芪明颗粒对糖尿病引起的视网膜病变的治疗作用研究

李杭珠[1]，方华[1]，董全胜[2]，邓茂芳[3*](1.杭州市富阳区第一人民医院，杭州 311400；2.解放军94981部队卫生队，江西 上饶 330300；3.杭州医学院，杭州 310053)

摘要：目的 基于网络药理学技术探讨芪明颗粒治疗糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy，DR)的作用机制并进行初步实验验证。**方法** 通过TCMID、TCMSP数据库及文献挖掘筛选芪明颗粒有效成分，利用Drugbank、SwissTargetPrediction及ChEMBL数据库预测筛选成分相关靶点，CTD、GeneCards、Pubmed数据库预测筛选DR相关靶点，重合靶点获取芪明颗粒有效成分治疗DR的相关靶点；采用Cytoscape软件构建靶点蛋白互作网络；分子对接验证核心靶点及对应成分并进行基因本体论及通路注释分析。此外，利用链脲佐菌素(streptozotocin，STZ)诱导建立糖尿病大鼠模型，随机分为模型组(等量生理盐水)和芪明颗粒低、中、高剂量组(3.75，7.5，15 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 芪明颗粒) 4组，同时选取6只正常SD大鼠设为空白组(等量生理盐水)，均连续灌胃干预4周。每周监测大鼠体质量、血糖浓度变化，并采用qRT-PCR检测视网膜组织中ALB、TNF-α、IL6、VEGFA、NOS3、MAPK3的mRNA水平。**结果** 芪明颗粒中共筛选出33个活性成分，包括黄芪苷、异鼠李素、葛根素、梓醇、水蛭素等，与治疗DR的59个靶点相关，其中包含TNF、IL6、VEGFA、TGF-β、NOS3、MAPK3、PTGS2等核心靶点。分子对接结果显示核心靶点与对应活性成分具有良好的结合力。针对靶点的基因本体论及KEGG通路富集分析表明这些靶点涉及了信号传导、糖尿病代谢、免疫系统、肿瘤等生物学过程，以及AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications、Type I diabetes mellitus、Type II diabetes mellitus、VEGF signaling、TGF-β signaling pathways等与DR发生发展直接密切相关的代谢或信号通路。动物实验验证结果显示芪明颗粒可有效提高糖尿病大鼠体质量，降低血糖浓度，同时可显著上调视网膜组织中ALB、VEGFA、NOS3、MAPK3 mRNA表达，下调TNF-α、IL6 mRNA表达，且呈剂量依赖性。**结论** 芪明颗粒可通过其有效成分上调ALB、VEGFA、NOS3、MAPK3 mRNA表达，下调TNF-α、IL6 mRNA表达发挥治疗DR的作用。

关键词：芪明颗粒；糖尿病视网膜病变；有效成分；靶点；通路

中图分类号：R285　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2022)11-1426-12

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.11.006

引用本文：李杭珠，方华，董全胜，等. 芪明颗粒对糖尿病引起的视网膜病变的治疗作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(11): 1426-1437.

Study on the Therapeutic Effect of Qiming Granule on Retinopathy Caused by Diabetes

LI Hangzhu[1], FANG Hua[1], DONG Quansheng[2], DENG Maofang[3*](*1.The First People's Hospital of Fuyang Hangzhou, Hangzhou 311400, China; 2.The Medicalcorp of Chinese People's Liberation Army 94981, Shangrao 330300, China; 3.Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the mechanism and conduct preliminary experimental validation of Qiming granules in the treatment of diabetic retinopathy(DR) using the network pharmacology. **METHODS** The effective components of Qiming granules were screened by TCMID and TCMSP databases and literature mining. The target targets of the components were predicted by Drugbank, SwissTargetPrediction and ChEMBL database. CTD, GeneCards and Pubmed databases were used to predict and screen the DR related targets, and the corresponding targets of Qiming granules for the treatment of DR were obtained by overlapping targets. Cytoscape software was used to construct the target protein interaction network. Core targets and corresponding components were verified by molecular docking, and gene ontology and pathway annotation were analyzed. In addition, streptozotocin(STZ) induction was used to establish a diabetic rat model, diabetic rats were randomly divided into four groups: model group(equal volume of saline), low-, medium- and high-dose group of Qiming granula(3.75, 7.5 and 15 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ Qiming granula), meanwhile, six normal SD rats were selected as the blank group(equal volume of normal saline), all of which were continuously gavaged with intervention for four weeks. The rats were monitored weekly for body weight and blood glucose concentration changes, and the mRNA levels of ALB, TNF-α, IL6, VEGFA, NOS3 and MAPK3 in the retinal tissues were determined by qRT-PCR. **RESULTS** A total of 33 active ingredients including astragaloside IV, isorhamnetin, puerarin, catalpol, hirudin, and 59 related targets for DR treatment including TNF, IL6, VEGFA, TGF-β, NOS3, MAPK3, PTGS2 of Qiming granule were obtained with the network pharmacology analysis. Molecular docking results demonstrated good binding score between hub targets and relative compounds. GO and KEGG pathway analysis revealed that these targets involved in the

作者简介：李杭珠，女，副主任医师　E-mail: 328779288@qq.com　*通信作者：邓茂芳，男，教授　E-mail: dmf945@163.com

multiple signaling pathways, diabetes metabolism, immune system, cancers, etc. What's more, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, Type I diabetes mellitus, Type II diabetes mellitus, VEGF signaling, TGF-β signaling pathways were directly related with the occurrence and development of DR. Animal validation results showed that Qiming granules effectively increased the body weight and decreased the blood glucose concentration of diabetic rats, while significantly upregulating ALB, VEGFA, NOS3 and MAPK3 mRNA expression and downregulating TNF-α and IL6 mRNA expression in retinal tissues, and in a dose-dependent manner. **CONCLUSION** Qiming granula could play a role in the treatment of DR by up regulating ALB, VEGFA, NOS3 and MAPK3 mRNA expression and down regulating TNF-α and IL6 mRNA expression through its active ingredients.
KEYWORDS: Qiming granule; diabetic retinopathy; active ingredients; targets; pathways

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy，DR)作为糖尿病的慢性和进行性微血管并发症，在全球糖尿病患者中的发病率为35%，是导致视力损伤和失明的主要原因之一[1]。糖尿病如何导致DR的发病机制十分复杂，但糖尿病病程、长期高血糖高血压和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)的过表达被公认为是主要的致病因素[2-3]。现有的治疗方法包括激光治疗、玻璃体切割和药物治疗(如玻璃体抗VEGF药物)，激光治疗一直是视力威胁性DR患者的标准治疗方法，但不能完全恢复患者的视力水平，玻璃体切除手术则一般适用于晚期DR患者[4-5]。而中医通过辨证论治，结合经验优势，在临床上对DR患者的治疗也有良好的疗效。

中医学者普遍认为DR是由消渴病迁延而生，属于中医“视瞻昏渺”“云雾移睛”“暴盲”“血灌瞳神”等范畴，瘀血、痰浊是其病理产物，反过来又加重病情[6]。芪明颗粒是根据我国著名中医眼科专家临床验方经现代实验学方法科学研制而成的复方中药，其药物组成为黄芪、葛根、地黄、枸杞子、决明子、茺蔚子、蒲黄、水蛭，具通络明目、益气生津、滋养肝肾之功效，临床治疗DR患者效果显著[7]。关于芪明颗粒治疗DR的临床疗效观察研究较多，但关于其治疗DR的具体作用机制却缺乏相关研究。

网络药理学通过整体性构建药物成分-靶点-通路相互作用网络，对于揭示药物的药效物质基础及作用机制具有重要意义。本研究以网络药理学为基础，探讨芪明颗粒治疗DR的有效成分作用靶点和治疗DR的潜在机制，并通过建立糖尿病模型大鼠进行初步验证，以期为芪明颗粒在DR治疗方面的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 芪明颗粒有效成分筛选 利用中药综合数据库(TCMID，http://183.129.215.33/tcmid/search/)和中药系统药理学分析平台数据库(TCMSP，http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php)对芪明颗粒中的中药组分相关化学成分进行搜索。对于搜索到的化学成分，以TCMSP推荐的药动学参数口服生物利用度OB≥30%，类药性DL≥0.18及药物半衰期HL≥8为筛选条件对芪明颗粒中的化学成分进行筛选，同时结合文献搜索芪明颗粒中各中药组分的药效成分，最终得到芪明颗粒中合适的活性成分。

1.1.2 芪明颗粒活性成分靶点及DR相关靶点的预测与筛选 利用Drugbank数据库(https://www.drugbank.ca/)、SwissTargetPrediction数据库(http://www.swisstargetprediction.ch/)以及ChEMBL数据库(https://www.ebi.ac.uk/chembl/，Activity Threshold>5)对从芪明颗粒中筛选得到的活性成分进行靶点预测与筛选，搜索选取物种的为“Homo sapiens”。以Diabetic Retinopathy为关键词在CTD(http://ctdbase.org/，Inference Score>0，Reference Count>0)，GeneCards(https://www.genecards.org/；Gifts>0，Relevance score>0)，Pubmed(https://www.ncbi. nlm. nih.gov/)对DR相关靶点进行检索和筛选。3个数据库中筛选得到的疾病相关靶点取交集后最终筛选确定为DR相关靶点。对于检索到的靶点，结合UniProt(https://www.uniprot.org/)进行命名规范化处理。

1.1.3 芪明颗粒有效成分-靶点网络构建 将筛选得到的芪明颗粒成分相关靶点与DR相关靶点合并取重合部分即为芪明颗粒有效成分治疗DR相关靶点。将芪明颗粒筛选所得活性成分及作用于DR相关靶点信息导入Cytoscape软件，构建芪明颗粒有效成分-靶点网络图，将芪明颗粒中的有效成分及与DR的相关靶点的互作关系进行可视化呈现。

1.1.4 芪明颗粒活性成分相关靶点蛋白互作网络

(protein protein interaction，PPI)构建　对于所筛选到的这些靶点，利用 STRING (https://string-db.org/cgi/input.pl)在线工具对靶点之间的 PPI 进行构建，2 个靶点间的 interaction score>0.4 被认为具有互作关联，并将靶点间的 PPI 信息导入 Cytoscape 软件，构建芪明颗粒 DR 相关靶点 PPI 网络图，并利用 Cytoscape 中的分析工具 NetworkAnalyzer 和 MCODE 对 PPI 网络进行进一步分析，以筛选出网络中的核心靶点。

1.1.5　分子对接验证　从 PDB 数据库(Protein Data Bank，https://www.rcsb.org/)下载核心靶点的 PDBID，从 PubChem 数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)下载核心靶点对应活性成分的 2D Structure，并以 SDF 格式保存。将靶点的 PDBID 和化合物的 2D Structure 上传至 SystemDock 网站进行分子对接分析。

1.1.6　芪明颗粒相关靶点生物学功能分析及成分-靶点-通路网络构建　对于筛选得到的芪明颗粒作用于 DR 的相关靶点，分别借助 DAVID 数据库(https://david.ncifcrf.gov/content.jsp?file=WS.html)和 Cytoscape 软件中的 ClueGO 工具对靶点进行基因本体论分析(gene ontology，GO)和 KEGG 通路富集分析，探讨这些靶点背后潜在的生物学功能，尤其是与 DR 相关的生物学过程及通路的联系。将芪明颗粒有效成分，作用于 DR 的相关靶点，靶点所富集的 KEGG 通路信息导入 Cytoscape 软件，构建芪明颗粒成分-靶点-通路网络图。

1.2　动物验证

1.2.1　动物　30 只 7 周龄，♂，正常 SD 大鼠，于上海斯莱克实验动物有限责任公司购买，动物生产许可证号：SCXK(沪)2017-0005；分笼饲养于浙江中医药大学动物实验中心，动物使用许可证号：SYXK(浙)2018-0012。温度 22~25 ℃，湿度 40%~70%，自由饮食、饮水，适应性饲养 1 周后开展实验。

1.2.2　糖尿病大鼠模型的建立与分组　适应性饲养 1 周结束后，随机选取 6 只大鼠给予普通饲料饲养设为空白组。其余 24 只大鼠给予高脂饲料饲养，利用 STZ 诱导建立糖尿病模型。STZ 于 0.1 mol·L^{-1} pH 4.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液充分溶解，过滤除菌，大鼠禁食 12 h 后称重，按 65 mg·mL^{-1} 剂量一次性腹腔注射 STZ，于 30 min 内注射完毕，72 h 后检测血糖浓度以决定是否追加剂量。空白组以同样方式注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。1 周后，尾静脉采血以测定血糖浓度，当血糖值>16.7 mmol·L^{-1}，则说明糖尿病模型建立成功。建模成功后随机分为模型组和芪明颗粒低、中、高剂量组 4 组，每组 6 只。芪明颗粒低、中、高剂量组分别给予 3.75，7.5，15 g·kg^{-1}·d^{-1} 芪明颗粒灌胃干预，空白组、模型组给予等量生理盐水干预，各组均连续灌胃 4 周。

1.2.3　大鼠体质量及血糖监测　每周定时监测并记录大鼠体质量及空腹血糖浓度波动情况，采用血糖试纸检测各组大鼠禁食 8 h 后的血糖浓度。

1.2.4　qRT-PCR 检测 mRNA 水平　各组大鼠 4 周称重完毕后，提取大鼠视网膜组织。腹腔注射 10% 水合氯醛行麻醉处理，表面麻醉以滴加盐酸奥布卡因滴眼液进行处理，待麻醉生效摘除眼球，剪去眼球周围组织，并分离视网膜组织，剪断视神经，分离的视网膜剪碎后置于冻存管以便进行 ALB、TNF-α、IL6、VEGFA、NOS3、MAPK3 mRNA 水平的检测。采用 Trizol 试剂盒提取总 RNA，逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。设计引物，如表 1 所示，特异性扩增 ALB、TNF-α、IL6、VEGFA、NOS3、MAPK3 行 qRT-PCR 反应，以 GAPDH 为内参。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 mRNA 表达量。

表 1　ALB、TNF-α、IL6、VEGFA、NOS3、MAPK3 的引物序列

Tab. 1　Primer sequences for ALB, TNF-α, IL6, VEGFA, NOS3, MAPK3

基因	引物序列	大小/bp
ALB	F：5'-CCACACTGGAGAAGTGCTGT-3' R：5'-TCGAACCAGAATGGCGTTTT-3'	167
TNF-α	F：5'-TTCTCATTCCTGCTTGTGGCA-3' R：5'-CTCCACTTGGTGGTTTGTGAG-3'	153
IL6	F：5'-TGATGGATGCTACCAAACTGG-3' R：5'-GTGACTCCAGCTTATCTCTTGG-3'	196
VEGFA	F：5'-GACCAAAGAAAGACAGAACAAAGCC-3' R：5'-GGCTCACAGTGAACGCTCC-3'	115
NOS3	F：5'-CTCCAGCACCGGAGCCTA-3' R：5'-TACAGGGCCCATCCTGCT-3'	183
MAPK3	F：5'-TACGATCCGACAGATGAGCCAG-3' R：5'-GGGTGTCTGTTCTTGTTAGGGG-3'	156
β-actin	F：5'-AACCCTTAAGAGGGATGCTGC-3' R：5'-CCAATACGGCCAAATCCGTT-3'	130

1.2.5　统计学分析　采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示多组间用 One-way-ANOAY 单因素方差分析，组间比较采用 SNK 分析，方差不齐者采用 Kruskal-Wallis H 检验，P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芪明颗粒有效成分的筛选

利用 TCMID、TCMSP 和数据库搜索芪明颗粒中 8 味中药所含的化学成分，并结合药动学参数和相关文献参考，从芪明颗粒中共筛选得到 33 个有效成分，8 味中药所含的有效成分存在部分重合。芪明颗粒中有效成分的相关信息见表 2。

2.2 芪明颗粒有效成分治疗 DR 相关靶点的筛选

对于从芪明颗粒中筛选得到的 33 个活性成分，预测筛选后共得到761个芪明颗粒成分相关靶点，见图 1a。同时，又通过 CTD，GeneCards 以及 Pubmed 数据库共得到 206 个 DR 相关靶点，见图 1b。最后，将芪明颗粒成分相关的 761 个靶点与 DR 相关的 206 个靶点绘制韦恩图，得到 59 个重合靶点，即为芪明颗粒有效成分治疗 DR 的相关靶点，见图 1c。芪明颗粒有效成分治疗 DR 的相关靶点信息见表 3。

2.3 芪明颗粒治疗 DR 有效成分-靶点网络分析

芪明颗粒有效成分和作用于 DR 相关靶点的网络图见图 2。整个成分-靶点网络图中共有 98 个节点和 298 条边。网络图中，每个有效成分可以同时作用于多个靶点，同时每个靶点又可以受多个有效成分调控，形成多条互作关系边，从而构成互相作用互相调控的芪明颗粒成分-靶点网络图。其中，黄芪中的 11 个有效成分共作用于 43 个靶点，共有 86 个条互作边。葛根中的 6 个有效成分共作用于 28 个靶点形成 45 条互作边，大豆苷元作用于 18 个靶点。地黄中的 2 个有效成分梓醇和地黄新苷各作用 2 个靶点。枸杞子中的 4 个有效成分共作用于 38 个靶点，形成 43 条边。决明子中的 6 个成分作用于网络图中的 17 个靶点，共有 36 条边，其中 Degree 最大的为大黄素(Degree=15)。茺蔚子中的 2 个有效成分刺槐素和益母草宁共作用于 3 个靶点。蒲黄中的 5 个有效成分共作用于 39 个靶点形成 70 条互作边。

2.4 芪明颗粒有效成分相关靶点 PPI 网络分析

为了探讨 59 个靶点之间的相互作用关系，利用 STRING 在线工具和 Cytoscape 软件构建了靶点 PPI 网络图，见图 3a。PPI 网络图中共包含 59 个节点和 658 条边，各靶点之间蛋白互作关系密切。其中 NetworkAnalyzer 分析所得 Degree≥40 的靶点有 6 个，分别为 ALB(Degree=50，Closeness Centrality=0.879)，TNF(Degree=46，Closeness

表 2 芪明颗粒主要活性成分

Tab. 2 Mainactive ingredients in Qiming granule

成分	中文名称	OB	DL	HL
黄芪[*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao]				
mairin	丁子香萜	55.38	0.78	8.87
jaranol	熊竹素	50.83	0.29	15.50
isorhamnetin	异鼠李素	49.60	0.31	14.34
3,9-di-O-methylnissolin	黄芪异黄烷苷	53.74	0.48	9.00
astrapterocarpan	黄芪紫檀烷苷	64.26	0.42	8.49
formononetin	芒柄花黄素	69.67	0.21	17.04
calycosin	毛蕊异黄酮	47.75	0.24	17.10
kaempferol	山柰酚	41.88	0.24	14.74
folic acid	叶酸	68.96	0.71	24.81
quercetin	槲皮素	46.43	0.28	14.40
astragaloside IV	黄芪苷	–	–	–
葛根[*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi]				
formononetin	芒柄花黄素	69.67	0.21	17.04
beta-sitosterol	谷固醇	36.91	0.75	5.36
3’-Methoxydaidzein	3’-甲氧基大豆苷元	48.57	0.24	17.04
Daidzein-4,7-diglucoside	大豆黄酮 4,7 醇二葡萄糖苷	47.27	0.67	16.18
puerarin	葛根素	–	–	–
daidzein	大豆苷元	–	–	–
地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)				
catalpol	梓醇	–	–	–
rehmaglutosides	地黄新苷	–	–	–
枸杞子(*Lycium barbarum* L.)				
glycitein	黄豆黄素	50.48	0.24	16.32
quercetin	槲皮素	46.43	0.28	14.4
cryptoxanthin	隐黄素	–	–	–
betaine	甜菜碱	–	–	–
决明子(*Cassia obtusifolia* L.)				
rhein	大黄酸	47.07	0.28	32.12
aloe-emodin	芦荟大黄素	83.38	0.24	31.49
Rubrofusarin-6-beta-gentiobioside	溴褐素 6-外生物苷	40.12	0.67	14.76
quinizarin	醌茜	47.34	0.19	33.69
emodin	大黄素	–	–	–
chrysophanol	大黄酚	–	–	–
茺蔚子(*Leonurus japonicus* Houtt.)				
acacetin	刺槐素	34.97	0.24	17.25
leonurinine	益母草宁	106.15	0.07	13.51
蒲黄(*Typha angustifolia* L.)				
naringenin	柚皮素	42.36	0.21	16.83
isorhamnetin	异鼠李素	49.60	0.31	14.34
kaempferol	山柰酚	41.88	0.24	14.74
quercetin	槲皮素	46.43	0.28	14.40
beta-sitosterol	谷固醇	36.91	0.75	5.36
水蛭(*Hirudo nipponica* Whitman)				
genipingentiobioside	京尼平龙胆双糖苷	45.58	0.83	10.25
heparin	肝素	–	–	–
hirudin	水蛭素	–	–	–

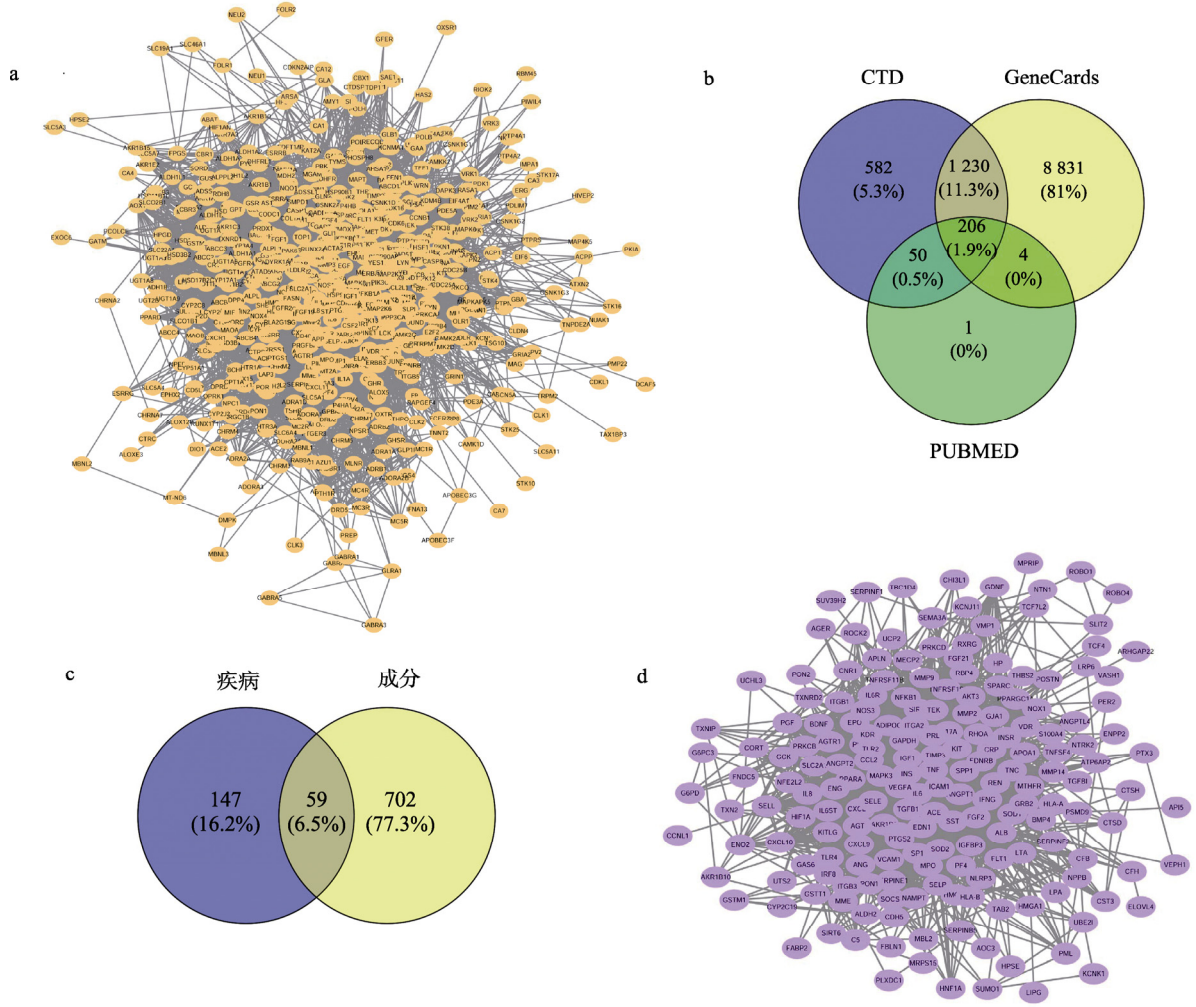

图 1 芪明颗粒有效成分 DR 相关靶点的筛选

a–芪明颗粒有效成分相关靶点；b–糖尿病视网膜病变相关靶点；c–芪明颗粒有效成分作用于 DR 相关靶点；d–糖尿病视网膜病变相关靶点蛋白互作网络图。

Fig. 1 Target screening of the ingredients in Qiming granule for DR treatment

a–ingredients related targets; b–DR related targets; c–ingredients related targets for DR treatment; d–diagram of interaction network of target proteins associated with diabetic retinopathy.

Centrality=0.829)，IL6(Degree=45，Closeness Centrality=0.817)，VEGFA(Degree=44，Closeness Centrality=806)，NOS3(Degree=40，Closeness Centrality=0.763)，MAPK3(Degree=40，Closeness Centrality=0.753)。表明该 6 个靶点在 PPI 网络图中占有核心地位，与其他靶点联系紧密。随后利用 MCODE 分析工具对 PPI 网络图中可能存在的显著模块进行筛选。默认的筛选条件为 Degree cutoff=2，Node score cutoff=0.2，K-core=2，max. Depth=100。筛选得到 1 个显著性 PPI 子模块，MCODE score 为 26.93，如图 3b 所示，该模块中包括 ALB、TNF、IL6、VEGFA、NOS3、MAPK3 这 6 个核心靶点。

2.5 靶点-活性成分分子对接验证

通过数据库预测筛选得到的核心靶点和与之对应的活性成分进行分子对接，二维对接结果见图 4。SystemDock 以对接分数(Score)评价靶点与配体间的交互作用程度，分数一般在 0~10，对应的结合程度由弱至强。当对接分数>5 时，认为蛋白与配体之间结合活性较好；当对接分数>7 时，认为蛋白与配体之间具有强烈的结合活性。分子对接验证所选取的主要靶点包括 ALB、TNF、IL6、VEGFA、NOS3，结果显示，靶点对应的化合物配体与靶点均具有良好的结合活性。其中，ALB 与丁子香萜之间的对接分数为 7.81>7，TNF 与山柰酚、IL6 与槲皮素、VEGFA 与黄芪苷之间的对接分数均>6，且对接分数也均大于靶点对应的阳性对照分数。

2.6 芪明颗粒有效成分 DR 相关靶点功能注释分析

对芪明颗粒有效成分 DR 相关的 59 个靶点进

表 3 芪明颗粒有效成分作用于 DR 相关靶点信息

Tab. 3 Targets of the ingredients in Qiming granule related with DR

序号	基因名	蛋白名	序号	基因名	蛋白名
1	*VEGFA*	Vascular endothelial growth factor A	31	*KDR*	Vascular endothelial growth factor receptor 2
2	*PON1*	Serum paraoxonase/arylesterase 1	32	*VDR*	Vitamin D3 receptor
3	*TNF*	Tumor necrosis factor	33	*SOD1*	Superoxide dismutase[Cu-Zn]
4	*INSR*	Insulin receptor	34	*LPA*	Lysophosphatidic acid
5	*CCL2*	C-C motif chemokine 2	35	*SELP*	Selenoprotein P
6	*ALB*	Serum albumin	36	*HIF1A*	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
7	*AKR1B1*	Aldose reductase	37	*PRKCD*	Protein kinase C delta type
8	*ICAM1*	Intercellular adhesion molecule 1	38	*SIRT1*	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1
9	*PPARG*	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	39	*GSTM1*	Glutathione S-transferase Mu 1
10	*SOD2*	Superoxide dismutase[Mn]	40	*CXCL10*	C-X-C motif chemokine 10
11	*IL6*	Interleukin-6	41	*MPO*	Myeloperoxidase
12	*SERPINE1*	Plasminogen activator inhibitor 1	42	*PTGS2*	Prostaglandin G/H synthase 2
13	*NOS3*	Nitric oxide synthase	43	*MMP2*	72 kDa type IV collagenase
14	*CRP*	C-reactive protein	44	*SPP1*	Osteopontin
15	*IL10*	Interleukin-10	45	*CTSD*	Cathepsin D
16	*VCAM1*	Vascular cell adhesion protein 1	46	*NFKB1*	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
17	*AGTR1*	Type-1 angiotensin II receptor	47	*GJA1*	Gap junction alpha-1 protein
18	*HLA-B*	HLA class I histocompatibility antigen	48	*ALDH2*	Aldehyde dehydrogenase
19	*IGFBP3*	Insulin-like growth factor-binding protein 3	49	*PF4*	Platelet factor 4
20	*SELE*	E-selectin	50	*NFE2L2*	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
21	*TGFB1*	Transforming growth factor beta-1 proprotein	51	*CYP2C19*	Cytochrome P450 2C19
22	*FGF2*	Fibroblast growth factor 2	52	*AKR1B10*	Aldo-keto reductase family 1 member B10
23	*MMP9*	Matrix metalloproteinase-9	53	*HPSE*	Heparanase
24	*PPARA*	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	54	*MAPK3*	Mitogen-activated protein kinase 3
25	*CXCL8*	Interleukin-8	55	*EDNRB*	Endothelin receptor type B
26	*FLT1*	Vascular endothelial growth factor receptor 1	56	*RHOA*	Transforming protein RhoA
27	*HLA-A*	HLA class I histocompatibility antigen	57	*SP1*	Transcription factor Sp1
28	*IFNG*	Interferon gamma	58	*MME*	Neprilysin
29	*PRKCB*	Protein kinase C beta type	59	*ROCK2*	Rho-associated protein kinase 2
30	*SLC2A1*	Solute carrier family 2 member 1			

行了 GO 富集分析，富集的前 15 个条目结果见图 5。GO 条目包含 3 个子类，分别为生物过程、细胞组分和分子功能。在生物学过程中，这些靶点主要富集在 response to wounding、regulation of cell migration、cell death、cell motion、locomotion、apoptosis、multicellular organismal process 等多种与细胞生长增殖凋亡的生物学过程紧密相关的条目，见图 5a。这些靶点主要富集在 extracellular space、extracellular region part、membrane raft、platelet alpha granule、vesicle lumen、plasmamembrane part 等细胞组分有关的条目上，见图 5b。在分子功能条目中，这些靶点主要富集在 cytokine activity、antioxidant activity、lipid binding、heparin binding、enzyme binding，growth factor binding 等条目上，见图 5c。GO 中每个条目中所富集的靶点数目见图 5d。

2.7 芪明颗粒有效成分 DR 相关靶点通路注释分析

KEGG 通路分析结果显示，芪明颗粒作用于 DR 的 59 个可能靶点共涉及 42 条相关通路。其中这些靶点主要富集在 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications、Type I diabetes mellitus、Type II diabetes mellitus、TGF-β signaling、VEGF signaling、Toll-like receptor signaling、NOD-like receptor signaling、T cell receptor signaling 等多条与 DR 直接或间接联系的通路上，形成了紧密关联的通路网络图，且每条通路均有多个靶点富

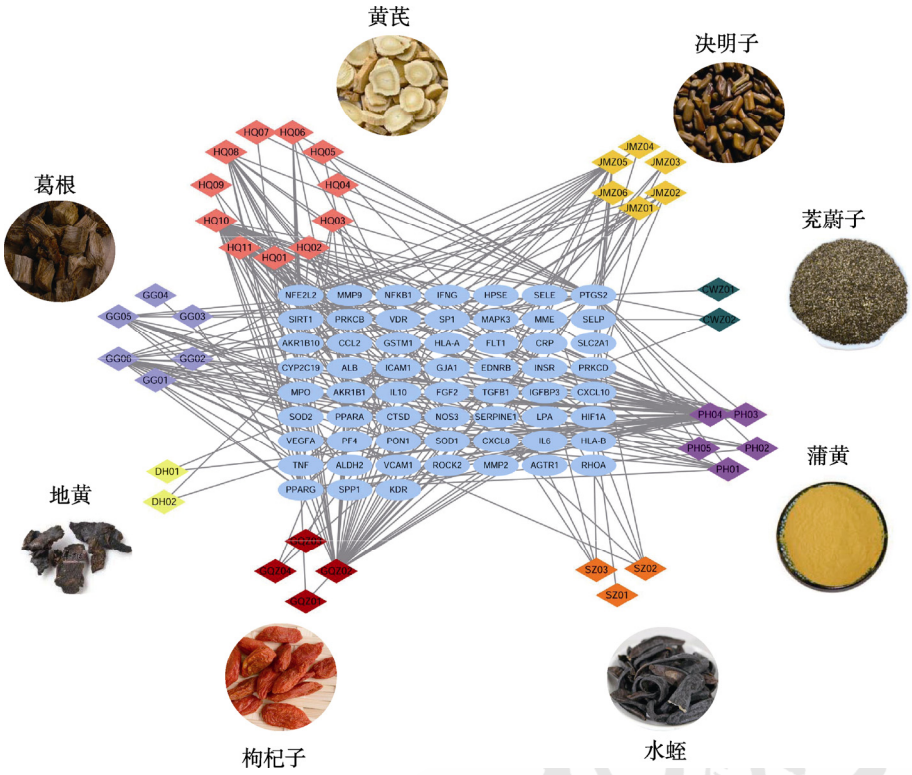

图 2　芪明颗粒有效成分-靶点网络图

Fig. 2　Qiming granule ingredients-related targets network

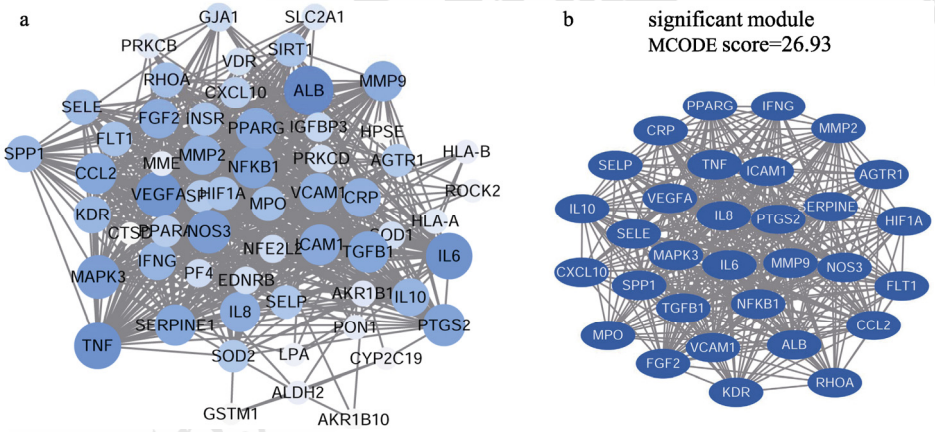

图 3　芪明颗粒相关靶点蛋白互作网络图

a–芪明颗粒相关靶点蛋白互作网络图；b–MCODE 分析筛选网络图显著性蛋白互作网络子模块。

Fig. 3　Protein-protein interaction network of Qiming granule

a–protein interaction network diagram of a Qiming granules related targets; b–MCODE was used to analyze and screen salient protein interaction network submodules.

集，见图 6。芪明颗粒有效成分 DR 相关靶点功能及通路注释结果表明这些靶点涉及了信号传导、糖尿病代谢、细胞周期、免疫系统、肿瘤等过程，且 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications、Type I diabetes mellitus、Type II diabetes mellitus I、VEGF signaling、TGF-β signaling pathways 等代谢或信号通路与 DR 密切相关，表明这些靶点直接影响和调控着 DR 的发生发展。

2.8　芪明颗粒对糖尿病大鼠体质量及血糖浓度的影响

每周定时监测记录各组大鼠体质量及血糖浓度的波动情况，见图 7。与空白组相比，模型组体质量呈降低趋势，血糖浓度呈升高趋势，差异具有统计学意义(P<0.01)。与模型组相比，芪明颗粒干预 2 周后，中、高剂量组大鼠体质量明显上升(P<0.01)，而低剂量组大鼠 4 周后体质量显著升高

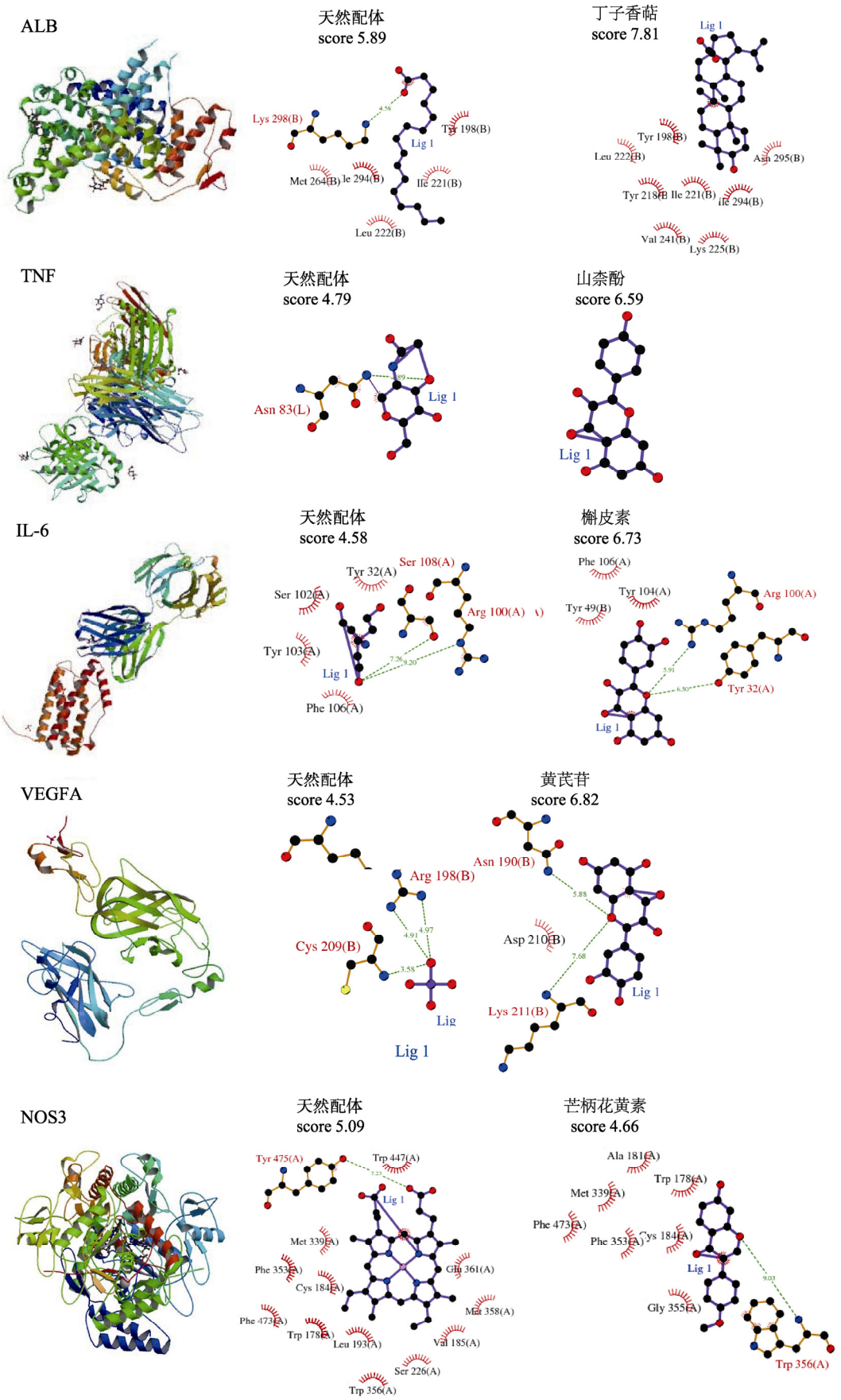

图 4 芪明颗粒靶点-活性成分分子对接验证

Fig. 4 Molecular docking of hub targets and relative active ingredients of Qiming granule

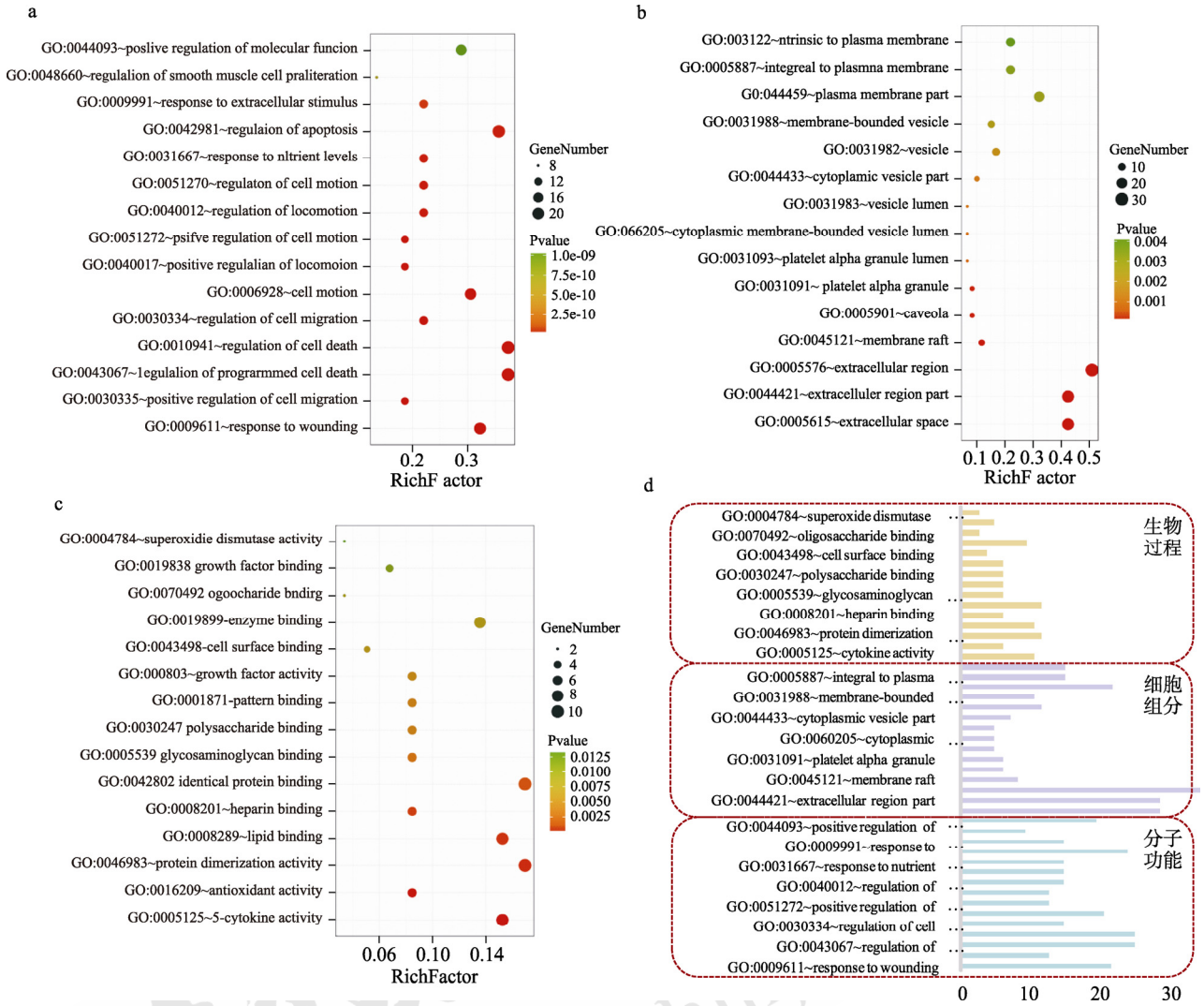

图 5 芪明颗粒活性成分相关靶点功能及通路注释分析

a–生物过程；b–细胞组分；c–生物学功能；d–各 GO 条目富集的靶点数目。

Fig. 5 Gene ontology enrichment analysis of Qiming granule targets

a–biological process; b–cellular component; c–molecular function; d–number of targets enriched in each GO entry.

(P<0.05)，血糖浓度无显著变化；芪明颗粒高剂量组 1 周起血糖浓度显著降低(P<0.01)，芪明颗粒中剂量组血糖浓度仅 1，4 周后有显著差异(P<0.01，P<0.05)。

2.9 芪明颗粒对视网膜组织中 ALB、TNF-α、IL-6、VEGFA、NOS3、MAPK3 mRNA 水平的影响

利用 qRT-PCR 检测视网膜组织中 ALB、TNF-α、IL-6、VEGFA、NOS3、MAPK3 的 mRNA 水平，见图 8。与空白组相比，模型组 ALB、VEGFA、NOS3、MAPK3 mRNA 表达显著降低(P<0.05 或 P<0.01)，TNF-α、IL-6 mRNA 表达显著增加(P<0.01)。与模型组相比，芪明颗粒高剂量组可显著提高 ALB、VEGFA、NOS3、MAPK3 mRNA 表达(P<0.05 或 P<0.01)，降低 TNF-α、IL-6 mRNA 表达(P<0.05)，芪明颗粒中剂量组除 NOS3 mRNA 表达无显著差异，其余 mRNA 表达水平均显著改善(P<0.05)，芪明颗粒低剂量组仅可显著升高 VEGFA mRNA 表达水平(P<0.05)。

3 讨论

DR 是受糖尿病进程、遗传等多种因素影响的进行性疾病，多种信号通路及相关靶蛋白参与病程的发生发展，形成复杂的调控网，影响 DR 的病理表征[8]。本研究运用网络药理学的方法，筛选出芪明颗粒中的活性成分和治疗 DR 的潜在靶点，并建立了芪明颗粒成分-靶点-通路网络图，从系统整体性的视角研究芪明颗粒活性成分与 DR 之间的关联，为阐述芪明颗粒治疗 DR 的作用机制提供参考。

芪明颗粒气微、味甘、微苦，由黄芪、葛根、地黄、决明子、枸杞子、茺蔚子、蒲黄及水蛭 8 味中药组成。黄芪益气固表，通条血脉，是为君

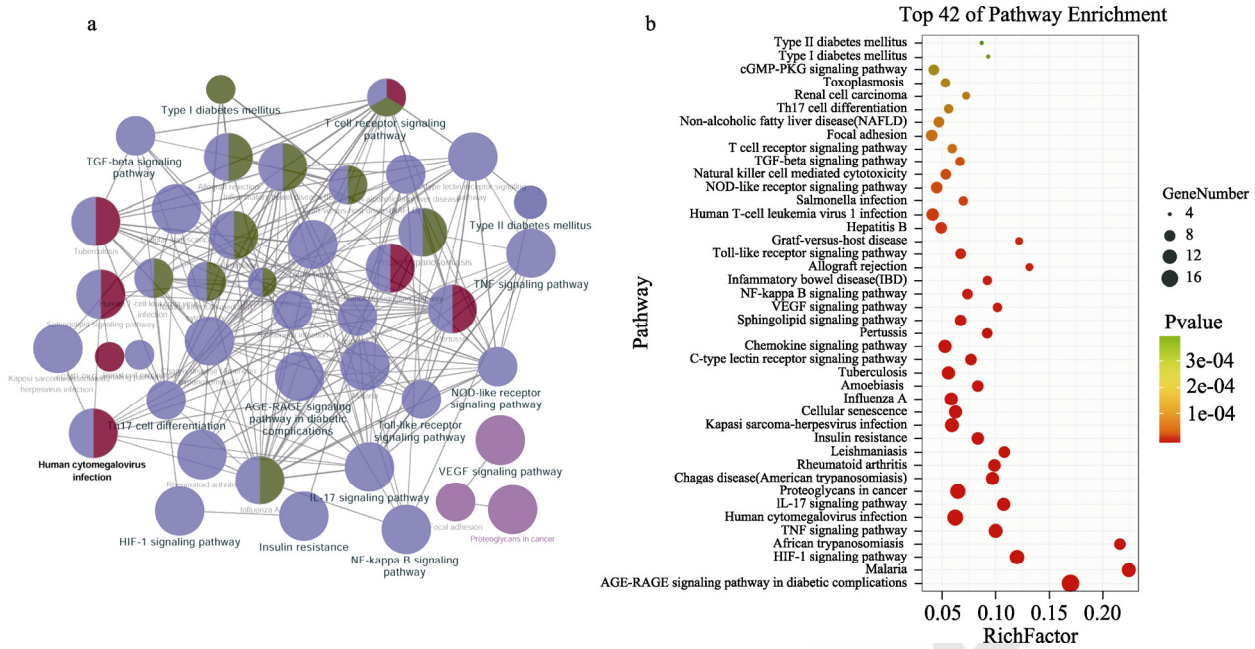

图 6 芪明颗粒相关靶点富集的 KEGG 通路

a–KEGG 通路网络图；b–KEGG 通路。

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis of Qiming granule targets

a–KEGG pathways network; b–KEGG pathways.

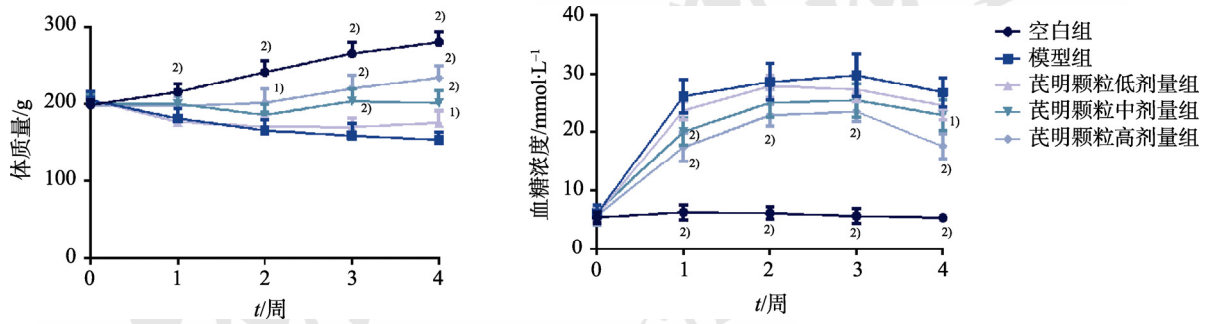

图 7 芪明颗粒对糖尿病大鼠体质量及血糖浓度的影响($\bar{x}\pm s$，n=6)

与模型组相比，$^{1)}P<0.05$，$^{2)}P<0.01$。

Fig. 7 Effects of Qiming granule on body weight and blood glucose concentration in diabetic rats($\bar{x}\pm s$, n=6)

Compared with the model group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$.

药；枸杞子和决明子滋肝补肾、益精明目，是为臣药；葛根益气生津、退热解肌；地黄补肝益肾、益气养阴；茺蔚子、蒲黄及水蛭活血化瘀、利水消肿、滋肝补肾，共为使药[9]。多味中药君臣使合理配伍，共奏通络明目、益气生津、滋肝养肾之效。芪明颗粒主要用于非增殖期 DR，可与眼部激光治疗或西药联合，是治疗 DR 的新型中药，临床疗效显著[10]。

运用网络药理学共从芪明颗粒中的 8 味中药材中筛选出了 33 个活性成分，如黄芪中的黄芪苷，异鼠李素，葛根中的葛根素，地黄中的梓醇，水蛭中的水蛭素等。筛选的阈值中，药物半衰期 HL≥8 属于慢速消除药物，表明要体内停留的时间相对比较长，发挥药效的作用也较久，因此本研究选择的活性化合物 HL≥8。同时还筛选出了 59 个这些活性成分作用于 DR 的靶点，主要的核心靶点有 *ALB*、*TNF*、*IL-6*、*VEGFA*、*NOS3*、*MAPK3*、*PTGS2*、*PRKCD*、*IFNG*、*TGFB1* 等。这些靶点涉及了信号传导、糖尿病代谢、细胞周期、免疫系统等过程，其中的 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications、Type I diabetes mellitus、Type II diabetes mellitus I、VEGF signaling、TGF-β signaling pathways 等代谢或信号通路直接与 DR 的发生发展密切相关，也证实了芪明颗粒能够有效治疗 DR 的作用。

VEGF 信号通路以及靶蛋白 VEGF、VEGFA 等可通过增加血管通透性，促进新生血管形成，诱导黄斑水肿等作用，在 DR 的发生发展中发挥重

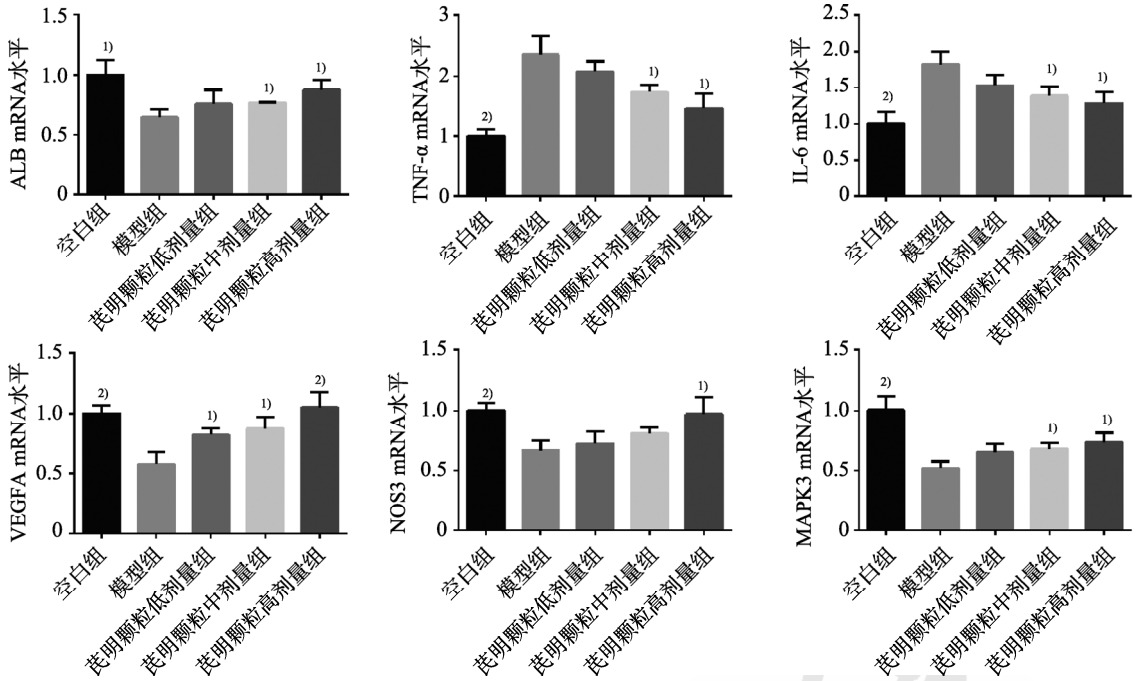

图 8 芪明颗粒对视网膜组织中 ALB、TNF-α、IL-6、VEGFA、NOS3、MAPK3 mRNA 水平的影响($\bar{x}\pm s$，n=3)
与模型组相比，[1)]P<0.05，[2)]P<0.01。

Fig. 8 Effects of Qiming granule on mRNA levels of ALB, TNF-α, IL-6, VEGFA, NOS3, and MAPK3 in retinal tissues($\bar{x}\pm s$, n=3)
Compared with the model group, [1)]P<0.05, [2)]P<0.01.

要作用[2,11]。临床研究发现芪明颗粒联合全视网膜激光光凝术治疗后，与对照组全视网膜激光光凝术治疗相比较疗效显著，VEGF 以及炎症因子 IL-6、TNF-α 等含量明显降低(P<0.05)，血脂水平也得到明显改善[12-13]。TGF-β 信号通路是视网膜周细胞的视网膜血管发育过程中的分化所必需的，而 TGF-β 在新生小鼠的视网膜微环境信号的缺失会导致大量微动脉瘤的形成，视网膜出血，与人类非增殖性和增殖性 DR 表型的变化具有相似性[14]。且 TGF-β 介导的 BIGH3 的表达可诱导人视网膜周细胞凋亡和炎症反应，可能是 DR 中视网膜周细胞脱落的新机制[15]。在 DR 病程中，许多炎症因子也参与其中，相关研究证明 DR 中炎症因子如 TNF、IL-6、ICAM-1 的表达均上调，而 VEGF 和糖基化终产物还可引起 DR 中的炎症改变[16]。网络药理学研究发现芪明颗粒可以有效作用于糖尿病代谢通路，VEGF 和 TGF-β 信号通路以及相关靶点 TNF、IL-6、VEGFA、TGF-β、NOS3、MAPK3、PTGS2 等，揭示了芪明颗粒可能是通过调控糖尿病代谢通路，VEGF 和 TGF-β 等信号通路及相关靶点发挥治疗 DR 的疗效。

为验证网络药理学的分析结果，本研究通过建立糖尿病模型大鼠，初步检测芪明颗粒是否可通过调控 ALB、TNF-α、IL-6、VEGFA、NOS3、MAPK3 等靶点发挥治疗 DR 的作用。结果显示芪明颗粒可有效提高糖尿病大鼠体质量，降低血糖浓度。qRT-PCR 检测视网膜组织中 ALB、TNF-α、IL-6、VEGFA、NOS3、MAPK3 的 mRNA 水平，结果显示，芪明颗粒可显著上调视网膜组织中 ALB、VEGFA、NOS3、MAPK3 mRNA 表达，下调 TNF-α、IL-6 mRNA 表达，且呈剂量依赖性，进一步提示芪明颗粒可通过调控糖尿病代谢通路 VEGF 和 TGF-β 等信号通路发挥治疗的作用。

本研究运用网络药理学的方法，从芪明颗粒中筛选出了 33 个活性成分以及治疗 DR 的 59 个作用靶点，且这些靶点涉及了 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications、Type I diabetes mellitus、Type II diabetes mellitus、VEGF signaling、TGF-β signaling pathways 等与 DR 密切相关的代谢或信号通路。进一步的动物实验证实芪明颗粒可通过相关靶点表达发挥治疗 DR 的作用。

REFERENCES

[1] YAU J W, ROGERS S L, KAWASAKI R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy[J]. Diabetes Care, 2012, 35(3): 556-564.

[2] WANG J H, LING D, TU L L, et al. Gene therapy for diabetic

retinopathy: Are we ready to make the leap from bench to bedside?[J]. Pharmacol Ther, 2017(173): 1-18.

[3] FANG D F, WANG X Q, WANG C J, et al. Study on the effect of simvastatin combined with ezetimibe on glycolipid and level of VEGF, IL-1β, CRP of type 2 diabetes mellitus with atherosclerosis rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(1): 49-52.

[4] BOSCIA F. Current approaches to the management of diabetic retinopathy and diabetic macular oedema[J]. Drugs, 2010, 70(16): 2171-2200.

[5] SIMÓ R, SUNDSTROM J M, ANTONETTI D A. Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: The role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. Diabetes Care, 2014, 37(4): 893-899.

[6] ZHAO Y Q, LI Q S, XIANG M H, et al. Distribution of traditional Chinese medicine syndromes of diabetic retinopathy and correlation between symptoms[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(14): 2796-2801.

[7] ZHAO Z H, FAN F, MA Q M, et al. Improvement effects of the application of Qiming granule on dry eye after eye surgery for patients with T2DM[J]. Genom Appl Biol(基因组学与应用生物学), 2018, 37(1): 80-86.

[8] CUNHA-VAZ J, RIBEIRO L, LOBO C. Phenotypes and biomarkers of diabetic retinopathy[J]. Prog Retin Eye Res, 2014(41): 90-111.

[9] ZHAO Z H, LI K J, ZHAO X B, et al. Efficacy observation on qiming granules in the treatment of patients with NPDR choroid circulation and dry eye[J]. World Chin Med(世界中医药), 2018, 13(11): 2762-2765, 2769.

[10] 张海杰. 新型治疗糖尿病视网膜病变中药芪明颗粒的研究与应用[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(7): 1030-1032.

[11] ZHOU J, ZHOU H Y, NI M W, et al. Intravitreal injection of triamcinolone acetonide versus ranibizumab in the treatment of diabetic macular edema: A meta-analysis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(5): 719-724.

[12] MU L, CAO X W, WU Y K. Effects of Qiming granules combined with PRP on serum inflammatory factors and neovascularization in patients with diabetic retinopathy[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2018, 33(8): 3721-3724.

[13] PANG F. Research of clinical curative effect and the effect on blood fat and serum factor of Qiming granules combine endolaser retinal photocoagulation in treating diabetic retinopathy[J]. Clin J Tradit Chin Med(中医药临床杂志), 2017, 29(1): 121-124.

[14] BRAUNGER B M, LEIMBECK S V, SCHLECHT A, et al. Deletion of ocular transforming growth factor β signaling mimics essential characteristics of diabetic retinopathy[J]. Am J Pathol, 2015, 185(6): 1749-1768.

[15] BETTS-OBREGON B S, MONDRAGON A A, MENDIOLA A S, et al. TGFβ induces BIGH3 expression and human retinal pericyte apoptosis: A novel pathway of diabetic retinopathy[J]. Eye, 2016, 30(12): 1639-1647.

[16] RÜBSAM A, SONIA P, PATRICE F. Role of inflammation in diabetic retinopathy[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 942. Doi: 10.3390/ijms19040942.

收稿日期：2021-05-25
(本文责编：沈倩)

http://www.chinjmap.com