

· 数据挖掘 ·

# 枸杞子-丹参药对治疗视网膜色素变性的分子机制探讨

宋厚盼<sup>1,2,3</sup>, 曾梅艳<sup>2</sup>, 彭俊<sup>3,4</sup>, 陈小娟<sup>1,2</sup>, 陈新怡<sup>1,2</sup>, 何卫波<sup>1,2</sup>, 杨毅敬<sup>3,4</sup>, 蔡雄<sup>1</sup>, 彭清华<sup>1,3,4\*</sup>

(1. 湖南中医药大学中医诊断研究所, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学中医学院, 长沙 410208;  
3. 湖南中医药大学中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病湖南省重点实验室, 长沙 410208;  
4. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

**[摘要]** 目的:基于网络药理学和生物信息学方法探讨枸杞子-丹参(LFSMR)药对治疗视网膜色素变性(RP)的分子机制。**方法:**通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)筛选和预测LFSMR药对可能的入血活性成分和作用靶点;通过疾病基因数据库挖掘视网膜色素变性相关的基因靶点;采用功能蛋白联合网络数据库(String)绘制成分-靶点和疾病-靶点的蛋白质-蛋白质交互作用(PPI)网络,并取这两个网络的交集;运用注释、可视化和整合发现数据库(DAVID)对交集网络进行基因本体和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析;采用cytoHubba分析筛选关键靶点。**结果:**在TCMSP数据库共检索出与LFSMR相关的活性成分390个,根据药代动力学参数筛得活性成分110个,进一步筛选获得19个入血活性成分,并检索出与这些成分相关的靶点208个;从疾病基因数据库获得与RP直接相关的基因206个;成分靶点和疾病靶点PPI网络取交集后得到79个基因;这些基因主要涉及蛋白自体磷酸化、转录调节、细胞增殖等生物学过程,分子功能主要涉及三磷酸腺苷结合、转录因子活性、核心启动子结合等,富集于核质、转录因子复合物、细胞核、细胞质等区域,主要与神经营养素信号通路、细胞周期相关通路,Wnt信号通路有关;进一步分析筛选得到LFSMR治疗RP的8个关键性基因靶点。**结论:**LFSMR药效作用的物质基础为多孔甾醇、丹参酮II<sub>A</sub>等19个入血活性成分,其治疗RP的关键靶点包括E2F转录因子1(E2F1),视网膜母细胞瘤基因1(RB1)等8个基因,主要作用机制与调控神经营养素信号通路、细胞周期相关通路等信号网络有关。

**[关键词]** 视网膜色素变性; 枸杞子; 丹参; 网络药理学; 生物信息学; 分子机制

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0199-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191205

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190228.1718.007.html>

**[网络出版时间]** 2019-03-01 16:20

## Molecular Mechanism of Lycii Fructus and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma in Treatment of Retinitis Pigmentosa

SONG Hou-pan<sup>1,2,3</sup>, ZENG Mei-yan<sup>2</sup>, PENG Jun<sup>3,4</sup>, CHEN Xiao-juan<sup>1,2</sup>, CHEN Xin-yi<sup>1,2</sup>,  
HE Wei-bo<sup>1,2</sup>, YANG Yi-jing<sup>3,4</sup>, CAI Xiong<sup>1</sup>, PENG Qing-hua<sup>1,3,4\*</sup>

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM) Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. Key Laboratory of TCM for Prevention and Treatment of Eye, Ear, Nose and Throat Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 4. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

**[收稿日期]** 20181205(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81804150, 81703920);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目(ZK1801YK015);湖南省教育厅创新平台开放基金项目(16K065);中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);长沙市科技计划项目(kc1704005);湖南省中医药管理局科研项目(201780);湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科开放基金优先项目(2015ZYD02)

**[第一作者]** 宋厚盼,博士,讲师,从事中西医结合防治眼科疾病研究、脾胃病病证研究,Tel:0731-88459435,E-mail:hpsong2015@126.com

**[通信作者]** \*彭清华,博士,教授,博士生导师,主要从事中西医结合防治青光眼、眼底病和中医局部诊法的研究,Tel:0731-88458010,E-mail:pqh410007@126.com

**[Abstract]** **Objective:** To explore the molecular mechanism of Lycii Fructus and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma (FLRSM) in the treatment of retinitis pigmentosa (RP) based on network pharmacology and bioinformatics. **Method:** Possible intake active components and targets of FLRSM were screened out and predicted by traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP). Gene targets related to RP were mined through disease gene databases. Protein-protein interaction (PPI) network of component-targets and disease-targets were mapped by functional protein association networks (STRING), and the intersection of the two networks was obtained. The gene ontology and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway of the intersection network were analyzed by the database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID). CytoHubba analysis was used to screen out the key targets. **Result:** A total of 390 active ingredients related to FLRSM were retrieved from TCMSP. According to pharmacokinetic parameters, 110 active ingredients were screened out, 19 active ingredients were further screened out, and 208 targets related to these constituents were retrieved. Totally 206 genes directly related to RP were obtained from the disease gene databases. And 79 genes were obtained from the intersection of PPI networks of component targets and disease targets. These genes mainly involved in biological processes, such as protein autophosphorylation, transcriptional regulation and cell proliferation, and the molecular functions mainly involved adenosine triphosphate binding, transcription factor activity, core promoter binding, and were enriched in nuclear, transcription factor complex, nucleus, cytoplasm and other regions. It was mainly related to neurotrophin signaling pathway, cell cycle related pathway and Wnt signaling pathway. And 8 key gene targets for FLRSM treatment of RP were identified by further screening. **Conclusion:** The material basis of pharmacodynamic action of FLRSM involves 19 active ingredients, such as porous sterol and tanshinone II<sub>A</sub>. The key targets of FLRSM in the treatment of RP include 8 genes, such as E2F transcription factor 1 (E2F1) and retinoblastoma gene1 (RB1). The main mechanism is related to the regulation of neurotrophin signaling pathways, cell cycle related pathways and other signaling networks.

**[Key words]** retinal pigmentation; Lycii Fructus; Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; network pharmacology; bioinformatics; molecular mechanism

视网膜色素变性(RP)是一组以视网膜光感受器(视锥细胞和视杆细胞)退化及视网膜色素上皮功能丧失为主要特征的进行性可致盲的遗传性眼底疾病。其主要临床症状表现为进行性视野缺损,夜盲,视神经乳头蜡黄或苍白,赤道部或后极部出现骨细胞样色素沉着,视网膜电图明显异常或无波形等<sup>[1]</sup>。RP通常为双眼发病,多起病于青少年时期,30~40岁年龄段症状明显加重,40~50岁时可见显著视力损害甚至全盲。

RP在世界范围内的发病率从1:7 000~1:1 878不等,平均发病率接近1:4 000,我国的发病率为1:3 784。当前全球约有300万RP患者,其中我国患病人数约为75万,受累家庭的直系成员数量将近1 200万<sup>[2]</sup>。RP的发病机制十分复杂,在遗传和表型上都具有明显的异质性,尽管目前已经发现了一些与RP有关的致病基因,但在已鉴定的这些致病基因中,只能解释5%左右的原发性视网膜色素变性(PR)和60%左右的家族遗传型视网膜色素变性(FRP),仍有很多未知的致病基因未被

识别<sup>[3]</sup>。

RP至今尚无有效的预防和治愈方法。中医学认为本病可归属于“鸡盲”“雀盲”“雀目”“高风雀目”“雀目内障”“高风内障”等范畴。历代医家对本病的病因病机已达成共识,即先天禀赋不足、肝肾精血虚损、脾胃运化失调、血脉凝滞不通是本病发生的关键因素。补虚活血是中医眼科治疗RP的重要治法<sup>[4]</sup>。枸杞子(Lycii Fructus, LF)性甘平质滋润,具有滋补肝肾、养血益精、明目的功效<sup>[5]</sup>;丹参(Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma, SMR)味苦寒性降泄,具有活血调经、凉血消痈、清心安神的功效,广泛应用于各种血瘀证,是活血化瘀的要药<sup>[6]</sup>。本课题组长期临证经验表明,枸杞子是治疗RP中药里具有代表性的补虚药物之一,丹参是治疗RP中药里具有代表性的活血药物之一。枸杞子补血生精,丹参活血祛瘀通血脉,血脉通则气血畅,丹参有助于枸杞子养血益精,濡养目睛微血管;枸杞子滋补肝肾,扶正养血,血为气之母,气为血之帅,气行则血行,气血充沛可助丹参祛除目睛瘀血,亦可防止

丹参祛邪伤正。枸杞子-丹参(LFSMR)配伍,攻补兼施,标本兼治,是中医眼科临床治疗 RP 常用的、相对固定的 2 味药的配伍组合(即药对)。

尽管临床报道已经表明 LFSMR 治疗 RP 具有显著的疗效,可有效缓解 RP 患者视力减退,改善患者视功能,但有关 LFSMR 治疗 RP 效应分子机制的研究较少。本文旨在通过网络药理学和生物信息学方法,挖掘出 LFSMR 药对的主要活性成分和作用靶点,预测其治疗 RP 的关键基因,并对这些基因进行功能富集分析和关键蛋白互作网络研究,从而探讨 LFSMR 治疗 RP 的分子机制,为 RP 的临床防治研究提供线索思路,为中医药或中西医结合临床治疗 RP 的推广运用提供科学依据。

## 1 资料与方法

**1.1 资料** 网络图像化软件 Cytoscape(3.6.1 版本);中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP);功能性蛋白连接网络数据库 STRING(10.5 版本);注释、可视化和整合发现数据库(DAVID 6.8);药物银行(DrugBank);在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM);治疗靶点数据库(TTD);遗传关联数据库(GAD);药物遗传学和药物基因组学知识库(PharmGKB)。

**1.2 LFSMR 药对入血活性成分筛选及其作用靶点预测** 基于吸收(absorption),分布(distribution),代谢(metabolism)及排泄(excretion)参数,在 TCMSP 数据库中查找 LFSMR 的所有化学成分数据。依据药物口服生物利用度(OB)  $\geq 30\%$ ,药物相似性(DL)  $\geq 0.18$  的原则,筛选其中可能的入血活性成分。同时,运用 TCMSP 数据库中“Related Targets”模块,预测 LFSMR 药对入血活性成分的作用靶点,以 Cytoscape 软件构建 LFSMR 入血活性成分-靶点网络图,以“节点(Node)”表示分子和靶蛋白,以“边(Edge)”表示成分与靶点之间的作用关系,可视化分析成分-靶点相互作用的关系

**1.3 检索已知与 RP 发病明确相关的基因** 以“Retinitis pigmentosa”或“pigmentary degeneration of retina”为关键词,在 DrugBank, OMIM, TTD, GAD, PharmGKB 五大疾病数据库检索当前已知的与 RP 发病明确相关的基因靶点。

**1.4 LFSMR 药对治疗 RP 的基因靶点分析** 药物的有效成分在机体发挥效应的方式不仅依靠其直接作用于靶点,其中还包括很多间接作用于其他靶点的方式。机体疾病的产生和防治受各种复杂信号网络调控,不同的信号通路之间存在交互作用,上下

游靶点之间亦存在信号传导。通过构建蛋白质-蛋白质交互作用网络(PPI),可清晰呈现靶点与靶点之间直接、间接的调控关系。将 LFSMR 活性成分作用靶点和 RP 疾病靶点导入 STRING(Version 10.5)进行 PPI 网络绘制,运用 Cytoscape 3.6.1 软件(版本 6.8)对上述绘制好的两个 PPI 网络融合,提取交集网络,得到 LFSMR 药对治疗 RP 的直接或间接作用靶点。

**1.5 LFSMR 药对治疗 RP 的基因本体及通路富集分析** 基因本体(GO)是注释基因及其表达产物的常用方法,主要分为生物过程(BP),细胞组成(CC)和分子功能(MF)3 部分<sup>[7]</sup>。通过 GO 分析可以基本明了药物作用靶点(或差异表达基因)在哪些生物学功能、途径或者细胞定位方面进行富集,可帮助研究者发掘新的研究方向。京都基因与基因组百科全书(KEGG)可对药物作用靶点(或差异表达基因)进行信号通路分析,从而了解疾病过程中发生显著改变的信号通路,对于探索 LFSMR 药对作用机制具有重要意义<sup>[8]</sup>。本研究采用 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 在线工具,对 LFSMR 药对治疗 RP 的直接或间接作用靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,将  $P < 0.05$  和  $FDR < 0.05$  设定为显著性基因富集临界值,以 Term 和  $-\lg(P)$  值作图<sup>[9]</sup>。

**1.6 LFSMR 药对治疗 RP 的关键靶点筛选** 通过 Cytoscape 3.6.1 软件(版本 6.8)构建 LFSMR 药对治疗 RP 的直接或间接作用靶点生物学网络,并对其中的区域进行关联度分析,运用 cytoHubba 插件对关键基因(Hub 基因)进行分析,采用 MCC 算法,选取得分排列前 8 的基因,即为 LFSMR 治疗 RP 的关键基因(蛋白)。

## 2 结果

**2.1 LFSMR 药对生物活性成分筛选及药代动力学参数分析** 共检索出 LFSMR 药对的相关化学成分 390 个,依据药物代谢动力学(ADME)参数 OB 和 DL 进行筛选,其中满足  $OB \geq 30\%$  的化学成分 230 个,占有药物成分比例 50.26%;满足  $DL \geq 0.18$  的化学成分 196 个,占有药物成分比例 58.97%;同时满足  $OB \geq 30\%$  且  $DL \geq 0.18$  的化学成分 110 个,占有药物成分比例 28.21%(图 1,表 1)。经进一步检索、配对分析后,在 LFSMR 中筛选到 19 个有对应靶点的入血活性成分,分别为 1, 2, 5, 6-四氢丹参酮,多孔甾醇,柳杉酚,去氢丹参酮 II<sub>A</sub>,黄芩苷,木犀草素,2-异丙基-8-甲基菲-3,4-二酮,2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-(3-羟丙基)-7-甲氧

基-3-苯并呋喃甲醛,丹参新醌 d,鼠尾草酚酮,丹参酮 II<sub>A</sub>,谷甾醇 α<sub>1</sub>,豆甾醇,β-谷甾醇,α-颠茄碱,大豆黄素,6-氟吡啶-7-脱氢胆固醇,β-颠茄碱,槲皮素(表 2)。其中 OB 值最大的化学成分为 2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-(3-羟丙基)-7-甲氧基-3-苯并呋喃甲醛,DL 值最大的化学成分为谷甾醇 α<sub>1</sub>。

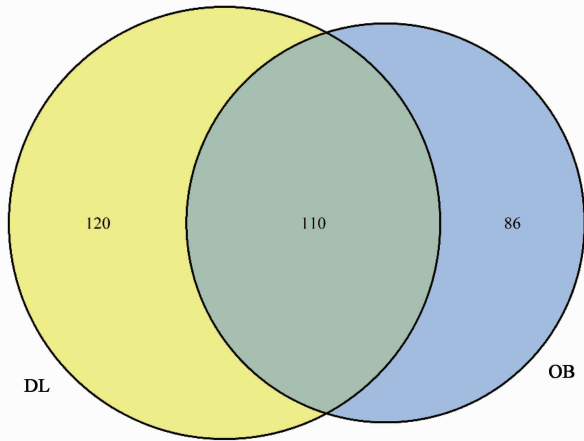


图 1 根据 ADME 参数筛选出的 LFSMR 药对生物活性成分分布韦恩

Fig. 1 Wayne diagram of distribution of bioactive components in LFSMR screened according to ADME parameters

表 1 符合筛选条件的 LFSMR 药对各成分数量及其所占比例  
Table 1 Quantity and proportion of components in LFSMR that meet screening criteria

药物	筛选条件		
	OB ≥ 30%	DL ≥ 0.18	OB ≥ 30% 且 DL ≥ 0.18
枸杞子 (FL)	90 (47.87%)	96 (51.06%)	45 (23.94%)
丹参 (RSM)	106 (52.48%)	134 (66.34%)	65 (32.18%)
LFSMR 药对	196 (50.26%)	230 (58.97%)	110 (28.21%)

**2.2 LFSMR 药对作用靶点预测及生物活性成分-靶点网络可视化分析** 基于 TCMSP 对上述药物活性成分的作用靶点进行检索,排除重复靶点,共获得预测靶点 208 个。运用 Cytoscape 3.6.1 对活性成分-靶点进行可视化分析,绘制网络关系图。图 2 结果显示,LFSMR 药对发挥药效作用的入血活性成分与其对应作用靶点的相互关系共 407 个。其中作用靶点最多的 3 个成分依次为 MOL000098(槲皮素),MOL000006(木犀草素)和 MOL001601(1,2,5,6-四氢丹参酮),效应靶点分别为 90 个,27 个和 16 个。

**2.3 与 RP 发生发展相关的靶点检索** 基于当前国际公认的 5 个汇集影响疾病发生发展密切相关的

基因数据库,从 DrugBank, OMIM, TTD, GAD, PharmGKB 数据库分别检索得到 0,183,2,46,17 个靶点,结合对 RP 靶点已有的研究和报道,剔除重复基因后,共筛选得到与 RP 密切相关的靶点基因 206 个。见表 3。

**2.4 LFSMR 治疗 RP 的 PPI 网络构建与靶点基因筛选** 运用 STRING 对 LFSMR 生物活性成分的基因靶点进行 PPI 网络构建,发现与其产生直接或间接作用的基因共 1 139 个,靶点与靶点之间的相互关系为 355 903 个。对与 RP 发生发展相关的靶点绘制 PPI 网络图,发现与其直接或间接相关的靶点为 276 个,靶点与靶点之间的相互关系为 71 034 个。运用 Cytoscape 对以上 2 个 PPI 网络图抽取交集网络,根据网络节点的拓扑属性进行筛选,发掘 79 个与 LFSMR 治疗 RP 相关的基因靶点,其中的相互作用关系共 546 个,筛选策略见图 3。

**2.5 LFSMR 治疗 RP 的机制分析** 依照 P 值由大到小排序,LFSMR 治疗 RP 的机制主要涉及泛素连接酶脱酰化反应、蛋白自体磷酸化、肽基丝氨酸磷酸化、调节转录、骨髓树突状细胞分化、细胞增殖等生物学过程;分子功能主要包括三磷酸腺苷结合,丝氨酸/苏氨酸激酶活性,转录辅激活蛋白活性,转录因子活性<sup>[10]</sup>,MAP 激酶活性,核心启动子结合<sup>[11]</sup>等;主要富集于 COP9 信号体,核质,转录因子复合物,TORC2 复合物,细胞核,细胞质等区域。KEGG 通路富集分析结果表明,LFSMR 治疗 RP 的机制主要涉及 MAPK 信号通路,破骨细胞分化相关信号通路,神经营养素信号通路<sup>[12]</sup>,细胞周期相关通路<sup>[13]</sup>,Wnt 信号通路,癌症通路相关信号分子等。部分结果与已证实的相关报道结果一致。见表 4。

**2.6 LFSMR 治疗 RP 的关键靶点筛选** 运用 cytoHubba 的 MCC 算法,筛选出 LFSMR 治疗 RP 的 8 个关键基因靶点,分别为 E2F1,TRRAP, TOPBP1, CDK3,TFDP2,TFDP1,E2F8,RB1。其中两个关键基因 E2F1<sup>[14]</sup>和 RB1<sup>[15]</sup>与已有的相关报道相吻合。见图 4。

### 3 讨论

视网膜色素变性是眼科遗传病门诊最常见的疾病。RP 发病早期可见视杆光感受器细胞变性,随后表现为内层视网膜细胞损伤与神经胶质细胞增生,晚期则表现为全层大片视网膜萎缩。RP 一般始于视杆细胞凋亡、损伤,随后视锥细胞亦受影响而发病。本病的主要临床症状表现为夜盲、进行性视野

表 2 LFSMR 药对入血生物活性成分

Table 2 Bioactive constituents of LFSMR in blood

编号	成分代码	化合物名称	OB 值	DL 值
1	MOL001601	1, 2, 5, 6-四氢丹参酮(1, 2, 5, 6-tetrahydrotanshinone)	38.75	0.36
2	MOL001659	多孔甾醇 (poriferasterol)	43.83	0.76
3	MOL002222	柳杉酚 (sugiol)	36.11	0.28
4	MOL002651	去氢丹参酮 II <sub>A</sub> (dehydrotanshinone II <sub>A</sub> )	43.76	0.4
5	MOL002776	黄芩苷 (baicalin)	40.12	0.75
6	MOL000006	木犀草素 (luteolin)	36.16	0.25
7	MOL007041	2-异丙基-8-甲基菲-3, 4-二酮(2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3, 4-dione)	40.86	0.23
8	MOL007050	2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-(3-羟丙基)-7-甲氧基-3-苯并呋喃甲醛[2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde]	62.78	0.4
9	MOL007093	丹参新醌 d (dan-shexinkum d)	38.88	0.55
10	MOL007145	鼠尾草酚酮 (salviolone)	31.72	0.24
11	MOL007154	丹参酮 II <sub>A</sub> (tanshinone II <sub>A</sub> )	49.89	0.4
12	MOL001323	谷甾醇 α <sub>1</sub> (sitosterol alpha1)	43.28	0.78
13	MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76
14	MOL000358	β-谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.75
15	MOL005406	α-颠茄碱 (αatropine)	45.97	0.19
16	MOL008400	大豆黄素 (glycitein)	50.48	0.24
17	MOL009644	6-氟吲哚-7-脱氢胆固醇(6-fluoroindole-7-dehydrocholesterol)	43.73	0.72
18	MOL009650	β-颠茄碱 (atropine)	42.16	0.19
19	MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28

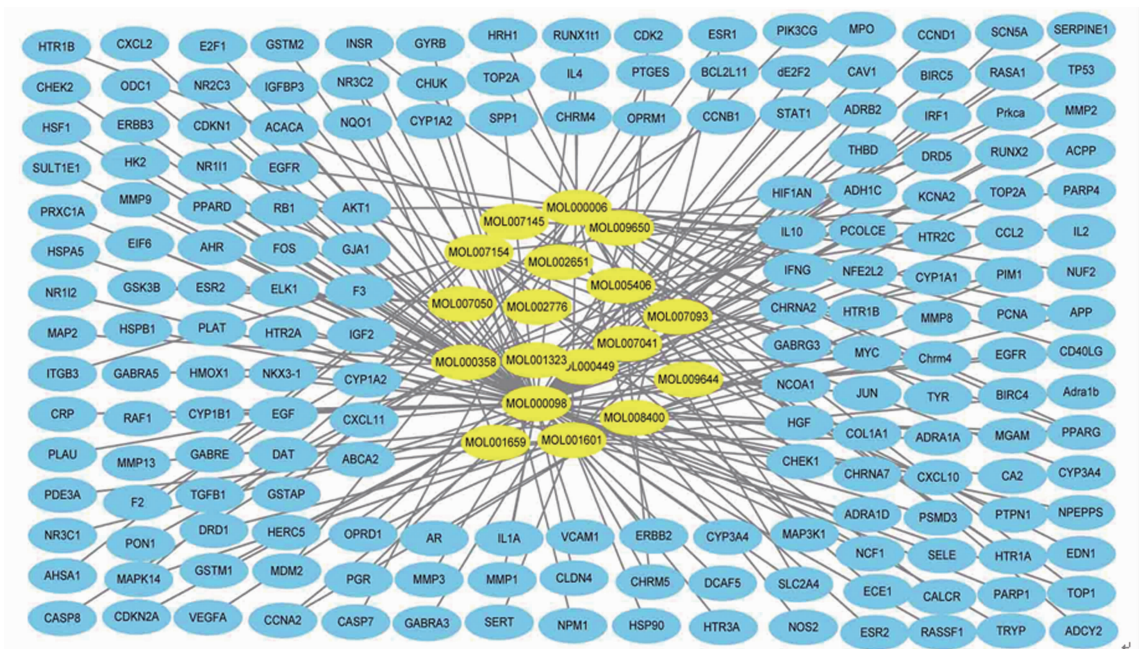


图 2 LFSMR 药对生物活性成分-作用靶点网络

Fig. 2 Network diagram of bioactive components and targets of LFSMR

表 3 与 RP 相关的基因靶点检索

Table 3 Retrieval results of RP-related gene targets

编号	数据库	基因靶点数量
1	DrugBank	0
2	OMIM	183
3	TTD	2
4	GAD	46
5	PharmGKB	17

损害(缩小)、视盘蜡黄或苍白、眼底色素骨细胞样沉积、视网膜电图明显异常甚至无波形。伴随视力的下降,患者本人及患者家庭的生活受到严重的影响。

作为眼科临床的疑难病症,由于其病因和发病机制尚未明确,现代医学对于 RP 至今尚无有效的根治方法。现阶段,RP 的主要治疗策略是延缓病情发展、预防并发症产生。当前采用较多的治疗方法

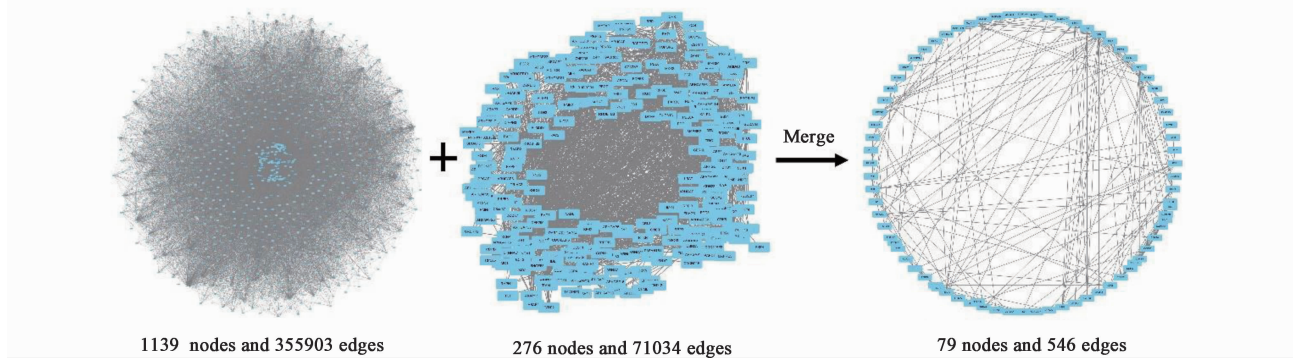


图 3 LFSMR 药对治疗 RP 的作用靶点筛选示意

Fig. 3 Diagram of screening method for targets of LFSMR in the treatment of RP

表 4 LFSMR 药对治疗 RP 靶基因 GO 富集及 KEGG 通路富集分析

Table 4 GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis of target genes in the treatment Of RP by LFSMR therapy

项目	编号	Term	Count	$-\log_{10}(P)$	Pop Hits	Fold Enrichment
Biological process	1	cullin deneddylation	9	7.10	9	169.64
	2	protein autophosphorylation	9	6.90	102	14.97
	3	peptidyl-serine phosphorylation	8	5.67	103	13.18
	4	regulation of transcription	13	4.47	509	4.34
	5	myeloid dendritic cell differentiation	4	3.84	18	37.70
	6	cell proliferation	5	2.21	126	6.73
Cellularcomponent	1	COP9 signalosome	9	6.58	30	54.85
	2	nucleoplasm	20	4.45	1 277	2.86
	3	transcription factor complex	7	3.65	160	8.00
	4	TORC2 complex	3	3.00	9	60.95
	5	nucleus	26	2.72	2 601	1.83
	6	cytoplasm	25	2.48	2 555	1.79
Molecular function	1	ATP binding	25	8.24	1 171	3.81
	2	serine/threonine kinase activity	9	4.60	218	7.36
	3	transcription coactivator activity	7	4.36	117	10.67
	4	transcription factor activity	4	3.91	18	39.62
	5	MAP kinase activity	3	3.75	4	133.71
	6	core promoter binding	4	2.71	45	15.85
KEGG pathway	1	MAPK signaling pathway	10	5.04	257	6.76
	2	Osteoclast differentiation	7	4.03	135	9.00
	3	Neurotrophin signaling pathway	6	3.24	123	8.47
	4	Cell cycle	5	2.28	126	6.89
	5	Pathways in cancer	8	2.26	392	3.54
	6	Wnt signaling pathway	5	2.13	139	6.25

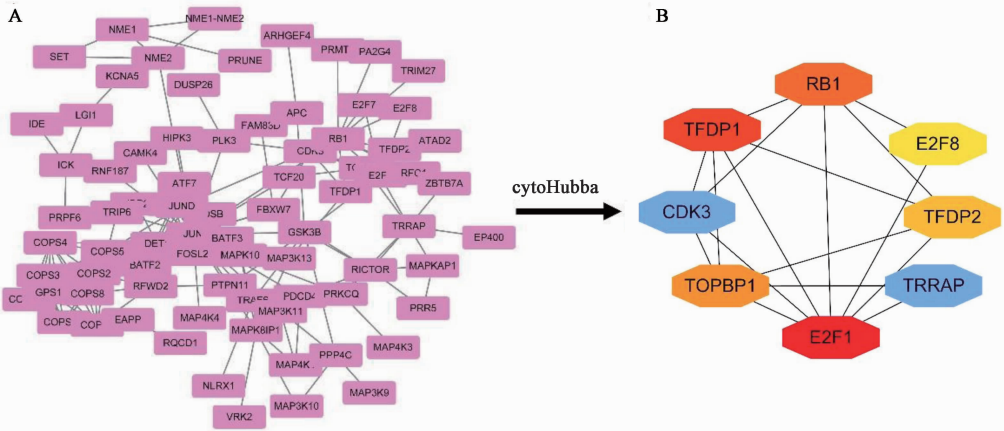


图 4 LFSMR 治疗 RP 基因靶点的蛋白互作网络图 (A) 及关键模块 (B)

Fig. 4 Protein interaction network map (A) and key module (B) of RP gene targets treated by LFSMR

主要包括视网膜移植、干细胞治疗、基因治疗、神经保护和营养疗法、中医药综合疗法等。尽管视网膜移植已经取得了很大进展,但由于治疗价格昂贵,移植来源及保存技术等问题需进一步研究,因此在临床推广应用较为困难;基因和干细胞治疗主要通过选择性地促进光感受器细胞生成、抑制细胞凋亡、修复损伤的细胞而达到治疗效果<sup>[16]</sup>。尽管已有相关的基础实验研究和临床试验报道该疗法的有效性,但样本数量不足,给药的方式和时间、药物载体的选择、发生不良反应的预防和应对措施均需进一步完善,限制了其在临床的推广应用;神经保护和营养疗法是对症治疗 RP 的传统疗法;越来越多的临床报道表明,中医药治疗 RP 具有显著的疗效,可明显改善患者视力和缓解病情发展,对提高患者的生活质量具有积极意义,与其他治疗方法相比呈现出一定的优势。

RP 的中医学病名为“高风雀目”“高风内障”等。对于 RP 的病因病机,历代医家均认为属于纯虚证。或因先天禀赋不足,肝肾脾虚;或因后天失养,阳气下陷,不能升清;或因肝肾亏损,精血不足;或因脾胃虚弱,清阳不升。因此多从脾肝肾论治,从先天不足、肝肾亏损或脾肾阳虚入手<sup>[17]</sup>。本课题组在历代医家研究基础上对 RP 的中医病因病机和治疗方法进行了较系统的探索,经过对比研究 RP 患者和正常人舌象及舌下静脉、眼血流图、眼底荧光血管造影、眼电图、球结膜及甲皱微循环、血清微量元素、血清自由基、血清性激素、血液流变学等指标,发现 RP 的病机为虚中夹实(瘀),在疾病发生发展过程中始终存在血瘀的病理改变<sup>[4]</sup>。课题组在临床采用补虚活血的基本治疗原则,取得了显著的临床疗效。

枸杞子具有滋补肝肾,益精明目之功效。常用于治疗肝肾阴虚、精亏血虚所致的内障目昏、视力减退。丹参具有活血调经、祛瘀止痛、凉血消痈、除烦安神的功效,临床广泛应用于各种瘀血病证的治疗。现代药理学研究表明,枸杞子具有含量丰富的胡萝卜素,胡萝卜素转化的维生素 A 对促进视网膜内视紫质的合成,调节视神经,维持正常视力均有重要意义;丹参具有扩张血管,增加视网膜微血管血流量的作用<sup>[18]</sup>。枸杞子和丹参分别是滋补肝肾和活血化瘀中药里面最具代表性的中药,因其明确的疗效已在临床被证实,而效应机制却报道较少,本研究通过网络药理学和生物信息学的方法,探索了 LFSMR 药对治疗视网膜色素变性的活性成分及分子机制。

通过 TCMSP 数据库,共检索出 LFSMR 药对所含的化学成分 390 个,对 OB 和 DL 进行条件性筛选后,获得 110 个化学成分,并进一步筛选得到 19 个有对应靶点的入血活性成分(图 1,表 1,2)。进一步检索共获得 LFSMR 的预测作用靶点 208 个,运用 Cytoscape 对活性成分-靶点进行可视化分析,发现 LFSMR 入血活性成分与其对应作用靶点的相互关系共 407 个(图 2)。临床实践中,枸杞子和丹参配伍同煎时,药物的化学成分可能发生相互作用,某些成分的化学结构可能产生变化,同一成分的药代动力学情况亦会发生改变,生物利用度随之发生相应变化。因此,本研究对 LFSMR 药对作用成分的筛选及靶点预测的结果可能与实际情况存在微弱差异。

通过 STRING 数据库,笔者获取了 LFSMR 成分对应靶点的 PPI 网络及 RP 疾病基因的 PPI 网络,采用 Cytoscape 对这两个 PPI 网络取交集,共获得 79 个 LFSMR 治疗 RP 可能直接或间接作用的靶点,包

含 546 个靶点之间的相互作用关系(图 3)。通过 DAVID 对这 79 个靶点进行 GO 和 KEGG 信号通路分析,结果发现,生物学过程主要涉及泛素连接酶脱酰化反应、蛋白自体磷酸化、肽基丝氨酸磷酸化、转录调节、细胞增殖等;调节的分子功能主要涉及三磷酸腺苷结合,丝氨酸/苏氨酸激酶活性,转录辅激活蛋白活性,转录因子活性,MAP 激酶活性,核心启动子结合等;作用区域包括 COP9 信号体,核质,转录因子复合物,TORC2 复合物,细胞核,细胞质等;分子机制主要涉及神经营养素信号通路,细胞周期相关通路,MAPK 信号通路,Wnt 信号通路等(表 4)。进一步,通过 CytoHubba 对靶点之间的关联度进行分析,筛选出八个 LFSMR 治疗 RP 可能作用的关键靶点(图 4)。上述结果与已发表的相关 RP 发病机制和防治研究的结果较为吻合。如有研究表明,神经营养素信号通路在正常患者和视网膜色素变性患者存在显著差异表达,通过调节视网膜神经退行性变与胶质增生有可能发展为治疗视网膜色素变性的有效策略<sup>[12]</sup>。另有报道表明,细胞周期相关通路可以有效保护感光体以及其他视网膜神经元,是治疗视网膜色素变性的重要途径之一<sup>[13]</sup>。

综上所述,本文研究结果表明 LFSMR 治疗 RP 的主要成分包括 1,2,5,6-四氢丹参酮,多孔甾醇,柳杉酚,去氢丹参酮 II<sub>A</sub>,黄芩苷,木犀草素等 19 个成分;LFSMR 治疗 RP 的作用机制涉及 MAPK 信号通路,神经营养素信号通路,细胞周期相关通路,Wnt 信号通路等;LFSMR 治疗 RP 的关键靶点包括 E2F1, TRRAP, TOPBP1, CDK3, TFDP2, TFDP1, E2F8, RB1 等,呈现出多成分、多途径、多靶点的特点。本研究可望为补虚活血类中药复方治疗 RP 的临床及基础研究提供前期基础,为补虚活血类中药复方临床推广应用于 RP 的治疗提供科学依据。

#### [参考文献]

[1] YANG Y J, PENG J, YING D, et al. A brief review on the pathological role of decreased blood flow affected in retinitis pigmentosa [J]. *J Ophthalmol*, 2018, doi: 10.1155/2018/3249064.

[2] Chaumet-Riffaud A E, Chaumet-Riffaud P, Cariou A, et al. Impact of retinitis pigmentosa on quality of life, mental health, and employment among young adults [J]. *Am J Ophthalmol*, 2017, 177(1):169-174.

[3] McMurtrey J J, Tso M O M. A review of the immunologic findings observed in retinitis pigmentosa [J]. *Surv Ophthalmol*, 2018, 63(6):769-781.

[4] 彭清华,李传课.视网膜色素变性虚中夹瘀的机理研究小结[J].*中国医药学报*,1993,8(6):7-10,61.

[5] 于国华,裴纹萱,孙慧娟,等.枸杞多糖的神经保护作用机制研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*,2018,24(9):213-219.

[6] 齐田田,包怡敏,刘爱华,等.丹参水溶性成分抗心肌缺血再灌注的研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*,2017,23(24):217-223.

[7] Calderon-Gonzalez K G, Hernandez-Monge J, Herrera-Aguirre M E, et al. Bioinformatics tools for proteomics data interpretation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 919(1):281-341.

[8] LIU L, WEI J, RUAN J. Pathway enrichment analysis with networks [J]. *Genes*, 2017, 8(10):E246.

[9] CONG L, ZHU Y, TU G. A bioinformatic analysis of microRNAs role in osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(8):1362-1371.

[10] ZHOU Y, LI S, HUANG L, et al. A splicing mutation in aryl hydrocarbon receptor associated with retinitis pigmentosa [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(14):2563-2572.

[11] Rose A M, Shah A Z, Venturini G, et al. Transcriptional regulation of PRPF31 gene expression by MSR1 repeat elements causes incomplete penetrance in retinitis pigmentosa [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep19450.

[12] Garcia T B, Hollborn M, Bringmann A. Expression and signaling of NGF in the healthy and injured retina [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 34(1):43-57.

[13] Arsenijevic Y. Cell cycle proteins and retinal degeneration: evidences of new potential therapeutic targets [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 854(1):371-377.

[14] ZHU Z H, FU Y, WENG C H, et al. Proteomic profiling of early degenerative retina of RCS rats [J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(6):878-889.

[15] Pang C P, Lam D S. Differential occurrence of mutations causative of eye diseases in the Chinese population [J]. *Hum Mutat*, 2002, 19(3):189-208.

[16] HUANG X F. Current pharmacological concepts in the treatment of the retinitis pigmentosa [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1074(1):439-445.

[17] 丁哲.古代医家对视网膜色素变性的认识 [J]. *吉林中医药*, 2012, 32(6):642-643.

[18] 师帅,胡元会,吴华芹,等.“丹参-三七”药对作用机制的网络药理学探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(18):192-197.

[责任编辑 周冰冰]