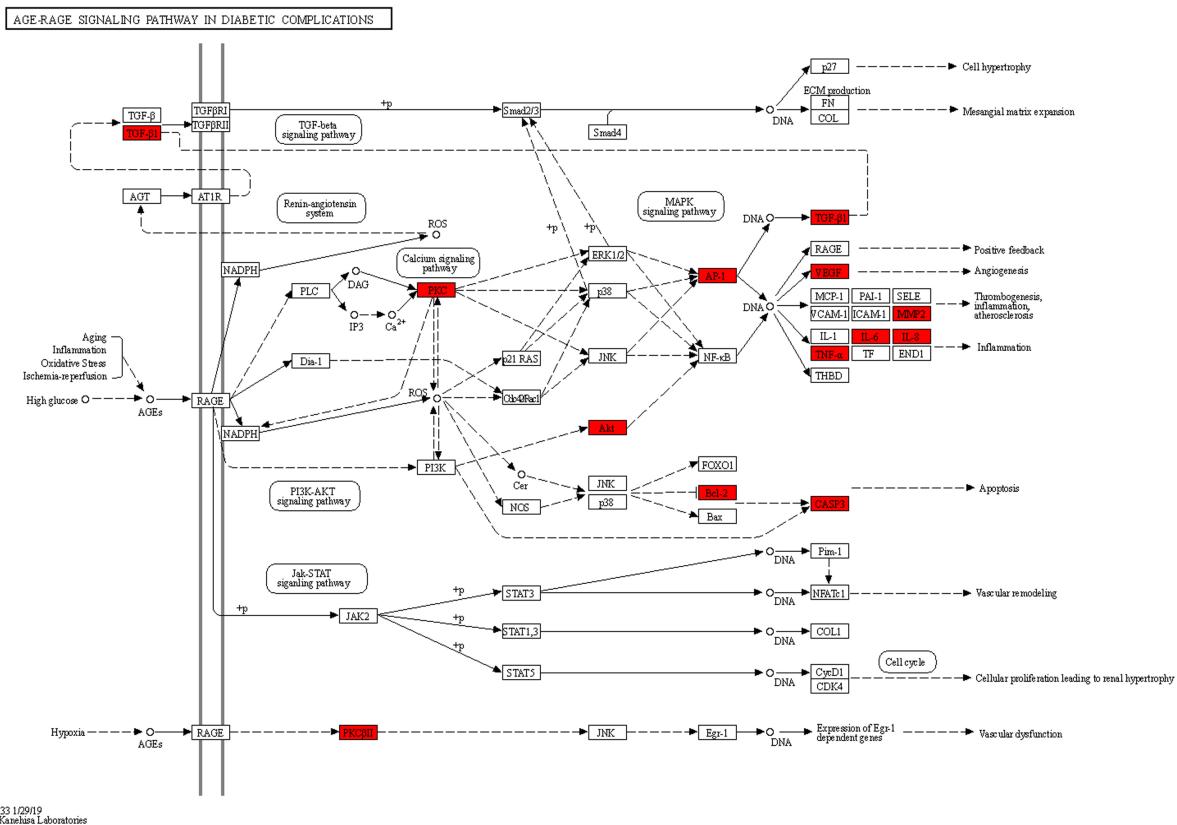


Figure 7. The role of core targets in the AGE-RAGE signaling pathway
图 7. 核心靶点在 AGE-RAGE 信号通路中的作用

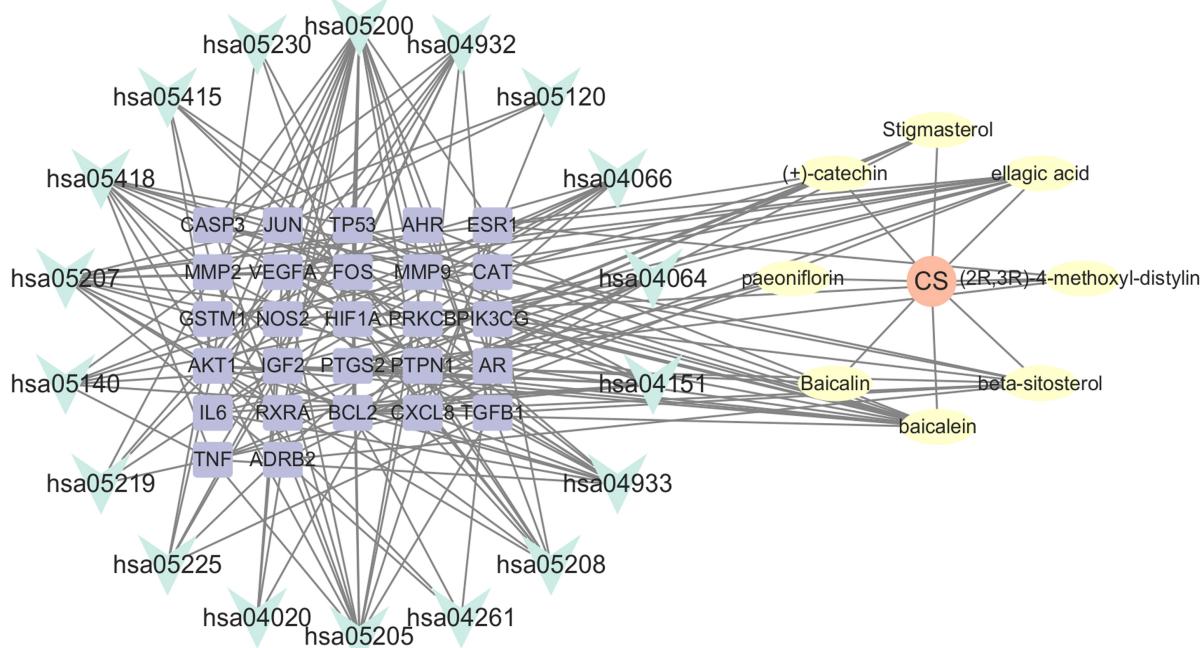


Figure 8. The “components-targets-pathways” network diagram
图 8. 成分 - 靶点 - 信号通路网络图

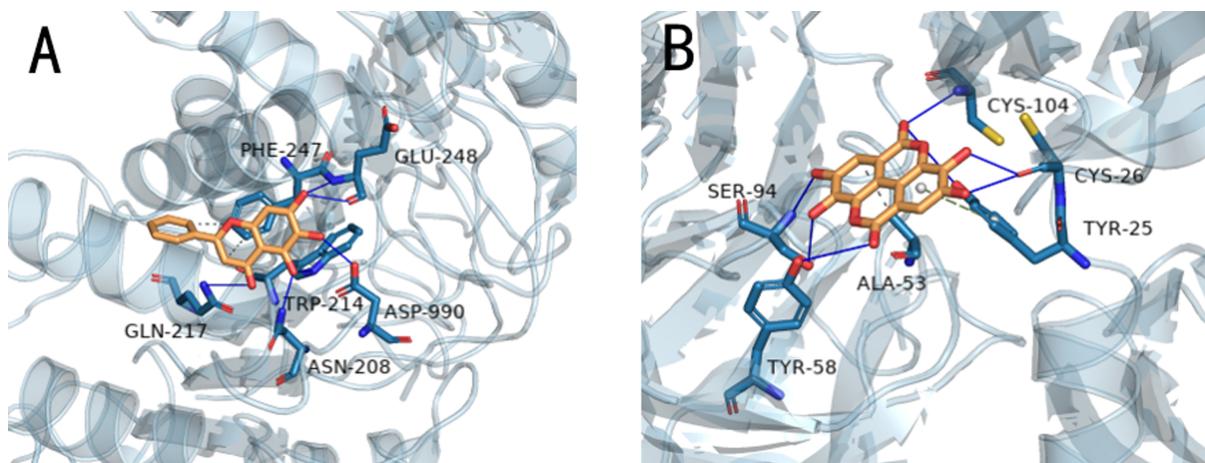


Figure 9. The results of molecular docking, Node: (a) baicalein-CASP3; (b) ellagic acid-VEGFA
图 9. 分子对接结果。(a) 黄芩素-CASP3; (b) 鞣花酸-VEGFA

Table 3. Molecular docking results

表 3. 分子对接结果

有效成分	结合能(kcal/mol)	
	CASP3	VEGFA
黄芩素(baicalein)	-7.3	-7.8
鞣花酸(ellagic acid)	-7.3	-7.7

4. 讨论

DR 是糖尿病最常见的微血管并发症之一，严重影响着人们的视力健康。近年来中药在 DR 防治中效果显著，尤其在改善 DR 临床症状方面颇具优势。中医药认为 DR 病机为“气阴两虚”，逐渐发展到“肝肾阴虚”，最终进展为“阴阳两虚”，病程中存在痰、瘀、郁等致病因素[20]，治疗上多以“疏肝泻热”、“活血通络”、“益气养阴”等为原则。赤芍味苦，性微寒，能清热凉血、活血散瘀，应用赤芍治疗 DR 符合中医辩证用药的原则，已有临床研究表明赤芍组成的方剂对 DR 疗效显著[21]。但是赤芍治疗 DR 的作用机制及具体作用成分仍有待进一步探讨。

本研究应用网络药理学的方法和理念，对赤芍治疗 DR 的作用机制进行预测，筛选出赤芍活性成分共 29 个，与 DR 相交的靶基因共 32 个，通过“赤芍成分-靶点-信号通路”调控网络可知黄芩素(baicalein)潜在靶点最多，其次为鞣花酸(ellagic acid)，再次为 β -谷甾醇(beta-sitosterol)、(+)-儿茶素[(+)-catechin]、豆甾醇(Stigmasterol)、(2R, 3R)-4-甲氧基-二苯乙烯[(2R, 3R)-4-methoxyl-distylin]、芍药苷(paeoniflorin)、黄芩苷(Baicalin)。黄芩苷和黄芩素是两种酮类化合物，在体内可以相互转化。动物实验发现黄芩素可以通过降低血清中的 IL-1 β 、IL6 以及 TNF- α 的浓度，抑制视网膜中 RAGE 受体蛋白及 ICAM-1 黏附因子的表达，进而抑制核转录因子的 NF- κ B 的激活及炎症因子的释放，减轻糖尿病大鼠早期视网膜组织结构的损害，延缓早期糖尿病大鼠视网膜病变进程[22]。Li Pan 等[23]应用蛋白质组学分析进一步揭示了黄芩素对调节 IL-17 信号通路及其上游调节因子 IL-1 β 的作用，并发现黄芩素可以通过限制小胶质细胞和 T 细胞活化以及慢性视网膜神经炎症在视网膜缺血/再灌注损伤中发挥有效作用。鞣花酸具有抗氧化、抗炎、抗癌等生物活性，可以改善胰岛素抵抗，具有降血糖、改善高胰岛素血症的作用[24]。研究证明鞣花酸可以通过 miR-223/keap1-Nrf2 通路改善高糖引起的细胞氧化应激和胰岛素抵抗[25]，并且通过动物实验，鞣

花酸已被证实可以改善视网膜淤血，干预糖尿病小鼠眼组织病理损害后的炎症，保护糖尿病小鼠眼组织[26]。 β -谷甾醇是一种具有抗氧化作用的植物甾醇，有综述报道，糖尿病肝病、糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病、糖尿病神经病变、糖尿病心肌病变等与糖尿病的高糖环境导致的氧化应激有关[27]。因此 β -谷甾醇的抗氧化作用有控制上述并发症发生和发展的潜力[28]。 β -谷甾醇可以通过激活脂肪组织中的胰岛素受体(insulin receptor, IR)和葡萄糖转运酶 4 (glucose transporter 4, GLUT4)来调节血糖水平[29]。Selvaraj Jayaraman 等[30]研究表明 β -谷甾醇通过下调 2 型糖尿病大鼠脂肪细胞中的 IKK β /NF- κ B 和 JNK 信号通路来规避肥胖引起的炎症和胰岛素抵抗。研究发现在糖尿病发展过程中，由于肝损伤血浆中会出现谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的升高，而通过 β -谷甾醇和豆甾醇可以降低上述肝酶水平，表明其对肝细胞的保护作用，从而加强肝脏对血糖水平的调控功能。另外己糖激酶是糖酵解中的关键酶， β -谷甾醇和豆甾醇可以通过提高己糖激酶的活性，从而增强葡萄糖的利用。而乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)与己糖激酶类似，活性都可以被 β -谷甾醇和豆甾醇增强从而发挥糖酵解的功能，发挥降血糖作用[31]。

通过对 32 个交集靶点的 PPI 网络进行分析得到 9 个核心靶点，体现出赤芍治疗 DR 具有复杂的作用机制，核心靶点按照 degree 值从大到小排序为 CASP3、ESR1、AR、TP53、VEGFA、CAT、TNF、AKT1、IL6，这些核心靶点聚焦于细胞增殖、凋亡、以及氧化应激、炎症反应等方面，在赤芍治疗 DR 的过程中发挥着重要作用。CASP3 被激活后具有抑制 DNA 修复和执行剪切细胞结构蛋白的作用，直接造成细胞凋亡[32]。因此我们推测 CASP3 可能通过调节细胞凋亡参与 DR 的病理过程。AKT1 与细胞增殖以及迁移等过程有关，高血糖可以引起脉络膜 - 视网膜内皮细胞系中的 VEGFA 和 PIK3R2 的表达增加，使 AKT1 活化[33]，这也说明该信号通路的失调会影响 DR 的病程进展。ESR1 可使胰岛素的敏感性增强，改善糖、脂代谢，当 ESR1 表达缺陷时可导致胰岛素抵抗[34] [35]。TP53 在糖尿病的发展中起着重要作用，可以诱导脂肪细胞与胰岛细胞早衰，进而减少胰岛素分泌，加剧血糖失调[36]。VEGFA 具有增加小静脉血管与微血管的通透性的生理功能，在血管生成过程中起着正向调控作用，抑制 VEGFA 的表达可影响高糖引起的 RF/6A 细胞的迁移和管腔形成[37]。抗血管内皮生长因子(VEGF)的药物已广泛应用于治疗 DR，疗效显著。抗 VEGFA 和血管生成素-2(Ang-2)的双特异性抗体 Faricimab 已在多个国家获批，可以用于治疗糖尿病性黄斑水肿等多种视网膜疾病[38]。TNF 是脂肪细胞产生的一种蛋白质，分 TNF- α 和 TNF- β 两种亚型，其中 TNF- α 发挥了 TNF 信号通路中 90% 的生物功能，TNF- α 在炎症反应中扮演着重要的角色。有研究发现 TNF- α 等可以通过增加血管通透性引起黄斑水肿，还可以导致病理性血管的生成[39]。IL6 是体内炎症反应和一系列病理生理过程中重要的白细胞介素之一，研究证实 IL6 可参与胰岛素抵抗[40]，并且随着 DR 患者病变程度加重，DR 患者玻璃体中 IL6 含量增高[41]，提示 IL6 可能参与 DR 的发生发展。

GO 富集分析表明 BP 主要涉及细胞对化学应激的反应、蛋白质的磷酸化的正调控、miRNA 的转录调控、对类固醇激素的反应、对伤害的反应等，CC 涉及转录调节复合物、血小板 α 颗粒、受体复合物、膜筏，MF 涉及结合转录因子结合、蛋白质同二聚化活性、蛋白酶结合、细胞因子受体结合等。

KEGG 富集分析表明赤芍可以介入多个信号通路干预 DR 的发展进程，其中 AGE-RAGE 信号通路可以诱导氧化应激反应，参与 DR 的发展进程，AGE 与 RAGE 结合之后，RhoA-ROCK 信号通路被激活，生成新生血管[42]。流体剪应力和动脉粥样硬化信号通路与炎症反应以及转录因子 NF- κ B、MAPK 密切相关，在 IL-6、TNF- α 等炎症因子以及流体剪应力的作用下，激活后的 NF- κ B 可能会刺激 VEGF 的表达[43]。HIF-1 是一种转录激活因子，由 HIF- α 和 HIF- β 亚单位组成，已有研究表明高血糖可以引起组织缺

氧[44]，而在缺氧条件下 HIF- α 会上调其表达，使机体内氧浓度维持稳定。同时 HIF- α 是 VEGF 的关键转录激活因子[45]。研究证明应用 HIF 抑制剂可以抑制眼部新生血管[46]。已有研究报道均表明 AGE-RAGE 信号通路、流体剪应力和动脉粥样硬化信号通路、HIF-1 信号通路等在 DR 的进程中起到了关键作用，这与本文中 KEGG 富集分析结果相切合。

分子对接结果说明赤芍中的活性成分黄芩素、鞣花酸与核心靶点 CASP3、VEGFA 可以稳定对接，进一步验证了应用网络药理学的方法预测的结果具有可靠性。

5. 结论

本研究应用网络药理学及分子对接的方法，探究赤芍干预 DR 进展的物质基础及作用机制，分析了赤芍和 DR 之间的关系，研究表明，赤芍可以通过多成分、靶点及信号通路干预 DR 进展，为赤芍治疗 DR 的临床应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] Sabanayagam, C., Yip, W., Ting, D.S., et al. (2016) Ten Emerging Trends in the Epidemiology of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmic Epidemiology*, **23**, 209-222. <https://doi.org/10.1080/09286586.2016.1193618>
- [2] Flaxman, S.R., Bourne, R.R.A., Resnikoff, S., et al. (2017) Global Causes of Blindness and Distance Vision Impairment 1990-2020: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Lancet Global Health*, **5**, e1221-e1234. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30393-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30393-5)
- [3] Yang, Q.H., Zhang, Y., Zhang, X.M., et al. (2019) Prevalence of Diabetic Retinopathy, Proliferative Diabetic Retinopathy and Non-Proliferative Diabetic Retinopathy in Asian T2DM Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Ophthalmology*, **12**, 302-311.
- [4] 张石凯, 曹永兵. 赤芍的药理作用研究进展[J]. 药学实践杂志, 2021, 39(2): 97-101.
- [5] 朱素华. 芍药苷抑制糖尿病视网膜病变基质金属蛋白酶9激活的研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京医科大学, 2017.
- [6] 张博, 李凤君, 左中夫. 芍药苷对糖尿病大鼠视网膜 Müller 细胞的保护作用[J]. 中国中医眼科杂志, 2019, 29(1): 5-9.
- [7] Ru, J., Li, P., Wang, J., et al. (2014) TCMSP: A Database of Systems Pharmacology for Drug Discovery from Herbal Medicines. *Journal of Cheminformatics*, **6**, Article No. 13. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-13>
- [8] Xu, X., Zhang, W., Huang, C., et al. (2012) A Novel Chemometric Method for the Prediction of Human Oral Bioavailability. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 6964-6982. <https://doi.org/10.3390/ijms13066964>
- [9] Deacon, C.F. (2020) Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, **16**, 642-653. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0399-8>
- [10] 马璐, 田国祥, 耿辉, 等. 中药系统药理数据库 TCMSP 及其分析应用简介[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2020, 12(12): 1413-1416.
- [11] Couderc, E., Gehant, S., De Castro, E., et al. (2023) Annotation of Biologically Relevant Ligands in UniProtKB Using ChEBI. *Bioinformatics*, **39**, btac793. <https://doi.org/10.1101/2022.08.19.504519>
- [12] Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., et al. (2003) Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, **13**, 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- [13] Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., et al. (2016) The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, **54**, 1.30.1-1.30.33. <https://doi.org/10.1002/cpb.5>
- [14] Amberger, J.S. and Hamosh, A. (2017) Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): A Knowledgebase of Human Genes and Genetic Phenotypes. *Current Protocols in Bioinformatics*, **58**, 1.2.1-1.2.12. <https://doi.org/10.1002/cpb.27>
- [15] Zhou, Y., Zhang, Y., Lian, X., et al. (2022) Therapeutic Target Database Update 2022: Facilitating Drug Discovery with Enriched Comparative Data of Targeted Agents. *Nucleic Acids Research*, **50**, D1398-D1407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab953>
- [16] Whirl-Carrillo, M., Huddart, R., Gong, L., et al. (2021) An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **110**, 563-572. <https://doi.org/10.1002/cpt.2350>

- [17] Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Guo, A.C., et al. (2018) DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018. *Nucleic Acids Research*, **46**, D1074-D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>
- [18] Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., et al. (2017) The STRING Database in 2017: Quality-Controlled Protein-Protein Association Networks, Made Broadly Accessible. *Nucleic Acids Research*, **45**, D362-D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
- [19] Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., et al. (2019) Metascape Provides A Biologist-Oriented Resource for the Analysis of Systems-Level Datasets. *Nature Communications*, **10**, Article No. 1523. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09234-6>
- [20] 段俊国, 金明, 接传红, 等. 糖尿病视网膜病变中医诊疗标准[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(7): 632-637.
- [21] 刘荣, 朱铭卿. 地黄赤芍祛瘀汤治疗非增殖期糖尿病视网膜病变 40 例[J]. 浙江中医杂志, 2021, 56(10): 730.
- [22] 师珍珍. 黄芩素对糖尿病大鼠血清及视网膜 RAGE/ICAM-1/NF- κ B 信号通路的影响[D]: [硕士学位论文]. 石家庄: 河北医科大学, 2022.
- [23] Pan, L., Sze, Y.H., Yang, M., et al. (2022) Baicalein-A Potent Pro-Homeostatic Regulator of Microglia in Retinal Ischemic Injury. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article 837497. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.837497>
- [24] 田亚丽, 巴合提别克·托合塔尔拜克, 古丽海夏·哈勒玛合拜, 等. 鞣花酸促进自噬性清除改善 2 型糖尿病小鼠肝脏胰岛素信号通路[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(10): 2353-2356.
- [25] Ding, X., Jian, T., Wu, Y., et al. (2019) Ellagic Acid Ameliorates Oxidative Stress and Insulin Resistance in High Glucose-Treated HepG2 Cells via miR-223/keap1-Nrf2 Pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **110**, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.018>
- [26] 张之, 黄琦敏, 李倩, 等. 鞣花酸改善糖尿病小鼠眼组织病变的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(15): 1792-1795.
- [27] Oguntibeju, O.O. (2019) Type 2 Diabetes Mellitus, Oxidative Stress and Inflammation: Examining the Links. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, **11**, 45-63.
- [28] Babu, S. and Jayaraman, S. (2020) An Update on β -Sitosterol: A Potential Herbal Nutraceutical for Diabetic Management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **131**, Article ID: 110702. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110702>
- [29] Ponnulakshmi, R., Shyamaladevi, B., Vijayalakshmi, P., et al. (2019) *In Silico* and *in Vivo* Analysis to Identify the Antidiabetic Activity of Beta Sitosterol in Adipose Tissue of High Fat Diet and Sucrose Induced Type-2 Diabetic Experimental Rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **29**, 276-290. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1545815>
- [30] Jayaraman, S., Devarajan, N., Rajagopal, P., et al. (2021) 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. *Molecules*, **26**, Article 2101. <https://doi.org/10.3390/molecules26072101>
- [31] Ramu, R., Shirahatti, P.S., Nayakavadi, S., et al. (2016) The Effect of a Plant Extract Enriched in Stigmasterol and β -Sitosterol on Glycaemic Status and Glucose Metabolism in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Food & Function*, **7**, 3999-4011. <https://doi.org/10.1039/C6FO00343E>
- [32] Liu, X., He, Y., Li, F., et al. (2015) Caspase-3 Promotes Genetic Instability and Carcinogenesis. *Molecular Cell*, **58**, 284-296. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.003>
- [33] Yang, W.Z., Yang, J., Xue, L.P., et al. (2017) MiR-126 Overexpression Inhibits High Glucose-Induced Migration and Tube Formation of Rhesus Macaque Choroid-Retinal Endothelial Cells by Obstructing VEGFA and PIK3R2. *Journal of Diabetes and Its Complications*, **31**, 653-663. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.12.004>
- [34] Yang, J., Han, R., Chen, M., et al. (2018) Associations of Estrogen Receptor Alpha Gene Polymorphisms with Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hormone and Metabolic Research*, **50**, 469-477. <https://doi.org/10.1055/a-0620-8553>
- [35] 张文婷. 苓箭合剂改善小鼠糖尿病物质基础研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [36] Kung, C.P. and Murphy, M.E. (2016) The Role of the p53 Tumor Suppressor in Metabolism and Diabetes. *The Journal of Endocrinology*, **231**, R61-R75. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0324>
- [37] 杨文芝. miR-126 通过阻碍 VEGFA 和 PIK3R2 抑制高糖下 RF/6A 细胞的迁移和管腔形成[D]: [博士学位论文]. 昆明: 昆明医科大学, 2017.
- [38] Shirley, M. (2022) Faricimab: First Approval. *Drugs*, **82**, 825-830. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01713-3>
- [39] Capitão, M. and Soares, R. (2016) Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy. *Journal of Cellular Biochemistry*, **117**, 2443-2453. <https://doi.org/10.1002/jcb.25575>
- [40] (2022) Retraction: Cajanonic Acid A Regulates the Ratio of Th17/Treg via Inhibition of Expression of IL-6 and TGF- β in Insulin-Resistant HepG2 Cells. *Bioscience Reports*, **42**, BSR-2018-1716_RET. https://doi.org/10.1042/BSR-2018-1716_RET

- [41] 张洁, 王伟超, 刘素波, 等. 不同分期糖尿病视网膜病变泪液 IL-6 的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(14): 51-55.
- [42] Chen, L., Cui, Y., Li, B., et al. (2020) Advanced Glycation End Products Induce Immature Angiogenesis in *in Vivo* and *ex Vivo* Mouse Models. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, **318**, H519-H533. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00473.2019>
- [43] Zhang, Y., Kong, W. and Jiang, J. (2017) Prevention and Treatment of Cancer Targeting Chronic Inflammation: Research Progress, Potential Agents, Clinical Studies and Mechanisms. *Science China Life Sciences*, **60**, 601-616. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9047-4>
- [44] Hao, K., Kong, F.P., Gao, Y.Q., et al. (2015) Inactivation of Corticotropin-Releasing Hormone-Induced Insulinotropic Role by High-Altitude Hypoxia. *Diabetes*, **64**, 785-795. <https://doi.org/10.2337/db14-0500>
- [45] Li, Y., Sun, R., Zou, J., et al. (2019) Dual Roles of the AMP-Activated Protein Kinase Pathway in Angiogenesis. *Cells*, **8**, Article 752. <https://doi.org/10.3390/cells8070752>
- [46] Zeng, M., Shen, J., Liu, Y., et al. (2017) The HIF-1 Antagonist Acriflavine: Visualization in Retina and Suppression of Ocular Neovascularization. *Journal of Molecular Medicine*, **95**, 417-429. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1498-9>