

丹参对视网膜色素变性病理过程 Müller 细胞特征性基因变化及关键蛋白表达的影响

宋厚盼^{1,2,3}, 曾梅艳², 彭俊^{3,4}, 陈小娟^{1,2}, 陈新怡^{1,2}, 何卫波^{1,2}, 杨毅敬^{3,4}, 周亚莎³, 蔡雄¹, 彭清华^{1,3,4*}

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

摘要: **目的** 基于网络药理学和生物信息学方法探讨丹参(SM)通过干预 Müller 细胞(MC)特征性基因和关键蛋白表达治疗视网膜色素变性(RP)的分子机制。**方法** 运用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)检索、筛选 SM 的入血活性成分和作用靶点;通过 GEO 数据库获取正常和 RP 小鼠 MC 差异表达基因;通过疾病数据库检索 RP 相关的基因靶点;采用 Cytoscape 构建 MC 差异表达基因和疾病靶点、成分靶点的蛋白质-蛋白质交互作用网络并提取交集;运用 DAVID 数据库对特征性基因进行基因本体和 KEGG 通路分析;采用 cytoHubba 分析筛选关键蛋白靶点。**结果** 检索得到与 SM 相关的化学成分 202 个,依据 ADME 参数筛得活性成分 65 个,其中入血活性成分 13 个,进一步检索配对得到这些成分可能作用的靶点 117 个;从芯片数据中分析得到正常和 RP 小鼠 MC 中差异表达基因 242 个;从疾病数据库获得与 RP 密切相关的靶点 206 个;提取交集得到 85 个 SM 影响 RP 病理过程 MC 的特征性基因;这些基因主要涉及转录调控、凋亡信号通路调控、DNA 核内复制调节等生物学过程,分子功能主要包括转录辅激活子活性、蛋白激酶活性、核心启动子结合等,富集于细胞核、核质、转录因子复合物、Rb-E2F 复合体等区域,主要与剪接体信号通路、肌动蛋白细胞骨架调控信号途径、细胞周期调控通路等有关;分析筛选出 SM 干预 RP 病理过程 MC 中的 8 个关键蛋白靶点。**结论** SM 药效作用的物质基础为隐丹参酮、木犀草素、丹参酮 II_A 等 13 个化学成分;其所干预的 RP 病理过程 MC 特征性基因与剪接体信号通路、肌动蛋白细胞骨架调控信号途径、细胞周期调控通路等机制相关,关键靶点包括 RB1、E2F1、TFDP1 等 8 个蛋白。

关键词: 视网膜色素变性; Müller 细胞; 丹参; 网络药理学; 生物信息学; 分子机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)08-1863-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.014

Effects of *Salviae miltiorrhizae* on characteristic gene changes and key protein expression of Müller cells in pathological process of retinitis pigmentosa

SONG Hou-pan^{1,2,3}, ZENG Mei-yan², PENG Jun^{3,4}, CHEN Xiao-juan^{1,2}, CHEN Xin-yi^{1,2}, HE Wei-bo^{1,2}, YANG Yi-jing^{3,4}, ZHOU Ya-sha³, CAI Xiong¹, PENG Qing-hua^{1,3,4}

1. Institute of Traditional Chinese Medicine 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 Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Eye, Ear, Nose and Throat Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
4. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

收稿日期: 2019-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81804150);国家自然科学基金资助项目(81703920);湖南省自然科学基金项目(2019JJ40226);湖南省自然科学基金项目(2019JJ50442);中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);湖南省中医药管理局科研项目(201780);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(2017280);湖南省中医药科研计划重点项目(201901);中医药防治耳鼻咽喉疾病湖南省重点实验室开放基金项目(2018YZD05);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2018ZYX26)

作者简介: 宋厚盼(1988—),博士,讲师,主要从事中西医结合防治眼科疾病、消化系统疾病研究。

Tel: 18182111356 E-mail: hpsong2015@126.com

***通信作者** 彭清华(1964—),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 investigate the molecular mechanism of *Salvia miltiorrhiza* (SM) in the treatment of retinitis pigmentosa (RP) by interfering with the expression of characteristic genes and key protein in Müller cells (MC) based on the methods of network pharmacology and bioinformatics. **Methods** Retrieval and screening of active ingredients and therapeutic targets of SM in blood was performed by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). Differentially expressed genes of MC in normal and RP mice were obtained by searching GEO database. RP-related gene targets were retrieved through disease database. Cytoscape was used to construct protein-protein interaction networks of differentially expressed MC genes, disease targets and component targets and the intersection was extracted. Gene Ontology and KEGG signaling pathway analysis of characteristic genes were carried out by DAVID. CytoHubba was used to analyze and screen the key protein targets. **Results** A total of 202 chemical constituents related to SM were retrieved, 65 active ingredients were screened according to ADME parameters, of which 13 were active ingredients in blood. A total of 117 possible targets were obtained by further searching and matching. A total of 242 differentially expressed genes in MC of normal and RP mice were obtained from chip data. A total of 206 targets closely related to RP were obtained from disease databases. A total of 85 characteristic genes of SM affecting MC in RP pathological process were extracted and intersected. These genes were mainly involved in transcriptional regulation, apoptotic signaling pathway regulation, DNA nuclear replication regulation and other biological processes. Molecular functions mainly include transcriptional coactivator activity, protein kinase activity, core promoter binding, etc. They were enriched in nuclear, nucleoplasm, transcription factor complex, Rb-E2F complex and other regions. The signaling pathways involved include splicer signaling pathway, actin cytoskeleton signaling pathway, cell cycle signaling pathway and so on. A total of eight key protein targets of SM on MC in RP pathological process were analyzed and screened. **Conclusion** The substance basis of the pharmacodynamics of SM is 13 chemical constituents, such as cryptotanshinone, luteolin, tanshinone II_A, etc. The MC characteristic genes involved in the pathological process of RP intervened by SM are related to spliceosome signaling pathway, actin cytoskeleton signaling pathway, cell cycle regulation pathway, etc. The key targets include eight protein such as RB1, E2F1, TFDP1, etc.

Key words: retinitis pigmentosa; Müller cell; *Salvia miltiorrhizae* Bge.; network pharmacology; bioinformatics; molecular mechanism

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, 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^[1]。RP 通常为双眼发病, 多起病于青少年时期, 30~40 岁症状明显加重, 40~50 岁时可见显著视力损害甚至全盲^[2]。

RP 在世界范围内的发病率为 1 : 7 000~1 : 1 878, 平均发病率接近 1 : 4 000, 我国的发病率为 1 : 3 784。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近 1 200 万。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, 但在已鉴定的致病基因中, 只能解释 5% 左右的原发性视网膜色素变性 (primary retinitis pigmentosa, PRP) 和 60% 左右的家族遗传型视网膜色素变性 (familial retinitis pigmentosa, FRP), 仍有很多未知的致病基因未被识别^[3]。

RP 至今尚无有效的预防和治愈方法。Müller 细胞 (MC) 是存在于哺乳动物视网膜中最主要的

神经胶质细胞, 几乎贯穿于整个视网膜, 同时具备星形胶质细胞和少突胶质细胞的功能特性。MC 对视网膜正常生理功能的发挥和病理反应的产生均具有极其重要的作用。近年研究表明, MC 具有神经干细胞特性, 当视网膜损伤后, MC 通过增殖、分化成为视网膜神经元, 可促进视网膜修复^[4]。通过分子生物学、高通量测序等方法探讨 MC 在 RP 发生发展过程中特征性基因的改变, 阐明其作用机制, 通过延缓或逆转其结构功能异常改变以防治 RP 是当前眼科疾病领域研究的热点。

RP 的中医学病名为“高风内障”, 本课题组前期大量临床实践表明, RP 的病理机制为虚中夹瘀, 在 RP 病变过程中自始至终存在血瘀的病理改变, 中医药治疗 RP 应以补虚活血为基本原则^[5]。丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈的功效^[6], 是临床治疗 RP 的常用药和代表药, 具有良好的临床疗效, 但其作用的分子机制不甚明确, 相关研究亦较少。本研究通过提取 NCBI (National Center for Biotechnology) 基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中的数据, 采用计算机分析和高效数据处理的算法语言, 读取

隐藏在全基因组表达芯片数据下的生物信息, 筛选出正常小鼠和 RP 小鼠视网膜中 MC 相关差异表达基因 (differentially expressed genes), 联合中医药系统药理学数据库和分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP), 旨在明确 RP 发生发展过程中 MC 发挥关键作用的基因和蛋白及丹参对其的干预机制, 为 RP 的临床防治研究提供思路 and 理论依据。

1 方法

1.1 丹参活性成分的筛选和靶点预测

通过 TCMSP 数据库^[7]检索出丹参的所有化学成分, 并对这些成分进行初步筛选, 筛选条件设置为口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且药物相似性 (DL) ≥ 0.18 ; 同时通过 TCMSP 数据库的靶点预测模型预测相关活性成分可能的作用靶点, 将获取的活性成分与已报道的研究结果及相关文献结合分析, 确定丹参的入血活性成分。

1.2 构建丹参活性成分-靶点网络

通过网络图像化软件 Cytoscape 3.6.1 构建丹参活性成分-靶点网络, 并对其进行分析。将筛选获得的丹参活性成分与靶基因导入软件进行相关网络构建, 其中以节点 (node) 表示分子和靶基因, 以边 (edge) 表示成分与靶基因之间的关系; 采用 network analyzer 分析网络特征, 从而明确丹参中较为重要的成分与靶基因, 结合已发表的相关文献分析其中的相互作用关系。

1.3 RP 病理过程中 MC 的 GEO 芯片数据获取

在 NCBI 的共享数据库 GEO 数据库中输入检索词 Retinitis pigmentosa, 获得 RP 表达谱数据集 63 条, 选取数据集 GSE35386, 实验平台为 GPL1261^[8]。该数据集含有 5 例正常小鼠 MC 细胞样本和 10 例 RP 小鼠 MC 样本 (包括 5 例视杆细胞受损的 MC 样本和 5 例视杆细胞、视锥细胞同时受损的 MC 样本)。为获取到较为完整的正常小鼠和 RP 小鼠 MC 中的差异表达基因, 本课题组选择分析的数据为 5 例正常小鼠的 MC 样本, 样本编号分别为 GSM867192、GSM867193、GSM867194、GSM867195、GSM867196; 5 例视杆细胞、视锥细胞同时受损小鼠的 MC 样本, 样本编号分别为 GSM867202、GSM867203、GSM867204、GSM867205、GSM867206。通过对上述样本数据进行处理分析, 获取关键的差异表达基因。

1.4 RP 病理过程中 MC 差异基因筛选

下载小鼠视网膜 MC 芯片 GSE35386 的 CEL 压缩包和探针文件。采用 R 语言分析软件 (3.5.0 版), 在 RStudio 中安装 affyPLM 数据包, 对芯片数据进行质量控制, 对原始数据进行背景校正、标准化和 log₂ 转化。运用 R 语言的 limma 包分析各组数据, 筛选差异倍数 ($|\log_2FC|$) > 2 , 调整后 P 值 < 0.05 的基因为候选差异基因探针, 并将探针转化为标准基因名称。提取的基因信息包括基因符号 (gene symbol)、log₂FC、 P 值、调整后 P 值等。并根据差异基因进行层次聚类分析。

1.5 检索已知的 RP 相关疾病靶点

在 Therapeutic Target Database (TTD)、DrugBank、Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)、Genetic association database (GAD) 和 PharmGKB 数据库中以 “Retinitis pigmentosa” 或 “pigmentary degeneration of retina” 为关键词, 对已知的 RP 靶点进行检索及筛选, 删除检索结果中重复的靶点, 获得 RP 发病相关的靶点。

1.6 丹参对 RP 病理过程中 MC 特征性基因靶点作用分析

通过构建蛋白质-蛋白质相互作用网络 (protein-protein-interaction-network, PPI), 可清晰呈现靶点与靶点之间直接或间接的调控关系。将丹参活性成分作用靶点和 MC 差异基因及 RP 疾病靶点导入 STRING (Version 10.5) 进行 PPI 网络绘制, 运用 Cytoscap 将 2 个 PPI 网络进行融合, 提取交集网络, 得到丹参治疗 RP 过程作用于 MC 的直接或间接靶点。

1.7 丹参作用于 RP 病理过程中 MC 特征性基因的基因本体 (gene ontology, GO) 及通路富集分析

GO 分析是注释基因及其表达产物的常用方法, 主要包括生物过程、细胞组成和分子功能 3 部分。京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 可对药物作用靶点 (或表达差异基因) 涉及的信号通路进行分析, 有助于了解疾病过程中发生显著改变的信号通路^[9]。本研究采用 DAVID 6.8 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 生物信息资源数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 中在线分析工具, 对丹参治疗 RP 病理过程中 MC 特征性基因进行 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的临界值, 以 Term 和 $-\lg P$ 作图。

1.8 丹参作用于 RP 病理过程 MC 关键蛋白的筛选

将“1.7”项所筛选出的特征性基因导入 STRING 软件,将最低互作分值(minimum required interaction score)设置成高度可信(high confidence: 0.7)进行分析,获得蛋白相互作用的数据,通过 cytoscape 对构建的生物学网络中的区域进行关联度分析。运用 cytoHubba 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 的蛋白,即为关键蛋白,运用 cytoscape 对结果进行可视化,获得丹参治疗 RP 过程中可能作用于 MC 的关键蛋白靶点。

2 结果

2.1 丹参生物活性成分筛选及药动学参数分析

共检索出丹参的相关化学成分 202 个,OB \geq 30%的化学成分有 106 个(52.48%),DL \geq 0.18 的化学成分有 136 个(67.33%),同时满足上述 2 个条件的化学成分为 65 个(32.18%,图 1)。经进一步

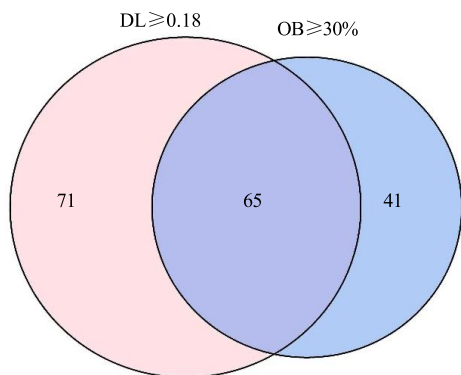


图 1 丹参生物活性成分韦恩图

Fig. 1 Wayne diagram of bioactive ingredients of SM

检索、配对分析后,在 FLRSM 中筛选到 13 个有对应靶点的入血活性成分,见表 1。在这些活性成分中,OB 值最大的为 (2R)-3-(3,4-二羟基苯基)-2-[(Z)-3-(3,4-二羟基苯基) 丙烯酰基] 氧丙酸,DL 值最大的为茯苓甾醇。

2.2 丹参作用靶点预测及其活性成分-靶点网络可视化分析

基于 TCMSP 数据库检索丹参活性成分的作用靶点,剔除重复靶点后共获得预测靶点 117 个。运用 Cytoscape 对活性成分-靶点网络图进行可视化分析,绘制相互作用关系图(图 2)。结果显示,丹参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 3 266 个,网络密集度为 0.014,网络异质性 2.599,网络集中度 0.372。

2.3 正常小鼠和 RP 小鼠 MC 中差异表达基因

通过对原始芯片数据进行分析,共筛选出正常小鼠和 RP 小鼠 MC 中表达有明显差异的基因 242 个。与正常小鼠比较,RP 小鼠 MC 中表达上调的基因有 101 个,表达下调的有 141 个。其中有 68 个基因的表达差异倍数在 5 以上,表达上调的有 55 个,表达下调的有 13 个(表 2)。表达倍数大于 5 的差异基因在正常小鼠和 RP 小鼠 MC 中的表达情况如图 3 所示,其中绿色表示表达下调,红色表示表达上调。

2.4 与 RP 密切相关的靶点

从 DrugBank、TTD、PharmGKB、GAD、OMIM 数据库分别得到 0、2、17、46、183 个与 RP 相关的基因,结合对 RP 靶点已有的研究和报道,剔除

表 1 丹参入血生物活性成分

Table 1 Bioactive ingredients of SM in blood

编号	化合物代码	化合物	OB/%	DL
1	MOL007088	隐丹参酮 (cryptotanshinone)	52.34	0.40
2	MOL007111	异硫蒽酮 II (isotanshinone II)	49.92	0.40
3	MOL007124	新隐丹参酮 II (neocryptotanshinone II)	39.46	0.23
4	MOL007132	(2R)-3-(3,4-二羟基苯基)-2-[(Z)-3-(3,4-二羟基苯基) 丙烯酰基] 氧丙酸 {(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) acryloyl] oxy-propionic acid}	109.38	0.35
5	MOL007145	鼠尾草酚酮 (salviolone)	31.72	0.24
6	MOL000006	木犀草素 (luteolin)	36.16	0.25
7	MOL007154	丹参酮 II _A (tanshinone II _A)	49.89	0.40
8	MOL007155	[(6S)-6-(羟甲基)-1,6-二甲基-8,9-二氢-7H-萘 [8,7-g] 苯并呋喃-10,11-二酮] [(6S)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho [8,7-g] benzofuran-10,11-dione]	65.26	0.45
9	MOL007156	丹参酮 VI (tanshinone VI)	45.64	0.30
10	MOL001601	1,2,5,6-四氢丹参酮 (1,2,5,6-tetrahydrotanshinone)	38.75	0.36
11	MOL001659	茯苓甾醇 (poriferasterol)	43.83	0.76
12	MOL002222	柳杉酚 (sugiol)	36.11	0.28
13	MOL002651	去氢丹参酮 II _A (dehydrotanshinone II _A)	43.76	0.40

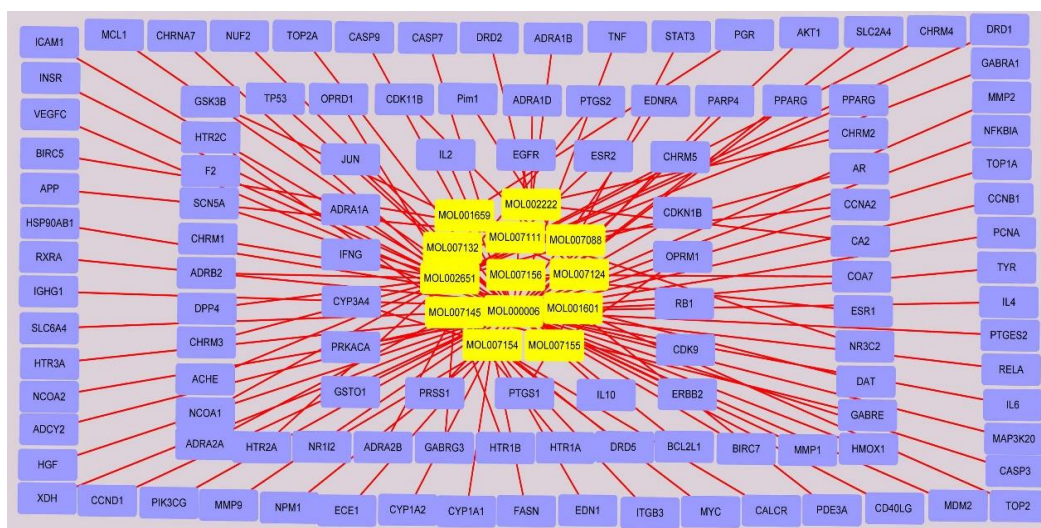


图 2 丹参生物活性成分-作用靶点网络

Fig. 2 Picture of network of bioactive ingredients and targets of SM

表 2 正常小鼠和 RP 小鼠 MC 中差异表达大于 5 倍的基因

Table 2 Differential expression of genes more than five times in MC of normal and RP mice

差异表达趋势	基因名称
上调	Fam96a、Snap25、Snhg11、Gsn、Rrn3、Gm14277、Xaf1、Zfp326、Pom121、6720475J19Rik、Fubp1、Tia1、Mcl1、Lamp5、Selk、Slc23a2、Tsn、Mageh1、Gpi1、Gsn、Npr2、Tpd5212、Oplah、Rbm25、Nefl、Gpi1、Gsn、Rad23b、Slc6a11、Hap1、Tiparp、Cdipt、Erp29、Cmb1、Psm8、Akr1b10、Psm13、Cops8、Tldc1、Ath11、Pcp2、Nme1、Rangrf、Pabpn1、Gclc、Cdk8、Vat1、Gng13、Zcchc17、Fkbp2、Khk、Psm13、Stt3b、Cnot6、Clu
下调	Apoe、Pdlim1、Ptpb1、Gpm6a、Nup50、Mettl5os、Iqca、4933401L05Rik、Snx29、Ptk2b、Kif12、Sox5、Rab17

重复靶点后，共筛选得到与 RP 密切相关的基因靶点 206 个。

2.5 丹参影响 RP 病理过程中 MC 的 PPI 网络构建与特征性基因筛选

运用 Cytoscape 对丹参生物活性成分的基因靶点进行 PPI 网络构建，检索出与其直接或间接作用的靶点 10 614 个，靶点之间的相互作用关系 414 100 个。对与 RP 发病相关的靶点绘制 PPI 网络，检索得到相关靶点 3 441 个，靶点与靶点之间的相互关系 145 952 个。RP 病理过程中 MC 差异基因 PPI 网络结果显示，共涉及相关靶点 5 011 个，相互作用关系 233 378 个。通过 Cytoscape 对以上 3 个 PPI 网络提取交集，根据网络节点的拓扑属性进行筛选，发掘 85 个丹参通过干预 MC 治疗 RP 的可能特征性基因靶点，其中相互作用关系 2 972 个，筛选策略见图 4。

2.6 丹参干预 RP 病理过程 MC 特征性基因 GO 分析

图 5 结果显示，丹参治疗 RP 病理过程对 MC 特征性基因的影响主要涉及转录负向调控、蛋白激酶活性的调节、转录正向调控、DNA 核内复制调控、

肌动蛋白细胞骨架极性的维持、凋亡信号通路调控、雷帕霉素靶蛋白复合物 2 信号通路等生物学过程；涉及的分子功能主要包括转录辅激活子活性、蛋白激酶活性、核心启动子结合、丝氨酸/苏氨酸激酶活性、ATP 结合、连接酶活性、转录共阻遏物活性等；主要富集于雷帕霉素靶蛋白复合物、细胞核、核质、转录因子复合物、聚集体、Rb-E2F 复合物、剪接体复合物等区域。

2.7 丹参干预 RP 病理过程 MC 特征性基因通路富集分析

KEGG 通路富集分析结果显示，丹参治疗 RP 病理过程对 MC 特征性基因的影响主要涉及剪接体信号通路、肌动蛋白细胞骨架调控信号途径、细胞周期调控通路、非小细胞肺癌相关信号分子、人类 T 型细胞淋巴瘤病毒感染信号通路、前列腺癌相关信号分子、环腺苷酸信号通路等（图 6）。

2.8 丹参干预 RP 病理过程 MC 关键蛋白筛选

图 7 结果显示，基于 cytoHubba 的 MCC 算法，共筛选出丹参干预 RP 病理过程 MC 中的 8 个关键

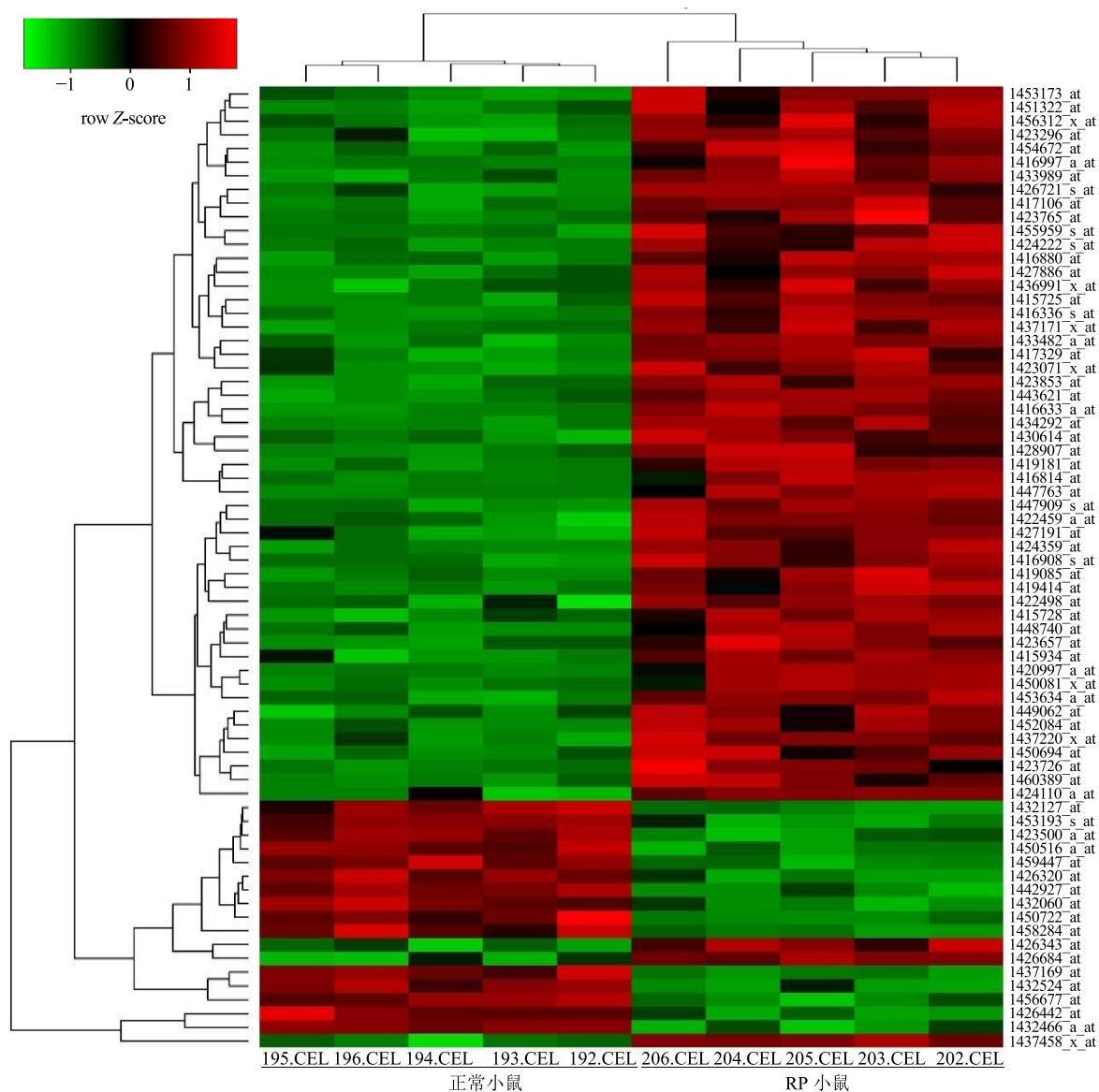


图 3 正常和 RP 小鼠 MC 中表达倍数超过 5 倍的差异基因聚类图

Fig. 3 Clustering map of differentially expressed genes more than five times in MC of normal and RP mice

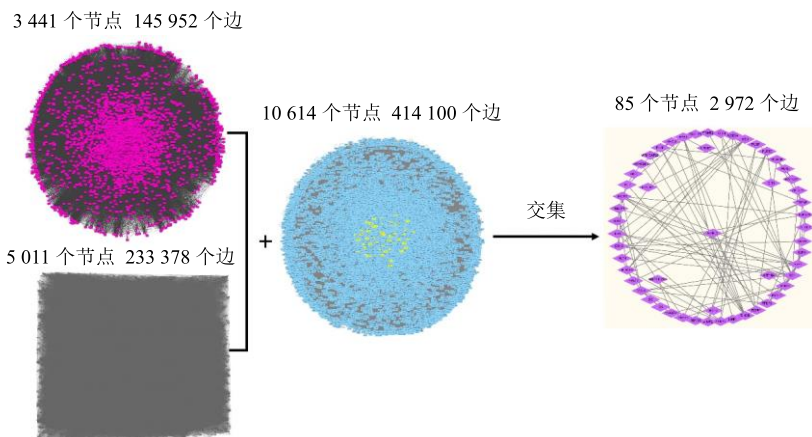


图 4 丹参治疗 RP 过程所干预的 MC 特征性基因筛选示意图

Fig. 4 Screening schematic map of MC-specific genes intervened by SM in treatment of RP

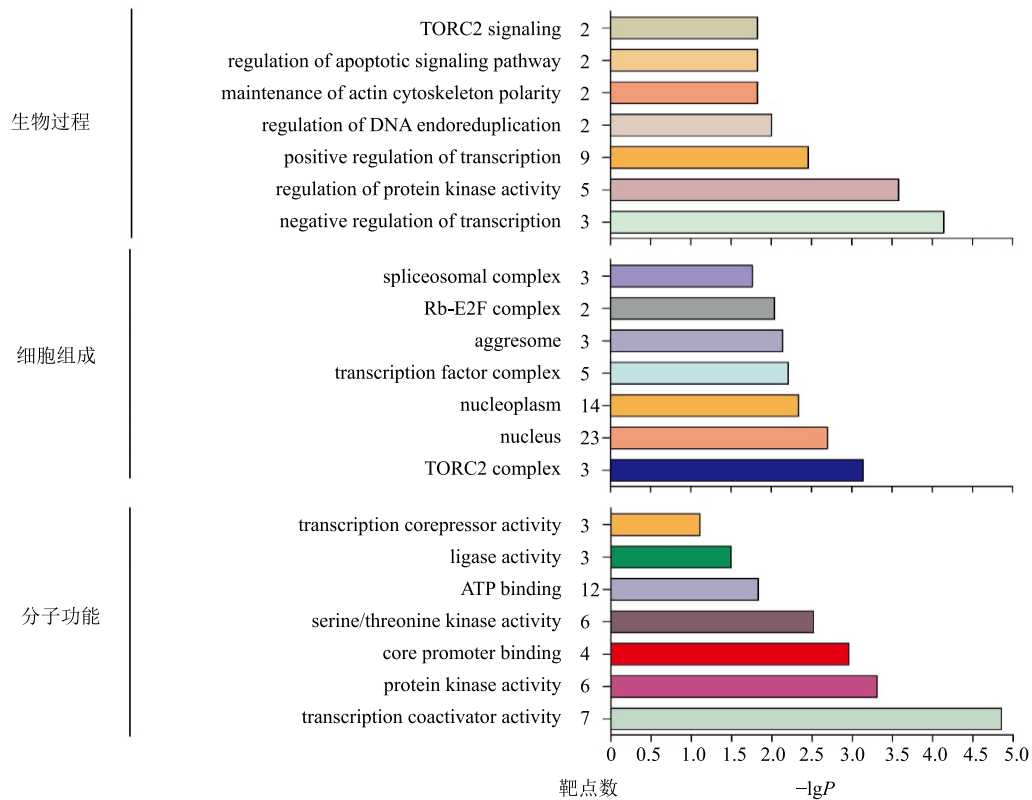


图 5 丹参干预 RP 病理过程 MC 特征性基因 GO 分析

Fig. 5 GO analysis of MC characteristic gene in RP pathological process intervened by SM

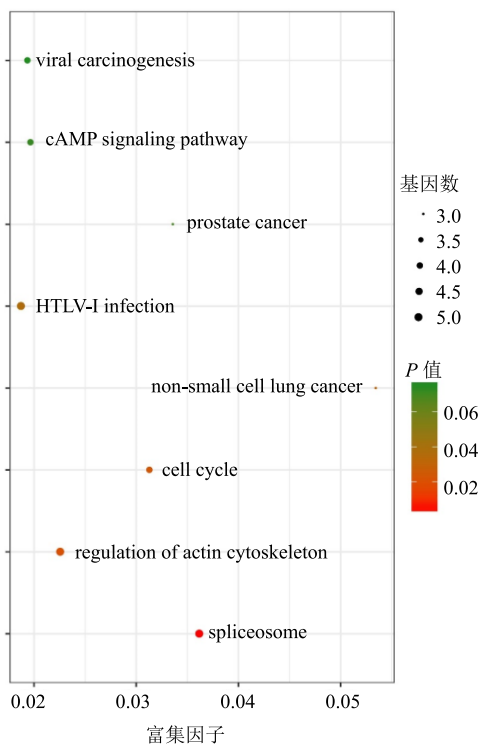


图 6 丹参干预 RP 病理过程 MC 特征性基因通路富集分析

Fig. 6 Pathway enrichment analysis of MC characteristic gene in RP pathological process intervened by SM

蛋白，其紧密相关度由高到低分别为 RB1、E2F1、TFDP1、MCL1、TFDP2、CDK5、CKD3、HUWE1。其中关键蛋白 RB1^[10]、E2F1^[11]、CDK5^[12]与已有的相关文献报道结果相吻合。

3 讨论

RP 是一种多发于青壮年的进行性视网膜功能退行性遗传眼病，在视网膜疾病类别中具有一定的代表性。当前医学界普遍认为 RP 的发病机制主要为视网膜色素上皮细胞对从光感受器脱落的外节膜盘的吞噬功能出现障碍，使其不断往视网膜外层堆积，从而引起光感受器外节段的形态结构及功能紊乱，进而引发光感受器细胞变性凋亡，致使患者视力出现严重下降^[13]。目前尚缺乏有效的预防和治疗 RP 的措施。干细胞治疗和基因治疗是当前研究较多的治疗方法，通过选择性地促进细胞增殖或抑制细胞凋亡，补充视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE) 或修复损伤的 RPE，以达到治疗目的。研究表明，人类诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS) 可分化成 RPE，iPS-RPE 在形态学上与 RPE 相近，并且可表达成熟 RPE 具备的许多标记物。人类视网膜疾病 I/II 期干细胞临床试验已

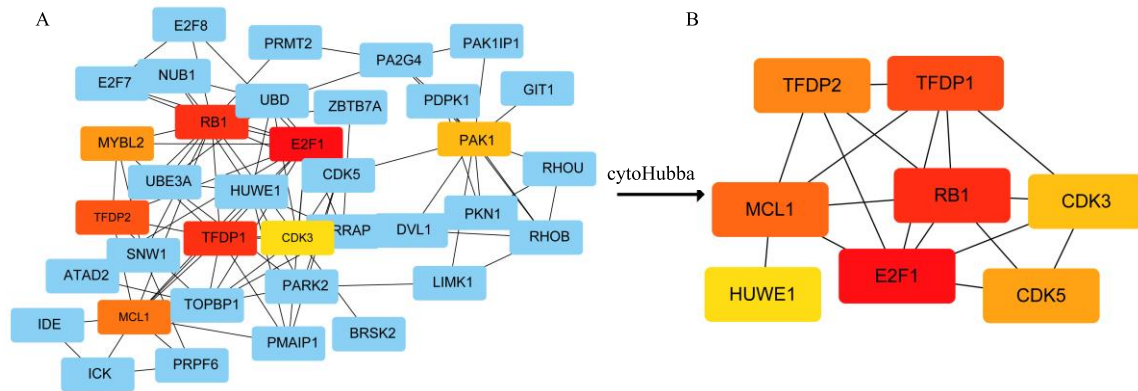


图 7 丹参干预 RP 病理过程 MC 关键蛋白网络 (A) 及关键模块 (B)

Fig. 7 Key protein network (A) and key module (B) of MC in RP pathological process intervened by SM

于 2010 年获得美国食品和药品管理局批准, 美国和欧洲国家联合开展了对人类胚胎干细胞分化衍生的 RPE 的研究, 我国则在 2015 年开展了类似研究^[14]。

视网膜是中枢神经系统的一个特化部位, 视网膜神经元主要包括光感受器、神经节细胞、双极细胞、无长突细胞、水平细胞和网间细胞 6 种, 但其主要的胶质细胞却只有 MC。细长形的 MC 几乎贯穿整个视网膜, 具有少突胶质细胞和星形胶质细胞共同的功能。研究表明, MC 在形态与功能上均具有神经干细胞特性的潜能, 当视网膜损伤后, MC 可向视网膜神经细胞方向分化。此外, MC 与视网膜血管细胞及神经细胞密切、广泛接触, 具有分泌细胞因子及排泄视网膜代谢废物的功能。MC 在维护视网膜正常结构、营养视网膜等生理功能及视网膜病理变化进程中均发挥着极为重要的作用^[15]。因此, 在 RP 病变过程中, MC 的作用及其特征性基因与关键蛋白表达的变化受到广泛关注, 或可为 RP 的治疗提供新的方向。

中医学将 RP 称为“高风雀目”, 最早记载于《秘传眼科龙木论》: “惟见顶上之物”。《目经大成》将其症状形象地描述为“大道行不去, 可知世界窄, 未晚草堂昏, 几疑天地黑”。历代医家均认为 RP 的中医学病因病机为先天禀赋不足, 元气虚衰, 肝肾脾虚, 因虚致瘀, 血脉滞涩, 脉道不通, 气血不能上荣于目; 或脾肾阳虚, 阳虚不能制阴, 清阳下陷。至 RP 后期, 经脉完全闭阻, 气血亏虚失养, 导致失明。本课题组对 RP 的中医发病机制和治疗方法进行了较为系统的研究, 通过对 RP 患者的微量元素、眼电图、眼血流图、球结膜及甲皱微循环、自由基含量、免疫学、血清性激素、血液流变学、血

小板活化、眼底荧光血管造影、舌象及舌下络脉等指标的检测, 采用中医综合疗法对 RP 患者辨证论治, 发现 RP 的病理机制为虚中夹瘀, 即 RP 病变过程中自始至终存在血瘀的病理改变, 中医药治疗应以补虚活血为基本法则^[16]。采用活血化瘀、通络明目的中药, 可增加局部缺血、缺氧组织的供血量, 从而扩张血管, 改善微循环, 恢复患者视力。

丹参味苦、性微寒, 具有活血化瘀、通经止痛、清心除烦的功效, 丹参及其复方制剂广泛应用于大小血管病变、微循环障碍的临床适应症。本课题组长期临床研究发现, 丹参对 RP 具有显著的临床疗效, 并且是 RP 临床治疗最具代表性的活血化瘀中药之一, 但有关丹参治疗 RP 的药效活性成分及分子机制报道较少。网络药理学通过分析疾病数据库、基因数据库、蛋白质数据库、药物数据库等现有数据库的数据资料, 结合已报道的从实验中获得的图谱数据, 运用专业的统计软件及算法, 系统、整体地揭示疾病-疾病、疾病表型-基因靶点、基因靶点-药物、药物-药物之间的关系, 从网络层面考察药物对疾病干预与影响的分子机制^[17]。本研究旨在通过网络药理学的方法, 考察丹参对 MC 特征性基因改变及关键蛋白表达的影响, 探讨丹参治疗 RP 的潜在分子机制。

通过 TCMSP 数据库, 共检索得到丹参的化学成分 202 个, 依据 ADME 参数筛选得到 65 个化学成分, 其中入血活性成分 13 个。进一步检索发现, 丹参入血活性成分的作用靶点共 117 个, 入血活性成分与其对应作用靶点的相互关系 3 266 个。通过对 GEO 数据库 GSE35386 数据集进行分析, 获得正常小鼠和 RP 小鼠 MC 中差异表达基因 242 个, 表

达差异倍数在 5 倍以上有 68 个, 其中上调的有 55 个, 下调的有 13 个。从疾病数据库获得与 RP 发病相关的基因靶点 206 个。通过 Cytoscape 对 RP 差异基因、疾病靶点、成分靶点 3 个 PPI 网络提取交集, 获得 85 个丹参治疗 RP 病理过程可能干预的 MC 特征性基因靶点。

剪接体信号通路是真核基因转录后期的关键调控途径, 它可使同一条蛋白质编码基因产生多种转录体, 从而使遗传信息的应用得到扩展, 剪接体与 RP 具有密切联系, 错误的剪接会导致 RP 的发生^[18]。细胞周期信号通路主要是由细胞周期蛋白组成, 细胞周期蛋白是通过细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK) 调控细胞增殖或凋亡的蛋白家族。细胞周期信号通路分为正性调节通路和负性调节通路^[19]。环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 作为细胞内重要的第二信使, 是一种在细胞内具有信息传递作用的小分子。cAMP 通过其下游信号分子调控细胞内增殖、凋亡等多种生理病理过程。cAMP 下游效应分子包括 cAMP 依赖蛋白激酶 A 和 cAMP 活化转换蛋白等^[20]。本研究对丹参干预的基因靶点进行 GO 和 KEGG 信号通路分析结果显示, 丹参治疗 RP 病理过程对 MC 特征性基因的影响主要涉及剪接体信号通路、肌动蛋白细胞骨架调控信号途径、细胞周期调控通路、人类 T 型细胞淋巴瘤病毒感染信号通路、环腺苷酸信号通路等。与 Takeda 等^[21]研究发现成年小鼠的 MC 可通过 α -氨基己二酸盐或谷氨酸盐信号诱导去分化、迁移和产生新的视网膜神经元和感光细胞结果一致。Arsenijevic^[22]的研究提示对于 RP 患者, 抑制细胞周期蛋白如 BMI1、CDK4、CDK5 的作用可对视网膜产生保护作用亦证实了本研究结果的可靠性。

综上所述, 本研究结果表明丹参对 RP 病理过程 MC 干预作用的主要成分包括隐丹参酮、异硫蒽酮 II、新隐丹参酮 II、鼠尾草酚酮、木犀草素、丹参酮 II_A 等 13 个成分; 丹参对 RP 病理过程 MC 特征性基因的干预机制涉及剪接体信号通路、肌动蛋白细胞骨架调控信号途径、细胞周期调控通路、非小细胞肺癌相关信号分子、人类 T 型细胞淋巴瘤病毒感染信号通路等; 丹参干预 RP 病理过程 MC 的关键蛋白靶点包括 RB1、E2F1、TFDP1、MCL1、TFDP2、CDK5、CKD3、HUWE1 等, 呈现出多成分、多途径、多靶点的特点。本研究可望为 RP 的临床治疗提供新的策略, 为丹参及其他活血化瘀类

中药治疗 RP 的临床及基础研究提供前期基础, 为丹参及其他活血化瘀类中药临床推广应用于 RP 的治疗提供科学依据。

参考文献

- [1] Fahim A. Retinitis pigmentosa: Recent advances and future directions in diagnosis and management [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2018, 30(6): 725-733.
- [2] Massengill M T, Ahmed C M, Lewin A S, et al. Neuroinflammation in retinitis pigmentosa, diabetic retinopathy, and age-related macular degeneration: A minireview [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1074(1): 185-191.
- [3] Ebdali S, Hashemi B, Hashemi H, et al. Time and frequency components of ERG responses in retinitis pigmentosa [J]. *Int Ophthalmol*, 2018, 38(6): 2435-2444.
- [4] Zhang S, Zhang S, Gong W, et al. Müller cell regulated microglial activation and migration in rats with *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced retinal degeneration [J]. *Front Neurosci*, 2018, doi: 10.3389/fnins.2018.00890.
- [5] 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.
- [6] 高丽娜, 崔元璐, 延阔, 等. 丹参红花配伍研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(4): 671-679.
- [7] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSPP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6(1): 13.
- [8] Roesch K, Stadler M B, Cepko C L. Gene expression changes within Müller glial cells in retinitis pigmentosa [J]. *Mol Vis*, 2012, 18(1): 1197-1214.
- [9] Zhou Q, Hong L, Wang J. Identification of key genes and pathways in pelvic organ prolapse based on gene expression profiling by bioinformatics analysis [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 297(5): 1323-1332.
- [10] 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.
- [11] Gardiner K L, Downs L, Berta-Antalics A I, et al. Photoreceptor proliferation and dysregulation of cell cycle genes in early onset inherited retinal degenerations [J]. *BMC Genomics*, 2016, doi: 10.1186/s12864-016-2477-9.
- [12] Kang M J, Chung J, Ryoo H D. CDK5 and MEKK1 mediate pro-apoptotic signalling following endoplasmic reticulum stress in an autosomal dominant retinitis pigmentosa model [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(4): 409-415.
- [13] 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.
- [14] Cyranoski D. Trials of embryonic stem cells to launch in China [J]. *Nature*, 2017, 546(7656): 15-16.
- [15] Telegina D V, Kozhevnikova O S, Kolosova N G. Changes in retinal glial cells with age and during development of age-related macular degeneration [J]. *Biochemistry*, 2018, 83(9): 1009-1017.
- [16] 彭清华. 继承朱文锋老师学术思想, 开展眼部诊断研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(1): 79-84.
- [17] Wu Z, Li W, Liu G, *et al.* Network-based methods for prediction of drug-target interactions [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01134.
- [18] Xu G, Li T, Chen J, *et al.* Autosomal dominant retinitis pigmentosa-associated gene PRPF8 is essential for hypoxia-induced mitophagy through regulating ULK1 mRNA splicing [J]. *Autophagy*, 2018, 14(10): 1818-1830.
- [19] Guen V J, Edvardson S, Fraenkel N D, *et al.* A homozygous deleterious CDK10 mutation in a patient with agenesis of corpus callosum, retinopathy, and deafness [J]. *Am J Med Genet A*, 2018, 176(1): 92-98.
- [20] Dong E, Bachleda A, Xiong Y, *et al.* Reduced phosphoCREB in Müller glia during retinal degeneration in *rd10* mice [J]. *Mol Vis*, 2017, 23(1): 90-102.
- [21] Takeda M, Takamiya A, Jiao J W, *et al.* Alpha-aminoadipate induces progenitor cell properties of Müller glia in adult mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(3): 1142-1150.
- [22] Arsenijevic Y. Cell cycle proteins and retinal degeneration: Evidences of new potential therapeutic targets [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 854(1): 371-377.