

GEO 芯片联合网络药理学和分子对接探讨归芍地黄汤治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性的作用机制及实验验证

石楠楠^{1,2}, 曹明芳^{2*}, 李婧², 梁慧颖^{1,2}, 吴安迪^{1,2}, 袁智^{1,2}

1. 福建中医药大学, 福建 福州 350122

2. 福建中医药大学附属人民医院, 福建 福州 350004

摘要: 目的 基于高通量基因表达数据库 (GEO)、网络药理学和分子对接技术分析归芍地黄汤对新生血管性年龄相关性黄斑变性的可能作用靶点和相关机制, 并通过体内实验进行验证。方法 通过查阅文献及中国传统医学公共数据库 (TCMSP) 确定归芍地黄汤的主要成分及靶标, 绘制成分-靶点网络拓扑图。通过整合 GEO 数据库和公共数据库对新生血管性年龄相关性黄斑变性的疾病靶点进行预测。使用 Venny 在线平台确定药物-疾病的交集靶点, 构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络图, 利用 Cytoscape 软件筛选关键基因 (Hub), 利用 R 语言对交集靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。将归芍地黄汤核心成分与靶基因之间进行分子对接, 最后利用光学相干断层扫描和免疫组化显示组织病理学变化, 荧光素眼底血管造影观察脉络膜新生血管膜渗漏情况, 并验证其对靶基因表达水平的影响。结果 从 GSE29801 数据集中获得 50 个差异基因, 筛选得到药物-疾病交集靶点 134 个。核心靶点包括白蛋白 (ALB)、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (CASP3)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、过氧化氢酶 (CAT)、表皮生长因子受体 (EGFR)、缺氧诱导因子 1A (HIF1A)。这些基因主要富集在对外来生物刺激的反应、对营养水平的反应和创口愈合等生物学过程中, 参与衰老、氧化应激、免疫炎症反应和细胞凋亡等相关途径。分子对接预测显示, 归芍地黄汤核心成分与丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8)、VEGFA、TNF- α 、IL-6 表现出稳定的结合。动物实验显示, 归芍地黄汤减轻了激光造模诱导的眼底病变, 下调了 VEGF、TNF- α 水平, 且治疗前后 BN 大鼠 p38 MAPK 表达水平存在差异。结论 归芍地黄汤可以减轻脉络膜新生血管膜渗漏大鼠视网膜病变, 揭示了归芍地黄汤治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性可能与激活 MAPK 信号通路有关。

关键词: 归芍地黄汤; 新生血管性年龄相关性黄斑变性; GEO 数据库; 网络药理学; 山柰酚; 槲皮素

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)06-1321-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.06.005

Mechanism and verification of Guishao Dihuang Decoction in treatment of neovascular age related macular degeneration by GEO gene microarray combined with network pharmacology and molecular docking technology

SHI Nan-nan¹, CAO Ming-fang², LI Jing², LIANG Hui-ying¹, WU An-di¹, YUAN Zhi¹

1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China

Abstract: Objective To explore the potential targets and related mechanisms of Guishao Dihuang Decoction in treatment of neovascular age related macular degeneration based on the GEO gene microarray database, network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The main targets and main component of Guishao Dihuang Decoction were identified by reviewing the literature and public databases of Chinese traditional medicine (TCMSP). Disease targets of neovascular age related macular degeneration were predicted by integrating GEO database and public databases. Drug-disease intersection targets were identified using the Venn online platform and the intersection targets were used to construct protein interaction network maps. Hub genes were screened using Cytoscape software, GO and KEGG enrichment analysis of the intersection targets were performed using R language. Molecular

收稿日期: 2023-02-13

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2020J011046); 福建中医药大学附属人民医院中药制剂研发项目 (ZYJZ2019003)

作者简介: 石楠楠, 女, 在读研究生, 研究方向为中医眼科。E-mail: 1181982648@qq.com

*通信作者: 曹明芳, 博士, 教授, 主要从事中医眼科疾病的防治与研究。E-mail: farrahcao@126.com

docking was performed between the core components of Guishao Dihuang Decoction and the target genes. Finally, optical coherence tomography and immunohistochemistry were used to reveal histopathological changes, and fluorescein fundus angiography was used to observe the leakage of choroidal neovascularization membrane, and to verify its influence on the expression level of target genes.

Results There were 50 differentially expressed genes from the GSE29801 dataset. A total of 134 intersection targets were screened. The core targets included ALB, TP53, AKT1, IL6, TNF, CASP3, VEGFA, CAT, EGFR, and HIF1A. These genes were mainly enriched in biological processes such as response to xenobiotic stimulation, response to nutrient level, and wound healing, and involved in related pathways such as aging, oxidative stress, immune inflammatory response, and apoptosis. The result of molecular docking showed that the core components of Guishao Dihuang Decoction had a stable binding with MAPK8, VEGFA, TNF α , and IL-6. Animal experiments revealed that Guishao Dihuang Decoction alleviated fundus lesions induced by laser modeling, down-regulated the expression levels of VEGF and TNF α , and there was a difference in the expression level of p38MAPK in BN rats before and after treatment. **Conclusion** Guishao Dihuang Decoction can attenuate retinal lesions in leakage of the choroidal neovascularization membrane rats and preliminarily revealed that the treatment of neovascular age related macular degeneration with Guishao Dihuang Decoction may be related to the activation of MAPK signaling pathway.

Key words: GuiShaoDiHuang Decoction; neovascular age-related macular degeneration; GEO gene microarray database; network pharmacology; kaempferol; quercetin

年龄相关性黄斑变性是一种中央视网膜进展性的慢性疾病^[1]。目前已成为第 3 大中重度视力障碍的主要原因^[2]。随着人口老龄化的发展,预计到 2040 年患病人数将达到 2.88 亿^[3]。年龄相关性黄斑变性主要有 2 种类型,其中新生血管性年龄相关性黄斑变性约占年龄相关性黄斑变性导致严重视力丧失的 80%^[4]。尽管抗血管内皮生长因子(VEGF)已应用于新生血管性年龄相关性黄斑变性的治疗中,并显示出一定的效果。然而,由于患者依从性不高,且多次眼内注射增添了患者和社会的经济负担^[5-7]。因此,积极探索新生血管性年龄相关性黄斑变性的发病机制,寻找安全有效的药物是迫切需要解决的问题。

归芍地黄汤首见于《症因脉治》卷二,具有养血滋阴的功效,主治肝肾真阴不足的目昏眼花。动物实验已经观察到归芍地黄汤能够下调青紫蓝兔眼内的 VEGF 水平,抑制新生血管生成,对于新生血管性年龄相关性黄斑变性有治疗作用^[8-10]。临床研究表明,归芍地黄汤联合光动力疗法、经瞳孔温热疗法和抗 VEGF 治疗能够很好改善新生血管性年龄相关性黄斑变性临床表现,治疗效果更佳^[11-12]。尽管归芍地黄汤在治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性方面显示出巨大的潜力,但其保护机制仍然不明确。本研究基于 GEO 基因数据库联合网络药理学及分子对接技术对归芍地黄汤防治新生血管性年龄相关性黄斑变性的分子机制进行探讨,并通过光学相干断层扫描、荧光血管造影、免疫组化等方法进行实验验证,初步验证相关作用机制,为后续实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 归芍地黄汤靶点预测

首先通过 TCMSP 数据库(<https://tcmsp-e.com/tcm-sp.php>)^[13]检索当归、白芍、生地、丹皮、茯苓、山药、山茱萸、泽泻的药物有效成分。按照药动学参数(ADME),在数据库中筛选口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18 的药物成分。同时收集文献中相关药物的化学成分及分子结构式,将化合物结构输入 Swiss ADME 平台(<http://www.swissadme.ch/>)^[14],上传 sdf 格式文件,设置核心化合物标准:(1)胃肠道吸收为 High,表明口服生物利用度良好;(2)类药性预测中前 5 项至少 2 项或 2 项及以上为 Yes,可以降低药物研发的风险。随后对药物成分进行靶点预测,一种是通过数据库预测,另一种是将药物成分名称输入至 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>),下载 2D sdf 格式,上传至 PharmMapper 数据库(<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmMapper/>)^[15-17]中进行靶点预测,选择目标集为“human protein targets only”,得到结果后按照 Norm Fit≥0.9 进行靶点筛选,将预测结果复制到 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)^[18]中对蛋白质靶点和基因进行标准化和整合;最后整理药物靶点数据库,上传至 Cytoscape 软件,绘制出药靶网络图。

1.2 Agilent 微阵列数据收集

基于 GEO 数据库中检索新生血管性年龄相关性黄斑变性的原始数据。GSE29801 数据集^[19]包含了 31 只正常眼、26 只年龄相关性黄斑变性和 11 只潜在的年龄相关性黄斑变性人眼的视网膜色素上

皮 (RPE)-脉络膜复合物进行系统级转录组分析, 使用 GPL4133 Agilent-014850 全人类基因组微阵列对该数据集进行分析。这个数据集发现了年龄相关性黄斑变性新的全球生物标志物和基因表达特征, 使用 R 4.2.1 软件 Limma 包提取探针矩阵, 其中的 normalize betweenarrays 函数进行数据标准化处理, 并用 pheatmap 包绘制热图进行可视化分析。

1.3 差异表达基因的选择及新生血管性年龄相关性黄斑变性靶点的筛选

收集 GSE29801 中全部正常与年龄相关性黄斑变性患者的基因, 设置 $P < 0.05$, 选出前 50 个差异表达基因。同时分别在 4 个公共数据库 TCMSP (<https://tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/drugs>)、GeeenCard (<https://www.genecards.org>)、OMIM (<https://mirror.oomi.org>) 搜索相关新生血管性年龄相关性黄斑变性基因靶标, 以 “wet age related macular degeneration” “neovascular age-related macular degeneration” “exudative age-related macular degeneration” 为关键词, 纳入所有的疾病靶标, 利用 Uniprot 数据库进行基因名转换, 结合 GEO 数据库结果, 删除所有重复项, 构建新生血管性年龄相关性黄斑变性疾病靶点数据库。

1.4 蛋白相互作用 (PPI) 网络构建

为了阐述归芍地黄汤与新生血管性年龄相关性黄斑变性预测靶点之间的 PPI 关系, 在 Venn (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 在线数据库中输入靶点, 得到交集基因。随后将获得的交集靶点上传至 STRING 数据库中进行 PPI 网络构建, 将物种设置为 “homo sapiens”, 下载 TSV 文件上传至 Cytoscape 3.7.2 中, 利用 cytoHubba 插件根据 degree 值进行网络拓扑分析选出 Hub 基因。

1.5 生物功能富集分析

基因本体 (GO) 分析根据分子功能 (MF)、生物过程 (BP) 和细胞组成 (CC) 对基因和基因产物进行注释。京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 是系统分析基因功能和相关高水平基因组功能信息的有用资源。下载 R 语言 org.Hs.eg.db、clusterProfiler、enrichplot、ggplot2 安装包对交集基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析, 并绘制气泡图可视化数据。

1.6 分子对接验证

首先准备 PDB 文件, 基于药靶网络根据 degree

值, betweenness 值和 closeness 值挑选出配体小分子, 随后在 TCMSP 数据库下载 mol2 格式文件, 或者使用 PubChem 数据库下载 2D sdf 格式文件。同时将 Hub 基因作为受体蛋白, 在 PDB 数据库检索大分子蛋白质结构, 结合 Uniprot 数据库, 根据分辨率、分子结晶和文献等筛选出合适的分子构象, 下载为 pdb 格式文件。使用 AutoDock tools 1.5.6 对蛋白质进行去水、加全氢, 导出 PDBQT 文件并设置为受体; 小分子加全氢, 设置为配体, 导出为 PDBQT 文件, 设置对接盒子, 导出为 GPF, 运行 Autogrid4, 设置对接参数集运算方法, 运行 Autodock4, 查看结果, 导出为 PDBQT 文件。最后通过 OpenBabel 2.4.1 将文件格式转化为 PDB, 并将文件导入 Pymol 软件中对得到的对接蛋白结构进一步优化。

1.7 实验验证

1.7.1 试剂与仪器 10%水合氯醛 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 J01HR12242A)、复方托吡卡胺滴眼液 [参天制药 (中国) 有限公司, 批号 MP2206]、倍诺喜滴眼液 (日本参天制药株式会社, 批号 H20100364)、卡波姆凝胶 (山东博士伦福瑞达制药有限公司, 批号 J20140165)、荧光素钠 (广州白云山明兴制药有限公司, 批号 1203001)。归芍地黄汤 (当归 10 g、白芍 10 g、生地 24 g、牡丹皮 10 g、山药 12 g、山茱萸 12 g、泽泻 10 g、茯苓 10 g), 制成浓缩制剂, 原生药 1.50 g/mL。由本院药学部制备并提供。双子星 Viridis-twin 多波段眼底激光治疗仪 532 nm 激光机 (法国光太公司)、Spectralis HRA 眼底血管造影仪 (德国海德堡公司)、Cirrus HD OCT 视网膜光学相干断层扫描仪 (德国蔡司公司)、前置镜 (美国 Volk 公司)、移液器 (德国 eppendorf)、酶标仪 (美国伯乐公司)、DHG-9091A 干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

1.7.2 动物与分组 选用 6~8 周龄的棕色挪威 (BN) 大鼠 27 只, 雌雄各半, 体质量 180~220 g。大鼠购自北京斯贝福生物技术有限公司 [动物许可证号 SCXK (京) 2019-0010], 动物实验经福建中医药大学伦理委员会批准, 批准文号 FJTCM IACUC 2022156。

将大鼠随机分为对照组、模型组和归芍地黄汤组, 每组各 9 只。对照组未经任何处理, ig 等量蒸馏水, 模型组常规造模, ig 蒸馏水, 归芍地黄汤组在造模的基础上给予归芍地黄汤, 根据原方和临床

处方用量,按照《实验动物学》^[20]中实验动物及人的体表面积比例进行剂量换算,ig 剂量为 11.13 g/(kg·d),持续至造模后 21 d。

1.7.3 造模 ip 10%水合氯醛,按照 3~4 mL/kg 全身麻醉,复方托比卡胺滴眼液频点散瞳,倍诺喜行眼表麻醉,在激光机前固定好大鼠,使用 532 nm 激光于大鼠视乳头 1~2 PD 行视网膜激光光凝,激光功率 280~320 mW,光凝斑直径 50 μ m,曝光时间 0.1 s,点数:每只眼球 25 点。观察眼底激光光凝处有气泡产生或伴有轻度出血即为 Brunch 膜破裂的标志^[21-22]。

1.7.4 光学相干断层扫描(OCT)和荧光素眼底血管造影(FFA)检查 造模后 1、2、3 周对大鼠眼底进行 OCT 和 FFA 检查,麻醉步骤同 1.7.3 项,对模型组和归芍地黄汤组的眼底病变处扫描,对照组进行全视网膜扫描以作对比。随后使用 5 mL 注射器抽取荧光素钠注射液,按照大鼠体质量 0.05~0.1 mL/100 g,进行尾 iv。充分暴露大鼠眼球于眼底血管造影仪器前,保持眼球表面滋润,进行检查。

1.7.5 免疫组织化学染色 造模 3 周后对大鼠进行安乐死,固定大鼠头部,暴露眼球,用显微镊夹持眼球周围组织,组织剪剪去眼球周围筋膜及脂肪组织,取出眼球后,固定并沿着赤道平面将眼球剪开,留下眼杯部分放入 4%多聚甲醛中保存。将视网膜组织进行脱水、包埋、切片等操作。采用免疫组化 SP 法,使用 200 倍目镜进行观察,选取阳性表达最多的切片,应用 Image J 2.1.0 计算 VEGF 蛋白质的积分光密度。

1.7.6 实时荧光定量 PCR(qPCR) 取材方法同 1.7.5 项,将视网膜-脉络膜-巩膜复合体储存于液氮后统一行 PCR 检测视网膜脉络膜中 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)含量。取大鼠眼杯部分,参照试剂盒说明加样进行逆转录反应,qPCR 扩增。

通过 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行数据处理,将阴性对照组设定为 1,以相对定量 C_t 值用于统计分析。p38 MAPK 的引物序列为 3'-TTGGACTCGGAT AAGAGGATCAC-5'(正向)、3'-TAGGTCAGG CTC TTCCATTTCG-5'(反向),内参为 GAPDH。

1.7.7 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)含量测定 取材方法同 1.7.5 项下,将收集的眼杯组织于冰水中匀浆,3 000 r/min,10 min 离心后提取组织上清液,存放于液氮中统一行 ELISA 检测视网膜中 TNF- α 、IL-6 含量。

1.8 统计学分析

数据均采用 SPSS 26.0 软件进行分析,Graphpad Prism 9.0.0 软件绘制图像。计量资料符合正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 归芍地黄汤和新生血管性年龄相关性黄斑变性靶点预测

基于文献报道^[23-26]及 TCMSP 数据库中筛选得出 87 个有效活性成分,其中当归 2 个,白芍 13 个,山药 16 个,山茱萸 20 个,茯苓 15 个,泽泻 10 个,丹皮 11 个,生地黄 8 个,见表 1。使用 PharmMapper 预测得到了 1 734 药物靶标,删除重复之后保留了 308 个潜在的归芍地黄汤靶点。根据所收集的药物成分-靶点,利用软件构建网络拓扑图,如图 1 所示。在 GSE29801 数据集中使用 R 语言的 Limma 包提取出探针矩阵,运用 normalize betweenarrays 函数对数据进行标准化处理,标准化前后结果见图 2。该数据集使用双色通用参考设计对 177 个来自人类供体眼 RPE 脉络膜黄斑或黄斑外区域的样本和 118 个来自人类供体视网膜黄斑或黄斑外区域的样本进行分析,对该数据集中所有正常人和新生血管性年龄相关性黄斑变性患者样本进行分析,绘制前 50 个差异基因热图,如图 3 所示。

表 1 归芍地黄汤主要成分

Table 1 Main components of Guishao Dihuang Decoction

MOL 编号	成分	OB/%	DL	来源
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	当归
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	
MOL001910	11alpha,12alpha-epoxy-3beta-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12beta-olide	64.77	0.38	白芍
MOL001918	paeoniflorgenone	87.59	0.37	
MOL001919	(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione	43.56	0.53	
MOL001921	lactiflorin	49.12	0.80	
MOL001924	paeoniflorin	53.87	0.79	
MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40	

续表 1

MOL 编号	成分	OB/%	DL	来源
MOL001928	albiflorin_qt	66.64	0.33	白芍
MOL001930	benzoyl paeoniflorin	31.27	0.75	
MOL000211	mairin	55.38	0.78	
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	
SD1	caproic acid	—	—	生地黄
SD2	rehmapicrogenin	—	—	
SD3	rehmaglutin A	—	—	
SD4	rehmaglutin B	—	—	
SD5	rehmaglutin D	—	—	
SD6	rehmaglutin C	—	—	
SD7	gentistic acid	—	—	
SD8	versulin	—	—	
MOL001559	piperlonguminine	30.71	0.18	山药
MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27	
MOL000310	denudatin B	61.47	0.38	
MOL000322	kadsurenone	54.72	0.38	
MOL005429	hancinol	64.01	0.37	
MOL005430	hancinone C	59.05	0.39	
MOL005435	24-methylcholest-5-en-3 β -O-glucopyranoside_qt	37.58	0.72	
MOL005438	campesterol	37.58	0.71	
MOL005440	isofucosterol	43.78	0.76	山茱萸
MOL000449	stigmaterol	43.83	0.76	
MOL005458	dioscoreside C_qt	36.38	0.87	
MOL000546	diosgenin	80.88	0.81	
MOL005461	doradexanthin	38.16	0.54	
MOL005463	methylcimicifugoside_qt	31.69	0.24	
MOL005465	AIDS180907	45.33	0.77	
MOL000953	CLR	37.87	0.68	
MOL001494	mandenol	42.00	0.19	茯苓
MOL001495	ethyl linolenate	46.10	0.20	
MOL001771	poriferast-5-en-3 β -ol	36.91	0.75	
MOL002879	diop	43.59	0.39	
MOL002883	ethyl oleate (NF)	32.40	0.19	
MOL003137	leucanthoside	32.12	0.78	
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	
MOL000449	stigmaterol	43.83	0.76	茯苓
MOL005360	malkangunin	57.71	0.63	
MOL005481	2,6,10,14,18-pentamethylicosa-2,6,10,14,18-pentaene	33.40	0.24	
MOL005486	3,4-dehydrolycopen-16-al	46.64	0.49	
MOL005489	3,6-digalloylglucose	31.42	0.66	
MOL005503	cornudentanone	39.66	0.33	
MOL005530	hydroxygenkwanin	36.47	0.27	
MOL005531	telocinobufagin	69.99	0.79	
MOL008457	tetrahydroalstonine	32.42	0.81	茯苓
MOL000554	gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside	30.25	0.67	
MOL005552	gemin D	68.83	0.56	
MOL005557	lanosta-8,24-dien-3-ol,3-acetate	44.30	0.82	
MOL000273	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	30.93	0.81	
MOL000275	trametenolic acid	38.71	0.80	
MOL000276	7,9(11)-dehydropachymic acid	35.11	0.81	
MOL000279	cervisterol	37.96	0.77	
MOL000280	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	31.07	0.82	

续表 1

MOL 编号	成分	OB/%	DL	来源
MOL000282	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	43.51	0.72	茯苓
MOL000283	ergosterol peroxide	40.36	0.81	
MOL000285	(2R)-2-[(5R,10S,13R,14R,16R,17R)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	38.26	0.82	
MOL000287	3beta-hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	38.70	0.81	
MOL000289	pachymic acid	33.63	0.81	
MOL000290	poricoic acid A	30.61	0.76	
MOL000291	poricoic acid B	30.52	0.75	
MOL000292	poricoic acid C	38.15	0.75	
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	
MOL000300	dehydroeburicoic acid	44.17	0.83	
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	泽泻
MOL000830	alisol B	34.47	0.82	
MOL000831	alisol B monoacetate	35.58	0.81	
MOL000832	alisol,b,23-acetate	32.52	0.82	
MOL000849	16β-methoxyalisol B monoacetate	32.43	0.77	
MOL000853	alisol B	36.76	0.82	
MOL000854	alisol C	32.70	0.82	
MOL000856	alisol C monoacetate	33.06	0.83	
MOL002464	1-monolinolein	37.18	0.30	
MOL000862	[(1S,3R)-1-[(2R)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5R,8S,9S,10S,11S,14R)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]butyl] acetate	35.58	0.81	
MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40	丹皮
MOL000211	mairin	55.38	0.78	
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	
MOL007003	benzoyl paeoniflorin	31.14	0.54	
MOL007369	4-O-methylpaeoniflorin_qt	67.24	0.43	
MOL007374	5-[[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene]barbituric acid	43.44	0.30	
MOL007382	mudanpioside-h_qt 2	42.36	0.37	
MOL007384	paeonidanin_qt	65.31	0.35	
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	

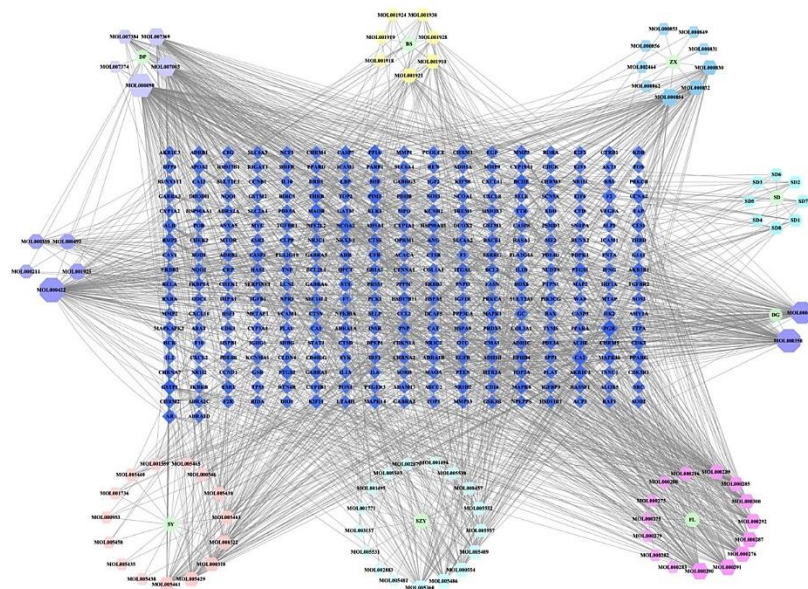


图 1 归芍地黄汤成分靶点网络拓扑图

Fig. 1 Target network topology of Guishao Dihuang Decoction

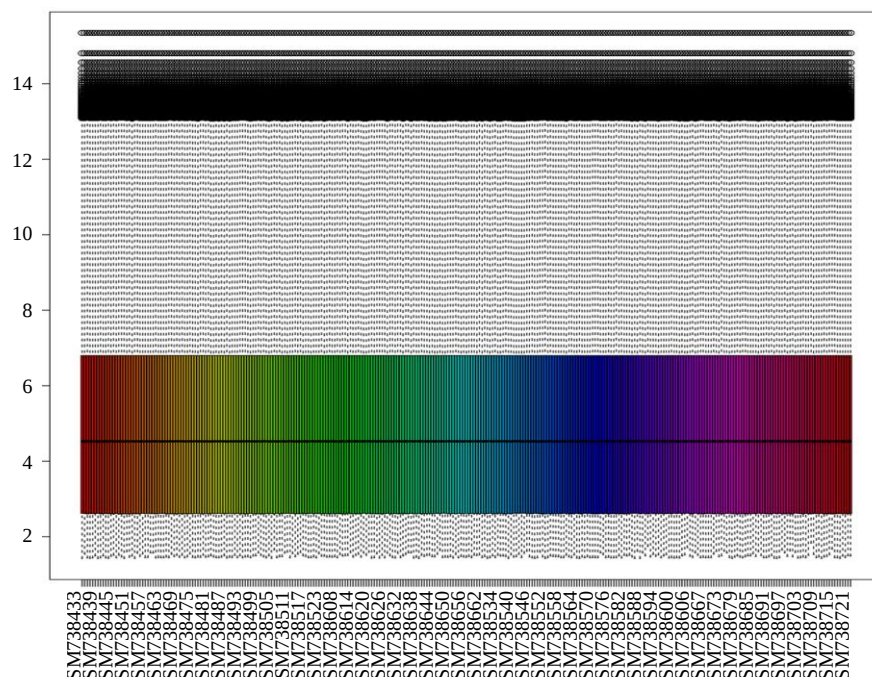


图 2 GSE29801 数据集样本

Fig. 2 Sample GSE29801 data set

2.2 归芍地黄汤和新生血管性年龄相关性黄斑变性核心靶标的确定与分析

除了在 GEO 数据库中提取疾病差异基因外, 还整合了 TCMSP、DrugBank、GeenCard、OMIM 数据库中的疾病靶标。根据检索词收集新生血管性年龄相关性黄斑变性相关基因, 其中有 3 个基因在 TCMSP 中被识别, 11 个基因在 DrugBank 被识别, 270 个靶点在 OMIM 中被预测, GeenCard 中依据 relevance score $\geq$ 中位数 (12.04) 的条件预测出 1 070 个基因。结合 GEO 数据库结果, 删除重复项后得到 1 317 个疾病预测靶标。随后, 将疾病和药物的靶点进行匹配, 得到了 134 个交集靶标。

2.3 PPI 网络及 Hub 基因

将 134 个交集靶标构建 PPI 网络, 设置最低要求互作分数为 0.4, 分析得出 134 个节点, 期望边数为 888, 实际边数为 2 896, 平均节点数为 43.2, 平均聚类系数为 0.696, PPI 富集的 P 值 $< 1.0 \times 10^{-16}$ (图 4A), 保存文件为 TSV 格式。使用 Cytoscape 3.7.2 中 “cytoHubba” 插件, 根据 degree 值筛选出前 10 个 Hub 基因[白蛋白 (ALB)、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (CASP3)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、过氧化氢酶 (CAT)、表皮生长因子受体 (EGFR)、

缺氧诱导因子 1A (HIF1A)], 用于后续分析 (图 4B)。

2.4 交集基因的生物学功能分析

GO 分析结果显示, 选中的靶基因共生成 2 767 个条目。根据 $P < 0.05$ 确定前 8 个 BP、CC、MF。KEGG 通路分析结果显示, 有 177 条通路, 主要关联的通路有脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE) 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) -Akt 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路等, 见图 5。

2.5 核心靶点分子对接

结合 PPI 和富集分析结果, 选择了 MAPK 通路上的基因作为研究对象, 并根据成分-靶点网络拓扑图中 degree 值排名靠前的活性成分槲皮素 (quercetin)、山柰酚 (kaempferol) 与所研究目的基因 MAPK8 (PDB:3PZE)、VEGFA (PDB:1MKK)、TNF- α (PDB:5TOZ)、IL-6 (PDB:1ALU) 进行分子对接, 模式图如图 6 所示, 结合自由能结果表示归芍地黄汤核心成分与关键基因之间具有良好的结合活性 (表 1)。其中槲皮素和山柰酚与 VEGFA 的结合能最小, 表示二者之间结合能力最好。

2.6 归芍地黄汤对视网膜病变的保护作用

2.6.1 OCT OCT 显示眼底视网膜的变化, 由图 7

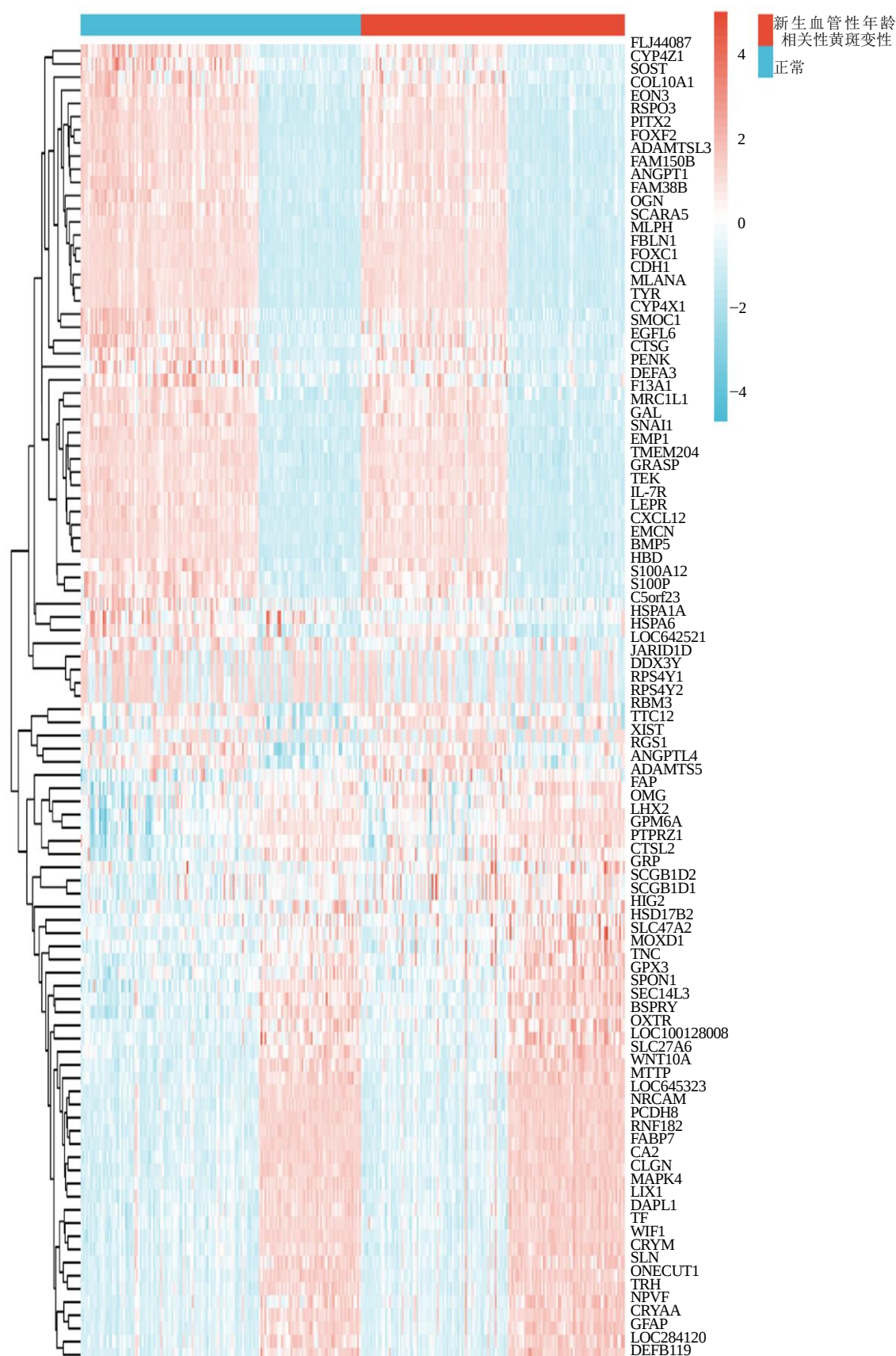
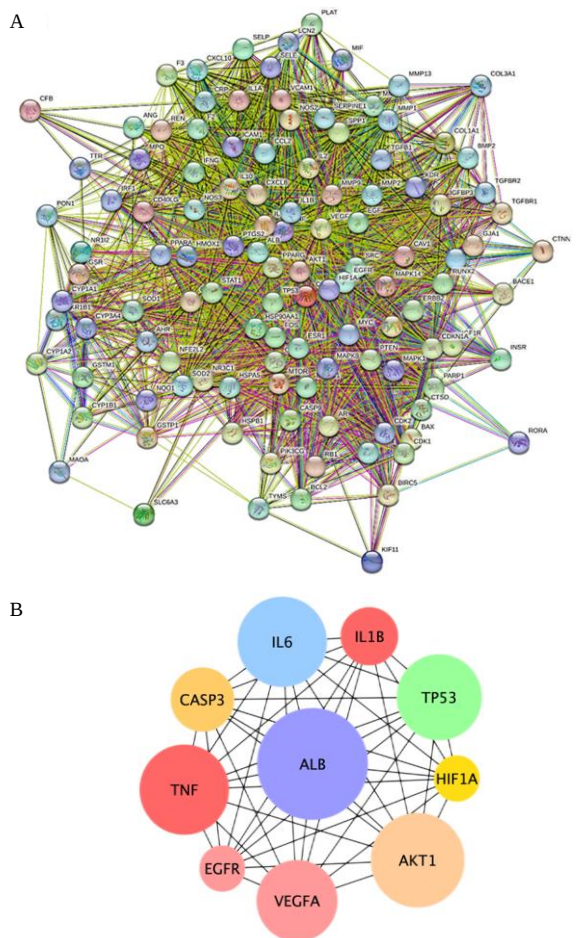


图 3 GSE29801 中新生血管性年龄相关性黄斑变性差异基因热图

Fig. 3 Heat map of differential genes for neovascular age-related macular degeneration in GSE29801



A-基于 STRING 数据库的 PPI 图 B-degree 值排名前 10 位的 Hub 基因

A- PPI map based on STRING database B- Hub genes ranked top 10 in degree value

图 4 归芍地黄汤和新生血管性年龄相关性黄斑变性交集基因的 PPI 图

Fig. 4 PPI map of intersection genes between Guishao Dihuang Decoction and neovascular age-related macular degeneration

可见, 对照组 OCT 示视网膜各层结构完整。模型组眼底 1 周可见激光斑处视网膜色素上皮层结构破坏, 呈现高反射团块; 第 2 周可见激光斑处高反射团块范围增大, 边界模糊; 第 3 周见激光斑处呈高反射, 形态、位置局限, 各层结构紊乱, 从脉络膜层突破了视网膜内层结构。而归芍地黄汤组 1 周见激光斑处结构完整, 周边呈现高反射光带; 2 周可见光斑处视网膜色素上皮层轻微隆起, 尚未突破内层视网膜; 第 3 周见激光部位反射光带平坦, 边界模糊, 呈不规则形态, 视网膜厚度明显低于阴性对照组。

2.6.2 FFA 如图 8 所示, 对照组可见血管高荧光充盈, 余无渗漏。模型组第 1 周隐约可见激光区域

环状高荧光, 与脉络膜背景荧光融合成片; 第 2 周后期像可见血管荧光消退, 光凝区域高荧光渗漏, 边界清晰; 第 3 周中晚期像见激光斑处持续高荧光, 眼底整体呈现圆环状强荧光渗漏。归芍地黄汤组第 1 周见视网膜血管强荧光渗漏, 光凝区域渗漏不明显; 2 周时隐约见环状荧光渗漏; 第 3 周可见数个激光斑区域强荧光, 其余光凝斑未见明显渗漏。

2.7 免疫组化结果

结果显示, 与模型组相比, 归芍地黄汤组吸光度值显著下降 ($P < 0.001$)。VEGF 在对照组 BN 大鼠视网膜神经节细胞层、内核层表现为弱阳性, 呈颗粒状; 模型组在视网膜神经节细胞层、内核层、外核层大量棕黄色阳性表达, 呈条带状分布。归芍地黄汤组在上述范围内表达较对照组减少, 见图 9。

2.8 归芍地黄汤对 BN 大鼠的基因表达变化的影响

结果显示, 与模型组比较, 归芍地黄汤组 p38 MAPK 显著降低 ($P < 0.001$), 见图 10A。ELISA 检测结果显示, 与模型组比较, 归芍地黄汤组 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.001$), 但 IL-6 水平与模型组相比差异无统计学意义, 见图 10B。

3 讨论

本研究主要采用网络药理学和实验验证相结合的方法, 对归芍地黄汤治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性的分子机制进行了探讨。结果发现, 归芍地黄汤能够减轻新生血管性年龄相关性黄斑变性的视网膜病变, 对 CNV 有抑制作用。其中目标基因 p38 MAPK、VEGF、TNF- α 可能参与了 MAPK 信号通路的调控。

年龄相关性黄斑变性属于中医“视瞻昏渺”“视直如曲”等眼病范畴^[27]。临床上多将黄斑区色素上皮萎缩等引起的视物模糊归属为“视瞻昏渺”; 水肿、渗出和新生血管膜等引起的视物变形归属为“视直如曲”; 眼底出血导致视力骤降归属为“暴盲”等病症范畴^[28]。年龄相关性黄斑变性的发生主要与精、气、血亏损, 肝、脾、肾功能失调有关。本病多由于年老体衰, 肝肾精血渐亏, 阴虚火旺, 灼伤络脉, 瘀血停聚, 从而导致气血循环失常, 精血不能上濡于目而致视力损害。治疗上采用宏观辨证与局部微观辨病结合的方法分型论治, 归芍地黄汤的组方侧重于滋补肝肾、活血明目。

在筛选出的核心成分中, 槲皮素是一种具有生物活性的类黄酮化合物, 具有抗氧化、抗病毒、抗菌和抗炎等特性^[29]。最近的 1 项研究报道了槲皮素

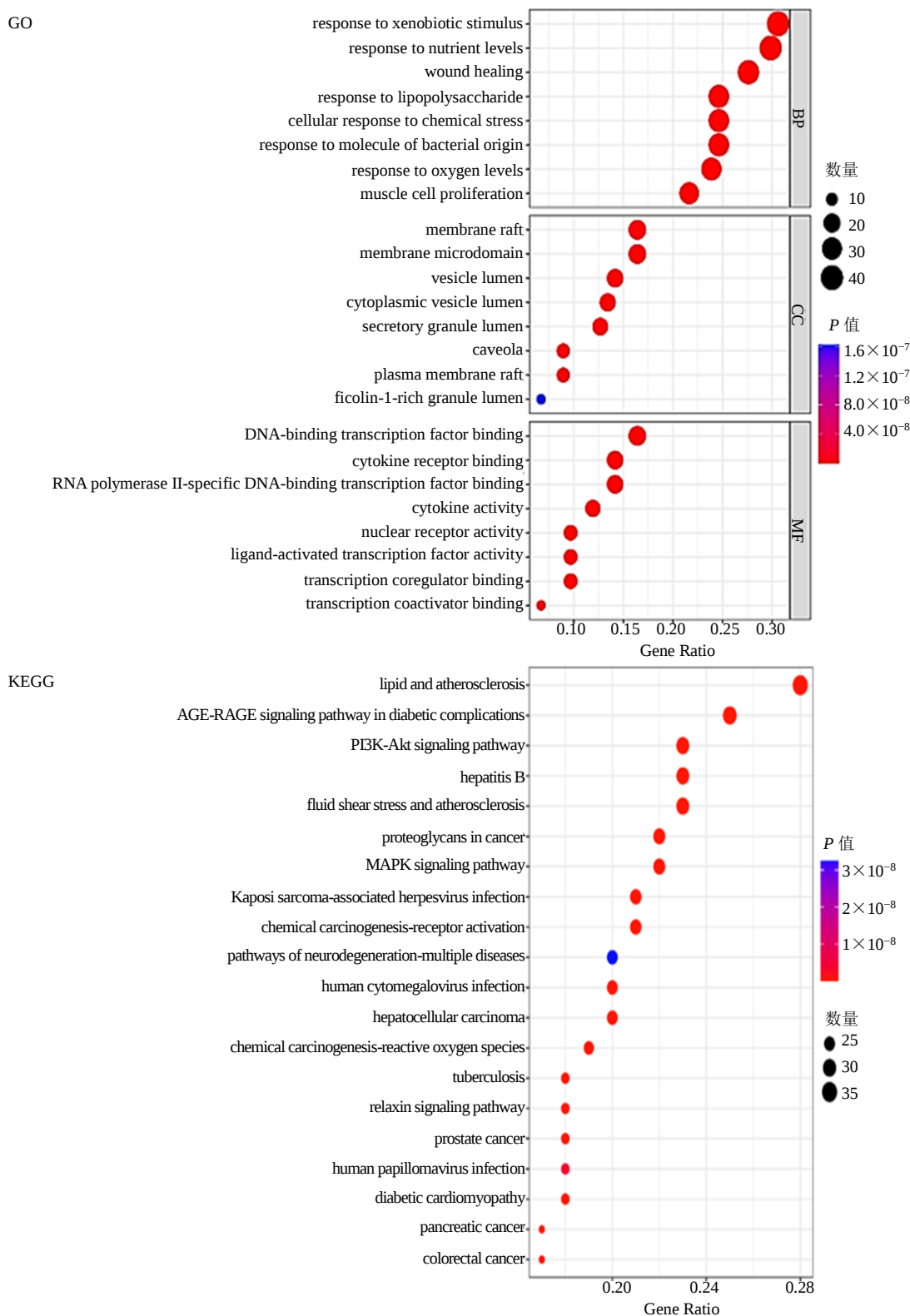


图 5 GO 与 KEGG 分析
Fig. 5 Analysis of GO and KEGG

通过调节 Smad2/3 磷酸化来抑制转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 介导的视网膜色素上皮 (RPE) 细胞的上

皮-间质转化过程, 从而抑制 RPE 细胞增殖、迁移和胶原分泌^[30]。在另一项研究中, 槲皮素在碘酸

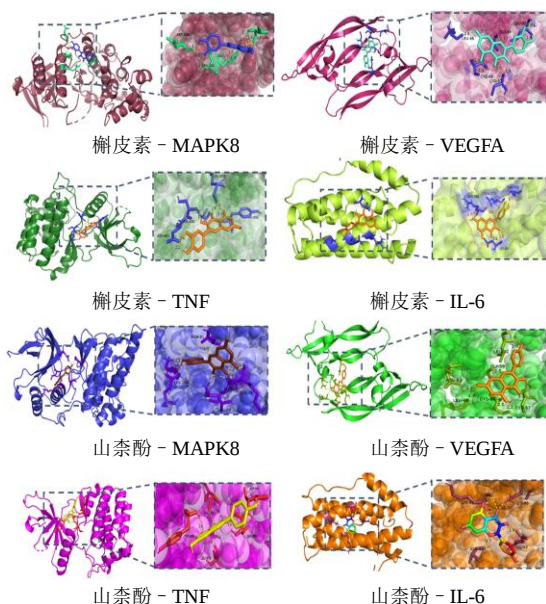


图 6 分子对接模式图

Fig. 6 Molecular docking model diagram

表 1 归芍地黄汤核心成分与关键靶点分子对接的结合能

Table 1 Binding energy of core components of Guishao Dihuang Decoction and key targets

成分	靶点	PDB ID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
槲皮素	IL-6	1ALU	-5.58
	TNF	5TOZ	-5.58
	VEGFA	1MKK	-6.97
	MAPK8	3pze	-6.00
山柰酚	IL-6	1ALU	-5.79
	TNF	5TOZ	-5.55
	VEGFA	1MKK	-6.85
	MAPK8	3pze	-6.06

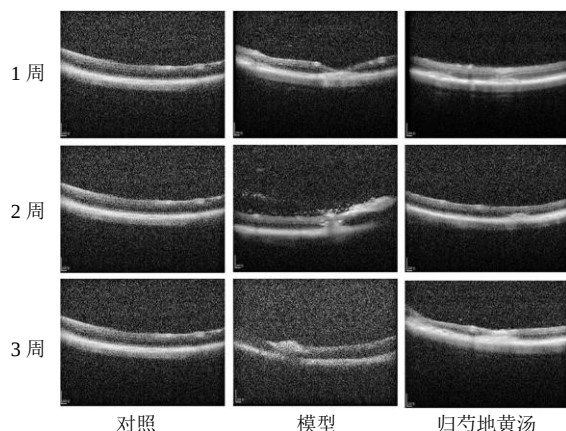


图 7 各组大鼠眼底光学相干断层扫描图

Fig. 7 Optical coherence tomography of fundus of rats in each group

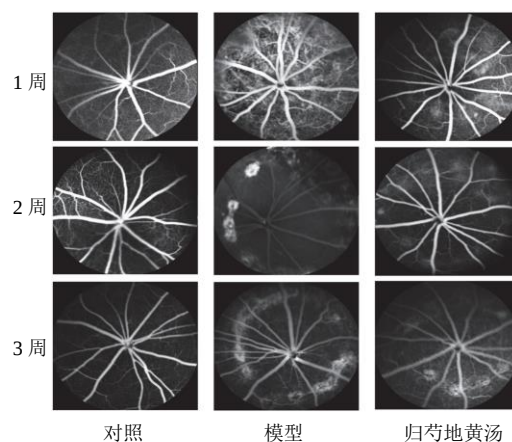
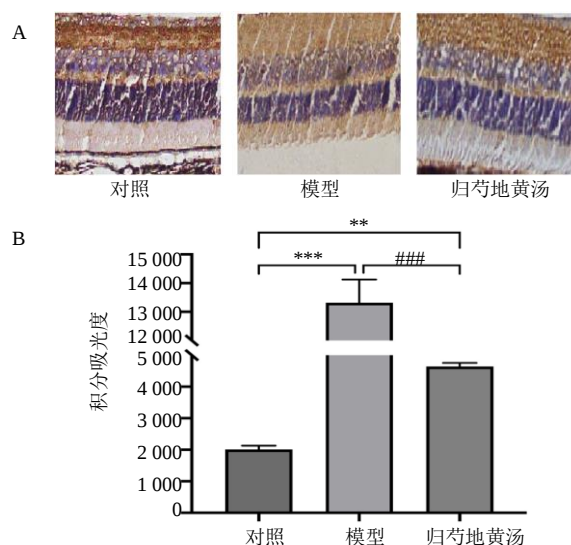


图 8 各组荧光血管造影图

Fig. 8 Fundus fluorescein angiography of each group

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group图 9 各组大鼠视网膜 VEGF 染色 (A) 和吸光度 (B) 结果
Fig. 9 Results of retinal VEGF staining (A) and expression of integral optical density (B) in rats of each group

钠 (NaIO_3) 诱导的小鼠视网膜损伤模型中降低了超氧化物歧化酶 (SOD) 水平, 逆转了氧化应激相关的病理, 验证了槲皮素通过核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) -过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α) -沉默调节蛋白 1 (SIRT1) 信号影响 SOD 的乙酰化来缓解 NaIO_3 诱导的氧化应激^[31]。山柰酚是一种天然类黄酮, 具有抗氧化、抗炎、抗癌和抗菌活性^[32]。研究表明, 山柰酚通过参与 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) /B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 信号通路,

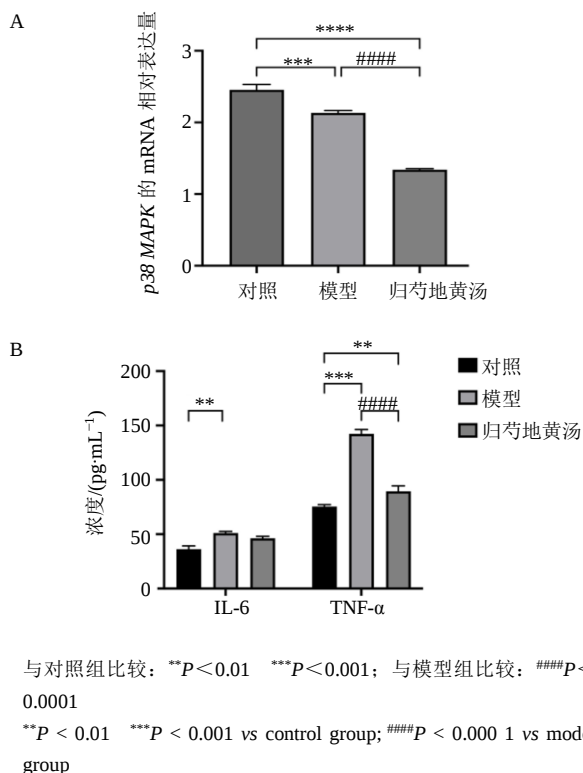


图 10 p38 MAPK mRNA 相对表达量 (A) 和 TNF- α 、IL-6 水平 (B)

Fig. 10 p38 MAPK mRNA relative expression level (A) and concentrations of TNF- α and IL-6 (B)

抑制过氧化物诱导的人视网膜上皮细胞 (ARPE-19) 氧化细胞损伤和凋亡, 并且降低了 VEGF mRNA 表达水平^[33]。

为了进一步探讨归芍地黄汤治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性的潜在机制, 本研究基于网络药理学的方法^[34]预测归芍地黄汤和新生血管性年龄相关性黄斑变性的潜在靶点, 对其中的 4 个核心靶点 (p38 MAPK、VEGF、TNF- α 、IL-6) 进行了实验验证。结果表明, p38 MAPK、VEGF、TNF- α 在归芍地黄汤治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性过程中发生了调控, 提示归芍地黄汤可以作为一种多成分、多靶点的中药复方治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性。MAPK 信号通路是一个高度保守的模块, 涉及各种细胞功能, 包括细胞增殖、分化和迁移。p38 丝裂原活化蛋白激酶、细胞外信号调节蛋白激酶 (ERKs) 和 c-Jun N 末端蛋白激酶 (JNK) 共同构成 MAPK 家族, 其中 p38 通路在正常免疫和炎症反应、细胞凋亡、细胞增殖甚至存活中起着关键作用^[35-36]。研究表明, MAPKs 参与氧化应激诱导的 RPE 变性, 磷酸化细胞外信号调节激酶 5 抗体

(ERK5) 参与血管生成, 并可能潜在调节 VEGF 介导的新生血管^[37-38]。本研究的靶基因中, VEGF 是胚胎发生、骨骼生长和生殖功能中生理血管生成的关键调节因子, 已有大量证据证实 VEGF 是病理性血管生成的中介, 并且能够增加血管通透性^[39-40]。TNF- α 和 IL-6 作为促炎细胞因子在感染和炎症中表达强烈上调, IL-6 具有多效性, 参与肝急性蛋白的诱导、及慢性炎症细胞的转运、适应性 T 细胞反应的分化、稳态调节和组织再生^[41]。

鉴于对以上核心靶点的分析, 可以推断归芍地黄汤通过抗炎、抗氧化、抑制血管生成来保护 CNV 动物模型视网膜损害。除此之外, GO 分析表示主要结果还与对脂多糖的反应、细胞凋亡和创伤愈合有关。KEGG 富集分析的通路主要包括脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力和动脉粥样硬化提示脂质代谢与新生血管性年龄相关性黄斑变性之间的关系。然而 1 项血脂水平及脂质通路基因与新生血管性年龄相关性黄斑变性发病相关性的 Meta 分析显示, 胆固醇指标、他汀类药物使用史或脂质通路基因与新生血管性年龄相关性黄斑变性的发生和进展无关^[42], 这个结果有待日后进一步研究。另外富集的通路还有糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、PI3K-Akt 信号通路和 MAPK 信号通路, 提示了衰老与某些病理因素与新生血管性年龄相关性黄斑变性之间的关系, AGE/RAGE 信号传导引发涉及还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶、蛋白激酶 C 和 MAPK 的多个细胞内信号通路的激活, 从而导致核因子 κ B (NF- κ B) 活性^[43]。此外, Janus 激酶-信号转导子与转录激活子 (JAK-STAT) 介导和 PI3K-Akt 依赖途径通过 RAGE 诱导, RAGE 又分别参与细胞增殖和凋亡^[44]。

综上所述, 本研究基于 GEO 芯片联合网络药理学, 确定了归芍地黄汤治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性的核心靶点, 并初步揭示了归芍地黄汤的治疗作用是通过 MAPK 信号通路实现, 为后续临床应用提供了坚实的理论和实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lim L S, Mitchell P, Seddon J M, et al. Age-related macular degeneration [J]. *Lancet*, 2012, 379(9827): 1728-1738.
- [2] Flaxman S R, Bourne R R A, Resnikoff S, et al. Global

- causes of blindness and distance vision impairment 1990—2020: A systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2017, 5(12): e1221-e1234.
- [3] Wong W L, Su X, Li X, *et al.* Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2014, 2(2): e106-e116.
- [4] Thomas C J, Mirza R G, Gill M K. Age-related macular degeneration [J]. *Med Clin North Am*, 2021, 105(3): 473-491.
- [5] Galindo-Camacho R M, Blanco-Llamero C, da Ana R, *et al.* Therapeutic approaches for age-related macular degeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11769.
- [6] Papadopoulos Z. Recent developments in the treatment of wet age-related macular degeneration [J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(5): 851-857.
- [7] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, *et al.* Age-related macular degeneration [J]. *Lancet*, 2018, 392(10153): 1147-1159.
- [8] 曹明芳, 刘安, 金威尔. 归芍地黄汤联合 TTT 抑制 CNV 的实验研究中细胞因子的表达 [J]. 中国中医眼科杂志, 2008(4): 210-213.
- [9] 刘安, 郑永征, 曹明芳, 等. 归芍地黄汤联合经瞳孔温热疗法对 MMP-2 和 MMP-9 抑制作用的实验研究 [J]. 中国中医眼科杂志, 2008, 18(6): 314-317.
- [10] 刘安, 曹明芳, 金威尔. 归芍地黄汤联合经瞳孔温热疗法抑制 CNV 的初步实验研究 [J]. 中国中医眼科杂志, 2008(5): 249-252.
- [11] 刘安, 任秉仪, 徐朝阳, 等. 归芍地黄汤联合 PDT 治疗肝肾不足型 ESMD 的疗效观察 [J]. 中国中医眼科杂志, 2013, 23(3): 161-164.
- [12] 曹明芳, 尤雯, 李婧, 等. 归芍地黄汤联合康柏西普治疗肝肾亏虚型湿性年龄相关性黄斑变性的疗效研究 [J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(9): 1791-1794.
- [13] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [14] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42717.
- [15] Liu X, Ouyang S, Yu B, *et al.* PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(web server issue): W609-W614.
- [16] Wang X, Shen Y, Wang S, *et al.* PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [17] Wang X, Pan C, Gong J, *et al.* Enhancing the enrichment of pharmacophore-based target prediction for the polypharmacological profiles of drugs [J]. *J Chem Inf Model*, 2016, 56(6): 1175-1183.
- [18] UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D480-D489.
- [19] Newman A M, Gallo N B, Hancox L S, *et al.* Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks [J]. *Genome Med*, 2012, 4(2): 16.
- [20] 秦川. 实验动物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 262.
- [21] Zhao M, Xie W, Hein T W, *et al.* Laser-induced choroidal neovascularization in rats [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2319: 77-85.
- [22] Grossniklaus H E, Kang S J, Berglin L. Animal models of choroidal and retinal neovascularization [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2010, 29(6): 500-519.
- [23] Liu C, Ma R, Wang L, *et al.* *Rehmanniae Radix* in osteoporosis: A review of traditional Chinese medicinal uses, phytochemistry, pharmacokinetics and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 351-362.
- [24] Zhang R X, Li M X, Jia Z P. *Rehmannia glutinosa*: Review of botany, chemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 199-214.
- [25] 朱珏, 朱香梅, 石雨荷, 等. 地黄的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中药材, 2022, 45(5): 1273-1281.
- [26] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1772-1784.
- [27] 吴星伟, 谢立科, 唐由之, 等. 国际中医临床实践指南年龄相关性黄斑变性(2021-12-14) [J]. 世界中医药, 2022, 17(16): 2229-2234.
- [28] 张仁俊, 钟兴武, 张铭连. 中西医眼科学 [M]. 北京: 科学出版社, 2019: 499.
- [29] Petrillo D A, Orrù G, Fais A, *et al.* Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review [J]. *Phytother Res*, 2022, 36(1): 266-278.
- [30] 刘畅, 蔡雯婷, 苏途, 等. 槲皮素对转化生长因子 $\beta 1$ 介导的视网膜色素上皮细胞上皮-间质转化过程的影响 [J]. 眼科新进展, 2021, 41(7): 638-642.
- [31] Hsu M Y, Hsiao Y P, Lin Y T, *et al.* Quercetin alleviates the accumulation of superoxide in sodium iodate-induced retinal autophagy by regulating mitochondrial reactive oxygen species homeostasis through enhanced deacetyl-SOD2 via the Nrf2-PGC-1 α -Sirt1 pathway [J].

- Antioxidants* (Basel), 2021, 10(7): 1125.
- [32] Luo W, Chen X, Ye L, *et al.* Kaempferol attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy by downregulating TRAF6 expression: The role of TRAF6 in diabetic nephropathy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113553.
- [33] Du W, An Y, He X, *et al.* Protection of kaempferol on oxidative stress-induced retinal pigment epithelial cell damage [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 1610751.
- [34] 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.
- [35] Chen Z, Gibson T B, Robinson F, *et al.* MAP Kinases [J]. *Chem Rev*, 2001, 101(8): 2449-2476.
- [36] Falcicchia C, Tozzi F, Arancio O, *et al.* Involvement of p38 MAPK in synaptic function and dysfunction [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5624.
- [37] Kyosseva S V. Targeting MAPK signaling in age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmol Eye Dis*, 2016, 8: 23-30.
- [38] Wu Y, Zuo Y, Chakrabarti R, *et al.* ERK5 contributes to VEGF alteration in diabetic retinopathy [J]. *J Ophthalmol*, 2010, 2010: 465824.
- [39] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(4): 581-611.
- [40] Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 669-676.
- [41] Mesquida M, Molins B, Llorenç V, *et al.* Targeting interleukin-6 in autoimmune uveitis [J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(10): 1079-1089.
- [42] Klein R, Myers C E, Buitendijk G H S, *et al.* Lipids, lipid genes, and incident age-related macular degeneration: the three continent age-related macular degeneration consortium [J]. *Am J Ophthalmol*, 2014, 158(3): 513-524.
- [43] Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes [J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(4): 217-224.
- [44] Huang J S, Guh J Y, Chen H C, *et al.* Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells [J]. *J Cell Biochem*, 2001, 81(1): 102-113.

[责任编辑 高源]