

·数字中医药·

本文引用: 郭心仪, 黄栢榕, 郭永红, 陈向东, 付美林. 利用 LC-MS/MS 和网络药理学探讨丹黄明目汤对糖尿病视网膜病变的潜在治疗作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(12): 2257-2266.

利用 LC-MS/MS 和网络药理学探讨丹黄明目汤对糖尿病视网膜病变的潜在治疗作用

郭心仪¹, 黄栢榕¹, 郭永红³, 陈向东^{1,2*}, 付美林^{1,2*}

1. 湖南中医药大学第一中医临床学院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208;
3. 衡阳市中医医院, 湖南 衡阳 421000

[摘要] **目的** 探讨丹黄明目汤对糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的潜在治疗作用。**方法** 采用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术检测丹黄明目汤入血成分。采用网络药理学分析丹黄明目汤的药效成分及其治疗 DR 的关键通路及潜在靶点。将 60 只大鼠随机分为未造模组(24 只)和造模组(36 只)。将 24 只未造模组大鼠分为空白组(等体积生理盐水)、空白给药组(等体积生理盐水+1.25 g/kg 丹黄明目汤浸膏), 每组 12 只。造模组腹腔一次性注射 40 mg/kg 链脲佐菌素(streptozocin, STZ)联合高脂饲养建立 DR 模型后, 分为模型组(40 mg/kg STZ)、阳性对照组(40 mg/kg STZ+羧苯磺酸钙胶囊 0.09 g/kg)、丹黄明目汤样本组(40 mg/kg STZ+1.25 g/kg 丹黄明目汤浸膏), 每组 12 只, 连续干预 4 周。生化试剂盒检测超氧化物歧化酶(superoxidodismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性; ELISA 检测大鼠血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-6 和血清炎症因子 IL-1 β 的水平; Western blot 检测大鼠视网膜组织 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)和细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)的蛋白表达水平。**结果** LC-MS/MS 结果表明, 丹黄明目汤中共检测到 347 个入血化合物, 其中前 7 个含量较高的入血代谢物分别为 1,7-bis(4-hydroxyphenyl)heptan-3-one、5-hydroxy-2,2-dimethyl-10-(2-methylbut-3-en-2-yl)pyrano[3,2-g]chromen-8-one、5,7,4'-Trimethoxyflavone、Cillin、Deacetylto mentoside I、canescin A、Ventiloquinone I。网络药理学结果显示, 丹黄明目汤可能通过调节丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、紧密连接和趋化因子信号通路等关键生物通路的多靶点干预 DR。与空白组相比, 模型组 SOD、CAT 水平及 p38 MAPK、ERK1/2 总蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$), TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平及 p38 MAPK、ERK1/2 磷酸化水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组相比, 阳性对照组、空白给药组和丹黄明目汤样本组的 SOD、CAT、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平及 p38 MAPK、ERK1/2 磷酸化水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 丹黄明目汤可通过调节 MAPK 信号通路抑制 p38 MAPK 等因子的表达和活性, 促进 SOD 和 CAT 的表达, 从而减轻 DR 的炎症反应、氧化应激、血管损伤, 最终起到治疗 DR 的作用。

[关键词] 糖尿病视网膜病变; 丹黄明目汤; 液相色谱-串联质谱; 抗炎; 抗氧化; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.12.018

Exploring the potential therapeutic effects of Danhuang Mingmu Decoction on diabetic retinopathy through LC-MS/MS and network pharmacology

GUO Xinyi¹, HUANG Longrong¹, GUO Yonghong³, CHEN Xiangdong^{1,2*}, FU Meilin^{1,2*}

[收稿日期] 2024-09-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82374525); 湖南省中医药科研计划项目(C2022003); 湖南省眼科疾病(中医)临床医学研究中心(2023SK4038); 湖南省自然科学基金项目(2021JJ30520); 湖南中医药大学校级科研项目(2023CX39)。

[通信作者] * 陈向东, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 564259166@qq.com; 付美林, 女, 硕士, 副教授, E-mail: neffy100@126.com。

1. The First Clinical School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;
2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hengyang Municipal Hospital of Chinese Medicine, Hengyang, Hunan 421000, China

[Abstract] Objective To explore the potential therapeutic effects of Danhuang Mingmu Decoction (DHMMD) on diabetic retinopathy (DR). **Methods** Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) was employed to identify the absorbed components of DHMMD in the blood. The pharmacological components of DHMMD and their key pathways and potential targets for treating DR were analyzed using network pharmacology. Sixty rats were randomized into a non–model group ($n=24$) and a model induction group ($n=36$). The 24 rats in the non–model group were subdivided into blank group (equal volume of normal saline) and blank treatment group (equal volume of normal saline+DHMMD extract 1.25 g/kg), with 12 rats in each group. After establishing the model by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) 40 mg/kg combined with a high–fat diet, the 36 rats in the model induction group were subdivided into model group (STZ 40 mg/kg), positive control group (STZ 40 mg/kg+calcium hydroxyl sulfonate capsule 0.09 g/kg), and DHMMD sample group (STZ 40 mg/kg+DHMMD extract 1.25 g/kg), with 12 rats in each group. The intervention lasted for four weeks. The activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) was determined using biochemical kits. The rat serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, and the inflammatory cytokine IL-1 β were measured by ELISA. The protein expression levels of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and extracellular regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2) in rat retinal tissues were examined by Western blot. **Results** The LC–MS/MS revealed that a total of 347 compounds of DHMMD were examined in the blood after administration, with the first seven metabolites with higher content checked in the blood being 1,7-bis (4-hydroxyphenyl) heptan-3-one, 5-hydroxy-2,2-dimethyl-10-(2-methylbut-3-en-2-yl) pyrano [3,2-g] chromen-8-one, 5,7,4'-Trimethoxyflavone, Cillin, Deacetylo mentosideI, canescinA CanescinA, and VentilquinoneI. The network pharmacology revealed that DHMMD might intervene in DR through multi-target regulation of key biological pathways such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, tight junctions, and chemotaxis factor signaling pathway. Compared with the blank group, the levels of SOD and CAT, as well as the total protein expressions of p38 MAPK and ERK1/2 in the model group decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β , as well as the phosphorylation levels of p38 MAPK and ERK1/2 increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the levels of SOD, CAT, TNF- α , IL-6, and IL-1 β , as well as the phosphorylation levels of p38 MAPK and ERK1/2 decreased in the positive control, blank treatment, and DHMMD sample groups ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** DHMMD can inhibit the expression and activity of factors such as p38 MAPK by regulating the MAPK signaling pathway, promote the expression of SOD and CAT, thereby reducing the inflammatory response, oxidative stress, and vascular damage in DR, and ultimately play a therapeutic role in DR.

[Keywords] diabetic retinopathy; Danhuang Mingmu Decoction; liquid chromatography–tandem mass spectrometry; anti-inflammation; anti-oxidation; p38 mitogen-activated protein kinase; superoxide dismutase; catalase

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的并发症之一,早期发现并干预可预防失明的发生^[1]。随着糖尿病病程的延长,几乎所有1型糖尿病患者和超过60%的2型糖尿病患者在确诊后20年内会发展为DR^[2]。尽管目前有多种治疗方法,但这些方法都存在局限性。激光治疗可能会导致视野缩小和夜视问题;抗血管内皮生长因

子(vascular endothelial growth factor, VEGF)治疗虽然有效,但需要定期重复注射,且可能引发眼内炎症或感染;而糖皮质激素的长期使用可能增加患白内障和青光眼的风险;晚期玻璃体手术有眼内感染风险^[3-4]。

中医药是中国传统文化和医学的重要组成部分,在糖尿病等慢性病的治疗中有其独特的优势^[5-7]。

中药的化学成分复杂,成分之间以及药物与人体之间的相互作用也极为复杂,探究中药的药效物质基础及有效成分变得尤为重要^[8-9]。丹黄明目汤是陈向东教授依据养阴清热、活血利水的治法研制而成的临床验方。本课题组成员通过实验得出,丹黄明目汤可通过降低 VEGF 表达、保护血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)和改善氧化应激反应等改善 DR, 在长期的临床实践中也证实了本方对 DR 具有明显的疗效^[10]。

本研究运用代谢组学对丹黄明目汤入血代谢物的变化进行分析,深入了解其在分子水平上的作用机制,阐明丹黄明目汤在缓解 DR 方面的复杂代谢作用,以期对 DR 患者制定更有效的治疗策略。

1 材料

1.1 主要试剂

甲醇、乙腈、甲酸(中国 Abiowell 公司,批号分别为 130100-201903、130103-202203、101414-201902);链脲佐菌素(streptozocin, STZ)(北京克尔慧科技有限公司,批号:242-648-8);p38 抗体、ERK1/2 抗体、山羊抗兔二抗(中国 Abiowell 公司,批号分别为 20A231106、09G240126、06G240902);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 Q19036889、U21036309、U20036308)。

1.2 主要仪器

台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R);全自动酶标洗板机、多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:PW-812、MB-530);电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司,型号:DHP-500);电泳仪、电泳槽、转膜仪(中国北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C、DYCZ-24DN、DYCZ-40D);超高效液相、高分辨质谱、离心机(Thermo Fisher Scientific 公司,型号:Vanquish、Q Exactive Focus、Heraeus Fresco17);天平(Sartorius 公司,型号:BSA124S-CW);研磨仪(上海净信科技有限公司,型号:JXFSTPRP-24);

纯水仪(Merck Millipore 公司,型号:明澈 D24 UV);超声仪(深圳市方奥微电子有限公司,型号:YM-080S)。

1.3 动物准备

本研究于湖南中医药大学第一附属医院实验室进行,实验经过湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(批准号:ZYFY20231210-001)。SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只,2 月龄,体质量 180~220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限责任公司提供(动物合格证编号:430727241100059528)。饲养环境:饮食符合清洁级动物的卫生质量要求,环境温度 21~27 °C,湿度 45%~50%,每 12 小时光暗交换,垫料每 2 天更换一次。

1.4 药物制备

丹黄明目汤药材:生地黄 15 g(批号:HY22081502),茯苓 15 g(批号:CK22082302),牡丹皮 15 g(批号:MG22082302),丹参 15 g(批号:TH22082302),黄连 10 g(批号:PR22080503),车前子 10 g(批号:HQ22080103),麦冬 10 g(批号:HQ22082201),白茅根 10 g(批号:20210501)。饮片均购于长沙新林制药有限公司。

取处方量,加 10 倍水量浸泡 1 h,煎煮 6 h,纱布过滤,加 8 倍水量煎煮 4 h,合并 2 次滤液,真空浓缩干燥,得浸膏。称取适量浸膏,蒸馏水溶解,即得。使用前,用生理盐水稀释至适宜浓度,根据人与大鼠体表面积的等效剂量^[11]计算得到灌胃浸膏剂量为 1.25 g/kg。

2 方法

2.1 代谢物提取

2.1.1 血清样本制备 将 12 只大鼠随机分为空白血清组(6 只)和含药血清组(6 只),分别予以等体积蒸馏水、丹黄明目汤(1.25 g/kg)连续灌胃 7 d。采用 3%戊巴比妥钠将大鼠麻醉,腹主动脉采血,30 °C 自然放置 2 h。待血液表面有淡黄色液体渗出时,放入低温离心机中,在 4 °C 以 5 000 r/min 离心 5 min(离心半径:15 cm)后取上清液。取 400 μ L 空白血清组及含药血清组血浆,分别加入 40 μ L 盐酸(2 mol/L),混匀后涡旋振荡 4 min,静置 15 min 后加入 1.6 mL 乙腈,以 12 000 r/min 离心 5 min(离心半径:8.6 cm)。

取 1 800 μL 上清液, 挥干溶剂, 加入 150 μL 甲醇复溶残渣, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 平行 3 次, 将样品准备好放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2.1.2 中药浸膏样本制备 将丹黄明目汤浸膏放于冰上解冻, 涡旋 30 s 后, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 12 000 r/min 离心 15 min (离心半径: 8.6 cm)。取上清液 300 μL 转移至新鲜试管中, 加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内标的提取液 1 000 μL , 冰水浴超声处理 5 min。样品在 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置 1 h 后, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以转速 12 000 r/min 离心 15 min (离心半径: 8.6 cm)。上清液通过 0.22 μm 微孔膜仔细过滤, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 以待超高效液相色谱-质谱联用 (ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, UHPLC-MS) 分析。

2.2 LC-MS/MS 检测与数据处理

2.2.1 色谱条件 LC-MS/MS 分析采用 UHPLC 系统, 色谱柱规格为 1.7 $\mu\text{m}\times 2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$ 。样品进样量设置为 5 μL , 流速设定为 0.5 mL/min, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和乙腈溶液 (B)。梯度洗脱程序为: 0~11 min, 85%~25% A; 11~12 min, 25%~2% A; 12~14 min, 2%~2% A; 14~14.1 min, 2%~85% A; 14.1~15 min, 85%~85% A; 15~16 min, 85%~85% A。

2.2.2 质谱条件 质谱仪在控制软件 Xcalibur 2.2 控制下基于 FullScan-ddMS² 功能进行一级、二级质谱数据采集。详细参数如下。鞘气流量: 45 Arb, 辅助气流量: 15 Arb, 毛细管温度: $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, 全扫描质谱分辨率: 70 000, 串联质谱分辨率: 17 500, 碰撞能量: 1/30/45 (归一化碰撞能量模式), 喷雾电压: 4.0 kV (正离子模式) 或 -3.6 kV (负离子模式)。

通过 XCMS 软件处理质谱数据。将质谱的原始数据导入 XCMS 软件中。进行一系列数据处理步骤, 包括保留时间的矫正, 峰的识别、提取和积分, 峰的对齐。通过利用自建的二级质谱数据库及相应的裂解规律匹配法, 对包含 MS/MS 数据的峰进行物质鉴定。

2.3 网络药理学分析

本研究利用质谱将中药入血成分进行代谢组学分析, 从生物活性分子数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) 和传统中医免疫肿瘤学综合数据库 ([<http://tcio.xielab.net>\) 查询代谢物的作用靶点, 选取口服生物利用度 \$\geq 30\%\$, 类药性 \$\geq 0.18\$ 的代谢物。从人类基因综合数据库 \(<https://www.genecards.org>\) 以及中医药关联分析数据库 \(<http://www.symmap.org>\) 中获取 DR 疾病治疗靶点。将入血成分作用靶点、疾病治疗靶点的结果以韦恩图表示。将测得的代谢物差异表达基因向 Gene Ontology 数据库的各节点映射, 并利用 GO \(<http://www.geneontology.org/>\) 进行功能富集分析。靶点蛋白按照生物学过程 \(biological process, BP\)、细胞组分 \(cellular component, CC\)、分子功能 \(molecular function, MF\) 3 种独立的方式进行分类展示。通过 KEGG 对靶点蛋白显著富集的代谢通路进行分析, 以气泡图的形式展示靶点蛋白通路富集分析结果。运用 STRING 数据库 \(\[string-db.org\]\(http://string-db.org\)\) 构建蛋白质-蛋白质相互作用 \(protein-protein interaction, PPI\) 网络分析图。具体操作如下: 首先将靶点蛋白输入 STRING 数据库中, 然后选择 Homosapiens \(human\) 选项以查询 PPI 关系, 进而构建出靶点蛋白的 PPI 图。针对检测入血成分匹配作用靶点前 50 的入血成分与其作用靶点, 构建复方药材-入血成分-作用靶点-通路-疾病网络图。](http://</p></div><div data-bbox=)

2.4 实验动物验证

2.4.1 造模及模型验证 将 60 只 SD 雄性大鼠随机分为未造模组 (24 只) 和造模组 (36 只)。未造模组腹腔注射生理盐水, 造模组腹腔一次性注射 40 mg/kg STZ。STZ 的配制方法如下: 将 STZ 溶解在 0.1 mmol 新鲜柠檬酸缓冲液中 (pH=4.5), 使其浓度为 1%。注射 STZ 后 72 h, 血糖仪监测大鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), FBG 检测前 1 天, 大鼠禁食 12 h 以上, 尾静脉采血 1 mL, 用血糖仪检测并记录。连续 3 次 FBG $> 16.7\text{ mmol}/\text{L}$, 即提示糖尿病大鼠造模成功。采用高脂饲料喂养糖尿病大鼠, 造模 12 周后, 荧光素血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA) 观察大鼠眼底出现视网膜出血、血管迂曲、微血管瘤等, 表明 DR 大鼠造模成功^[10]。

2.4.2 动物分组及给药 将 24 只未造模组大鼠分为空白组 (等体积生理盐水)、空白给药组 (等体积生理盐水+1.25 g/kg 丹黄明目汤浸膏), 36 只造模组大鼠

分为模型组(40 mg/kg STZ)、阳性对照组(40 mg/kg STZ+羟苯磺酸钙胶囊 0.09 g/kg)、丹黄明目汤样本组(40 mg/kg STZ+1.25 g/kg 丹黄明目汤浸膏),以上 5 组,每组 12 只,共干预 4 周。

2.4.3 生化及 ELISA 试剂盒检测 腹主动脉取血,室温自然凝固 30 min,3 000 r/min 离心 15 min(离心半径:15 cm),取上清液,按照生化及 ELISA 试剂盒步骤检测大鼠视网膜组织 SOD、CAT、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量。

2.4.4 Western blot 检测 VEGF、MAPK 信号通路蛋白表达 取-80 $^{\circ}$ C 保存的 6 只大鼠左眼球,分离出视网膜组织,裂解、提取总蛋白,经电泳后转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h。在 4 $^{\circ}$ C 下加入一抗 p38 MARK(1:1 000)、ERK1/2(1:500)和 GAPDH(1:3 000)孵育过夜,清洗。在 4 $^{\circ}$ C 下加入山羊抗兔二抗(1:2 000)孵育 2 h。用 ECL 发光显影,观察拍照,用 ImageJ 软件处理分析各条带灰度值。

2.4.5 统计学分析 本实验所有数据均使用 Graph-Pad Prism 8 软件进行分析。结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。两组间的比较采用独立样本 *t* 检验,3 组及以上的统计分析则采用单因素方差分析(ANOVA)配合 Tukey 事后多重比较检验。不满足正态性时,使用非参数检验, $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血清药物化学分析结果

共检测到 347 个人血化合物,其中前 7 个含量较高的人血代谢物分别为 1,7-bis(4-hydroxyphenyl)heptan-3-one、5-hydroxy-2,2-dimethyl-10-(2-methylbut-3-en-2-yl)pyrano[3,2-g]chromen-8-one、5,7,4'-Trimethoxyflavone、Cillin、Deacetylto mentosideI、canescinA、CanescinA、VentiloquinoneI。详见表 1。

3.2 入血成分分析结果

空白血清组的代谢物总数为 2 944,丹黄明目汤浸膏组代谢物总数为 3 048,含药血清组代谢物的总数为 3 058。3 组的共有代谢物总数为 2 545。空白血清组有 7 个人血成分,含药血清组有 6 个人血成分,丹黄明目汤浸膏组有 8 个人血成分。详见表 2、图 1。

3.3 网络药理学分析结果

测得丹黄明目汤药物有效靶点为 115 个,DR 疾病靶点为 2 583 个,共有 73 个交集靶点。靶点蛋白的 PPI 网络构建分析结果提示,丹黄明目汤的主要作用靶点为 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase,p38 MAPK)和细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2,ERK1/2)、核因子 κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)、VEGF、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B,PI3K/AKT)等。靶点蛋白的 GO 注释富集分析结果显示:BP 的富集结果主要为对凋亡信号通路、活性氧物种代谢过程、氧化应激反应的调控及蛋白质、肽酰酪氨酸修饰及磷酸化;CC 的富集结果表明,靶点主要在核周、跨膜受体、细胞膜筏及核染色质等区域;MF 结果显示,靶点蛋白主要通过生长因子、辅因子结合,催化氧化还原反应,催化磷酸化、去磷酸化反应等功能调控机体。KEGG 结果显示,丹黄明目汤活性成分可能通过多种癌症相关及细胞结构与信号传导通路发挥作用。详见图 2。

代谢物-靶点-GO 通路互作网络图及代谢物-靶点-KEGG 互作网络图显示,丹黄明目汤的主要代谢物有黄芩苷、黄芩素、黄芪苷、葛根素等黄酮类化合物,靶点主要有 p38 MAPK、ERK1/2、NF- κ B、VEGF、PI3K/AKT 等,主要涉及丝裂原活化蛋白激酶信号通路、紧密连接信号通路、趋化因子信号通路等。详见图 3。

丹黄明目汤活性成分主要包括槲皮素、山柰酚、黄连碱、丹参酸、多糖类等。作用机制主要为抗氧化作用、抗炎作用、调节细胞信号传导等。通过 STRING 数据库构建的 PPI 网络识别出丹黄明目汤活性成分作用的关键靶点蛋白,包括 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、p38 MAPK、ERK1/2、VEGF 等,它们与多个其他蛋白相连,在疾病进程中起核心调控作用。详见图 4。

3.4 丹黄明目汤对 DR 大鼠氧化应激和炎症反应的影响

3.4.1 抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活性 与空白组相比,模型组的 SOD 和 CAT 水平降低($P<0.05$)。与模型组相比,阳性对照组、空白给药组和丹黄明目汤样

表 1 丹黄明目汤化学成分鉴定

Table 1 Chemical component identification of DHMMD

丹黄明目汤化学成分	分子式
(25S)-Spirost-5-en-3 β ,27-diol-3-O-< α -L-arabinopyranosyl(1->6)>- β -D-glucopyranoside(25S)-Spirost-5-en-3 β ,27-diol-3-O-[α -L-arabinopyranosyl(1->6)]- β -D-glucopyranoside(25S)-spirostan-5-en-3 β ,27-diol3-O-[α -L-arabinopyranosyl-(16)]- β -D-glucopyranoside	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₃
(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hydroxymethyl)-6-[(E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoxy]oxane-3,4,5-triol	C ₁₅ H ₂₀ O ₇
(8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydropyrano[2,3-h]chromen-9-yl)(Z)-2-methylbut-2-enoate	C ₁₉ H ₂₀ O ₅
(E)-3-hydroxy-6-(4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-1H-2-benzofuran-5-yl)-4-methylhex-4-enoicacid	C ₁₇ H ₂₀ O ₇
(R)-3,5-dihydroxy-7-(16-hydroxyheptadecyl)benzoicacid	C ₂₄ H ₄₀ O ₅
[3aR-[3aR,4R(2S,3S),6E,8S,10E,11aR]]-2,3,3a,4,5,8,9,11a-Octahydro-8-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylene-2-oxocyclodeca[b]furan-4-ylester2-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-3-mercapto-butanoicacid	C ₂₀ H ₂₈ O ₇ S
1,7-bis(4-hydroxyphenyl)heptan-3-one	C ₁₉ H ₂₂ O ₃
12-Hydroxy-8,10-octadecadienoicacid	C ₁₈ H ₃₂ O ₃
16 β -hydroxy-ent-kauran-19-oicacid19-[α -L-arabinopyranosyl-(1->2)]- β -D-glucopyranosyl]ester	C ₃₁ H ₅₀ O ₁₂
1 α -Hydroxy-4 α -peroxybishopsolicepolide	C ₁₇ H ₂₀ O ₇
2-Acetyl-5-methylpyridine	C ₈ H ₉ NO
2-amino-4-methyl-6-hydroxyhex-4-enoicacid	C ₇ H ₁₃ NO ₃
2-hydroxy-6-(16-hydroxy-8-heptadecenyl)benzoicacid	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
23-oxo-isopristimerin23-oxoisopristimerinIII	C ₃₀ H ₃₈ O ₅
3-Hydroxy-4-methoxyxanthone	C ₁₄ H ₁₀ O ₄
3,4-Dimethoxy-5,7-dihydroxy-8-[2,4-dihydroxy-3-[3-(4-hydroxyphenyl)propionyl]-5-methyl-6-methoxybenzyl]flavone	C ₃₅ H ₃₂ O ₁₁
3 β -hydroxy-3-epi-fusicoccinHfusicoccinS	C ₂₆ H ₄₂ O ₉
4-(3-hydroxybutyl)-2-methoxyphenol	C ₁₁ H ₁₆ O ₃
4-[4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dimethylbutyl]benzene-1,2-diol	C ₁₈ H ₂₂ O ₄

表 2 丹黄明目汤入血成分分析

Table 2 Analysis of the absorbed components of DHMMD in the blood

入血成分全称	丹黄明目汤浸膏组	空白血清组	含药血清组
(25S)-Spirost-5-en-3 β ,27-diol-3-O-< α -L-arabinopyranosyl(1->6)>- β -D-glucopyranoside(25S)-Spirost-5-en-3 β ,27-diol-3-O-[α -L-arabinopyranosyl(1->6)]- β -D-glucopyranoside(25S)-spirostan-5-en-3 β ,27-diol3-O-[α -L-arabinopyranosyl-(16)]- β -D-glucopyranoside	1	1	0
(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hydroxymethyl)-6-[(E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoxy]oxane-3,4,5-triol	1	1	1
(8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydropyrano[2,3-h]chromen-9-yl)(Z)-2-methylbut-2-enoate	1	0	0
(E)-3-hydroxy-6-(4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-1H-2-benzofuran-5-yl)-4-methylhex-4-enoicacid	1	1	1
(R)-3,5-dihydroxy-7-(16-hydroxyheptadecyl)benzoicacid	1	1	0
[3aR-[3aR,4R(2S,3S),6E,8S,10E,11aR]]-2,3,3a,4,5,8,9,11a-Octahydro-8-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylene-2-oxocyclodeca[b]furan-4-ylester2-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-3-mercapto-butanoicacid	1	1	1
1,7-bis(4-hydroxyphenyl)heptan-3-one	0	0	1
12-Hydroxy-8,10-octadecadienoicacid	1	1	1
16 β -hydroxy-ent-kauran-19-oicacid19-[α -L-arabinopyranosyl-(1->2)]- β -D-glucopyranosyl]ester	1	1	1

注:0 代表不存在入血成分,1 代表存在入血成分。

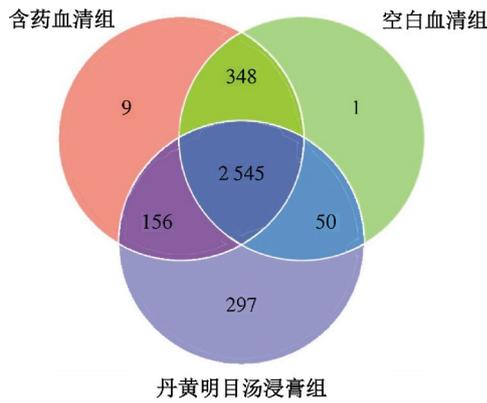


图1 血清药物化学分析韦恩图

Fig.1 Venn diagram for serum pharmacochemical analysis

本组的 SOD 和 CAT 水平升高 ($P < 0.05$)。与阳性对照组相比,空白给药组、丹黄明目汤样本组的 SOD 和 CAT 水平降低 ($P < 0.05$)。详见表 3。

3.4.2 炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达水平 与

空白组相比,模型组的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,阳性对照组、空白给药组和丹黄明目汤样本组的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平均降低 ($P < 0.05$)。与阳性对照组相比,空白给药组、丹黄明目汤样本组的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$)。详见表 3。

3.5 丹黄明目汤对 DR 大鼠 p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2 和 ERK1/2 的蛋白表达水平的影响

与空白组相比,模型组中 p-p38 MAPK、p-ERK1/2 的蛋白表达水平上调 ($P < 0.01$), p38 MAPK、ERK1/2 的蛋白表达水平下调 ($P < 0.01$)。与模型组相比,阳性对照组、空白给药组、丹黄明目汤样本组的 p-p38 MAPK、p-ERK1/2 的蛋白表达水平下调 ($P < 0.01$), p38 MAPK、ERK1/2 的蛋白表达水平上调 ($P < 0.01$)。详见表 4、图 5。

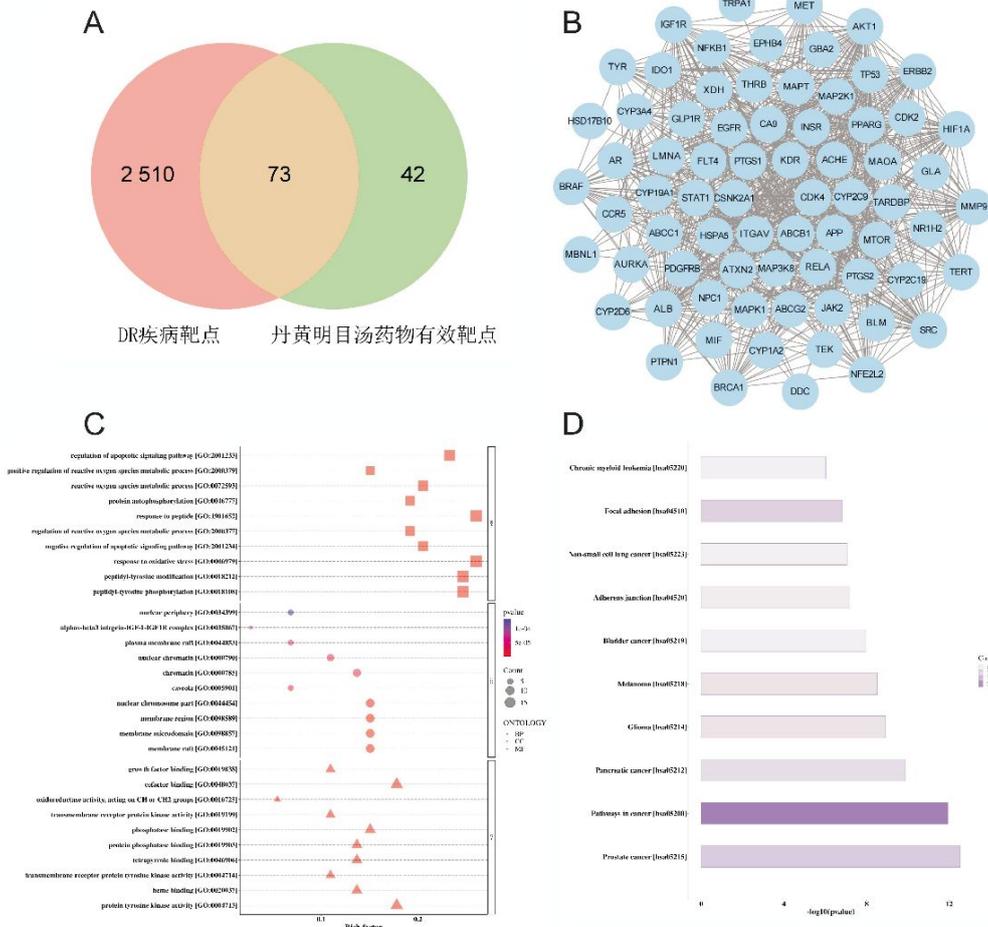


图2 丹黄明目汤主要作用靶点及富集分析结果

Fig.2 Major targets and related enrichment analysis of DHMMD

注: A.靶点韦恩图; B.代谢物-靶点 PPI 网络图; C.靶点蛋白 GO 富集分析分类气泡图; D.靶点蛋白的 KEGG 富集分析柱状图。

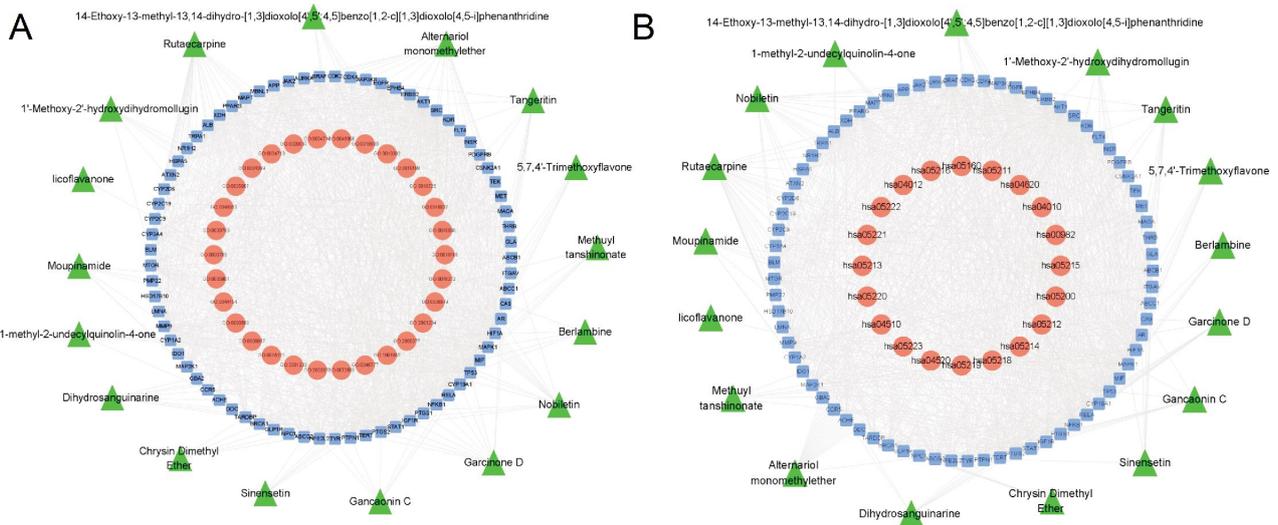


图 3 代谢物-靶点-通路的网络构建分析

Fig.3 Network construction analysis of metabolites-targets-pathways

注:A.代谢物-靶点-GO 通路互作网络图;B.代谢物-靶点-KEGG 互作网络图。

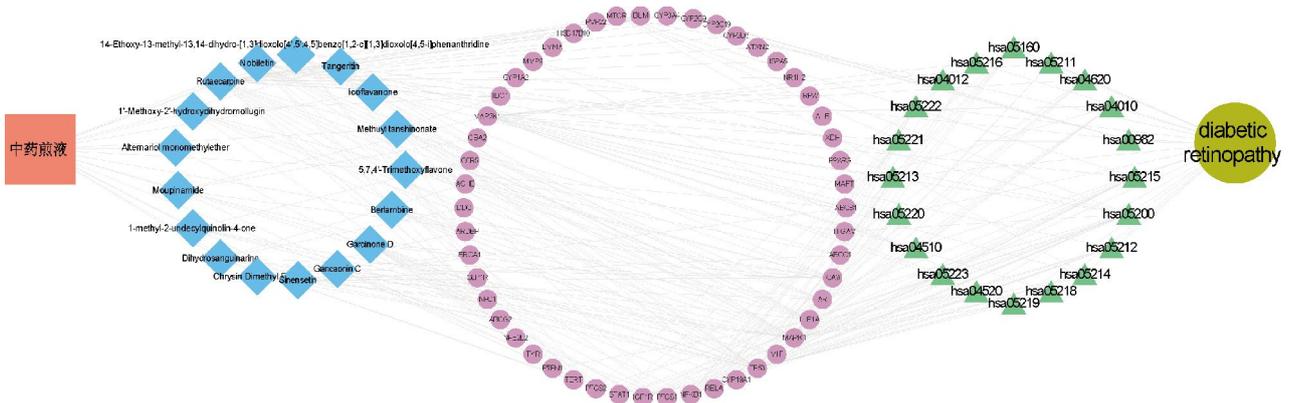


图 4 复方药材-入血成分-作用靶点-通路-疾病网络图

Fig.4 Network diagram of DHMMD constituent medicines-components absorbed into the blood-action targets-pathways-disease

表 3 各组大鼠机体氧化应激(SOD、CAT)和炎症因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)水平比较

Table 3 Comparison of the rat levels of oxidative stress factors (SOD and CAT) and inflammatory factors (TNF- α , IL-6, and IL-1 β) among various groups

组别	SOD/(U/mL)	CAT/(U/mL)	TNF- α /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)
空白组	120.56 \pm 5.23	35.42 \pm 2.87	10.23 \pm 1.54	15.34 \pm 2.12	8.76 \pm 1.34
模型组	85.45 \pm 10.34*	24.32 \pm 5.67*	18.76 \pm 2.89*	25.67 \pm 3.45*	14.32 \pm 2.12*
阳性对照组	130.21 \pm 7.45*#	39.87 \pm 3.54*#	6.54 \pm 0.98*#	11.23 \pm 1.65*#	5.43 \pm 0.87*#
空白给药组	118.78 \pm 4.89*# ^{nk}	34.98 \pm 2.65*# ^{nk}	9.87 \pm 1.43*# ^{nk}	14.89 \pm 1.98*# ^{nk}	8.45 \pm 1.23*# ^{nk}
丹黄明目汤样本组	125.34 \pm 6.12 ^{nk}	37.65 \pm 3.12 ^{nk}	7.95 \pm 1.23 ^{nk}	12.56 \pm 1.87 ^{nk}	6.78 \pm 1.02 ^{nk}

注:与空白组比较,* P <0.05;与模型组比较,# P <0.05;与阳性对照组比较,^{nk} P <0.05。

4 讨论

本研究利用 XCMS 软件处理 LC-MS/MS 数据,

进行代谢物的检测和定量。XCMS 通过高效的数据

预处理,包括峰检测、峰对齐和峰整合,确保了数据

表4 各组大鼠视网膜组织 p38 MAPK、ERK1/2 的蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 4 Comparison of protein expression levels of p38 MAPK and ERK1/2 in rat retinal tissues among various groups ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	ERK1/2	p-ERK1/2	p38 MAPK	p-p38 MAPK
空白组	1.113±0.017 6	0.793±0.073 3	1.399±0.003 9	0.914±0.001 9
模型组	0.938±0.011 4**	1.246±0.042 5**	0.767±0.001 4**	1.468±0.002 8**
阳性对照组	1.255±0.020 9 [#]	0.508±0.009 7 [#]	0.876±0.007 4 [#]	1.081±0.003 9 [#]
空白给药组	1.469±0.017 5 [#]	0.537±0.026 9 [#]	0.931±0.001 1 [#]	1.223±0.001 4 [#]
丹黄明目汤样本组	0.968±0.005 5 [#]	0.725±0.075 2 [#]	1.109±0.116 0 [#]	1.005±0.001 0 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

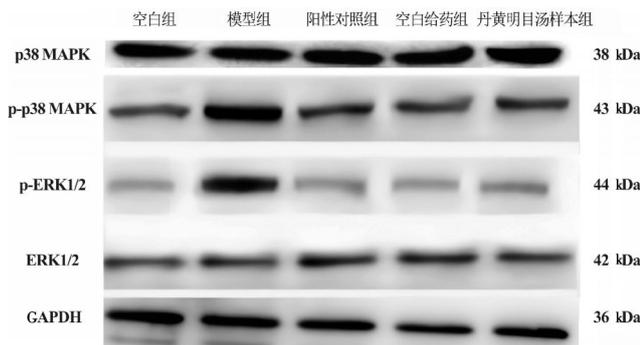


图5 各组大鼠视网膜组织 p38 MAPK、ERK1/2 蛋白表达条带图

Fig.5 Band diagram of p38 MAPK and ERK1/2 protein expression in retinal tissues of rats in each group

的高质量 and 可重复性。通过网络药理学识别了与丹黄明目汤成分相关的关键靶点,如 MIF、MAPK1、AURKA、CSNK2A1 等,这些蛋白在 DR 中发挥作用^[12]。MAPK1 参与细胞生长、分化和死亡的调节,其活化与炎症、细胞凋亡和血管新生密切相关^[13]。AURKA 的异常表达会导致细胞增殖和血管异常^[14]。MIF 是巨噬细胞迁移抑制因子,是一种多功能的细胞因子,在免疫调节、炎症反应、细胞增殖和炎症等过程中发挥作用^[15]。

GO 富集分析结果显示,丹黄明目汤主要靶点包括 ERK1/2、NF- κ B、VEGF、PI3K/AKT 等。这与炎症反应和氧化应激调节密切相关^[16-18]。KEGG 通路分析结果提示,MAPK 信号通路、紧密连接和趋化因子信号通路为关键通路,这些通路在细胞增殖、炎症反应和细胞黏附中发挥作用,是 DR 的重要调控路径。

p38 MAPK 在调控 DR 过程中扮演非常重要的角色。DR 与氧化应激、炎症和血管生成密切相关^[19-20]。有研究表明,糖尿病引发的视网膜病变常常伴随氧

化应激的产生,导致 p38 MAPK 信号通路的活化,而 p38 MAPK 的激活会促进 ROS 的生成,进一步加重细胞损伤和功能障碍^[21]。本研究结果提示,丹黄明目汤能显著提升 SOD、CAT 抗氧化酶活性,减轻 DR 所诱导的氧化应激。这与丹参注射液联合羟苯磺酸钙通过上调抗氧化酶 CAT 和 SOD 的活性抑制 DR 所导致氧化应激的研究^[22]结果一致。p38 MAPK 是炎症信号通路的重要组成部分,p38 MAPK 被激活时,会促进 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的表达,进一步促进视网膜内的炎症反应,导致微血管病变和视网膜损伤^[21,23]。在本研究中,DR 大鼠血清中促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著升高,丹黄明目汤能有效降低这些促炎细胞因子的表达水平,抑制炎症反应。这表明丹黄明目汤可能通过抑制 p38 MAPK 信号通路的激活从而发挥抗炎、抗氧化的作用。研究报道,p38 MAPK 可以促进 VEGF 的表达,进而促进新生血管的形成,而新生血管较为脆弱,容易导致出血和视网膜水肿^[21]。丹黄明目汤可以通过抑制 DR 大鼠视网膜组织 p38 MAPK、ERK1/2 的表达调控血管新生,这与组胺受体 4 通过调控 p38 MAPK 轴缓解糖尿病视网膜色素上皮中促 VEGF 和抗 VEGF 之间的不平衡研究^[24]结果相类似。这表明丹黄明目汤可通过调节 p38 MAPK 信号通路,发挥抗炎、抗氧化、保护细胞和调节血管生成的作用。

综上所述,本研究探究了丹黄明目汤对 DR 的潜在治疗作用。通过质谱检测分析了丹黄明目汤入血的主要成分。对差异代谢物结果进行 GO 和 KEGG 分析,发现丹黄明目汤可以通过调控 MAPK 信号通路、紧密连接完整性和趋化因子信号等多条信号通路影响 DR 的进程。动物实验研究结果发现,丹黄明目汤可以通过抑制 p38-MAPK 信号通路缓解 DR

所导致的氧化应激、炎症以及血管生成增加。但由于选用的数据库有限,筛选方式及动物实验存在局限性,无法完全阐明丹黄明目汤的作用机制,在接下来的研究中,本课题组将通过进一步的体外实验以及临床实验深入探究丹黄明目汤发挥药效的具体分子机制,以期为 DR 的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 陈言, 单留峰, 车文生, 等. 中药单体及复方干预 mTOR 通路改善 DR 的研究进展[J/OL]. 中药药理与临床, 1-20[2024-12-01]. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20241108.001>.
- [2] 伍玉洁, 张壬嘉. 2 型糖尿病患者血清 SFRP-4 和 CHI3L1 水平对糖尿病视网膜病变的评估价值[J]. 国际眼科杂志, 2024, 24(11): 1728-1732.
- [3] 朱嘉丽, 封月娟, 刘钊. 血清 Leptin、Apelin 水平与增生型糖尿病性视网膜病变患者玻璃体切割术后视力残疾的关系[J]. 山东医药, 2024, 64(31): 10-14.
- [4] 罗文彬, 李国栋. 白内障手术前全视网膜激光凝对糖尿病视网膜病变发展的影响研究[J]. 中国医疗器械信息, 2024, 30(18): 61-64.
- [5] XU Q H, BAUER R, HENDRY B M, et al. The quest for modernisation of traditional Chinese medicine[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, 13: 132.
- [6] 叶勇, 吴吉, 赵凡, 等. 基于网络药理学结合动物实验探究六味地黄丸治疗孤独症谱系障碍的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 185-196.
- [7] 李会影, 刘实琪, 李东慧, 等. 基于网络药理学研究瑶药黑老虎三萜类成分对类风湿关节炎的作用机制及试验验证[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(10): 1834-1844.
- [8] 刘艳, 杨立宏. 中医药治疗糖尿病视网膜病变研究进展[J]. 新疆中医药, 2024, 42(4): 149-150, 封 3-封 4.
- [9] 崔莹, 刘适欣. 中医药治疗糖尿病视网膜病变的 Meta 分析[J]. 继续医学教育, 2024, 38(7): 178-183.
- [10] NEI F J, LIU Z M, SUN S M, et al. Dan Huang Ming Mu recipe suppresses the progression of streptozotocin-induced diabetic retinopathy after retinal laser photocoagulation in brown norway rats via down-regulating vascular endothelial growth factor and up-regulating pigment epithelium-derived factor[J]. Digital Chinese Medicine, 2019, 2(1): 19-28.
- [11] 柯小清, 刘光辉, 潘铭东, 等. 益景汤对糖尿病大鼠视网膜 Occludin、CIV 及 PDGF-B 的影响[J]. 亚太传统医药, 2024, 20(11): 20-24.
- [12] WANG N, WEI L F, LIU D, et al. Identification and validation of autophagy-related genes in diabetic retinopathy[J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 867600.
- [13] NISHIMURA Y, YAMAKAWA D, SHIROMIZU T, et al. Aurora A and AKT kinase signaling associated with primary Cilia[J]. Cells, 2021, 10(12): 3602.
- [14] LUO T T, LU Y, YAN S K, et al. Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: Methodology, application and prospective[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2020, 26(1): 72-80.
- [15] 朱辉, 徐永申. MIF、MMPs 基因交互作用与强直性脊柱炎及免疫相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(10): 2150-2157.
- [16] 田珈瑜, 秦文熠, 杨涓, 等. 基于 MAPK/NF- κ B 通路探讨归肾丸加味对多囊卵巢综合征大鼠炎症的影响[J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 1-11[2024-12-01]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20241842>.
- [17] 刘政国, 王艳婷, 高静, 等. 康柏西普联合全视网膜激光光凝术治疗增殖性糖尿病视网膜病变的疗效及对血清 VEGF 及 PEDF 水平的影响[J]. 海南医学, 2024, 35(20): 2960-2964.
- [18] 尹一舟. ResolvinD1 对糖尿病大鼠视网膜炎症小体及 NF- κ B 通路影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.
- [19] 李光云, 周霖, 李鹏, 等. 地榆皂苷 II 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路在体内外减轻糖尿病视网膜病变的作用机制研究[J]. 现代药物与临床, 2024, 39(10): 2470-2476.
- [20] 刘秋平, 刘昭麟, 李晶明. 糖尿病视网膜病变发病机制及潜在治疗靶点研究最新进展[J]. 眼科新进展, 2024, 44(10): 757-768.
- [21] 陈红, 李春花, 王文军, 等. α 1-抗胰蛋白酶联合骨髓间充质干细胞通过 p38 MAPK/NF- κ B 信号通路调节糖尿病大鼠视网膜病变的研究[J]. 海南医学院学报, 2021, 27(1): 11-17.
- [22] 郑玮, 王冰, 任瑶. 丹参注射液联合羧基磺酸钙治疗糖尿病视网膜病变对视功能和血清 VEGF、IGF-1、SOD、MDA 水平的影响[J]. 中国现代医生, 2023, 61(13): 69-72, 76.
- [23] 邸莎. 基于 PRC2/p38 MAPK 通路探讨益气通络方防治糖尿病视网膜病变的作用机制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
- [24] LEE B J, BYEON H E, CHO C S, et al. Histamine causes an imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors in the retinal pigment epithelium of diabetic retina via H4 receptor/p38 MAPK axis[J]. BMJ Open Diabetes Research & Care, 2020, 8(2): e001710.

(本文编辑 周旦)