

·数字中医药·

本文引用: 吕怡, 蒋鹏飞, 彭俊, 彭清华. 基于网络药理学和 SIRT1/PGC-1 α 信号通路探究青光安 II 号方的视神经保护作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(8): 1438-1447.

基于网络药理学和 SIRT1/PGC-1 α 信号通路探究 青光安 II 号方的视神经保护作用

吕怡^{1,2}, 蒋鹏飞^{1,2}, 彭俊^{2,3*}, 彭清华^{1,2*}

1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南省中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病与视功能保护工程技术研究中心,湖南长沙 410208;3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007

[摘要] 目的 基于网络药理学和实验研究探讨青光安 II 号方对青光眼视神经的保护作用机制。方法 通过 TC MSP 数据库筛选青光安 II 号方成分靶点,在 GeneCards、Disgenet、CTD 数据库挖掘青光眼相关靶点,进而筛选青光安 II 号方作用于青光眼的靶点;制作蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络取其交集,并通过 GO 分析和 KEGG 富集分析。建立自发性慢性高血压 DBA/2J 青光眼小鼠模型,将 C57BL/6J 小鼠设置为空白组(等体积蒸馏水),DBA/2J 小鼠随机分为模型组(等体积蒸馏水)、益脉康组[0.31 g/(kg·d)]、青光安 II 号方低浓度组[0.85 g/(kg·d)]、青光安 II 号方中浓度组[1.7 g/(kg·d)]、青光安 II 号方高浓度组[3.4 g/(kg·d)],每组 8 只,每日灌胃 1 次。干预 4 周后,触式眼压笔监测小鼠眼压;HE 染色观察小鼠视网膜形态结构;Western blot 检测沉默信息调节因子-1(silent information regulator type-1, SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferation-activated receptor- γ -coactivator 1 α , PGC-1 α)的蛋白表达水平;qRT-PCR 检测 SIRT1、PGC-1 α 的 mRNA 表达水平。结果 从青光安 II 号方共筛选得到 101 个活性成分和 245 个相关靶点,2 412 个青光眼疾病相关基因靶点;药物-活性成分-靶点相互作用最强的 5 个靶点分别是前列腺素内过氧化物合成酶 2、核受体共激活因子 2、胃蛋白酶原 II、前列腺素内过氧化物合成酶 1 以及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferative activated receptor gamma, PPAR γ);PPI 网络显示较强的靶点是 SIRT1、PPAR γ ;GO 分析和 KEGG 富集分析得到细胞衰老、IL-17 等信号通路。与给药前相比,给药后用药组眼压显著降低($P<0.01$)。给药后,与空白组相比,模型组眼压显著升高($P<0.01$),视网膜中 SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达量和蛋白表达量均显著降低($P<0.01$);与模型组相比,用药组眼压显著降低($P<0.01$),SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达量和蛋白表达量均显著升高($P<0.01$)。与益脉康组和青光安 II 号方低浓度组相比,青光安 II 号方中、高浓度组 SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达量和 SIRT1 蛋白表达量显著升高($P<0.01$);与青光安 II 号方低浓度组相比,青光安 II 号方高浓度组 PGC-1 α 蛋白表达量均显著上升($P<0.01$)。与青光安 II 号方中浓度组相比,青光安 II 号方高浓度组 PGC-1 α mRNA 表达量和蛋白表达量显著升高($P<0.01$)。结论 青光安 II 号方可有效调控 SIRT1/PGC-1 α 信号通路,抑制 RGC 的丢失,主要在氧化应激、细胞衰老等方面对青光眼视神经发挥保护作用。

[关键词] 青光眼;青光安 II 号方;细胞衰老;沉默信息调节因子-1;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.08.013

Protective effects of Qingguang'an II Formula on the optic nerve based on network pharmacology and SIRT1/PGC-1 α signaling pathway

LV Yi^{1,2}, JIANG Pengfei^{1,2}, PENG Jun^{2,3*}, PENG Qinghua^{1,2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Engineering Technology Research Center for Prevention & Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases and Visual Function Protection with

[收稿日期]2024-04-01

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(82274588,81874492);国家中医药管理局人才支持项目——岐黄学者(国中医药人教函[2022]6号);湖南省中医药科研计划项目(D2022045);湖南省自然科学基金青年基金项目(2020JJ5436);湖南中医药大学科研揭榜挂帅项目(2022XJJB003);中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目(ZK1801YK015);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科建设项目;中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病湖南省重点实验室开放基金项目(2018YZD02)。

[通信作者]*彭清华,男,博士,二级教授,博士研究生导师,E-mail:pqh410007@126.com;彭俊,男,硕士,E-mail:154451101@qq.com。

Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] Objective To explore the mechanism of protective action of Qingguang'an II Formula (QGAF II) on optic nerve in glaucoma based on network pharmacology and experimental research. **Methods** Targets of QGAF II components were screened through the TCMSP database, and glaucoma-related targets were mined from GeneCards, Disgenet, and CTD databases. Then the targets through which QGAF II acts on glaucoma were identified. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed using the intersection of these targets, and GO and KEGG pathway analyses were performed on them. A spontaneous chronic high intraocular pressure (IOP) DBA/2J glaucoma mouse model was established. C57BL/6J mice were set as the blank group (an equal volume of distilled water), and DBA/2J mice were randomized into the model group (an equal volume of distilled water), Yimaikang (YMK) group [0.31 g/(kg·d)], and low- [0.85 g/(kg·d)], medium- [1.7 g/(kg·d)], and high-concentration [3.4 g/(kg·d)] QGAF II groups. Each group consisted of eight mice, and they were administered by gavage once daily. After 4 weeks of intervention, the IOP of mice was monitored by a contact tonometer; HE staining was used to observe the morphological structure of the mouse retina; Western blot was used to examine the protein expression levels of silent information regulator type-1 (SIRT1) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ -coactivator 1 α (PGC-1 α); qRT-PCR was used to check the mRNA expression levels of SIRT1 and PGC-1 α . **Results** A total of 101 active ingredients and 245 related targets were screened from QGAF II. Additionally, 2412 disease-related gene targets for glaucoma were identified. The five targets with the strongest drug-active ingredient-target interactions were prostaglandin-endoperoxide synthase 2, nuclear receptor coactivator 2, pepsinogen II, prostaglandin-endoperoxide synthase 1, and peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG). The PPI network showed that the stronger targets were SIRT1 and PPARG. Signaling pathways such as oxidative stress, cellular senescence, and IL-17 were obtained by GO and KEGG enrichment analyses. Compared with before administration, the IOP of the treatment groups significantly decreased after administration ($P<0.01$). After administration, compared with the blank group, the model group showed a significant increase in IOP ($P<0.01$), and the mRNA and protein expression levels of SIRT1 and PGC-1 α in the retina were significantly reduced ($P<0.01$). Compared with the model group, the IOP in the treatment groups showed a significant decrease ($P<0.01$), while the mRNA and protein expression levels of SIRT1 and PGC-1 α significantly increased ($P<0.01$). Compared with the YMK group and the low-concentration QGAF II group, the mRNA expression levels of SIRT1 and PGC-1 α and the protein expression level of SIRT1 significantly increased in the medium- and high-concentration QGAF II groups ($P<0.01$); compared with the low-concentration QGAF II group, the protein expression level of PGC-1 α in the high-concentration QGAF II group significantly increased ($P<0.01$); compared with the medium-concentration QGAF II group, the mRNA and protein expression levels of PGC-1 α significantly increased in the high-concentration QGAF II group ($P<0.01$). **Conclusion** QGAF II can effectively regulate the SIRT1/PGC-1 α signaling pathway, and inhibit the loss of retinal ganglion cells (RGCs). It mainly exerts protective effects on the optic nerve in glaucoma by targeting oxidative stress and cellular senescence.

[Keywords] glaucoma; Qingguang'an II Formula; cellular senescence; silent information regulator type -1; peroxisome proliferation-activated receptor- γ -coactivator 1 α

青光眼作为年龄相关性视神经退行性病变疾病,又被称作是眼部的阿尔茨海默病^[1]。虽然,病理性高血压被认为是青光眼进展的先导因素,但高血压无法解释正常眼压性青光眼的视神经损伤,临床上亦存在部分患者经过有效降眼压治疗后视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)仍持续性丢失,导致视神经进行性萎缩,极大程度影响患者生活质量^[2]。研究表明,青光眼中晚期视神经退变以及眼压控制后视神经仍进行性损伤是衰老的结果^[3]。神经元细胞一旦损伤通常不会再生,因此,在控制眼压的同时,如何进行有效视神经保护治疗逐渐成为研究热点。

现代医学认为,神经退行性变的发病机制大多与衰老相关。从中医学角度理解,亦可说明青光眼视神经损害与衰老相关。彭清华教授结合多年临床经验指出,青光眼中晚期患者的关键病机在于肝肾亏虚、气虚血瘀,为因虚致实之病^[4]。久病可导致精气亏耗,加之本病多发于中老年,阴血无以充养,阳气逐渐痿弱,致肝肾不足、精血暗耗,此乃青光眼中晚期病机的本质。而肝肾精血亏虚会导致机体组织细胞的衰老,视神经进行性萎缩就是“衰老”的表现之一。青光安II号方是彭清华教授的经验方,该方由枸杞子、牛膝、女贞子、黄芪、灯盏细辛、川芎组成,具有补益肝肾、益气活血的功效,可用于治疗肝肾亏虚、

脉络瘀滞的青光眼中晚期视神经损害^[5-9]。补益肝肾一直被认为是抗衰老的根本,而驱除瘀积是祛瘀生新的重要步骤,瘀积之物不除,阻碍精血上达,则目窍日渐衰老。本团队前期研究表明,青光安Ⅱ号方可提高 RGC 的存活率,具有保护视神经的作用,但具体机制并未明确^[5-11]。沉默信息调节因子-1(silent information regulator type-1, SIRT1)是组蛋白去乙酰化酶家族中的一员,在视网膜损伤和眼部老化中起重要作用^[12]。同时,SIRT1 通过去乙酰化过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferation-activated receptor- γ -coactivator 1 α , PGC-1 α)可以提高细胞对氧化应激的抵抗力,还可以影响线粒体呼吸功能和活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累,从而在能量代谢、氧化平衡、细胞存活、衰老等过程中发挥作用^[13-14]。SIRT1/PGC-1 α 信号通路协同发挥抗衰作用^[15]。

研究表明,益脉康分散片具有清除氧自由基的作用,还可以提高机体抗纤溶活性和抗血栓形成,能够改善视网膜血管的血液黏滞状态,联合甲钴胺片还能够控制青光眼眼压、改善视野,显示出一定的视神经保护作用^[16]。本研究采用网络药理学技术探究青光安Ⅱ号方治疗青光眼的机制,并加以实验验证:采用益脉康分散片作为阳性药物对照组,观察青光安Ⅱ号方不同药物浓度对青光眼模型 DBA/2J 小鼠视网膜中 SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平的影响,以进一步探究青光安Ⅱ号方对青光眼视神经保护作用的机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 DBA/2J 雌性小鼠 40 只,6 周龄,18~22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0006,质量合格证:1100111911055898。SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠 8 只,6 周龄,18~22 g,由湖南中医药大学实验动物中心代购,实验动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002,质量合格编号:ZS-202111230007。实验经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准:LLBH-2021ZYX13。

1.2 主要药品及试剂

青光安Ⅱ号方:由枸杞子、女贞子、黄芪、川芎、牛膝、灯盏细辛按比例(1.5:1.5:1.5:1:1:1)用灭菌蒸馏水制成悬混液(药材均采购于湖南中医药大学第一附属医院)。益脉康分散片(湖南湘雅制药有限公司,国药准字 Z20080073,规格:400 mg/片)。

SIRT1 抗体、PGC-1 α 抗体、 β -actin、RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 AS391-1、AF7736、AF0003、P0013C);SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒、BCA 蛋白定量检测试剂盒、PVDF 转印膜(兰杰柯科技有限公司,批号分别为 BL522A、BL521A、BS-PVDF-45);电泳缓冲液购、脱脂奶粉(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 G2018、G5002)。

1.3 主要仪器

笔式眼压计(美国 Reichert 公司,型号:Reichert 7);灌胃针(北京冀诺泰科技发展有限公司,型号:JNT-GWQ);光学显微镜(北京奥特伟业科贸有限公司,型号:BK6000);裂隙灯显微镜(日本 Topcon 公司,型号:SL-3G);低温离心机、摇床、荧光定量 RCP 仪、电泳仪、液氮罐(美国 Thermo 公司,型号为 75009750、88882014、A51685、G8100、CY50985-70);EP 管(上海希言科学仪器有限公司,型号:10-0850);-80 °C 冰箱(中国美菱公司,型号:DW-HL530)。

2 方法

2.1 青光安Ⅱ号方治疗青光眼的网络药理学研究

2.1.1 青光安Ⅱ号方活性成分的获取及其对应靶点的收集 在 TCMS 数据库(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)中筛选青光安Ⅱ号方中六味中药的活性成分,设置口服利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 且类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为条件进行筛选;获得其相关靶点后导入 Excel 表格中处理,去除重复值,并利用 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>)对各靶点名称进行规范化处理。

2.1.2 构建青光安Ⅱ号方药物-活性成分-靶点相互作用网络图 将青光安Ⅱ号方药物、药物活性成分以及活性成分对应的靶点均导入 Cytoscape 3.9.1 软件中进行处理,获得药物-活性成分-靶点相互作用的网络,利用 Network Analyze 功能对网络进行分析,获得各靶点的节点度(Degree)值后行可视化处理。

2.1.3 青光眼疾病基因靶点收集及韦恩图制作 以“glaucoma”为检索词于 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、Disgenet 数据库(<https://www.disgenet.org/>)、CTD 数据库(<https://ctdbase.org/>)中进行检索,获得青光眼疾病基因靶点。借助 Draw Venn Diagram 软件制作韦恩图,将成分靶点与青光眼疾病靶点取交集以获得青光安Ⅱ号方治疗青光眼的靶点。

2.1.4 构建青光安Ⅱ号方治疗青光眼的蛋白质-蛋

白质相互作用网络 将方药与疾病的靶点导入 String 平台 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>), 获得蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 再利用 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行分析及可视化处理。

2.1.5 GO 及 KEGG 富集分析及可视化 将方药治疗疾病的靶点导入 Metascape 平台 (<https://metascape.org/>) 进行 GO 富集分析, 包括生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)。物种选择为 *Homo sapiens*, 选择 Custom Analysis, 设置 Min Overlap 为 3, P-value Cutoff 为 0.01, Min Enrichment 为 1.5, 将结果导入 Excel 表格中, 根据 Count 进行降序排列, 选择前 10 的内容, 利用微生信平台进行可视化处理。KEGG 富集分析同上述法。

2.2 青光安 II 号方对青光眼视神经保护作用的实验研究

2.2.1 青光眼小鼠模型建立及给药 本实验采用的 DBA/2J 小鼠喂养至 38 周龄时即可自动成模^[7]。将 C57BL/6J 小鼠设置为空白组, DBA/2J 小鼠随机分为模型组、益脉康组以及青光安 II 号方低、中、高浓度组, 每组 8 只。

参照团队前期研究^[4-11]及《中医科研设计与统计学》^[18]中成人等效剂量换算方法, 得出各组药物浓度如下, 益脉康组 0.31 g/(kg·d)、青光安 II 号方低浓度组 0.85 g/(kg·d)、青光安 II 号方中浓度组 1.7 g/(kg·d)、青光安 II 号方高浓度组 3.4 g/(kg·d)。给予以上各组药物混悬液 2 mL (用蒸馏水作为溶剂配制), 空白组、模型组予等体积蒸馏水, 灌胃 1 次/d, 连续干预 4 周。

2.2.2 监测眼压 造模成功后, 对给药前及给药 4 周后的小鼠右眼眼压进行测量。在小鼠清醒状态下每日固定时间段用接触式眼压笔测量眼压, 3 次重复测量后取平均值。

2.2.3 HE 染色观察视网膜形态结构 将视网膜组织制成石蜡切片后, 苏木精染色 2 min, 冲洗, 1% 盐酸乙醇分化液 10 s, 冲洗, 氨水返蓝 2 min, 梯度乙醇脱水, 伊红染色 2 min, 冲洗, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明。风干后滴加中性树胶以封片, 置于荧光显微镜下观察。

2.2.4 qRT-PCR 检测各组视网膜 SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达 用 Trizol 法提取小鼠视网膜组织中总 RNA, 然后按试剂盒说明书依次加入 2 μ L Primer Mix, 7 μ L RNA Template, 4 μ L 5 \times RT Buffer, 2 μ L

DTT 和 1 μ L HiFiScript, 逆反录合成 cDNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。运用 Primer 5.0 软件设计引物, 采用微流控微滴发生仪制备微滴后, 将微滴转移到 96 孔 PCR 板上, 封膜, 于梯度 PCR 仪上按试剂盒说明进行扩增。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C、30 s, 58 $^{\circ}$ C、1 min, 40 个循环; 4 $^{\circ}$ C、5 min, 90 $^{\circ}$ C、5 min; 4 $^{\circ}$ C 保温, 升降温速度 \leq 2 $^{\circ}$ C/s。以 β -actin 作为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。SIRT1: 正向 5'-TTCTATACCCATGAAGTGCCTC-3', 反向 5'-CAC-CACCTAGCCTATGACACA-3', 长度 128 bp; PGC-1 α : 正向 5'-AAGTGGTGTAGCGACCAATCG-3', 反向 5'-AATGAGGGCAATCCGTCTTCA-3', 长度 161 bp; β -actin: 正向 5'-ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC-3', 反向 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3', 长度 223 bp。

2.2.5 Western blot 检测各组视网膜 SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达 取视网膜组织按照 1:100 的比例加入 RIPA 裂解液, 组织破碎仪 90 Hz, 45 s, 循环 5 次, 以破碎组织。冰上裂解 20 min 后, 离心机 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min, 离心 15 min (离心半径 9 cm), 取上清液。按照试剂盒说明进行蛋白浓度测定, 用 RIPA 配平成等密度、同体积的蛋白样品。在 60 V 恒定电压中电泳, 当溴酚蓝迁移至凝胶底部时停止电泳。冰水浴恒流 300 mA, 2 h, 转膜到 PVDF 膜; 室温下封闭 1 h; 稀释一抗, 取出 PVDF 膜, 加入 SIRT1 (1:1 000)、PGC-1 α 抗体 (1:2 000) 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min 后二抗孵育 2 h。置于避光室内, 按照发光试剂 A:B=1:1 比例混合显影并存档, 采用 Image J 软件分析灰度值。

2.2.6 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件对结果进行分析。若满足正态性和方差齐性, 则采用单因素方差分析; 多重比较采用 LSD 法; 若不符合正态分布或方差齐性, 则采用非参数检验; 计量资料以 " $\bar{x}\pm s$ " 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 青光安 II 号方活性成分及靶点筛选

在 TCMS 数据库中获得青光安 II 号方的活性成分为 101 个, 其中有 10 个成分无法在 TCMS 数据库中预测到靶点, 故予以剔除, 将 91 个成分预测所得靶点整合并删除重复值, 共得到靶点 245 个。以下选取每种药物排名前 2 的活性成分, 详见表 1。

3.2 构建青光安 II 号方药物-活性成分-靶点相互作用网络图

药物中 Degree 值最大的为枸杞, 活性成分中相

表 1 青光安 II 号方各药物活性成分及 OB、DL 值

Table 1 The active ingredients and OB and DL values of Qinguang'an II Formula

药物	成分	OB 值/%	DL 值
川芎	Perlolryrine	65.95	0.27
川芎	FA	68.96	0.71
枸杞	Glycitein	50.48	0.24
枸杞	Physcion-8-O-beta-D-gentiobioside	91.71	0.27
黄芪	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofuran[3,2-c]c	74.69	0.33
黄芪	Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	109.99	0.32
牛膝	Quercetin	64.62	0.65
牛膝	Spinoside A	46.43	0.28
女贞子	Quercetin	103.23	0.78
女贞子	Oloritoriside	83.12	0.83
灯盏细辛	Ergosta-7,22-dien-3-one	69.67	0.21
灯盏细辛	Acanthoside B	101.06	0.34

相互作用最强的前 5 位为槲皮素、山柰酚、木犀草苷、β-谷甾醇以及黄芩素。靶点中相互作用最强的 5 个分别是前列腺素内过氧化物合成酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase, PTGS)2、核受体共激活因子

2(nuclear receptor coactivator 2, NCOA2)、胃蛋白酶原 II (pepsinogen I/pepsinogen II, PGR)、PTGS1 以及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(peroxisome proliferative activated receptor gamma, PPARG)。详见图 1。

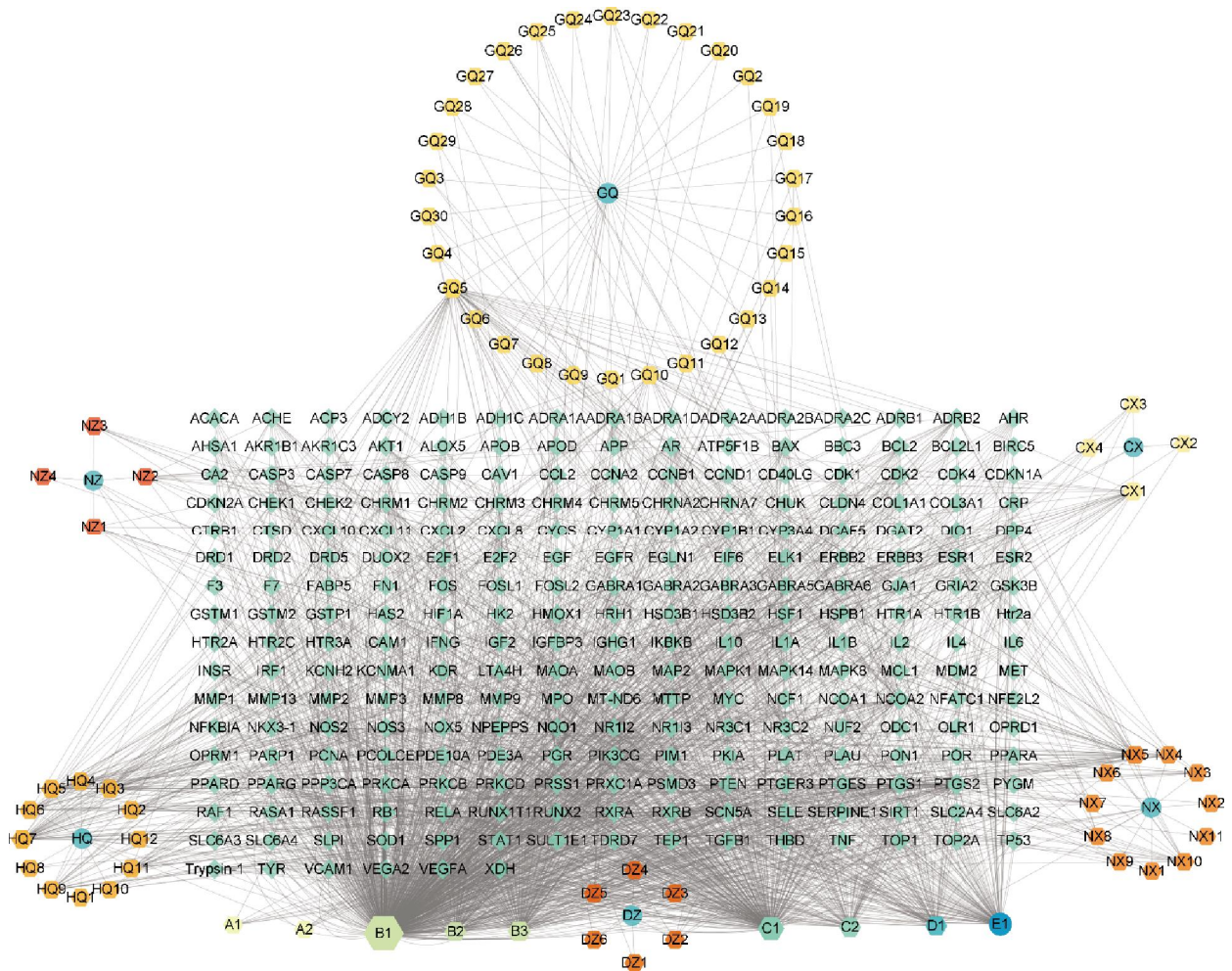


图 1 青光安 II 号方药物-活性成分-靶点相互作用网络图

Fig.1 Drug-active ingredient-target interaction network diagram of Qinguang'an II Formula

3.3 青光安 II 号方治疗青光眼关键靶点网络构建

通过 CTD、GeneCard、Disgenet 数据库整合去重后获得青光眼疾病相关基因靶点 2 412 个。青光安 II 号方靶点与青光眼疾病靶点取交集,共获得青光安 II 号方治疗青光眼靶点 155 个。将青光安 II 号方治疗青光眼的靶点导入 String 平台后获得青光安 II 号方治疗青光眼的 PPI 网络,SIRI1、PPARG 均为作用较强的靶点。详见图 2。

3.4 青光安 II 号方治疗青光眼靶点的 GO 及 KEGG 富集分析及可视化

运用 Metascape 进行 GO 富集分析后将 BP、CC、MF 三部分结果均按 Count 进行降序排列,各取前 10 位绘制柱状图,详见图 3。BP 富集结果主要为细胞因子对无机物、激素、含氮化合物、有机环状化合物、有机氮化合物的反应等。CC 富集结果主要为膜微域、膜筏、树突状树、树突、突触后等。MF 富集结果主要为激酶结合、蛋白激酶结合、转录因子结合、DNA 结合转录因子结合、氧化还原酶活性等。KEGG 富集结果主要为癌症通路、脂质与动脉粥样硬化、乙型肝炎、IL-17 信号通路、细胞衰老等通路,详见图 4。

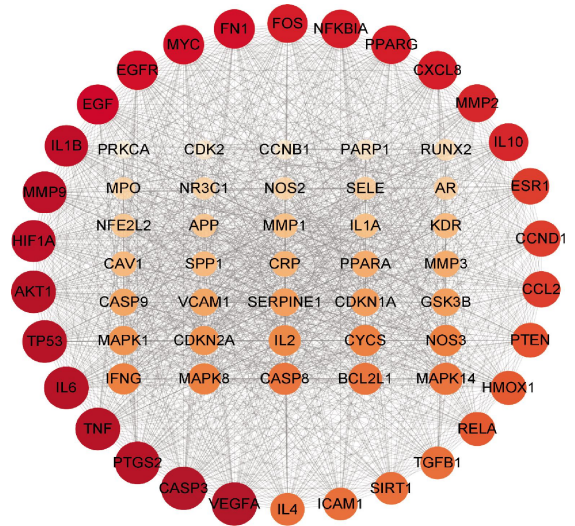


图 2 青光安 II 号方治疗青光眼 PPI 网络图

Fig.2 PPI network diagram of Qinguang'an II Formula for the treatment of glaucoma

3.5 青光安 II 号方对小鼠眼压的影响

与给药前相比,给药后用药组眼压显著降低($P < 0.01$)。给药前,与空白组相比,其他组眼压显著升高($P < 0.01$)。给药后,与空白组相比,模型组眼压显著升高($P < 0.01$),用药组眼压显著降低($P < 0.01$);与模型组相比,用药组眼压显著降低($P < 0.01$)。详见表 2。

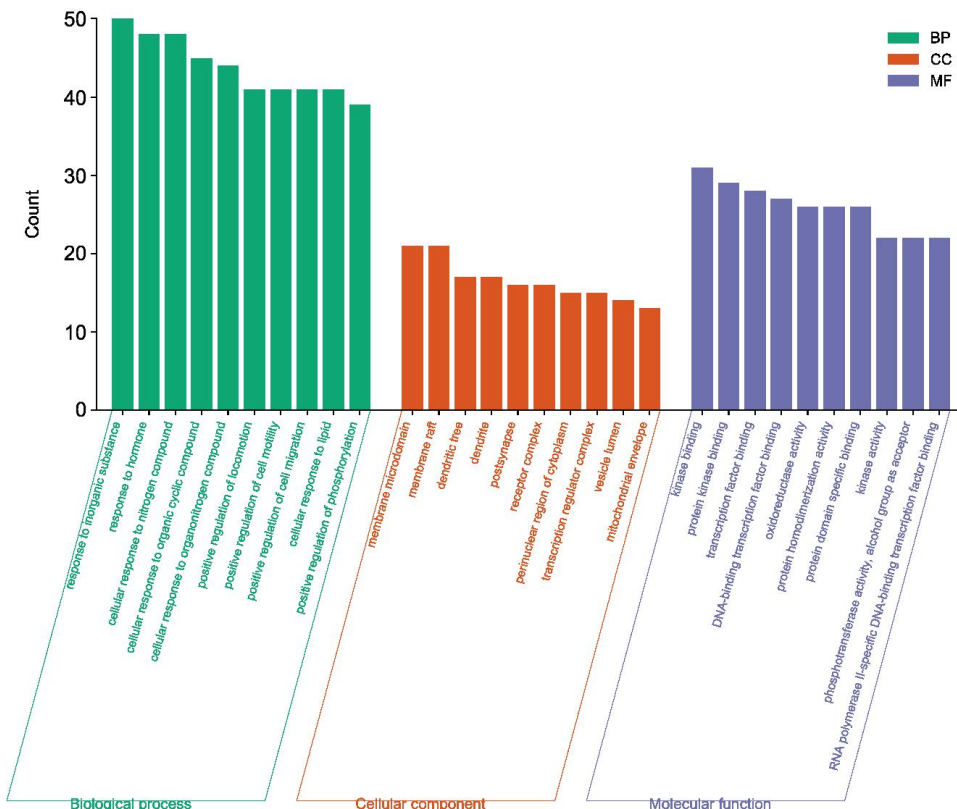


图 3 青光安 II 号方治疗青光眼靶点的 GO 富集分析结果

Fig.3 GO enrichment analysis results of glaucoma target treated by Qinguang'an II Formula

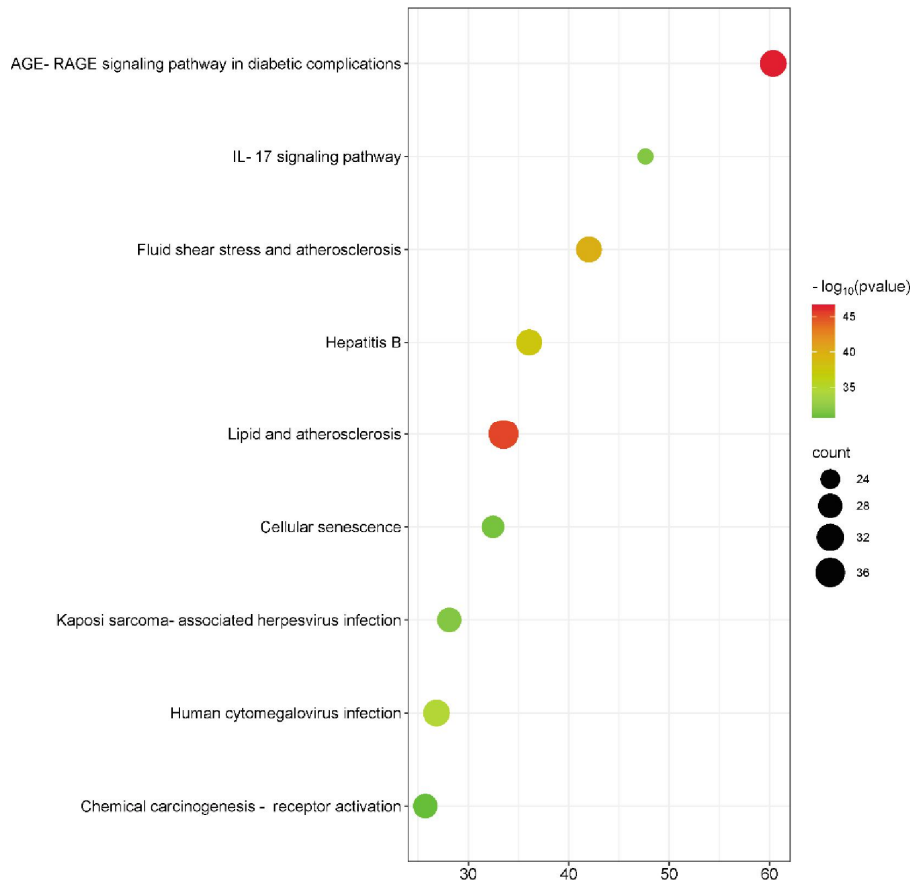


图 4 青光安 II 号方治疗青光眼靶点的 KEGG 富集分析结果

Fig.4 KEGG enrichment analysis results of glaucoma target treated by Qingguang'an II Formula

注:横坐标为通路中靶点在总靶点中的数量,纵坐标为 P 值;节点数量越多,点直径越大;P 值越小,颜色越红。

表 2 各组小鼠给药前后眼压比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Intraocular pressure comparison between mice before and after administration in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药前(38 周龄)	给药后(42 周龄)
空白组	13.73±1.23	13.66±1.10
模型组	24.89±1.10 ^{##}	24.50±1.43 ^{##}
益脉康组	25.10±1.26 ^{##}	16.86±1.41 ^{##~^}
青光安 II 号方低浓度组	25.03±1.42 ^{##}	17.65±0.92 ^{##~^}
青光安 II 号方中浓度组	24.97±1.47 ^{##}	16.56±1.07 ^{##~^}
青光安 II 号方高浓度组	25.06±1.29 ^{##}	16.29±1.41 ^{##~^}

注:与给药前相比,^{##} $P < 0.01$;与空白组相比,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{~^} $P < 0.01$ 。

3.6 青光安 II 号方对小鼠视网膜形态结构的影响

空白组小鼠视网膜各层组织结构致密有序,视网膜神经节细胞排列有序,细胞形态完整;模型组小鼠视网膜各层组织分离,结构紊乱,神经节细胞层可见较多空泡,神经节细胞数量减少、大小不等,视网膜各层厚度均变薄;与模型组相比,益脉康组及青光安 II 号方低、中、高浓度组小鼠视网膜均可见不同程

度的改善,神经节细胞层内空泡减少,视网膜增厚;其中青光安 II 号方高浓度组改善较为明显,视网膜各层结构相对致密,神经节细胞明显增多,细胞膜较为完整,细胞核清晰。详见图 5。

3.7 青光安 II 号方对小鼠视网膜组织 SIRT1、PGC-1 α mRNA 的影响

与空白组相比,模型组、益脉康组和青光安 II 号方低、中浓度组视网膜中 SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达量显著降低($P < 0.01$);与模型组相比,用药组 SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达量均显著升高($P < 0.01$);与益脉康组相比,青光安 II 号方低浓度组 PGC-1 α mRNA 表达量均显著升高($P < 0.01$),青光安 II 号方中、高浓度组 SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达量显著升高($P < 0.01$);与青光安 II 号方低浓度组相比,青光安 II 号方中、高浓度组 SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达量显著升高($P < 0.01$);与青光安 II 号方中浓度组相比,青光安 II 号方高浓度组 PGC-1 α mRNA 表达量显著升高($P < 0.01$)。详见表 3。

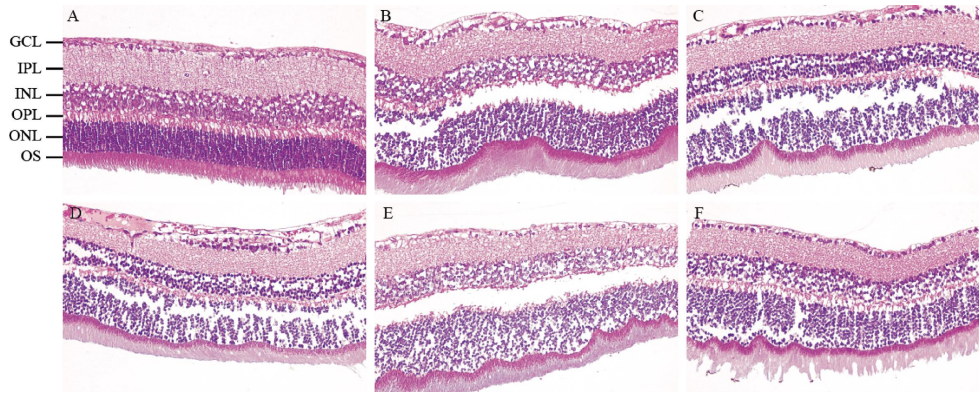


图5 各组视网膜形态(HE染色,×400)

Fig.5 Retinal morphology of each group (HE staining, ×400)

注:A.空白组;B.模型组;C.益脉康组;D.青光安Ⅱ号方低浓度组;E.青光安Ⅱ号方中浓度组;F.青光安Ⅱ号方高浓度组;GCL.神经节细胞层。

表3 各组视网膜 SIRT1、PGC-1α mRNA 表达量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Comparison of mRNA expressions of SIRT1 and PGC-1α in retina in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	SIRT1	PGC-1α
空白组	0.89±0.06	0.96±0.03
模型组	0.12±0.02 [#]	0.12±0.01 [#]
益脉康组	0.38±0.02 ^{#~}	0.29±0.03 ^{#~}
青光安Ⅱ号方低浓度组	0.42±0.04 ^{#~}	0.46±0.03 ^{#~***}
青光安Ⅱ号方中浓度组	0.70±0.02 ^{#~***▲▲}	0.58±0.04 ^{#~***▲▲}
青光安Ⅱ号方高浓度组	0.80±0.03 ^{#~***▲▲}	0.87±0.01 ^{#~***▲▲●●}

注:与空白组相比,[#] $P<0.01$;与模型组相比,[~] $P<0.01$;与益脉康组相比,^{**} $P<0.01$;与青光安Ⅱ号方低浓度组相比,^{▲▲} $P<0.01$;与青光安Ⅱ号方中浓度组相比,^{●●} $P<0.01$ 。

表4 各组视网膜 SIRT1、PGC-1α 蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Comparison of retinal SIRT1 and PGC-1α protein expressions in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	SIRT1	PGC-1α
空白组	1.13±0.01	1.01±0.02
模型组	0.14±0.01 [#]	0.12±0.01 [#]
益脉康组	0.37±0.02 ^{#~}	0.27±0.01 ^{#~}
青光安Ⅱ号方低浓度组	0.46±0.01 ^{#~***}	0.38±0.01 ^{#~***}
青光安Ⅱ号方中浓度组	0.55±0.02 ^{#~***▲▲}	0.41±0.01 ^{#~***}
青光安Ⅱ号方高浓度组	0.65±0.01 ^{#~***▲▲●●}	0.61±0.03 ^{#~***▲▲●●}

注:与空白组相比,[#] $P<0.01$;与模型组相比,[~] $P<0.01$;与益脉康组相比,^{**} $P<0.01$;与青光安Ⅱ号方低浓度组相比,^{▲▲} $P<0.01$;与青光安Ⅱ号方中浓度组相比,^{●●} $P<0.01$ 。

3.8 青光安Ⅱ号方对小鼠视网膜组织 SIRT1、PGC-1α 蛋白表达量的影响

与空白组相比,其余各组视网膜 SIRT1、PGC-1α 蛋白表达量显著降低($P<0.01$);与模型组相比,用药组 SIRT1、PGC-1α 蛋白表达量显著升高($P<0.01$);与益脉康组比较,青光安Ⅱ号方各浓度组 SIRT1、PGC-1α 蛋白表达量均显著升高($P<0.01$);与青光安Ⅱ号方低浓度组相比,青光安Ⅱ号方中、高浓度组 SIRT1 蛋白表达量均显著上升($P<0.01$),青光安Ⅱ号方高浓度组 PGC-1α 蛋白表达量显著上升($P<0.01$);与青光安Ⅱ号方中浓度组相比,青光安Ⅱ号方高浓度组 SIRT1、PGC-1α 蛋白表达量均显著上升($P<0.01$)。详见表4、图6。

4 讨论

中医学将青光眼视神经萎缩的阶段归属于“青

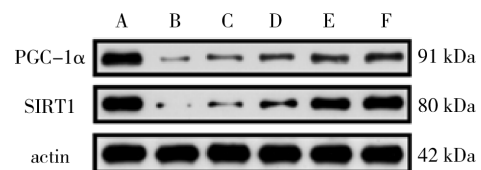


图6 各组视网膜 SIRT1、PGC-1α 蛋白电泳图

Fig.6 Electropherograms of SIRT1 and PGC-1α proteins in each group

注:A.空白组;B.模型组;C.益脉康组;D.青光安Ⅱ号方低浓度组;E.青光安Ⅱ号方中浓度组;F.青光安Ⅱ号方高浓度组。

盲”范畴,多责之于肝肾亏虚^[9]。诸多医家认为,肝肾与衰老之间有着紧密联系。青光安Ⅱ号方中枸杞子、女贞子、牛膝皆为滋补肝肾之品,黄芪为健脾化源之物,牛膝与灯盏细辛、川芎合用活血化瘀,川芎、黄芪相配利水行气,全方以补为主,补中寓通,共奏补益肝肾、活血利水之功,可有效延缓青光眼视神经的衰老退化。网络药理学研究显示,青光安Ⅱ号方和青光

眼的共同靶点主要富集在氧化应激、细胞衰老、转录因子结合等方面, PPI网络中PPARG、SIRT1为相互作用较强的靶点。沉默信息调节因子(silent information regulator type, SIRT)家族被称为“衰老基因家族”, SIRT1是其成员之一, 在眼组织中高度表达, 包括视网膜^[20]。YAMAN等^[21]发现, 与正常人相比, POAG和剥脱性青光眼患者小梁网组织中SIRT1明显下调; 纪舒昱等^[22]实验表明, 相比健康对照组, POAG患者小梁网组织中SIRT1和PGC-1 α 的表达量呈下降趋势。本研究中模型组小鼠视网膜中SIRT1、PGC-1 α mRNA表达及蛋白表达较空白组亦明显降低。进一步证实了SIRT1、PGC-1 α 表达活性的下调可能是青光眼发病因素之一。这可能与神经细胞衰老相关, 机体内SIRT1的表达会随年龄增加逐渐下降, 而SIRT1的表达水平可直接影响神经细胞的寿命^[23]。

与模型组相比, 给药组SIRT1、PGC-1 α mRNA表达及蛋白表达均升高; 与益脉康组相比, 青光安II号方各浓度组PGC-1 α mRNA表达量及SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达量均显著升高, 青光安II号方中、高浓度组SIRT1 mRNA表达量显著升高。与青光安II号方低浓度组相比, 青光安II号方中、高浓度组SIRT1、PGC-1 α mRNA表达量及SIRT1蛋白表达量显著升高, 青光安II号方高浓度组PGC-1 α 蛋白表达量显著上升; 与青光安II号方中浓度组相比, 青光安II号方高浓度组PGC-1 α mRNA表达量及SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达量均显著升高。尽管Western blot和qRT-PCR的检测结果并不完全一致, 但总体具有协同性。SIRT1是线粒体生物合成信号通路中的关键蛋白^[24]。PGC-1 α 位于SIRT1的下游区域, 既是核转录共激活因子, 又是调节线粒体生物发生的重要因子^[25]。且PGC-1 α 为PPARG的辅助激活因子, PPARG基因定位于3p25, 是重要的细胞分化转录因子, 主管细胞分化及能量代谢^[26]。SIRT1/PGC-1 α 信号通路被称作是细胞的“能量感应网络”, 涵盖了线粒体功能调节、能量输出等环节^[27]。SIRT1激活剂会增加受压的RGC-5细胞中的琥珀酸脱氢酶的表达, 并促进PGC-1 α 的脱乙酰化影响氧化应激和减少线粒体呼吸功能, 从而抑制视网膜神经元细胞的死亡^[28]。线粒体存在于细胞核内, 以ATP的形式为机体提供能量, 以满足其细胞需求, 是细胞内产生“精气”的单位^[29]。激活SIRT1/PGC-1 α 信号通路类似于中医所

谓“补虚”之法, 如同青光安II号方补益肝肾以温煦气化之源。本次实验结果提示, 青光安II号方上调SIRT1、PGC-1 α 效果优于益脉康分散片, 可能与药物组成的功效相关, 益脉康分散片中活血化瘀药物居多, “通”的作用较强, 而青光II号“补中寓通”, 补益肝肾作用强于益脉康分散片, 因此调节能量的“补虚”作用较强。

本研究发现, 与给药前相比, 给药后青光安II号方低、中、高浓度组小鼠眼压后均降低; 与模型组相比, 给药组小鼠眼压均降低。慢性青光眼患者通常存在血液循环障碍、房水流通障碍等“血水同病”的特点, 需血水同治, 活血药与利水药相配伍可改善微循环, 加速房水循环, 降低眼压^[30-31]。青光安II号方中牛膝和灯盏细辛可活血化瘀, 川芎和黄芪可行气利水, 提示青光安II号方降低小鼠眼压的作用可能与活血行气利水功效有关。视网膜形态、厚薄程度及RGC数量等指标对评价视神经保护剂有重要价值^[32]。本研究中, 与模型组相比, 给药组DBA/2J小鼠视网膜均可见不同程度的改善, 视网膜神经节细胞层内空泡减少, 视网膜增厚, 其中以青光安II号方高浓度组改善较为显著。说明青光安II号方可有效改善小鼠视网膜形态结构损害, 防止RGC的丢失, 从而保护视神经。

综上, 网络药理学与体内实验研究表明, 青光安II号方可抑制RGC的丢失, 对视神经有保护作用, 其机制可能与激活SIRT1/PGC-1 α 信号通路、调控氧化应激或衰老过程相关。但由于选用的数据库有限, 活性成分、靶点更新相对缓慢, 筛选方式局限, 无法完全纳入药物治疗疾病的所有靶点。本实验还需进一步与临床实验进行相互验证, 以进一步明确青光安II号方发挥视神经保护作用的机制。

参考文献

- [1] ZHANG Y C, JIN G M, FAN M, et al. Time trends and heterogeneity in the disease burden of glaucoma, 1990–2017: A global analysis[J]. *Journal of Global Health*, 2019, 9(2): 020436.
- [2] 张纯, 吴倩如, 张嶙, 等. 青光眼性视神经损伤的非压力依赖因素[J]. *中华眼科杂志*, 2020, 56(7): 549–556.
- [3] CHRYSOSTOMOU V, TROUNCE I A, CROWSTON J G. Mechanisms of retinal ganglion cell injury in aging and glaucoma[J]. *Ophthalmic Research*, 2010, 44(3): 173–178.
- [4] 李银鑫, 欧晨, 周亚莎, 等. 彭清华教授采用青光安II号方治

- 疗青光眼中晚期视神经损害[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(12): 113-116.
- [5] 曾志成, 李银鑫, 秦惠钰, 等. 青光安 II 号方有效组分对慢性高血压 DBA/2J 小鼠视网膜神经节细胞的保护作用及机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(12): 1973-1981.
- [6] 秦惠钰, 曾志成, 李银鑫, 等. 青光安 II 号方及其有效组分对 DBA/2J 小鼠视网膜 Ras、MEK 及 ERK 蛋白表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(5): 738-742.
- [7] 蒋鹏飞, 彭俊, 曾志成, 等. 青光安 II 号方治疗青光眼的分子机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 4219-4222.
- [8] 姚小磊, 时健, 刘倩宏, 等. 青光安 II 号方对诱导损伤的 RGC-5 细胞中 NF- κ B/HIF-1 α 通路相关细胞因子的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(7): 992-997.
- [9] 李银鑫, 蒋鹏飞, 曾志成, 等. 青光安 II 号方有效组分对青光眼模型 DBA/2J 小鼠视网膜中 RhoA、ROCK 及 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(6): 673-678.
- [10] 周亚莎, 徐剑, 彭俊, 等. 青光安 II 号对慢性高血压模型大鼠视网膜 GSK-3 β 及 β -catenin mRNA 表达影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(10): 1049-1051.
- [11] 刘悦, 周亚莎, 徐剑, 等. 青光安 II 号方对慢性高血压大鼠视网膜热休克蛋白的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2017, 27(5): 281-285.
- [12] LUO H D, ZHOU M, JI K B, et al. Expression of sirtuins in the retinal neurons of mice, rats, and humans[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2017, 9: 366.
- [13] 杨艳敏, 张克交, 张彦栋, 等. 线粒体 Sirtuins 在疾病中的作用及天然激活剂的研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(30): 132-135.
- [14] 梁荣斌, 吴康瑞, 邵毅. Sirtuins 在眼科疾病中的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2020, 20(5): 831-833.
- [15] WHITAKER R M, CORUM D, BEESON C C, et al. Mitochondrial biogenesis as a pharmacological target: A new approach to acute and chronic diseases[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2016, 56: 229-249.
- [16] 赵艳, 张进. 益脉康分散片联合甲钴胺治疗原发性开角型青光眼的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(7): 2115-2118.
- [17] 吴凯, 陈立浩, 时健, 等. 青光安颗粒剂对 DBA/2J 小鼠视网膜中自噬途径相关蛋白表达的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2022, 32(6): 434-439.
- [18] 贺石林, 王健, 王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2006: 48-49.
- [19] 汤丹月, 柳成刚. 青盲源流考[J]. 中国中医眼科杂志, 2020, 30(2): 128-131.
- [20] JAMMAL A A, THOMPSON A C, MARIOTTONI E B, et al. Impact of intraocular pressure control on rates of retinal nerve fiber layer loss in a large clinical population[J]. *Ophthalmology*, 2021, 128(1): 48-57.
- [21] YAMAN D, TAKMAZ T, YÜKSEL N, et al. Evaluation of silent information regulator T (SIRT) 1 and Forkhead Box O (FOXO) transcription factor 1 and 3a genes in glaucoma[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(12): 9337-9344.
- [22] 纪舒昱, 钟华, 李雷, 等. SIRT1、PGC-1 α 在原发性开角型青光眼患者小梁网组织中的表达及意义[J]. 眼科新进展, 2019, 39(3): 250-254.
- [23] YEO E J. Hypoxia and aging[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2019, 51(6): 1-15.
- [24] CHEN C, ZHOU M, GE Y C, et al. SIRT1 and aging related signaling pathways[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2020, 187: 111215.
- [25] 文超越, 段叶辉, 李颖慧, 等. 能量感应网络 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 对骨骼肌纤维类型转化调节[J]. 动物营养学报, 2016, 28(1): 57-63.
- [26] 王玲, 刘恒, 张楠, 等. PPAR γ 基因 rs1801282 位点多态性与 2 型糖尿病视网膜病变的相关性[J]. 锦州医科大学学报, 2023, 44(1): 63-69.
- [27] BALAIYA S, ABU-AMERO K K, KONDKAR A A, et al. Sirtuins expression and their role in retinal diseases[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2017: 3187594.
- [28] ZHOU Y, CAI L J, XU L H, et al. The role of sirt1 in the retinal ganglion cells cultured by high glucose[J]. *International Ophthalmology*, 2021, 41(3): 845-852.
- [29] 郑敏麟, 阮诗玮. 中医藏象实质细胞生物学假说之一: “脾”与线粒体[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(5): 10-12.
- [30] 蒋鹏飞, 沈志华, 周亚莎, 等. 活血化痰中药在青光眼中的应用进展[J]. 江西中医药, 2019, 50(2): 68-71.
- [31] 彭清华. 活血利水法治疗慢性高血压临床体会[J]. 实用中医药杂志, 1994(6): 12-13.
- [32] 刘红倩. 基于 NGF/ASK1/FoxO1 与 NGF/AKT/CREB 通路研究 RGCs 凋亡机制及补肾活血法的干预效应与作用机制[D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.

(本文编辑 田梦妍)