

基于网络药理学和实验验证探究白藜芦醇治疗糖尿病视网膜病变的作用机制

焦军杰, 常昆, 姚文艳, 张前辉, 李晓鹏*

新乡医学院第三附属医院 眼科, 河南 新乡 453000

摘要: **目的** 采用网络药理学的方法探讨白藜芦醇在糖尿病视网膜病变治疗中的潜在机制, 为白藜芦醇防治糖尿病视网膜病变提供理论依据。 **方法** 使用 CTD、DGIdb、Drugbank、Swiss Target Prediction、TCMSP 数据库获得白藜芦醇的作用靶点。从 GeneCard、DisGeNET、OMIM、DrugBank 数据库获得糖尿病视网膜病变疾病相关靶点。使用 Venn 图取交集即为白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点。将白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变靶点蛋白上传至 String 数据库, 将所得数据导入 Cytoscape 3.7.1, 构建白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变靶点蛋白的蛋白互作 (PPI) 网络, 并筛选出核心作用靶点。使用 DAVID 数据库对白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变靶点基因进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。对核心作用靶点与白藜芦醇结合力进行分子对接验证。利用细胞活力实验观察白藜芦醇对高糖作用下的人视网膜血管内皮细胞 (HRCECs) 细胞增殖的影响; 检测不同浓度 (40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 白藜芦醇对高糖作用下 HRCECs 细胞 STAT3、VEGFA、TNF mRNA 表达的影响。 **结果** 共获得白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点 130 个, 并筛选出核心靶基因 10 个。KEGG 途径分析富集的信号通路包括 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、FoxO 信号通路等。分子对接显示, 核心靶基因 AKT1、IL-6、TNF、VEGFA、IL-1B、MAPK3、EGFR、JUN、STAT3 及 CASP3 与白藜芦醇亲和力较好, 尤其与 STAT3、VEGFA 和 TNF 具有强烈的结合活性。细胞实验显示, 与模型组相比, 白藜芦醇能明显抑制高糖作用下 HRCECs 的细胞增殖能力 ($P < 0.05$ 、 0.01)。同时能明显降低高糖作用下 HRCECs 细胞 STAT3、VEGFA、TNF mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 **结论** 白藜芦醇治疗糖尿病视网膜病变具有多靶点、多途径的特点。白藜芦醇可能通过作用于 VEGFA、AKT1、CASP3、IL-6、STAT3、EGFR、TNF、和 MAPK3 等核心靶点基因, 影响 TNF 信号通路和 HIF 信号通路等发挥对糖尿病视网膜病变的治疗作用。

关键词: 白藜芦醇; 糖尿病视网膜病变; 网络药理学; 分子对接; TNF 信号通路; HIF-1 信号通路

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)05-0942-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.05.004

To explore the mechanism of resveratrol in treatment of diabetic retinopathy based on network pharmacology and experimental verification

JIAO Jun-jie, CHANG Kun, YAO Wen-yan, ZHANG Qian-hui, LI Xiao-peng

Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of resveratrol in treatment of diabetic retinopathy by network pharmacology, and to provide a theoretical basis for resveratrol to prevent and treat diabetic retinopathy. **Methods** The target of resveratrol was obtained by using CTD, DGIdb, Drugbank, Swiss Target Prediction, and TCMSP database. Diabetic retinopathy related targets were obtained from GeneCard, DisGeNET, OMIM, DrugBank database. The intersection of the two are the targets of resveratrol against diabetic retinopathy. The resveratrol anti-diabetic retinopathy target protein was uploaded to String database, and the obtained data were imported into Cytoscape 3.7.1 to construct the protein interaction (PPI) network of resveratrol anti-diabetic retinopathy target protein, and the core targets were screened. GO and KEGG pathway enrichment analysis of resveratrol anti-diabetic retinopathy target genes were performed using DAVID database. The binding ability of resveratrol to the core action target was verified by molecular docking. The effects of resveratrol on the proliferation of human retinal vascular endothelial cells (HRCECs) were investigated by cell viability assay. The effects of resveratrol (40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$) on mRNA expression of STAT3, VEGFA and TNF in HRCECs cells

收稿日期: 2022-01-09

基金项目: 河南省医学科技攻关计划 (联合共建) 项目 (LHGJ20190492)

作者简介: 焦军杰 (1981—), 女, 副主任医师, 硕士, 主要从事眼科眼底病和白内障方向研究。E-mail: 42451623@qq.com

*通信作者: 李晓鹏 (1971—), 男, 主任医师, 硕士, 主要从事白内障方向研究。E-mail: lxp3029631@126.com

treated with high glucose were investigated. **Results** 130 Targets of resveratrol against diabetic retinopathy were obtained, and 10 core target genes were screened out. The signal pathways enriched by KEGG pathway analysis include TNF signal pathway, HIF-1 signal pathway, FOXO signal pathway and so on. Molecular docking showed that resveratrol had good affinity with the core target genes AKT1, IL-6, TNF, VEGFA, IL-1B, MAPK3, EGFR, JUN, STAT3, and CASP3, especially with STAT3, VEGFA, and TNF. In addition, compared with model group, cell experiment showed that resveratrol could significantly inhibit the proliferation of HRCECs cells under the effect of high glucose ($P < 0.05, 0.01$). At the same time, the mRNA expressions of STAT3, VEGFA and TNF in HRCECs cells under high glucose were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Resveratrol in treatment of diabetic retinopathy has the characteristics of multi-target and multi-pathway. Resveratrol may play a therapeutic role in diabetic retinopathy by acting on core target genes such as VEGFA, AKT1, CASP3, IL-6, STAT3, EGFR, TNF, and MAPK3, and affecting TNF signaling pathway and HIF signaling pathway.

Key words: resveratrol; diabetic retinopathy; network pharmacology; molecular docking; TNF signaling pathway; HIF signaling pathway

糖尿病视网膜病变是糖尿病的常见问题,也是职业年龄人群获得性失明的主要原因^[1-2]。糖尿病视网膜病变期间发生的进一步后果是血视网膜屏障破裂、视网膜水肿、新生血管和脱离以及最终视力丧失^[3-4]。在过去的几十年中,一些方法(如部分和全视网膜光凝、激光治疗和玻璃体切除术)虽可以减少视力丧失,但由于这些方法的相对有效性和副作用,到目前为止,糖尿病视网膜病变仍然难以预防和有效治疗,视力丧失的发生率仍然惊人^[5-6]。因此,提供有效且副作用较小的治疗药物或方法,以预防或改善糖尿病视网膜病变是一个迫切的问题。

白藜芦醇(反式-3,5,4'-三羟基二苯乙烯)是一种多酚类植物抗毒素,存在于葡萄、花生和浆果等不同植物中,具有延长寿命、抗氧化、抗炎、抗癌、抗凝、心脏保护和血管保护作用^[7-10]。近年来,大量研究集中于白藜芦醇在预防或治疗糖尿病并发症中的作用^[7, 10-11]。据报道,白藜芦醇主要通过降低血糖、脂质过氧化、循环促炎细胞因子和凋亡水平,同时增强抗氧化剂防御作用起到治疗糖尿病的作用^[8, 11-14]。另外,Dong 等^[15]发现白藜芦醇能明显降低链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠视网膜血管通透性,增加视网膜神经节细胞层和神经纤维层的厚度。Chen 等^[16]发现白藜芦醇能减轻视网膜炎症状态和糖尿病视网膜病变损伤。Zeng 等^[17]研究结果显示,白藜芦醇能够抑制糖尿病大鼠视网膜 Muller 细胞的凋亡。另一方面,到目前为止,在体外和体内研究中显示,健康受试者接受长期白藜芦醇治疗时未出现严重的副作用^[18]。虽然白藜芦醇治疗糖尿病视网膜病变的疗效确切,但其具体的作用机制尚不清楚。

网络药理学因其整体性、系统性和高效性而被广泛应用于药物研究,利用生物信息学、分子生物

学和数据库系统研究“药物-靶点-途径-疾病”之间的相互关系^[19-20]。近年来,利用网络药理学认识中医药出现了新的趋势。网络药理学从系统生物学的角度探索药物成分与靶向疾病之间的关系,预测药物治疗疾病的潜在机制,为药物治疗疾病的有效性提供理论依据^[21]。因此,本研究采用网络药理学的方法,从多个数据平台收集数据和信息,探索白藜芦醇在糖尿病视网膜病变治疗中的潜在机制,为临床白藜芦醇防治糖尿病视网膜病变提供理论依据。

1 方法

1.1 白藜芦醇作用靶点的筛选

白藜芦醇作用靶点从 CTD(<http://ctdbase.org/>)、DGIdb (<https://dgidb.genome.wustl.edu/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.com/>)、Swiss Target Prediction (<http://www.swiss-target-prediction.ch/>)、TCMSP (<https://www.tcmsp-e.com/>) 数据库获得,合并,去除重复靶点,并剔除非人源靶点。

1.2 糖尿病视网膜病变疾病相关靶点的筛选

糖尿病视网膜病变疾病相关靶点从 GeneCard (<https://www.genecards.org>)、DisGeNET (<http://www.disgenet.org>)、OMIM (<https://omim.org/>)、DrugBank(<https://www.drugbank.com/>)数据库获得。合并,去除重复靶点。

1.3 白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点的筛选

将白藜芦醇作用靶点与糖尿病视网膜病变疾病相关靶点使用 Venn 图(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)取交集即为白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点。

1.4 白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变靶点蛋白相互作用(PPI)网络图的构建及核心靶点蛋白的筛选

将白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变靶点蛋白上

传至 String 数据库 (<https://www.string-db.org/>), 选择置信分数 > 0.4 的蛋白质相互作用。将所得数据导入 Cytoscape 3.7.1, 构建白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变靶点蛋白的 PPI 网络。利用 Cytoscape 分析白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变靶点蛋白 PPI 网络的拓扑参数。根据拓扑学参数中度中心性、紧密中心性和中介中心性筛选核心靶点蛋白。3 者数值越大说明该节点在网络中越重要。将度中心性、紧密中心性和中介中心性数据排名前 10 位的蛋白筛选为核心靶点蛋白。

1.5 白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变靶点基因的富集分析

使用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变靶点基因进行富集分析, 包括基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析。GO 分析包括细胞组分 (CC)、分子功能 (MF)、生物过程 (BP) 3 个方面的分析。

1.6 分子对接

PDB 数据库 (<https://www.pdb.org/>) 查找并下载核心靶点蛋白的 PDB 文件, 使用 Autodock Tools 对其进行去水, 加氢等处理。PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载白藜芦醇的 mol2 文件。使用 Autodock Vina 对白藜芦醇与核心靶点蛋白进行分子对接。并使用 pymol 软件将对接结果进行可视化。

1.7 细胞实验

1.7.1 试剂与耗材 人视网膜血管内皮细胞 (HRCECs) 购于上海子实生物科技有限公司; 白藜芦醇 (质量分数 99%, 批号 201121) 购于东明格鲁斯生物科技有限公司; MTT (CAS: 57360-69-7) 购于默克 Sigma Aldrich 公司; TRIzol 试剂 (批号 15596026) 购于赛默飞世尔科技公司; BeyoRT™ II cDNA 第一链合成试剂盒 (RNase H-) (批号 200812) 购于碧云天生物技术有限公司; SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒 (批号 210116) 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; Spectral Max Plus384 全波长微孔板读取器购于 Molecular Devices 公司; 罗氏 LightCycler®96 全自动实时荧光定量 PCR 仪购于瑞士罗氏公司。

1.7.2 HRCECs 细胞培养 HRCECs 在正常葡萄糖 (5.5 mmol/L) DMEM 中培养, DMEM 含有 10% 的胎牛血清和 1% 的链霉素和青霉素, 在 37 °C 的 5%

CO₂ 培养箱中培养。第 3~5 代细胞在 80%~90% 的融合率下用于实验。

1.7.3 白藜芦醇对高糖作用下 HRCECs 细胞增殖能力的影响^[22] HRCECs 以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种在 96 孔培养板中, 细胞生长至约 70% 的汇合时, 模型组培养基中加入 25 mmol/L 葡萄糖。白藜芦醇处理组的细胞培养基中加入 25 mmol/L 葡萄糖和不同浓度白藜芦醇 (40、80、160 μ mol/L)。培养 48 h 后, 在 37 °C 下向每孔中添加 20 μ L MTT (5 mg/mL), 培养箱作用 4 h。小心吸去孔内培养液, 每孔添加 150 μ L DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min 以溶解甲臞晶体, 并使用 Spectral Max Plus 微孔板读取器在 490 nm 处测量每个板的吸光度。

1.7.4 白藜芦醇对高糖作用下 HRCECs 细胞信号转导与转录活化因子 3 (STAT3)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、肿瘤坏死因子 (TNF) mRNA 表达的影响 使用 Invitrogen TRIzol 试剂提取细胞中总 RNA。使用 BeyoRT™ II cDNA 第一链合成试剂盒 (RNase H-) 将 RNA 反向转录成 cDNA。在罗氏 LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪上使用 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒 (Takara) 进行实时荧光定量 PCR 反应。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。实验所使用的引物序列如下: GAPDH 正向, 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3', 反向, 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'; TNF- α 正向, 5'-CCCCAAAGGGATGAGAAGTT-3', 反向, 5'-CACTTGGTGGTTTGCTACGA-3'; VEGFA 正向, 5'-CGAAGAGAAGAGACACAT TG-3', 反向, 5'-GGATGGAGGAAGGTCAAC-3'; STAT3 正向, 5'-CCTTCCTGCTAAGATTCA-3', 反向, 5'-GACTGG ATCTGGGTCTTA-3'。qPCR 扩增条件: 95 °C、30 s 预变性; 随后 95 °C、5 s, 60 °C、20 s, 共 35 次循环。按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 STAT3、VEGFA、TNF mRNA 相对表达量。

1.7.5 统计分析 数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较使用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析 (ANOVA)。P < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点获取

共获得白藜芦醇的作用靶点 271 个, 糖尿病视网膜病变的疾病靶点 1 539 个。二者取交集即白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点, 共 130 个, 见图 1。

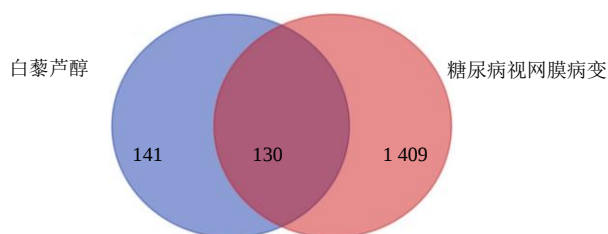


图 1 白藜芦醇靶点与糖尿病视网膜病变交集靶点 Venn 图
Fig. 1 Venn diagram of the intersection of resveratrol target and diabetic retinopathy

2.2 白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点的 PPI 网络图及核心靶点蛋白的筛选

白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点的 PPI 网络图见图 2。共包括 130 个节点，2412 条边。根据拓扑学参数中度中心性、紧密中心性和中介中心性筛选核心靶点蛋白。其中数值均较大的蛋白为蛋白激酶 B1 (AKT1)、白细胞介素 (IL)-6、TNF、VEGFA、IL-1B、丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK3)、人类表皮生长因子受体 (EGFR)、转录因子 AP-1 (JUN)、STAT3、胱天蛋白酶 3 (CASP3)。白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变核心靶点基因的拓扑学参数见表 1。

2.3 白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点的 GO 富集分析结果

白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点的 GO 富集分析结果见图 3。GO 分析包括 CC、MF、BP 3 个方面。MF 主要涉及血红素结合 (heme binding)、四吡咯结合 (tetrapyrrole binding)、细胞因子受体结合 (cytokine receptor binding)、磷酸酶结合

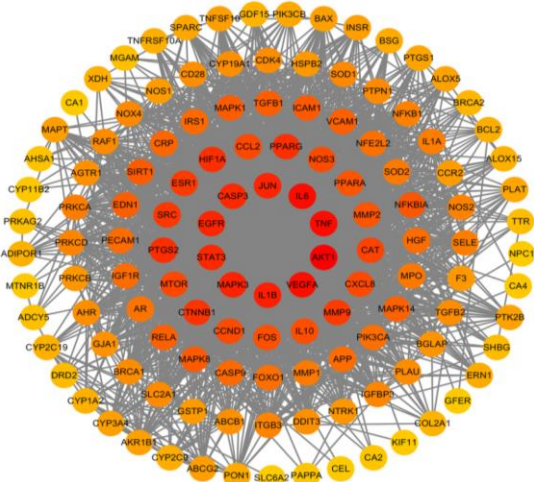


图 2 白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点 PPI 网络图
Fig. 2 PPI network of resveratrol against diabetic retinopathy

表 1 白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变核心靶点基因的拓扑学参数

Table 1 Topological parameters of core target genes of resveratrol against diabetic retinopathy

靶点	中度中心性	紧密中心性	中介中心性	聚类系数
AKT1	101	0.830 065 36	0.060 947 43	0.405 544 55
IL-6	95	0.793 750 00	0.036 274 31	0.434 714 45
TNF	95	0.793 750 00	0.037 118 02	0.434 042 55
VEGFA	94	0.788 819 88	0.029 164 86	0.455 044 61
IL-1B	86	0.742 690 06	0.020 270 28	0.493 570 45
MAPK3	84	0.738 372 09	0.016 615 33	0.521 801 49
EGFR	83	0.738 372 09	0.023 641 29	0.495 445 20
JUN	83	0.738 372 09	0.019 806 10	0.524 831 03
STAT3	81	0.725 714 29	0.014 660 85	0.534 259 26
CASP3	81	0.729 885 06	0.015 182 04	0.533 641 98

(phosphatase binding) 等。CC 主要集中在膜筏 (membrane raft)、膜微区 (membrane microdomain)、膜区 (membrane region) 等。BP 主要涉及活性氧代谢过程 (reactive oxygen species metabolic process)、细胞对化学应激的反应 (cellular response to chemical stress)、对肽类激素的反应 (response to peptide hormone)、对脂多糖的反应 (response to lipopolysaccharide) 等。

2.4 白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点的 KEGG 富集分析结果

白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点的 KEGG 富集分析结果见图 4。富集显著性较高的通路主要有 TNF 信号通路、缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 信号通路、叉头框转录因子 O (FoxO) 信号通路等。其中 TNF 信号通路包含 7 个核心靶点基因: AKT1、IL-6、TNF、IL-1B、MAPK3、JUN、CASP3。HIF-1 信号通路包含 6 个核心靶点基因: AKT1、IL-6、VEGFA、MAPK3、EGFR、STAT3。FoxO 信号通路包含 4 个核心靶点基因: AKT1、VEGFA、STAT3、CASP3。靶点基因与 KEGG 通路相互关系的网络图见图 5。核心靶点基因在 TNF 及 HIF 通路中的位置见图 6、7。

2.5 白藜芦醇与核心靶点基因编码蛋白分子对接结果

将白藜芦醇与核心靶点蛋白进行分子对接, 结合能数据结果见表 2。通常认为, 若结合能小于 -5.0 kJ/mol, 表明此物质成分与对接靶点蛋白结合性较好, 若结合能小于 -7.0 kJ/mol, 则表明对接的两者有强烈的结合活性^[23]。在本研究中, 10 个核心靶点

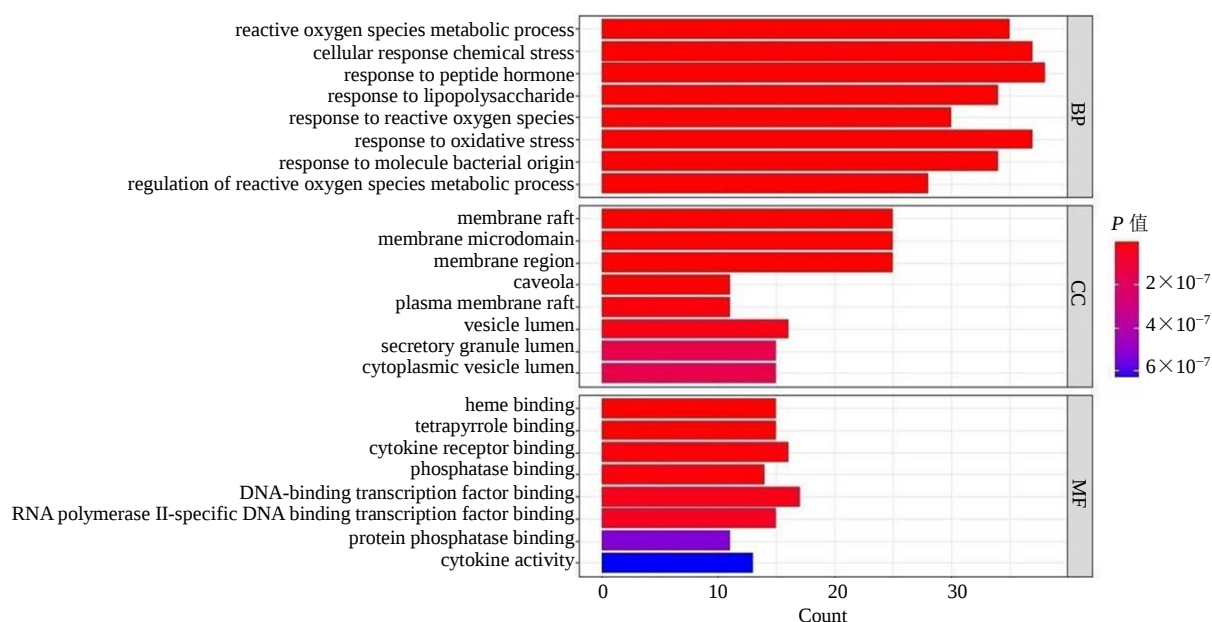


图 3 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis

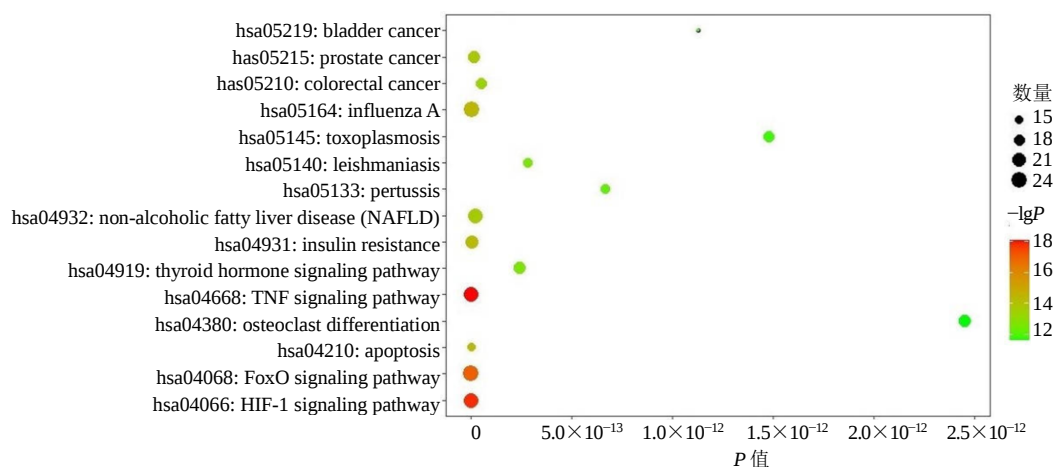


图 4 KEGG 富集分析图

Fig. 4 KEGG enrichment analysis diagram

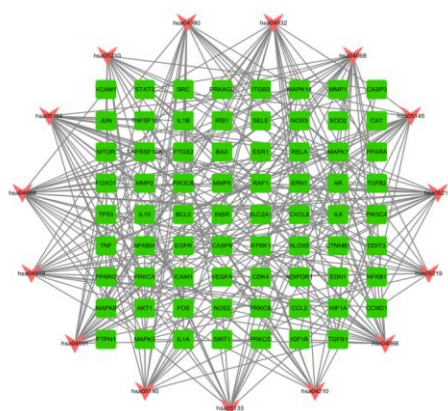


图 5 靶点基因与 KEGG 通路相互关系的网络图

Fig. 5 Network diagram of the relationship between target genes and KEGG pathway

蛋白与白藜芦醇的结合能均 < -5.0 kJ/mol, 说明白藜芦醇与 10 个核心蛋白结合良好。其中 STAT3、TNF、VEGFA 与白藜芦醇的结合能均 < -7.0 kJ/mol。白藜芦醇与核心靶点蛋白的结合能 ≤ -6.5 kcal/mol 分子对接示意图见图 8。

2.6 白藜芦醇对高糖作用下的 HRCECs 细胞增殖的影响

与对照组相比, 模型组 HRCECs 细胞的细胞增殖能力显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 白藜芦醇 40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 组 HRCECs 细胞增殖能力显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 见图 9。表明白藜芦醇可以明显抑制高糖作用下的视网膜血管内皮细胞

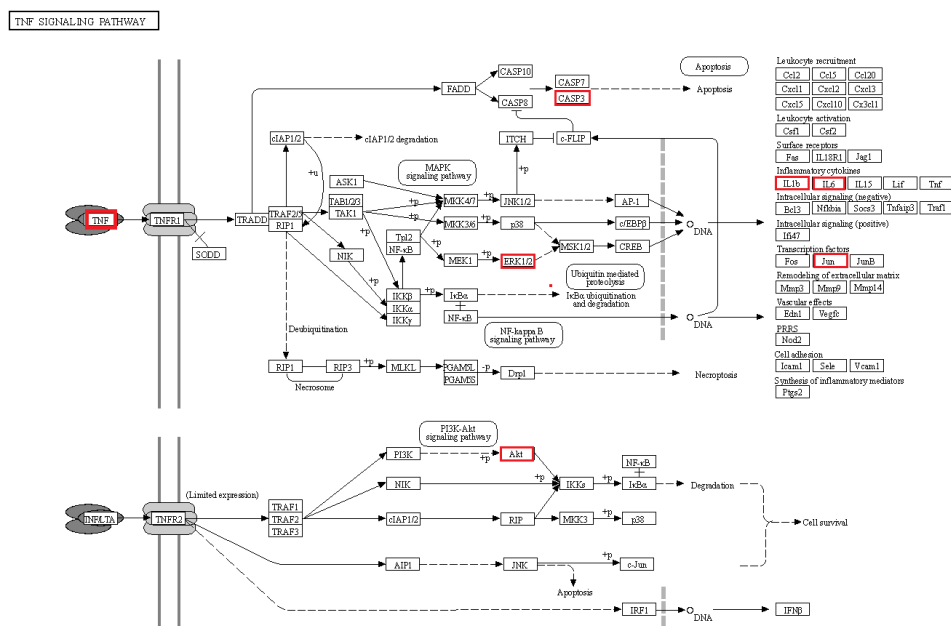


Fig. 6 Location of core target genes in the TNF pathway

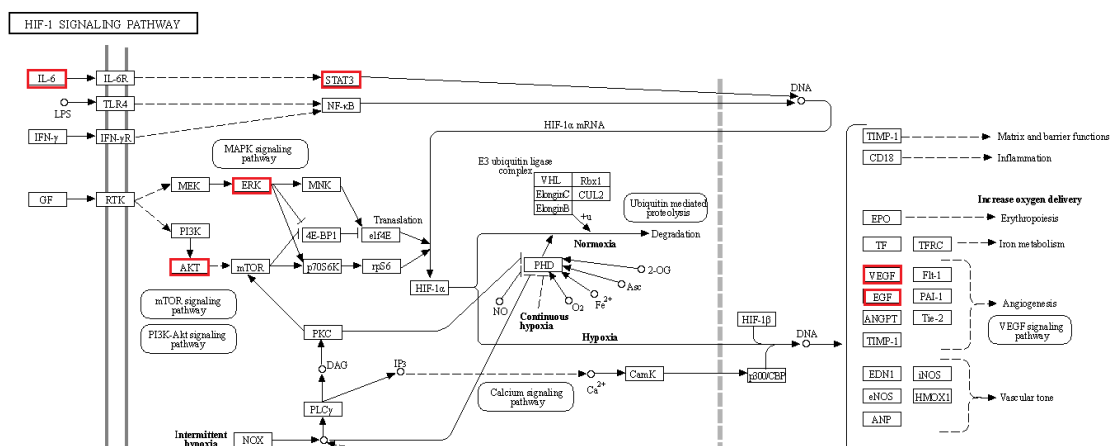


Fig. 7 Location of core target genes in the HIF pathway

Table 2 Docking results of resveratrol with core target protein molecules

核心靶点蛋白	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
AKT1	-6.0
CASP3	-6.5
EGFR	-6.1
IL-1B	-6.0
IL-6	-5.8
JUN	-5.5
MAPK3	-6.6
STAT3	-7.2
TNF	-7.4
VEGFA	-7.3

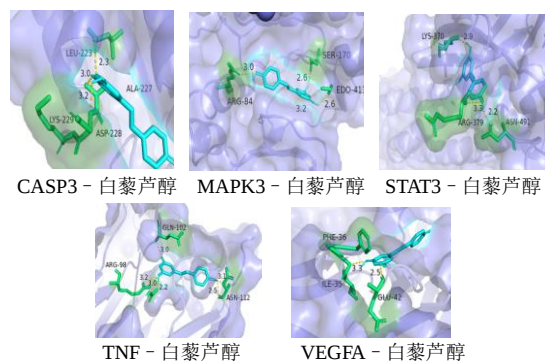
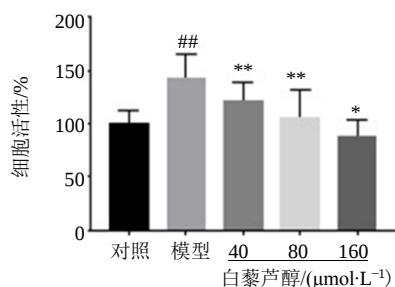


Fig. 8 Molecular docking diagram of resveratrol and core target protein



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图 9 白藜芦醇对高糖作用下 HRCECs 细胞增殖的影响
 Fig. 9 Effect of resveratrol on proliferation of HRCECs cells under high glucose

HRCECs 增殖。不同浓度 (40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 白藜芦醇作用下 HRCECs 细胞镜下图片见图 10。镜下可见, 模型组细胞数量较对照组增多, 细胞间隙变小。随着白藜芦醇浓度的增加, 细胞数量逐渐减少, 细胞间隙逐渐增大。

2.7 白藜芦醇对高糖作用下 HRCECs 细胞 STAT3、VEGFA、TNF mRNA 表达的影响

与对照组相比, 模型组 HRCECs 细胞的 STAT3、

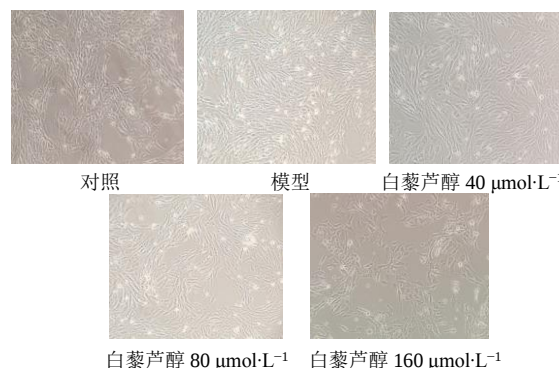
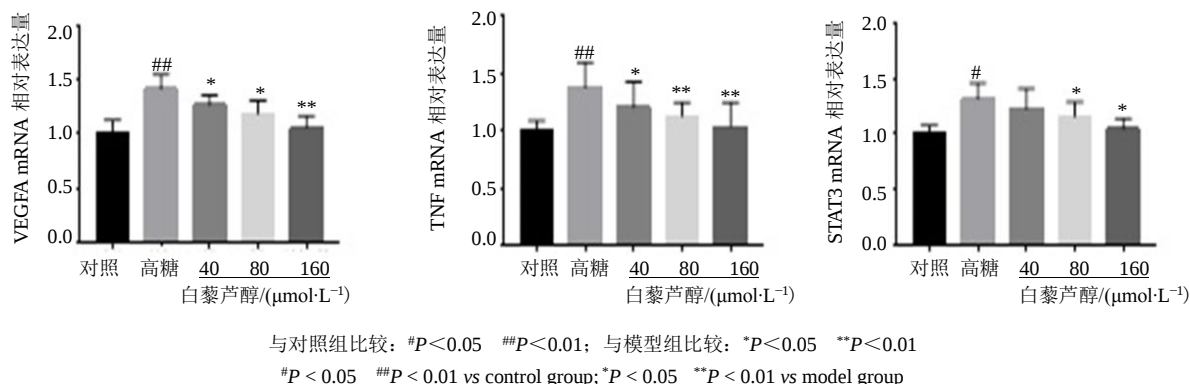


图 10 不同浓度白藜芦醇作用下 HRCECs 细胞镜下图片 ($\times 100$)
 Fig. 10 Images of HRCECs under different concentrations of resveratrol under microscope ($\times 100$)

Fig. 10 Images of HRCECs under different concentrations of resveratrol under microscope ($\times 100$)

VEGFA、TNF mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组相比, 白藜芦醇 80、160 $\mu\text{mol/L}$ 组能明显降低高糖作用下 HRCECs 细胞 STAT3、VEGFA、TNF mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。白藜芦醇 40 $\mu\text{mol/L}$ 组能明显降低高糖作用下 HRCECs 细胞 VEGFA、TNF mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 但对 STAT3 mRNA 表达作用不明显, 见图 11。



与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图 11 白藜芦醇对高糖作用下 HRCECs 细胞 STAT3、VEGFA、TNF mRNA 表达的影响

Fig. 11 Effects of resveratrol on mRNA expressions of STAT3, VEGFA and TNF in HRCECs cells treated with high glucose

3 讨论

糖尿病视网膜病变是糖尿病常见的严重并发症, 是成人致盲的主要原因。早期阶段, 高糖环境造成视网膜微血管损伤, 其特征是视网膜细胞丢失、毛细血管基底膜增厚、毛细血管扩张和变形以及血视网膜屏障破坏。此外, 这种进展的特点是毛细血管阻塞、病理性新生血管形成、视网膜出血等, 最终导致不可逆转的视力丧失^[24]。专家学者一直致力于糖尿病视网膜病变的有效防治研究, 但仍有许多问题尚不清楚。近年来, 有研究报道中医药治疗

本病逐年增多, 疗效逐渐提高。白藜芦醇用于糖尿病视网膜病变虽然疗效显著^[15-17], 但其对糖尿病视网膜病变的确切作用机制尚不清楚。因此, 有必要利用网络药理学中预测靶点和分析药物途径的功能, 探讨白藜芦醇在糖尿病视网膜病变治疗中的作用机制。

本研究预测了 130 个白藜芦醇和糖尿病视网膜病变之间的共同靶点, 并构建了白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点的 PPI 网络图并进行了核心靶点蛋白的筛选。共获得了 10 个白藜芦醇在糖尿病

视网膜病变治疗中的核心靶点,即 VEGFA、AKT1、CASP3、IL-6、STAT3、EGFR、TNF、IL-1B、MAPK3 和 JUN。这些靶点主要集中在细胞增殖、凋亡、炎症等方面。这些核心靶点在白藜芦醇治疗糖尿病视网膜病变的过程中发挥了重要作用。VEGF 具有高度特异性,可以促进血管内皮细胞的迁移、增殖和血管生成。据报道,VEGF 在糖尿病视网膜病变中显著升高^[25],糖尿病视网膜病变患者玻璃体中 VEGF 水平显著升高,这促进了病理性新生血管的形成^[26]。大量研究表明,AKT 信号通路可能参与糖尿病视网膜病变的发生和发展,AKT 激活可维持视网膜毛细血管内皮功能的稳定状态^[27]。CASP3 是一个凋亡相关基因。CASP3 可能通过调节细胞凋亡参与糖尿病视网膜病变的病理过程,CASP3 的异常高表达水平可能与糖尿病视网膜病变的严重程度有关^[28]。IL-6 是体内炎症反应和一系列病理生理过程中重要的白细胞介素之一。在糖尿病视网膜病变的情况下,由于高血糖引起线粒体活性氧的增加,细胞黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)的表达在活性氧诱导的白细胞介素(IL-1、IL-6)的作用下上调,白细胞黏附损伤内皮细胞。Ran 等^[29]的研究表明,经高糖处理的视网膜色素上皮细胞中炎症因子如 IL-6 的分泌增加。同时,Zhou 等^[30]的研究表明,增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)患者的玻璃体中 IL-6 和其他炎性细胞因子增加,这表明炎性细胞因子可能与 PDR 有关。细胞因子与 PDR 的发生和发展密切相关。通过抑制 IL-6/STAT3 信号通路的激活进而影响视网膜的氧化和抗氧化过程,可以达到保护糖尿病大鼠视网膜的目的^[31]。STAT3 激活也被认为与高血糖诱导的内皮细胞内质网应激有关^[32];先前的研究表明,内皮细胞中 STAT3 的激活易引起糖尿病视网膜病变的早期血管损伤^[32-34]。STAT3 可能通过激活与炎症和血管生成相关的基因,如 VEGF 和 HIF-1,从而导致早期血管损伤^[35-36]。抑制 STAT3 可以减轻糖尿病视网膜病变大鼠的视网膜炎症并减少视网膜细胞死亡^[31]。EGFR 是 EGF 的特异性受体,以自分泌或旁分泌的形式参与糖尿病视网膜病变的形成和发展。Ju 等^[37]的研究指出,糖尿病视网膜病变模型中的 EGFR 引起糖尿病小鼠的视网膜功能障碍、视网膜血管中视网膜结构和线粒体结构的损伤以及视网膜血管异常。MAPK3 是 MAPK 家族重要成员。安明等^[38]发现,MAPK3 参与了糖尿病视网膜病变的发生,而抑制糖尿病大鼠视网膜中

ERK1/ERK2 的表达对糖尿病视网膜病变具有改善作用。

随后,本研究对白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。结果表明 MF 主要涉及血红素结合、四吡咯结合、细胞因子受体结合等。CC 主要集中在膜筏、膜微区、膜区等。BP 主要涉及活性氧代谢过程、细胞对化学应激的反应、对肽类激素的反应等。白藜芦醇抗糖尿病视网膜病变作用靶点的 KEGG 富集分析结果显示,富集显著性较高的通路主要有 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、FoxO 信号通路等。TNF 对正常细胞无明显毒性的细胞因子,可分为 TNF- α 和 TNF- β 。研究表明,高糖环境下人视网膜内皮细胞(HREC)中炎症相关细胞因子(TNF- α 、IL-6 等)分泌增加^[39],表明 TNF- α 可能参与高糖环境下视网膜内皮细胞的炎症反应,从而引起了糖尿病视网膜病变的相关临床表现。研究表明,治疗后,糖尿病视网膜病变模型中 TNF- α 的表达水平降低^[40-42]。这进一步证实了 TNF- α 在糖尿病视网膜病变病理改变中的重要作用。HIF-1 是一种必需的转录激活因子,介导细胞对缺氧的适应。HIF 由 HIF- α 和 HIF- β 亚单位组成,其中 HIF- α 分为 HIF-1 α 、HIF-2 α 和 HIF-3 α 亚型。关于 HIF-1 α 的研究很多。HIF- α 的主要生理功能是在缺氧条件下上调其表达,以维持全身、局部和细胞内氧浓度的稳定。研究证实血管生成在糖尿病视网膜病变中起着重要作用,HIF-1 α 是血管内皮生长因子的重要转录激活因子^[43]。HIF 拮抗剂对眼部新生血管具有显著的抑制作用^[44],这也证明了 HIF-1 在病理性新生血管形成中的重要作用。糖尿病并发症中的 TNF 和 HIF 信号通路可能在白藜芦醇治疗糖尿病视网膜病变过程中发挥重要作用。其中 TNF 信号通路包含 7 个核心靶点基因为 AKT1、IL-6、TNF、IL-1B、MAPK3、JUN、CASP3。HIF-1 信号通路包含 6 个核心靶点基因:AKT1、IL-6、VEGFA、MAPK3、EGFR、STAT3。

本研究通过分子对接验证了白藜芦醇与核心靶点蛋白之前的亲和力,结果表明白藜芦醇成分与 10 个核心蛋白结合良好,其中 STAT3、TNF、VEGFA 蛋白与白藜芦醇具有强烈的结合作用。另外,本研究通过细胞实验证实白藜芦醇能明显抑制高糖作用下 HRCECs 细胞的增殖($P < 0.05$ 、 0.01)。同时,与高糖组相比,白藜芦醇能明显降低高糖作用下 HRCECs 细胞 STAT3、VEGFA、TNF mRNA 的表

达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 进而影响 TNF 和 HIF-1 信号通路的活性, 对糖尿病视网膜病变起到治疗作用。

综上所述, 本研究利用网络药理学从作用靶点和作用途径两方面分析了白藜芦醇治疗糖尿病视网膜病变的作用机制。糖尿病视网膜病变治疗中的白藜芦醇具有多靶点、多途径的特点。白藜芦醇可能通过作用于 VEGFA、AKT1、CASP3、IL-6、STAT3、EGFR、TNF、和 MAPK3 等核心靶点基因, 进而影响 TNF 和 HIF 信号通路发挥对糖尿病视网膜病变的治疗作用。这为白藜芦醇在糖尿病视网膜病变治疗中的应用提供了理论依据, 为糖尿病视网膜病变药物的开发提供了新的方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Pan H Z, Zhang H, Chang D, et al. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2008, 92(4): 548-451.
- [2] Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products (AGEs), oxidative stress and diabetic retinopathy [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(3): 362-368.
- [3] Barber A J, Gardner T W, Abcouwer S F. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(2): 1156-1163.
- [4] Hu W K, Liu R, Pei H, et al. Endoplasmic reticulum stress-related factors protect against diabetic retinopathy [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 507986.
- [5] Kowluru R A, Chan P S. Oxidative stress and diabetic retinopathy [J]. *Exp Diabetes Res*, 2007, 2007: 43603.
- [6] Yu X, Xu Z, Mi M, et al. Dietary taurine supplementation ameliorates diabetic retinopathy via anti-excitotoxicity of glutamate in streptozotocin-induced Sprague-Dawley rats [J]. *Neurochem Res*, 2008, 33(3): 500-507.
- [7] Csiszar A. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1215: 117-122.
- [8] Lee S M, Yang H, Tartar D M, et al. Prevention and treatment of diabetes with resveratrol in a non-obese mouse model of type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2011, 54(5): 1136-1146.
- [9] Szkudelska K, Szkudelski T. Resveratrol, obesity and diabetes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 635(1-3): 1-8.
- [10] 王丽娟, 史惠蓉. 白藜芦醇通过调控 SIRT1 抑制卵巢癌细胞生长及 Wnt 信号通路的研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(3): 675-680.
- [11] Sharma S, Misra C S, Arumugam S, et al. Antidiabetic activity of resveratrol, a known SIRT1 activator in a genetic model for type-2 diabetes [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(1): 67-73.
- [12] Palsamy P, Subramanian S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 224(2): 423-432.
- [13] Sharma S, Kumar A, Arora M, et al. Neuroprotective potential of combination of resveratrol and 4-amino 1,8 naphthalimide in experimental diabetic neuropathy: Focus on functional, sensorimotor and biochemical changes [J]. *Free Radic Res*, 2009, 43(4): 400-408.
- [14] 卢佳倩, 赵耀鑫, 刘晓彤, 等. 白藜芦醇对糖尿病及其并发症作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 41(2): 334-339.
- [15] Dong Y, Wan G, Yan P, et al. Fabrication of resveratrol coated gold nanoparticles and investigation of their effect on diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2019, 195: 51-57.
- [16] Chen Y, Meng J, Li H, et al. Resveratrol exhibits an effect on attenuating retina inflammatory condition and damage of diabetic retinopathy via PON1 [J]. *Exp Eye Res*, 2019, 181: 356-366.
- [17] Zeng K, Wang Y, Yang N, et al. Resveratrol inhibits diabetic-induced Müller cells apoptosis through MicroRNA-29b/specificity protein 1 pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(6): 4000-4014.
- [18] Cottart C H, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, et al. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(1): 7-16.
- [19] Hopkins A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [20] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [21] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [22] Zhou M, Li G, Zhu L, et al. Arctiin attenuates high glucose-induced human retinal capillary endothelial cell proliferation by regulating ROCK1/PTEN/PI3K/Akt/VEGF pathway in vitro [J]. *Cell Mol Med*, 2020, 24(10): 5695-5706.
- [23] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [24] Wang W, Lo A C Y. Diabetic retinopathy: Pathophysiology

- and treatments [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1816.
- [25] Han N, Xu H, Yu N, *et al.* MiR-203a-3p inhibits retinal angiogenesis and alleviates proliferative diabetic retinopathy in oxygen-induced retinopathy (OIR) rat model via targeting VEGFA and HIF-1 α [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(1): 85-94.
- [26] Abu El-Asrar A M, Ahmad A, Siddiquei M M, *et al.* The proinflammatory and proangiogenic macrophage migration inhibitory factor is a potential regulator in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2752.
- [27] Xie W, Zhou P, Qu M, *et al.* Ginsenoside Re attenuates high glucose-induced RF/6A injury via regulating PI3K/AKT inhibited HIF-1 α /VEGF signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 695.
- [28] Tian M, Liu S, Liu L, *et al.* Correlations of the severity of diabetic retinopathy with EPO, Caspase-3 expression and oxidative stress [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(22): 9707-9713.
- [29] Ran Z, Zhang Y, Wen X, *et al.* Curcumin inhibits high glucose-induced inflammatory injury in human retinal pigment epithelial cells through the ROS/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 1024-1031.
- [30] Zhou J, Wang S, Xia X. Role of intravitreal inflammatory cytokines and angiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Curr Eye Res*, 2012, 37(5): 416-420.
- [31] Wang Y, Zhai W L, Yang Y W. Association between NDRG2/IL-6/STAT3 signaling pathway and diabetic retinopathy in rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7): 3476-3484.
- [32] Chen Y, Wang J J, Li J, *et al.* Activating transcription factor 4 mediates hyperglycaemia-induced endothelial inflammation and retinal vascular leakage through activation of STAT3 in a mouse model of type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(9): 2533-2545.
- [33] Li J, Wang J J, Yu Q, *et al.* Inhibition of reactive oxygen species by lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice: Role of NADPH oxidase 4 [J]. *Diabetes*, 2010, 59(6): 1528-1538.
- [34] Al-Shabraway M, Bartoli M, El-Remessy A B, *et al.* Role of NADPH oxidase and Stat3 in statin-mediated protection against diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(7): 3231-3238.
- [35] Darnell Jr J E. STATs and gene regulation [J]. *Science*, 1997, 277(5332): 1630-1635.
- [36] Bromberg J F, Wrzeszczynska M H, Devgan G, *et al.* Stat3 as an oncogene [J]. *Cell*, 1999, 98(3): 295-303.
- [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] 安明, 牛膺筠, 邵乐平. 缬沙坦对糖尿病大鼠视网膜组织 ERK1/ERK2 表达的影响 [J]. *眼科新进展*, 2008(11): 817-820.
- [39] Zhang L, Yu J, Ye M, *et al.* Upregulation of CKIP-1 inhibits high-glucose induced inflammation and oxidative stress in HRECs and attenuates diabetic retinopathy by modulating Nrf2/ARE signaling pathway: An *in vitro* study [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9: 67.
- [40] Ahiskali I, Pinar CL, Kiki M, *et al.* Effect of taxifolin on development of retinopathy in alloxan-induced diabetic rats [J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2019, 38(3): 227-232.
- [41] Gupta S K, Sharma H P, Das U, V *et al.* Effect of rutin on retinal VEGF, TNF- α , aldose reductase, and total antioxidant capacity in diabetic rats: Molecular mechanism and ocular pharmacokinetics [J]. *Int Ophthalmol*, 2020, 40(1): 159-168.
- [42] Ye Q, Lin Y N, Xie M S, *et al.* Effects of etanercept on the apoptosis of ganglion cells and expression of Fas, TNF- α , caspase-8 in the retina of diabetic rats [J]. *Int J Ophthalmol*, 2019, 12(7): 1083-1088.
- [43] Li Y, Sun R, Zou J, *et al.* Dual roles of the AMP-activated protein kinase pathway in angiogenesis [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 752.
- [44] Zeng M, Shen J, Liu Y, *et al.* The HIF-1 antagonist acriflavine: Visualization in retina and suppression of ocular neovascularization [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(4): 417-429.

[责任编辑 高源]