

基于网络药理学和分子对接探讨黄芪甲苷治疗糖尿病视网膜病变的作用机制

于乃馨, 李国琼, 李标, 许扬*

(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的:利用网络药理学和分子对接探讨黄芪甲苷治疗糖尿病视网膜病变的作用机制,为创新药物开发和作用机制研究提供依据。方法:利用成分靶点数据库(SwissTargetPrediction)和靶点数据库平台(Targetnet)筛选出黄芪甲苷的潜在靶点,在人类基因数据库(GeneCards)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)和药物靶标数据库(TTD)中检索糖尿病视网膜病变的相关靶点。将黄芪甲苷潜在靶点和糖尿病视网膜病变相关靶点进行重合,交集靶点即为黄芪甲苷治疗糖尿病视网膜病变可能的作用靶点。随后进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络建立、基因本体论(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。最后使用Autodock Vina软件进行分子对接分析。在此基础上,运用实验研究对发现的结合力最强的关键靶点信号传导通路进行了验证。结果:黄芪甲苷的作用靶点和糖尿病视网膜病变的交集靶点共56个,经过PPI网络分析获得排名前5位的关键靶点为蛋白激酶B1(Akt1)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、表皮生长因子受体(EGFR)、非受体酪氨酸蛋白激酶(Src)、信号转导和转录激活因子3(STAT3)。分子对接分析验证显示,黄芪甲苷与上述5个关键靶标受体的亲和力较强。实验研究表明,黄芪甲苷通过Akt/Nrf2/HO-1和Akt/糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)信号通路的调控,抑制了高糖引起的视网膜色素上皮细胞的损伤。结论:黄芪甲苷的潜在靶点与糖尿病视网膜病变的相关靶点高度相关,表明黄芪甲苷具有多靶点、多途径治疗糖尿病视网膜病变的潜在作用。

[关键词] 黄芪甲苷; 糖尿病视网膜病变; 网络药理学; 分子对接分析; 分子机制

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0209-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220716 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220328.1616.007.html>

[网络出版日期] 2022-03-29 10:58

Mechanism of Astragaloside IV in Treating Diabetic Retinopathy Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

YU Naixin, LI Guoqiong, LI Biao, XU Yang*

(The Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To reveal the pharmacological mechanisms of astragaloside IV (AS-IV) in treating diabetic retinopathy based on network pharmacology and molecular docking and to provide reference for new drug development and mechanism research. **Method:** Potential targets of AS-IV were obtained from SwissTargetPrediction and Targetnet. The targets of diabetic retinopathy were screened using GeneCards, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and Therapeutic Target Database. The targets of AS-IV and diabetic retinopathy were intersected by Venny 2.1.0. STRING platform and Cytoscape 3.7.2 were used to construct protein-protein interaction (PPI) network and screen core targets, respectively. Then, Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed.

[收稿日期] 2022-01-10

[基金项目] 北京协和医学院学科建设项目(清华211-201920100902)

[第一作者] 于乃馨,在读硕士,从事中药药理学及创新中药研究,E-mail:1337517880@qq.com

[通信作者] *许扬,研究员,从事中药药理学及创新中药研究,E-mail:vascular888@126.com

Furthermore, the binding affinity of AS-IV to key target receptors was assessed by molecular docking with Autodock Vina, and the key target signaling transduction pathway was **Result:** A total of 56 intersected targets of AS-IV and diabetic retinopathy were found, and the top five key targets were obtained through PPI network analysis: protein kinase B (Akt) 1, vascular endothelial growth factor A (VEGFA), epidermal growth factor receptor (EGFR), Src and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Molecular docking verified the strong binding affinity of AS-IV to the five key target receptors. In addition, *in vitro* tests have been confirmed that AS-IV attenuated high glucose-induced injury in human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 by regulating Akt/Nrf2/HO-1 and Akt/glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) signaling pathways. **Conclusion:** There was a significant overlap in the targets of AS-IV and diabetic retinopathy. The key targets and pathways may reveal the main pharmacological mechanism of AS-IV in the treatment of diabetic retinopathy.

[Keywords] astragaloside IV; diabetic retinopathy; network pharmacology; molecular docking; molecular mechanism

糖尿病视网膜病变(DR)是一种慢性眼病,由于糖尿病的流行而迅速增长。DR是糖尿病视网膜微血管损伤的结果,可导致糖尿病视网膜缺血、血管通透性增加、视网膜新生血管增生和糖尿病黄斑水肿。在全球范围内,糖尿病的患病率正在迅速增加,已成为全球重大的公共卫生问题,而DR是糖尿病患者主要的并发症之一,随糖尿病患者病程的延长,患病率和致盲率均增加。据1项中国DR患病率的荟萃分析^[1],糖尿病人群中DR的患病率为22.4%。在DR发生早期,通常加强血糖控制、降压或降脂来减缓DR的进展或诱导消退。而在临床上确诊的DR患者中,大多已出现影响生活质量的微血管症状,治疗的难度较大,有效的手段缺乏。目前的治疗方法包括玻璃体内注射、激光光凝和玻璃体切除术,这些都是侵入性的治疗手段,疗效的不确定性和手术风险是困扰临床治疗的一大问题^[2]。抗血管内皮生长因子疗法的出现在DR患者治疗中虽显示出显著的临床益处,然而,大多数患者未能实现具有临床意义的视力改善^[3]。因此,迫切需要开发新的治疗方法以解决临床治疗中的难题。

寻找有效的中医药防治手段,将为DR的防治开辟新的途径。中药黄芪具有利水消肿、补气固表、健脾补中的作用,在我国最早的本草学著作《神农本草经》中就已记载,药用历史达两千多年,是一种药用价值很高的传统中药。糖尿病在中医中属于“消渴病”范畴,用于治疗糖尿病的院内制剂降糖消脂片中,黄芪为君药之一得到应用^[4]。前期的研究表明,降糖消脂片对于链脲佐菌素诱导的大鼠DR具有明显地抑制作用^[5]。另外,全小林等使用黄芪为主药辨治多种糖尿病并发症^[6],包括黄芪桂枝五物汤及乌头汤治疗糖尿病周围神经病变、黄芪建

中汤治疗糖尿病性胃轻瘫、防己黄芪汤治疗糖尿病合并痛风及桂枝加黄芪汤治疗糖尿病泌汗异常,可见含有黄芪的经方在治疗糖尿病及其并发症中的显著疗效和巨大价值。黄芪甲苷(AS-IV)是中药黄芪的主要活性成分之一。AS-IV有多种药理作用,如抗炎、抗氧化损伤、免疫调节、血糖调节、抗肿瘤、抗病毒等。已经有研究发现AS-IV对糖尿病小鼠的DR有一定的抑制作用^[7],表明AS-IV对人DR的治疗具有潜在的价值。本研究运用网络药理学和分子对接方法,研究了AS-IV治疗DR可能的作用机制,并对网络药理学的发现进行了实验验证,将为寻找防治DR的创新药物和进一步的作用机制研究提供指导性依据。

1 材料和方法

1.1 AS-IV的潜在作用靶点筛选 从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[8]数据库中获得AS-IV的化学结构线性 Canonical Smiles号,并导入成分靶点数据库(SwissTargetPrediction, <http://www.swisstargetprediction.ch/>)^[9]中并选择选择物种为人类 Homo sapiens,获得AS-IV的潜在作用靶点。然后再将AS-IV的 Canonical Smiles号输入 TargetNet (<http://targetnet.scbdd.com/>)中,选择 prob>0的基因,并利用 UniProt(<https://www.uniprot.org/>)^[10]规范 TargetNet中的靶点。合并2个数据库的靶点,并删除重复靶点。

1.2 DR的相关靶点预测 在人类基因数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>)^[11]数据库中输入“Diabetic retinopathy”,求得基因得分中位数为2.099 320 173,取中位数之前的基因^[12]。在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org/>)^[13]和药物靶标数据库(TTD, <http://db.idrblab.net/>)

ttd/)^[14]中输入“Diabetic retinopathy”获取基因,合并3个数据库的靶点信息并去除重复靶点。

1.3 AS-IV和DR交集靶点获取、蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络建立和关键靶点的筛选 利用Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)对获得的AS-IV作用靶点和DR靶点进行重合,绘制韦恩图取交集,即可以获取AS-IV治疗DR的潜在靶点。然后将得到的交集靶点上传至STRING 11.0 (<https://www.string-db.org/>)平台,将物种限定为“Homo sapiens”,在设置中选择隐藏网络中断开的节点,导出构建AS-IV靶标-DR靶标的PPI网络图,并下载tsv文件,导入Cytoscape 3.7.2^[15]软件,根据度值(Degree)筛选关键靶点,排名前5的为关键靶点。

1.4 基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将AS-IV和DR的共有靶点进行GO的生物过程(BP)、分子功能(MF)、细胞组分(CC)富集。使用R 4.0.3软件,引用STRINGI 4.0.3数据包,安装clusterProfiler 4.0.3, enrichplot 4.0.3, ggplot2软件包进行GO富集分析及绘制气泡图,将校正 $P < 0.05$ 的项目进行筛选。然后对共有靶点进行KEGG通路富集分析,使用R 4.0.3,引用STRINGI 4.0.3数据包,安装并引用clusterProfiler软件包后,进行气泡图绘制,将校正 $P < 0.05$ 的项目进行筛选。

1.5 分子对接分析 使用Autodock Vina 1.2^[16]进行分子对接。

1.6 细胞实验

1.6.1 材料 人视网膜色素上皮细胞(中国典型培养物保藏中心,批号ARPE-19);AS-IV(上海吉至生化科技有限公司,批号A70100-1g);胎牛血清(美国Gibco公司,批号16000-044);葡萄糖(美国Sigma公司,批号G7021-100G);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒(日本株式会社同仁化学研究所,批号xy5015);核染色试剂盒(Hoechst 33342)、磷酸盐(PBS)缓冲液、青-链霉素混合液(100×)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为B8040-25、P1020-500、P1400);培养基(DMEM/F12)(美国Hyclone公司,批号SH30023.01B);0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号25200-056);血红素酶-(HO-1)抗体(美国CST公司,批号70081S,1:1 000);核因子E2相关因子2(Nrf2)抗体(美国Abcam公司,批号ab137550,1:1 000);蛋白激酶B(Akt)抗体、磷酸化(p)-Akt抗体、糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)抗体、

(p)-GSK-3 β 抗体[美国CST公司,批号分别为4691S(1:1 000)、4060S(1:1 000)、12456T(1:1 000)、5558T]; β -肌动蛋白(actin)内参抗体(Easybio公司,批号BE0022,1:1 000);山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(康为世纪生物科技有限公司,批号CW0103S,1:2 000)。MCO-18AC型二氧化碳培养箱(日本松下公司);CKX41型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);MQX200型酶标仪(美国Bio Tek Instrument公司);ChemiDOC™型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);TS-2000A型脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);MP-300V型电泳仪和转膜仪(美国Major Science公司)。

1.6.2 CCK-8检测细胞活性 确定AS-IV最佳作用浓度时,根据课题组前期预实验^[17]和相关研究^[18],将细胞分为空白组(正常培养基)、模型组(葡萄糖,50 mmol·L⁻¹)、AS-IV+模型组(50 mmol·L⁻¹葡萄糖+5 μ mol·L⁻¹AS-IV组、50 mmol·L⁻¹葡萄糖+10 μ mol·L⁻¹AS-IV组和50 mmol·L⁻¹葡萄糖+20 μ mol·L⁻¹AS-IV组)。每孔加入CCK-8 10 μ L,孵育后使用酶标仪检测其在450 nm下的吸光度 A ,通过计算获得细胞活力。

1.6.3 细胞核形态检测 将细胞分为空白组(正常培养基)、AS-IV组(AS-IV 10 μ mol·L⁻¹)、模型组(葡萄糖 50 mmol·L⁻¹)、AS-IV+模型组(葡萄糖 50 mmol·L⁻¹+AS-IV 10 μ mol·L⁻¹)。采用Hoechst 33342细胞核荧光染色法。细胞经处理后,用PBS清洗,加入无血清培养基稀释的Hoechst 33342染色液,细胞培养箱中避光染色15 min,用PBS清洗干净多余染料,然后利用荧光显微镜拍照,并统计视野中细胞核形态异常和总细胞个数。

1.6.4 蛋白提取定量和蛋白免疫印迹法(Western bolt)分析 提取蛋白并定量,进行Western blot实验。电泳时,起始电压设为85 V,约30 min,将电压调整至120 V,电泳约1 h后结束。然后转膜1.5 h,5%的脱脂奶粉液室温下在摇床上封闭,封闭后快洗3次,加入一抗,放于冰箱4 $^{\circ}$ C,过夜。回收一抗,用TBST慢洗PVDF膜3次,每次15 min。在室温下,加入二抗,于摇床上孵育2 h。结束后,回收二抗,用TBST洗膜快洗3次,慢洗3次。最后用显影剂处理,利用凝胶成像系统进行扫描显影。使用Image J对显影后的蛋白条带进行统计分析,并使用Photoshop进行图像处理。

1.6.5 统计学分析 所有实验均至少重复3次,两组间采用 t 检验比较,多组采用单因素方差分析

(One-way ANOVA), 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AS-IV的潜在靶点分析 在 SwissTargetPrediction 和 TargetNet 数据库平台中导入 Pubchem 数据库获取 AS-IV 的 Canonical Smiles 号, 并删除重复靶点, 一共得到 109 个 AS-IV 的潜在作用靶点。

2.2 DR 的相关基因分析 在 GeneCards, OMIM 和 TTD 这 3 个数据库中输入“Diabetic retinopathy”, 这一步共获取 DR 靶点 2 241 个, 其中 GeneCards 中获得了 2 005 个, OMIM 中获得了 228 个, TTD 中获得了 8 个。

2.3 AS-IV 防治 DR 的潜在靶点和 PPI 网络建立 通过 Venny 2.1.0 一共获得 56 个 AS-IV 作用靶点和 DR 相关靶点交集; 将交集靶点上传至 STRING 11.0, 获得蛋白相互作用网络。使用 Cytoscape 3.7.2 制作 AS-IV 治疗 DR 蛋白靶点-通路相互作用图; 然后对交集靶点进行分析, 计算 Degree 均值, Degree 值大于均值的为关键靶点, 一共 24 个。通常选择排名前 5 的靶点进行分子对接, 前 5 个靶点的信息见表 1。相关图谱见增强出版附加材料。

表 1 AS-IV 治疗 DR 的前 5 个关键靶点基本信息
Table 1 Critical targets of AS-IV for DR

基因名	中介中心性	紧密中心性	Degree
Akt1	0.214 721 277	0.739 726 027	36
EGFR	0.109 581 065	0.692 307 692	34
VEGFA	0.121 671 982	0.683 544 304	32
SRC	0.066 137 389	0.650 602 410	28
STAT3	0.010 321 165	0.562 500 000	20

2.4 AS-IV 治疗 DR 的相关靶点 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析 GO 富集一共得到 1 149 条生物过程, 74 项分子功能相关, 22 项细胞组成相关。将每一部分最显著的前 10 条功能进行气泡图的展示。AS-IV 治疗 DR 的靶点主要在蛋白激酶 B 的调节, 蛋白激酶 B 信号通路, 蛋白激酶 B 的正向调节等。KEGG 总共富集到 114 条信号通路。将最显著的前 20 条通路通过气泡图进行展示。AS-IV 治疗 DR 可能涉及到 PI3K/Akt 信号通路, 碳水化合物在体内的消化吸收和代谢, AGE/RAGE 信号通路等。相关图谱见增强出版附加材料。

2.5 分子对接分析 通过分子对接分析以评估 AS-IV 与关键靶标受体的结合亲和力。结果表明,

AS-IV 与 Akt1、EGFR、VEGFA、SRC、STAT3 的结合自由能 $-16.2 \sim -12.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal} \approx 4.186 \text{ J}$), 见表 2。结合自由能越低, 表示结合亲和力越高, 表明 AS-IV 与这 5 个关键靶标受体的结合亲和力较强。

表 2 AS-IV 与关键蛋白分子对接结合自由能
Table 2 Affinity molecular docking of AS-IV

靶点名称	PDB ID	结合能/ $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$
Akt1	6HHG	-16.2
EGFR	5X28	-12.2
VEGFA	3P9W	-12.0
SRC	1KSW	-15.1
STAT3	6TLC	-13.6

2.6 实验结果

2.6.1 AS-IV 对葡萄糖损伤的 ARPE-19 细胞的保护作用 在葡萄糖模型为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、AS-IV 浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率为 $(75.9 \pm 3.3)\%$, 与模型组比较细胞活力明显提高 ($P < 0.05$); 当 AS-IV 浓度提高至 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞存活率为 $(75.0 \pm 4.5)\%$, 细胞活力和模型组比较也有明显提高 ($P < 0.05$), 见表 3。实验结果表明 AS-IV 对葡萄糖引起的细胞活力下降具有保护作用, 可明显提高细胞存活率。但 AS-IV $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 给药后对葡萄糖损伤的 ARPE-19 细胞活力的提升水平差异无统计学意义, 因此后续的实验以 AS-IV $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为给药浓度。

表 3 AS-IV 对高糖损伤 ARPE-19 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

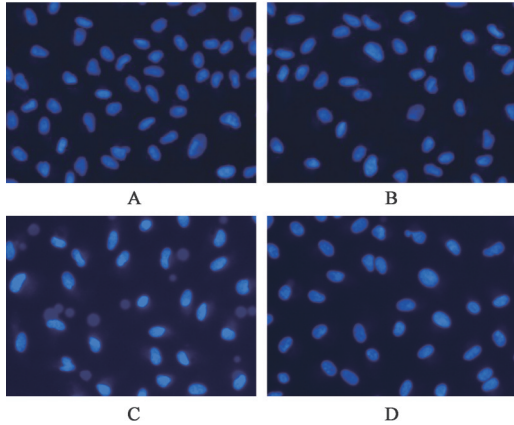
Table 3 Effect of AS-IV on ARPE-19 cells on viability by high-glucose ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	细胞存活率/%
空白组		100±0.9
模型组	$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	62.6±2.5 ¹⁾
AS-IV+模型组	$5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	65.2±3.8 ¹⁾
	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	75.9±3.3 ²⁾
	$20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	75.0±4.5 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 4 和表 5 同)

2.6.2 AS-IV 对葡萄糖损伤的 ARPE-19 细胞核形态的影响 利用 Hoechst 33342 对细胞核进行荧光染色, 空白组细胞核形态大部分正常, 均匀淡蓝着色; 模型组细胞核形态发生改变, 细胞核内可以看见明亮蓝着色的凋亡小体; 而 AS-IV 预给药能显著改善细胞核的形态, 形态失常的细胞核数量少于模型

组,密亮蓝着色的凋亡小体的数量也少模型组,表明AS-IV能够抑制葡萄糖引起的细胞核损伤。见图1和表4。



注:空白组(正常培养基);B. AS-IV组(AS-IV, 10 μmol·L⁻¹); C. 模型组(葡萄糖 50 mmol·L⁻¹); D. AS-IV+模型组(葡萄糖 50 mmol·L⁻¹+AS-IV, 10 μmol·L⁻¹)(图2同)

图1 AS-IV对高糖诱导的细胞核形态改变的影响(Hoechst 33342, ×400)

Fig. 1 AS-IV reversed the changes in high-glucose induced ARPE-19 cells apoptosis(Hoechst 33342, ×400)

表4 AS-IV对高糖损伤的ARPE-19细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of AS-IV on ARPE-19 cells on apoptosis by high-glucose ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	异常细胞比例/%
空白组		5.8±0.6
AS-IV组	10 μmol·L ⁻¹	4.5±1.5
模型组	50 mmol·L ⁻¹	19.3±2.0 ¹⁾
AS-IV+模型组	10 μmol·L ⁻¹ +50 mmol·L ⁻¹	10.2±1.3 ²⁾

2.6.3 AS-IV对Akt/Nrf2/HO-1及Akt/GSK-3β信号通路相关蛋白表达的影响 Nrf-2是一种转录因子,通过调节下游靶蛋白的表达来调控细胞功能状态,

HO-1便是其下游蛋白之一。而Akt信号通路可调节Nrf2的活性,Akt的磷酸化可以增强下游Nrf2的活性,Nrf2的活性增强,其下游蛋白HO-1的表达增加,从而参与细胞功能状态的调节。利用Western blot检测AS-IV对相关蛋白表达的影响,模型组蛋白HO-1和Nrf-2的表达与正常组比较明显减少($P<0.05$);AS-IV干预给药后,抗氧化蛋白HO-1和Nrf-2的表达与模型组比较明显升高,AS-IV组蛋白HO-1和Nrf-2的表达量分别增加至1.83和1.38倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。GSK-3β是位于PI3K/Akt的下游的蛋白,属于丝氨酸/苏氨酸激酶,参与细胞功能的调节,如能量代谢、细胞生长和凋亡。研究结果表明,AS-IV干预处理明显增加了ARPE-19细胞p-Akt和p-GSK的表达,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见图2和表5。

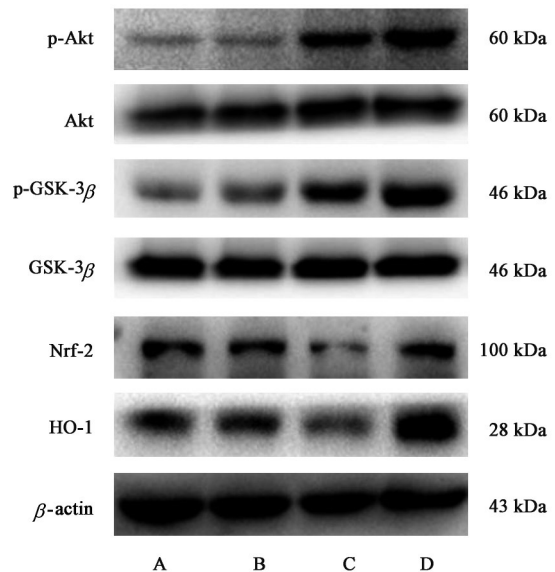


图2 Akt/Nrf-2/HO-1及Akt/GSK-3β信号通路蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of Akt/Nrf-2/HO-1 and Akt/GSK-3β pathway related protein expression

表5 AS-IV对高糖损伤的ARPE-19细胞Akt/Nrf-2/HO-1及Akt/GSK3β信号通路蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of AS-IV on Akt/Nrf-2/HO-1 and Akt/GSK3β pathway in high-glucose stimulated ARPE-19 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	Nrf-2/β-actin	HO-1/β-actin	p-Akt/Akt	p-GSK-3β/GSK-3β
空白组		100	100	100	100
AS-IV组	10 μmol·L ⁻¹	93.2±8.9	96.9±2.2	113.5±19.9	109.6±16.6
模型组	50 mmol·L ⁻¹	74.9±2.2 ¹⁾	63.1±3.3 ¹⁾	183.5±28.8 ¹⁾	150.7±23.0 ¹⁾
AS-IV+模型组	10 μmol·L ⁻¹ +50 mmol·L ⁻¹	137.1±11.0 ^{1,2)}	87.1±1.5 ^{1,2)}	250.4±28.7 ^{1,2)}	209.3±26.6 ^{1,2)}

3 讨论

AS-IV通过多靶点、多通路在许多糖尿病并发症中有潜在的治疗作用^[19],如糖尿病酮症酸中

毒^[20],糖尿病心肌病^[21],糖尿病肾病^[22]和DR^[7],也可以促进糖尿病患者伤口的愈合^[23]。但AS-IV抑制DR的机制仍不明确。

本研究通过网络药理学和分子对接,发现了AS-IV治疗DR的5个密切靶点,分别为Akt1、VEGFA、EGFR、SRC、STAT3。分子对接验证分析表明,AS-IV与这5个密切靶点的结合力均较强。文献报道已表明,Akt1已被证明在胰岛素敏感组织中表达,通过诱导下游分子如葡萄糖转运蛋白去增强葡萄糖摄取,最终调节葡萄糖代谢^[24-26],缺乏Akt1会损害VEGF表达、伤口血管生成和随后的脉管系统成熟^[27]。另外,Akt相关的信号通路与DR有着紧密关联,如促红细胞生成素通过Src/Akt/cofilin信号传导通路在实验性DR中保护内部血视网膜屏障^[28],MiR-19a抑制剂通过PTEN/Akt/p-Akt信号通路改善大鼠DR^[29],人参皂苷Rg₁通过激活IRS-1/Akt/GSK-3 β 信号传导而产生糖尿病视网膜神经变性的神经保护作用^[30]。VEGF家族有5个成员,分别为VEGFA~VEGF E和胎盘生长因子,人体中最常见的是VEGF-A,来自动脉、静脉和淋巴管的微血管和大血管内皮细胞,VEGF抑制剂或抗VEGF药物已被证明在DR的治疗中非常有效^[31-34]。EGFR是一种受体酪氨酸激酶,在视网膜色素上皮和视网膜周细胞中高度表达^[35-36]。有研究表明EGFR抑制剂可以抑制DR小鼠的炎症浸润和血管生成^[37]。特异性Src家族激酶抑制可能对视网膜血管病变有效^[38],可能是预防和治疗晚期糖基化终产物相关微血管病变的合适靶点^[39]。抑制STAT3信号通路可减缓DR大鼠模型的视力丧失^[40]。

GO富集分析表明,AS-IV治疗DR的靶点主要在Akt1信号通路,Akt1的正向调节。同时,KEGG通路富集分析显示AS-IV治疗DR可能涉及到PI3K/Akt信号通路。而Akt1在分子对接中与AS-IV结合力最强,综合以上网络药理学的分析结果,在验证实验中,对Akt相关信号通路进行了细胞水平的详细研究。选择人视网膜色素上皮细胞来源的细胞株(ARPE-19)作为研究对象,因为在生理上,视网膜色素上皮细胞形成外层血-视网膜屏障,控制细胞代谢物与脉络膜血管的能量及营养交换,该细胞的损伤及功能障碍与DR的发生和发展有着密切的联系^[41]。通过实验验证表明,在高糖诱导的ARPE-19细胞损伤模型中,AS-IV预处理提高了Akt蛋白的磷酸化水平,激活Nrf-2进入细胞核,调控下游蛋白HO-1表达的增加,抑制高糖诱导ARPE-19细胞的损伤。同时,AS-IV预处理促进Akt的磷酸化也增加了下游的GSK-3 β 蛋白的表达,共同参与细胞存活的调控。

尽管以前的研究对AS-IV应用于DR治疗的直接证据尚不充分,但通过网络药理学研究显示了AS-IV对于DR具有潜在的治疗作用,并阐明了作用的靶点。实验验证也表明,AS-IV通过调控Akt/Nrf2/HO-1及Akt/GSK-3 β 信号通路,对高糖损伤的ARPE-19细胞具有明显的保护作用。本研究结果将为AS-IV治疗DR的新药研发和深入的机制研究提供指导性依据。

本文的实验验证进行了细胞水平的研究,还应该结合相应的DR动物模型进行深入的探讨。另外,对于网络药理学和分子对接发现的AS-IV治疗DR的具有密切关联的5个靶点中,通过实验研究验证了AS-IV对第一位靶点Akt1的表达及其相关蛋白表达的影响,余下4个靶点中,AS-IV是否具有调控作用还需要进一步确证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 邓宇轩,叶雯青,孙艳婷,等. 中国糖尿病视网膜病变患病率的荟萃分析[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(48):3846-3852.
- [2] ELKJAER A S, LYNNGE S K, GRAUSLUND J. Evidence and indications for systemic treatment in diabetic retinopathy: A systematic review [J]. Acta Ophthalmol, 2020, 98(4):329-336.
- [3] WANG W, LO A. Diabetic retinopathy: Pathophysiology and treatments [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6):1816.
- [4] 葛争艳,金龙,闫爱国,等. 降糖消脂片对糖尿病动物降糖作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16):143-146.
- [5] LI L, LI Y L, ZHOU Y F, et al. Jiangtang Xiaozhi Recipe (降糖消脂方) prevents diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(6):425-432.
- [6] 赵天宇,郭敬,王明琦,等. 全小林以黄芪为主药辨治糖尿病并发症经验[J]. 山东中医杂志, 2015, 34(11):871-873.
- [7] DING Y, YUAN S, LIU X, et al. Protective effects of astragaloside IV on db/db mice with diabetic retinopathy [J]. PLoS One, 2014, 9(11):e112207.
- [8] WANG Y, XIAO J, SUZEK T O, et al. PubChem's bioassay database [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(Database issue):D400-D412.
- [9] GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. Nucleic

- Acids Res, 2014, 42(Web Server issue): W32-W38.
- [10] UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D480-D489.
- [11] FISHILEVICH S, NUDEL R, RAPPAPORT N, et al. GeneHancer: Genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards[J]. *Database (Oxford)*, 2017, doi: 10. 1093/database/bax028.
- [12] 戚明珠, 张锐雪, 苏晓慧, 等. 黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的网络药理学[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(3): 163-170.
- [13] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCHIETTECATTE F, et al. OMIM. org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (Database issue) : D789-D798.
- [14] WANG Y, ZHANG S, LI F, et al. Therapeutic target database 2020: Enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D1031-D1041.
- [15] OTASEK D, MORRIS J H, BOUÇAS J, et al. Cytoscape automation: Empowering workflow-based network analysis[J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 185.
- [16] RENTZSCH R, RENARD B Y. Docking small peptides remains a great challenge: An assessment using AutoDock Vina [J]. *Brief Bioinform*, 2015, 16(6): 1045-1056.
- [17] 周云丰, 李琳, 葛争艳, 等. 黄芪甲苷对甲基乙二醛诱导的人视网膜色素上皮细胞损伤的保护作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(7): 915-921.
- [18] XI X, YANG Y, MA J, et al. MiR-130a alleviated high-glucose induced retinal pigment epithelium (RPE) death by modulating TNF- α /SOD1/ROS cascade mediated pyroptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109924.
- [19] 尤良震, 林逸轩, 方朝晖, 等. 黄芪甲苷治疗糖尿病及其并发症药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(24): 4700-4706.
- [20] DENG L L. Astragaloside IV as potential antioxidant against diabetic ketoacidosis in juvenile mice through activating JNK/Nrf2 signaling pathway [J]. *Arch Med Res*, 2020, 51(7): 654-663.
- [21] WANG Z, ZHU Y, ZHANG Y, et al. Protective effects of AS-IV on diabetic cardiomyopathy by improving myocardial lipid metabolism in rat models of T2DM [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110081.
- [22] LEI X, ZHANG L, LI Z, et al. Astragaloside IV/ lncRNA-TUG1/TRAF5 signaling pathway participates in podocyte apoptosis of diabetic nephropathy rats [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 2785-2793.
- [23] LUO X, HUANG P, YUAN B, et al. Astragaloside IV enhances diabetic wound healing involving upregulation of alternatively activated macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 35: 22-28.
- [24] ZHANG Z, LIU H, LIU J. Akt activation: A potential strategy to ameliorate insulin resistance [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 156: 107092.
- [25] KANG C, LEROITH D, GALLAGHER E J. Diabetes, obesity, and breast cancer [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(11): 3801-3812.
- [26] YU N, FANG X, ZHAO D, et al. Anti-diabetic effects of Jiang Tang Xiao Ke granule via PI3K/Akt signalling pathway in type 2 diabetes KKAY mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0168980.
- [27] SOMANATH P R, CHEN J, BYZOVA T V. Akt1 is necessary for the vascular maturation and angiogenesis during cutaneous wound healing [J]. *Angiogenesis*, 2008, 11(3): 277-288.
- [28] XIE H, ZHANG C, LIU D, et al. Erythropoietin protects the inner blood-retinal barrier by inhibiting microglia phagocytosis via Src/Akt/cofilin signalling in experimental diabetic retinopathy [J]. *Diabetologia*, 2021, 64(1): 211-225.
- [29] ZHANG X L, LIU Z. MiR-19a inhibitor improves diabetic retinopathy in rats through PTEN/Akt/p-Akt signaling pathway [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(2): 509-515.
- [30] YING Y, ZHANG Y L, MA C J, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg₁ against hyperphosphorylated Tau-induced diabetic retinal neurodegeneration via activation of IRS-1/Akt/GSK3 β signaling [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(30): 8348-8360.
- [31] AJLAN R S, SILVA P S, SUN J K. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinal disease [J]. *Semin Ophthalmol*, 2016, 31(1/2): 40-48.
- [32] 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.
- [33] STRIGLIA E, CACCIOPPO A, CASTELLINO N, et al. Emerging drugs for the treatment of diabetic retinopathy [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2020, 25(3): 261-271.
- [34] HANNA R M, BARSOUM M, ARMAN F, et al. Nephrotoxicity induced by intravitreal vascular endothelial growth factor inhibitors: Emerging

- evidence[J]. *Kidney Int*, 2019, 96(3):572-580.
- [35] BIKBOV M M, KHALIMOV T A, CERRADA-GIMENEZ M, et al. Compatibility of intravitreally applied epidermal growth factor and amphiregulin[J]. *Int Ophthalmol*, 2021, 41(6):2053-2063.
- [36] FEINER R C, PENNÈ I, MÜLLER B, et al. EGF-mCherry fusion protein expressed in *E. coli* shows product heterogeneity but a high biological activity[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(8):1043-1047.
- [37] JU X, YANG X, YAN T, et al. EGFR inhibitor, AG1478, inhibits inflammatory infiltration and angiogenesis in mice with diabetic retinopathy[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46(1):75-85.
- [38] SERGEYS J, VAN HOVE I, HU T T, et al. The retinal tyrosine kinome of diabetic Akimba mice highlights potential for specific Src family kinase inhibition in retinal vascular disease[J]. *Exp Eye Res*, 2020, 197:108108.
- [39] LI P, CHEN D, CUI Y, et al. Src plays an important role in AGE-induced endothelial cell proliferation, migration, and Tubulogenesis[J]. *Front Physiol*, 2018, 9:765.
- [40] VANLANDINGHAM P A, NUNO D J, QUIAMBAO A B, et al. Inhibition of Stat3 by a small molecule inhibitor slows vision loss in a rat model of diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(4):2095-2105.
- [41] ANTONETTI D A, SILVA P S, STITT A W. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(4):195-206.

[责任编辑 顾雪竹]

·书讯·

泌尿系结石术后尿源性脓毒血症的发生和防治 ——评《泌尿外科微创技术与临床诊疗》

我国近年来泌尿系结石的发病率逐年增加,成为世界上三大结石高发区。泌尿系结石按发生部位分为肾结石、输尿管结石、膀胱结石和尿道结石四个部位结石,其中以肾结石和输尿管结石最为常见。大部分肾结石是没有症状的,如果患者的结石停留时间过长,会导致积水,会造成肾功能受损。其治疗方法,根据肾结石或输尿管结石的大小、部位、结石程度及感染程度采取个体化治疗。即便现阶段医学水平已经能够改善患者病情症状,但患者通过去除结石,梗阻解除后,结石伴随的症状得以控制,会导致术后并发症。现阶段随着微创技术的不断发展,尿路结石的治疗由传统的开放手术转为微创手术治疗。经皮肾镜取石碎石术、输尿管镜碎石术和输尿管软镜碎石术得到了广泛应用。尿源性脓毒血症是泌尿系统结石术后早期最严重的并发症,发生率虽低,但死亡率极高。脓毒血症通常发生在结石相关手术术后6h之内。在泌尿外科微创手术指南引导下,为防止术后并发症的发生,预防和治疗对于改善患者预后、提升手术疗效、减少并发症的发生和蔓延有着重要的作用。

《泌尿外科微创技术与临床诊疗》由刘光泉主编,湖北科学技术出版社2018年出版。该书主要介绍了泌尿外科基础理论,包括泌尿系统解剖与生理、泌尿外科常见症状、体格检查、实验室检查、影像学检查等。上尿路梗阻性病变是尿源性脓毒症发病原因,其中最常见病因是尿路结石,尿源性脓毒症患者起因于尿路梗阻,患者接受泌尿外科治疗后发展为尿源性脓毒症。泌尿系结石腔镜手术后尿源性脓毒血症的预防,术前尿培养阳性患者,使用敏感的抗菌药物治疗使尿液无菌;尿培养阴性患者,上尿路结石患者尿常规见白细胞,但无临床症状,在平时不需要抗生素治疗;如需手术治疗,一般要求使用抗生素治疗2~3d,并复查尿常规。术中预防措施包括留取肾盂尿及结石进行细菌培养、肾盂压力的控制、手术时间的控制、进行中心静脉置管术、合理应用利尿剂、保证引流管通畅、可以适时终止手术。术后2h血常规白细胞的下降是尿脓毒血症的早期预警因子,文献报道尿路结石术后2h白血细胞降至 2.85×10^9 个/L时,出现尿源性感染中毒性休克的敏感性为95.9%,特异性为92.7%。可以通过监测白血细胞变化来早期发现并进行积极地早期治疗。泌尿系结石腔镜手术后尿源性脓毒血症的治疗,尿源性脓毒症的治疗需要联合治疗,包括维持血压、呼吸等生命支持、抗感染治疗和去除病因。由于尿源性脓毒症起病和进展迅速,其治疗也存在黄金时间,治疗启动时间愈早,对提高患者生存率愈有利。液体和电解质平衡是对脓毒症患者进行管理的一个重要部分,尤其当并发脓毒症休克时。术中、术后尿源性脓毒血症仍有发生,能否早期识别和及时处理是患者治愈的关键。尿源性脓毒血症主要使用抗菌消炎、清凉解毒等方法进行治疗。维持呼吸循环稳定,发病6h是复苏的重要时间点,争取在这个时间内改善尿源性脓毒症所致的循环低灌注状态。解除梗阻,引流尿液,有利于症状的恢复和缓解,这是治疗的关键组成部分,存在梗阻的尿脓毒血症单纯通过药物极难控制,即使在生命体征不稳定的情况下及时解除梗阻,感染可得到迅速控制,但风险较大,操作前需得到患者家属充分的理解和配合。对于结石感染合并明显梗阻的患者,可先置入输尿管支架管或者肾造瘘管引流,待感染控制后再二期手术治疗结石,术后再给予足量的敏感抗生素;术中应遵循“见脓就停”的原则,即发现脓性絮状物应立即停止手术,同时置入支架管引流;术中使用大口径软镜输送鞘,有助于降低肾盂内压力;术中灌注的原则,在维持视野清晰的前提下,尽量保持低压,低流量灌注。对于手术后尿源性脓毒血症及早的抗感染和解除梗阻在治疗中起关键作用。

《泌尿外科微创技术与临床诊疗》是泌尿外科微创手术的入门书籍,其实用性和指导性强,知识内容可供各级泌尿外科领域医护人员及研究生阅读使用,适合泌尿外科医师、医学院校的学生学习与参考。

(作者胡赛峰,浙江省永康市中医院,浙江永康321300)