

基于“成分-靶点-通路”的枸杞子调控年龄相关性黄斑变性作用机制研究

郑慧丽^{1,2,3}, 曹程^{1,2,3}, 王颖异^{1,2,3}, 陈晨凯^{1,2,3}, 张浩宽^{1,2,3}, 张芳^{1,2,3}, 朱悦^{1,2,3*}, 段金廛^{1,2,3*}

1. 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程中心, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

3. 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 采用网络药理学方法探讨枸杞子改善年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 的活性成分及作用机制。方法 以检索 TCMSP 数据库和查阅文献获得的枸杞子潜在活性成分为研究对象, 通过 Swiss Target Prediction 平台、GeneCards 数据库、OMIM 数据库、DDT 数据库和 Drugbank 数据库预测活性成分的潜在靶点; 应用 Metascape 平台对潜在靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析; 运用 String 数据库和 Cytoscape 软件构建蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络和“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络; 考察枸杞子不同提取部位对碘酸钠诱导的人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 活力的影响, 以及对脂多糖诱导的小鼠小胶质细胞系 BV2 中炎症因子表达的影响。结果 枸杞子中的 88 个活性成分通过调控血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 等靶点, 参与氧化应激、炎症反应等生物学过程, 影响晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGE)-晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE)、IL-17、TNF 等信号通路发挥改善 AMD 的作用。枸杞子 95%乙醇提取部位能够显著提高碘酸钠诱导的 ARPE-19 细胞活力 ($P < 0.001$), 并显著降低脂多糖诱导的 BV2 细胞中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 枸杞子中多种成分具有影响 AMD 相关靶点的潜在作用, 枸杞子能够通过改善氧化损伤、抑制炎症反应治疗 AMD, 为后续深入研究枸杞子中不同活性成分调节 AMD 的作用机制提供依据。

关键词: 网络药理学; 枸杞子; 年龄相关性黄斑变性; 氧化应激; 炎症反应; 95%乙醇提取部位

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)04-1039-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.017

Machansim of *Lycii Fructus* on regulating age-related macular degeneration based on “component-target-pathway”

ZHENG Hui-li^{1, 2, 3}, CAO Cheng^{1, 2, 3}, WANG Ying-yi^{1, 2, 3}, CHEN Chen-kai^{1, 2, 3}, ZHANG Hao-kuan^{1, 2, 3}, ZHANG Fang^{1, 2, 3}, ZHU Yue^{1, 2, 3}, DUAN Jin-ao^{1, 2, 3}

1. National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Province Key Laboratory of High Technology Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the mechanism and active components of *Lycii Fructus* in treating age-related macular degeneration (AMD) based on network pharmacology and molecular experimental validation. **Methods** Active compounds of *Lycii Fructus* obtained from TCMSP database and literature investigation were selected as the research objects. Swiss Target Prediction platform, GeneCards, OMIM, DDT, and Drugbank database were used to screen and predict potential targets. Metascape platform

收稿日期: 2020-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773837)

作者简介: 郑慧丽 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学与分析。Tel: 18851093140 E-mail: 2503567239@qq.com

*通信作者: 段金廛, 男, 博士生导师, 研究方向为中药资源化学与资源循环利用及产业化。Tel: (025)85811917 E-mail: dja@njucm.edu.cn
朱悦, 男, 硕士生导师, 研究方向为中药功效物质基础研究。Tel: (025)85811917 E-mail: zhuyue@njucm.edu.cn

was used for gene ontology and Kyoto encyclopedia of genes and genomes enrichment analysis of potential targets. The protein-protein interaction network model and “drug-ingredients-targets-pathways-disease” network were constructed by using String database and Cytoscape software. The effects of different extraction parts of *Lycii Fructus* on the activity of ARPE-19 of human retinal pigment epithelial cells induced by sodium iodate and the expression of inflammatory factors in mouse microglia cell line BV2 induced by lipopolysaccharide were investigated. **Results** A total of 88 active ingredients in *Lycii Fructus* might regulate vascular endothelial growth factor A (VEGFA), interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and other targets. Potential targets mainly involve biological processes such as response to oxidative stress, regulation of inflammatory response, which played roles in the treatment of AMD by adjusting AGE-RAGE signaling pathway, IL-17 signaling pathway, and TNF signaling pathway. The results showed that the 95% ethanol extracts of *Lycii Fructus* significantly improved the survival rate of ARPE-19 cells damaged by sodium iodate ($P < 0.001$) and reduced the mRNA levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in BV2 cells induced by lipopolysaccharide ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** The results of network pharmacology showed that a variety of components in *Lycii Fructus* had potential effects on AMD related targets, and preliminarily proved that *Lycii Fructus* could treat AMD by improving oxidative damage and inhibiting inflammatory response, which can provide references for further research on the mechanism of AMD regulation by different active compounds in *Lycii Fructus*.

Key words: network pharmacology; *Lycii Fructus*; age-related macular degeneration; oxidative stress; inflammatory response; 95% ethanol extract

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 多发于 60 岁以上的老人, 主要影响视网膜中央凹黄斑区域, 可导致永久性视力障碍或失明, 严重影响患者的生活质量。对 AMD 患病率的最新荟萃分析显示^[1], 45~85 岁人群 AMD 的患病率约为 8.7%, 其中早期患病率约为 8%, 晚期患病率约为 0.4%。随着人口老龄化加剧, 预计 2040 年全球受 AMD 影响的人数将增加至 2.88 亿^[2-3]。作用于血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的药物可降低失明和严重视力损害^[4-5], 但国际上尚无治疗干性 AMD 的药物。

中医学认为, AMD 属于“视直为曲”“视瞻昏渺”“暴盲”的范畴。《灵枢·大惑论》中“五脏六腑之精气皆上注于目而为之精”, 明确了眼睛与脏腑之间的关系。中医学认为肝肾亏虚、脾气虚弱是 AMD 的基本病机, 滋补肝肾、活血化瘀、益精明目 AMD 的基本治法^[6-7]。枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实, 《本草纲目》中记载“枸杞子除邪热、明目轻身, 可用于虚劳亏损、眩晕耳鸣、内热消渴、目眩不明等病症”。枸杞子中化学成分较为丰富, 主要包括多糖、糖脂、甾醇及固醇类、黄酮类、类胡萝卜素、酰胺类、生物碱、氨基酸、脂肪酸、萜类等成分。研究表明, 枸杞子具有抗氧化、抗炎、免疫调节、神经保护作用^[8-9], 为治疗 AMD 的常用代表中药^[10]。

网络药理学融合了系统生物学、多向药理学和计算机分析技术, 通过多层次阐明药物的作用机

制, 具有整体性、系统性的特点, 与中医药治疗的整体性和协同性相契合^[11-12]。本研究采用网络药理学构建“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络, 从整体揭示枸杞子对 AMD 的干预作用及其机制, 为后续深入研究枸杞子中不同活性成分调节 AMD 的作用机制以及抗 AMD 药物的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 活性成分的收集

通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)^[13]以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 为筛选条件, 结合国内外文献调研获取枸杞子活性成分信息, 通过 PubChem 数据库和 ChemDraw 18.0 软件获得活性成分的分子结构。

1.2 靶点的预测与筛选

以筛选所得的活性成分为研究对象, 通过 TCMSP、Swiss Target Prediction 平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)^[14]预测靶点。以“AMD”“湿性 AMD”“新生血管性 AMD”“干性 AMD”“地图样萎缩”为疾病关键词, 通过 OMIM (<https://omim.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 和 DurgBank (<https://www.drugbank.ca/>) 数据库进行检索, 并与枸杞子靶点取交集, 获得枸杞子改善 AMD 的潜在靶点。

1.3 蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建

为了明确枸杞子活性成分与 AMD 靶点之间的

对应关系,取二者靶点的交集,通过 STRING (<https://string-db.org>) 数据库构建交集靶点 PPI 网络,将生物种类设定为人类,最小相互作用阈值设定为 0.4。通过 Cytoscape 3.7.2 软件中 MCODE 和 Network Analyzer 功能对 PPI 网络进行聚类分析和拓扑分析,获得枸杞子调控 AMD 的核心靶点。

1.4 基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析

将枸杞子改善 AMD 的靶点输入 Metascape 平台 (<https://www.metascape.org>),将生物种类设定为人类,设置 $P < 0.001$,进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析,保存数据并进行可视化处理。

1.5 “药物-成分-靶点-通路-疾病”网络的构建

将枸杞子活性成分、潜在靶点与疾病通路富集分析结果进行映射,导入 Cytoscape 软件,构建“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络图。

1.6 实验验证

1.6.1 细胞株 人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 和小鼠小胶质细胞系 BV2 均购自上海赛百慷公司。

1.6.2 药物及提取物制备 枸杞子 (批号 1612102) 购自宁夏明德中药饮片有限公司,经南京中医药大学中药资源产业化过程协同创新中心段金廛教授鉴定为茄科植物宁夏枸杞 *L. barbarum* L. 的干燥成熟果实。按图 1 提取流程制备得到枸杞子水提取液 (ST)、多糖部位 (DT)、水部位 (SBW)、30%乙醇部位、70%乙醇部位、95%乙醇部位、水提后醇提取液 (SC) 和色素部位 (SS)。各样品经离心浓缩或冻干后,称取 10 mg 溶于 DMSO 配制质量浓度为 10 mg/mL 的母液,经 0.22 μm 滤膜滤过,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6.3 试剂 DMEM/F-12 培养基 (批号 10092011)、MEM-Eagle 培养基 (批号 12120005) 购自 Corning 公司;0.25%胰蛋白酶 (批号 2038152)、胎牛血清 (批号 2177370)、青霉素-链霉素-制霉素溶液 (批号 2012208) 购自 Gibco 公司;噻唑蓝溴化四唑 (批号 I1810035)、碘酸钠 (批号 E1802068) 购自 Aladdin 公司;脂多糖 (批号 12180309) 购自 Sigma 公司;Trizol (批号 176908) 购自 Life Technology 公司;FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 试剂盒 (批号 S8125) 购自 TianGen 公司、Green qPCR SuperMix 检测试剂盒 (批号 N41217) 购自北京全式金生物技术有限公司;白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物由上海英潍捷基公司合成。

1.6.4 仪器 1300 series A2 细胞恒温培养箱 (Thermo Fisher Scientific 公司);多功能酶标仪 (PerkinElmer 公司);QuantStudio 5 荧光实时定量 PCR 仪 (美国 AB 公司)。

1.6.5 枸杞子提取物对碘酸钠诱导的 ARPE-19 细胞活力的影响 将处于对数生长期的 ARPE-19 细胞以 4×10^4 个/mL 接种于 96 孔板,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。设置对照组、模型组、枸杞子不同部位药物 (1、3、10 $\mu\text{g/mL}$) 组,模型组和各给药组加入碘酸钠 (1.3 mg/mL),各给药组另加入相应药物,对照组加入不含药物的 10% FBS DMEM/F-12 培养基,培养 24 h。每孔加入 MTT (500 $\mu\text{g/mL}$) 溶液,孵育 4 h,弃去上清,每孔加入 150 μL DMSO,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 30 min,于 570 nm 处检测吸光度 (A) 值。

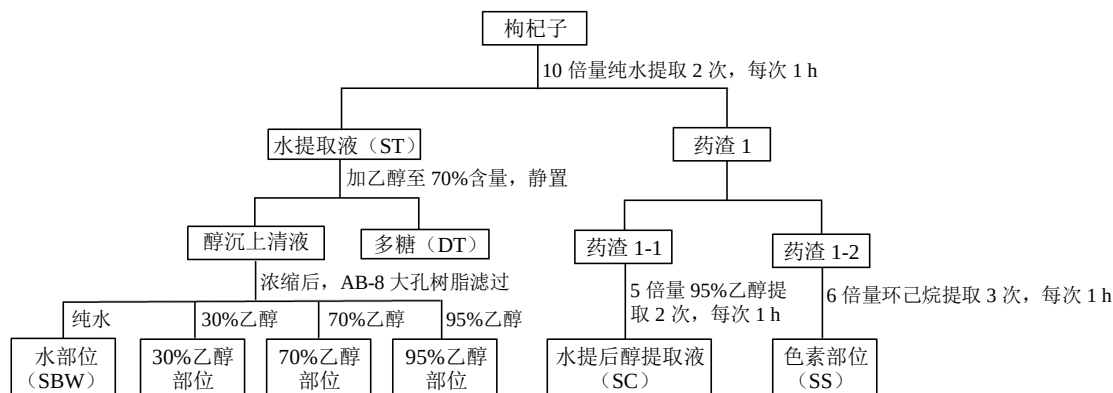


图 1 枸杞子提取物制备流程

Fig. 1 Preparation flow chart of *Lycii Fructus* extract

1.6.6 枸杞子提取物对脂多糖诱导的 BV2 细胞中炎症因子表达的影响 将融合度为 70% 的 BV2 细胞以 4×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 培养 24 h。设置对照组、模型组、枸杞子不同部位药物 (1、3、10 $\mu\text{g/mL}$) 组, 模型组和各给药组加入脂多糖 (1 $\mu\text{g/mL}$), 各给药组另加入相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 2 h。以磷酸盐缓冲液洗涤 2 遍后, 按照 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA 后, 按照试剂盒说明书制备 cDNA, 进行 qRT-PCR。引物序列: IL-6 上游引物为 5'-CGTCACACATCCCGTCAG-3', 下游引物为 5'-GGATGAGGGATGCCAGTTG-3'; IL-1 β 上游引物为 5'-TGCTGAATCCAAGCCTCTG-3', 下游引物为 5'-TTTAATGCAACTTCCCTT-3'; TNF- α 上游引物为 5'-GGATCCTGCACATGGGTAC-3', 下游引物为 5'-CTGTTCTCCAGGTCGATG-3'; GAPDH 上游引物为 5'-GACGCTGCTCATCCCACTA-3', 下游引物为 5'-CCACCTGGTCCTCATCGTT-3'。

1.7 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析, 通过单因素方差分析及 t 检验进行各组间差异比较。

2 结果

2.1 枸杞子活性成分的筛选

通过 TCMSP 数据库得到枸杞子活性成分 36 个, 删除重复值后共 35 个。通过检索国内外文献得到枸杞子活性成分 265 个^[15-23], 合并 2 次检索信息, 删除重复值, 共获得枸杞子活性成分 287 个, 其具体类型及分布见图 2。

2.2 潜在靶点预测

将上述活性成分的结构导入 Swiss Target Prediction 平台预测靶点, 共获得靶点 1133 个。可能性值越高表明该靶点可信度越高, 根据靶点的可信度, 取可能性 ≥ 0.5 的 126 个靶点进行下一步分析。通过 TCMSP 数据库获得 194 个靶点, 合并 2 次检索信息, 删除重复值, 共获得枸杞子靶点 444 个。从 Genecards 数据库获得 AMD 靶点 3021 个, 疾病靶点度值最大值为 156.59, 最小值为 0.23, 取其 2 倍中位数, 设定相关度大于 6.47 的靶点为 AMD 的潜在靶点。结合 OMIM、TTD、DrugBank 数据库相关靶点, 整合并删除重复值, 经 Uniport 数据库规范化后得到 553 个疾病靶点。利用 Venn 作图取交集, 如图 3 所示, 得到 80 个枸杞子改善 AMD 的潜在靶点。

2.3 PPI 网络分析

将从 String 数据库获得的靶点 PPI 图导入 Cytoscape 软件, 通过 MCODE 聚类分析功能得到核心子网络, 如图 4 所示, 靶点度值越大, 形状越大, 表明靶点与网络中其他靶点连接越紧密。VEGFA、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、IL-6、TNF、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 等排名靠前的靶点为枸杞子改善 AMD 的核心靶点。

2.4 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

2.4.1 GO 分析 利用 Matescape 平台对枸杞子调控 AMD 的潜在靶点进行 GO 分析, 枸杞子主要通过参与调节对无机物的反应、对有毒物质的反应、活性氧代谢过程、对氧化应激的反应、细胞因子诱导的信号通路等 1816 个生物过程发挥改善 AMD 的作用, 将 $P < 0.001$ 排名前 10 的条目运用 R 语言绘制气泡图, 如图 5 所示。

2.4.2 KEGG 分析 利用 Matescape 平台对枸杞子调控 AMD 的潜在靶点进行 KEGG 分析, 枸杞子主要通过参与调节流式剪切应力与动脉粥样硬化通路、晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGE)-晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 信号通路、癌症通路、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路、TNF 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路等 135 个通路发挥改善 AMD 的作用, 将 $P < 0.001$ 排名前 10 的条目运用 R 语言绘制气泡图, 如图 6 所示。

2.5 “药物-成分-靶点-通路-疾病”网络

通过 CytoScape 3.7.2 软件构建“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络, 如图 7 所示, 该网络共有 180 个节点 (包括 1 种药材、88 个活性成分、80 个靶点、10 条通路、1 个疾病)。拓扑分析结果如表 1 所示, 槲皮素、杨梅素、谷氨酸、 β -胡萝卜素、桑色素等节点度值排名靠前, 可能为枸杞子中的主要活性成分。

2.6 枸杞子提取物对碘酸钠诱导的 ARPE-19 细胞活力的影响

如图 8 所示, 与模型组比较, 各质量浓度的枸杞子 95%乙醇部位均可显著升高 ARPE-19 细胞活力 ($P < 0.001$), 70%乙醇部位次之 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 此外, ST 低剂量组和 SC 中剂量组可显著提高 ARPE-19 细胞活力 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明枸



图2 枸杞子中潜在活性成分类型及其分布

Fig. 2 Types and distribution of potential active compounds in *Lycii Fructus*

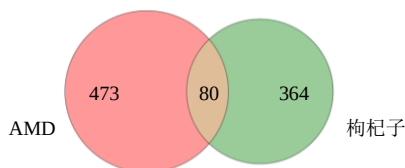


图3 枸杞子成分与 AMD 靶点的韦恩图

Fig. 3 Venn's diagram of targets in AMD and *Lycii Fructus*

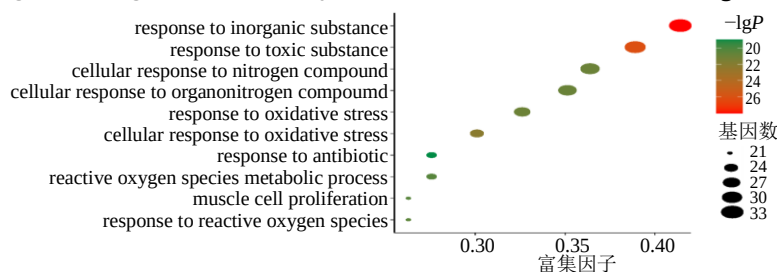


图5 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis

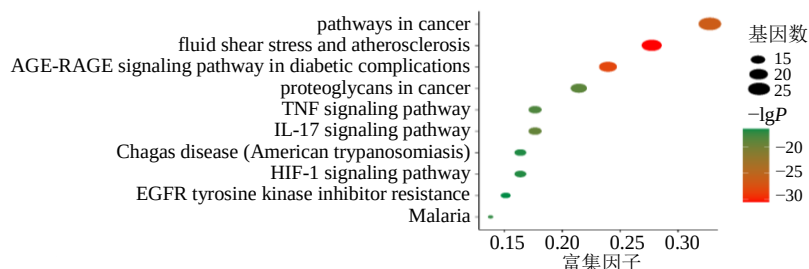
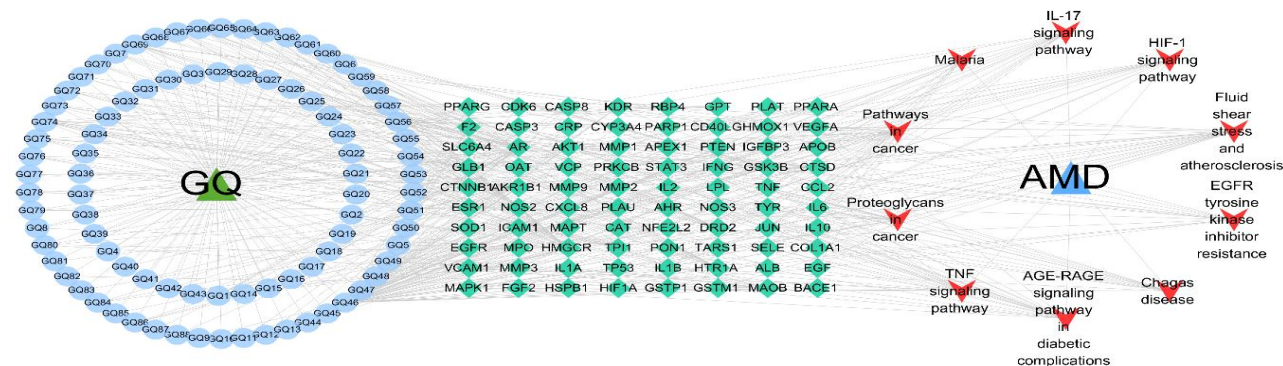


图6 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis



绿色三角形代表药物；蓝色圆圈代表枸杞子活性成分；绿色菱形代表靶点；红色箭头代表通路；蓝色三角形代表疾病

The green triangle represents drug; The blue circle represents active ingredients in *Lycii Fructus*; The green diamond represents targets; The red arrows represent pathways; The blue triangle represents disease

图7 “药物-成分-靶点-通路-疾病”网络

Fig. 7 Network of “drug-ingredients-targets-pathways-disease”

表 1 枸杞子活性成分拓扑信息

Table 1 Topological information of active compounds in *Lycii Fructus*

编号	名称	化学式	度值
GQ1	β -sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	7
GQ2	campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	4
GQ3	lanosterol	C ₃₀ H ₅₀ O	2
GQ4	cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	3
GQ5	24-methylcholesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	3
GQ6	24-ethylcholesterol	C ₂₉ H ₅₀ O	3
GQ7	stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	5
GQ8	24-methylcholesta-5,24-dien-3 β -ol	C ₂₈ H ₄₆ O	3
GQ9	28-isofucoesterol	C ₂₉ H ₄₈ O	3
GQ10	24-methylidenecholesterol	C ₂₈ H ₄₆ O	2
GQ11	24-ethylcholesta-5,24-dien-3 β -ol	C ₂₉ H ₄₈ O	3
GQ12	24-ethylcholestan-3 β -ol	C ₂₉ H ₅₂ O	2
GQ13	31-norlanosterol	C ₂₉ H ₄₈ O	2
GQ14	31-norlanost-8-enol	C ₂₉ H ₅₀ O	2
GQ15	31-norlanost-9(11)-enol	C ₂₉ H ₅₀ O	2
GQ16	24-methyl-31-norlanost-9(11)-enol	C ₃₀ H ₅₂ O	2
GQ17	4 α -methylcholest-8-en-3 β -ol	C ₂₈ H ₄₈ O	2
GQ18	cholest-5-en-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₆ O	3
GQ19	24-methylcholest-5-en-3 β -ol	C ₂₈ H ₄₈ O	3
GQ20	24-ethylcholesta-5,22-dien-3 β -ol	C ₂₉ H ₄₈ O	3
GQ21	24-ethylcholest-5-en-3 β -ol	C ₂₉ H ₅₀ O	3
GQ22	24-ethylidenecholest-5-en-3 β -ol	C ₂₉ H ₄₈ O	2
GQ23	24-ethylidenecholest-7-en-3 β -ol	C ₂₉ H ₄₈ O	2
GQ24	lophenol	C ₂₈ H ₄₈ O	2
GQ25	24-ethyllophenol	C ₃₀ H ₅₂ O	2
GQ26	24-methyllophenol	C ₂₉ H ₅₀ O	2
GQ27	gramisterol	C ₂₉ H ₄₈ O	2
GQ29	obtusifoliol	C ₃₀ H ₅₀ O	2
GQ30	lanost-8-enol	C ₃₀ H ₅₂ O	2
GQ31	24-methylidenelanost-8-en-3 β -ol	C ₃₁ H ₅₂ O	2
GQ32	β -sitosterol-3- β -D-glucopyranoside	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	2
GQ33	ethyl trans-ferulate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	2
GQ34	trans-p-coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	2
GQ35	cis-p-coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	2
GQ36	caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	4
GQ37	linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O	3
GQ38	oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	3
GQ39	linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	3
GQ40	myristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	2
GQ41	palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	2
GQ42	chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	2
GQ43	quercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	2
GQ44	nicotiflorin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	2
GQ45	narcissoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	2
GQ46	quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	60
GQ47	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	7
GQ48	myricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	14
GQ49	morin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	12
GQ50	rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	2
GQ51	isorhamnetin 3-O-rutinoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	2
GQ52	N-trans-p-coumaroyltyramine	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	4
GQ53	N-trans-caffeoyltyramine	C ₁₇ H ₁₇ NO ₄	4
GQ54	atropine	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	4
GQ55	glycitein	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	6
GQ56	β -carotene	C ₄₀ H ₅₆	13
GQ57	zeaxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	5
GQ58	lutein	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	2
GQ59	β -cryptoxanthin	C ₄₀ H ₅₆ O	4

续表 1

编号	名称	化学式	度值
GQ60	zeaxanthin monopalmitate	C ₅₆ H ₈₆ O ₃	6
GQ61	zeaxanthin dipalmitate	C ₇₂ H ₁₁₆ O ₄	6
GQ62	zeaxanthin monomyristate	C ₅₄ H ₈₂ O ₃	2
GQ63	zeaxanthin myristate palmitate	C ₇₀ H ₁₁₂ O ₄	6
GQ64	β-cryptoxanthin palmitate	C ₅₆ H ₈₂ O ₂	6
GQ69	tetraterpenyl hexaarabinoside	C ₇₀ H ₁₁₈ O ₂₆	11
GQ70	violaxanthin dipalmitate	C ₇₂ H ₁₁₆ O ₆	4
GQ71	aspartic acid	C ₄ H ₇ NO ₄	4
GQ72	L-threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	5
GQ73	serine	C ₃ H ₇ NO ₃	6
GQ74	L-glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	14
GQ75	alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	7
GQ76	valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	4
GQ77	methionine	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	2
GQ78	isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	3
GQ79	L-leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	3
GQ80	tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	5
GQ81	L-arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	2
GQ82	tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	2
GQ83	proline	C ₅ H ₉ NO ₂	2
GQ84	γ-aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂	4
GQ85	L-ornithine	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	2
GQ86	nicotinic acid	C ₆ H ₅ NO ₂	4
GQ87	adenine	C ₅ H ₅ N ₅	2
GQ88	α-tocopherol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	2

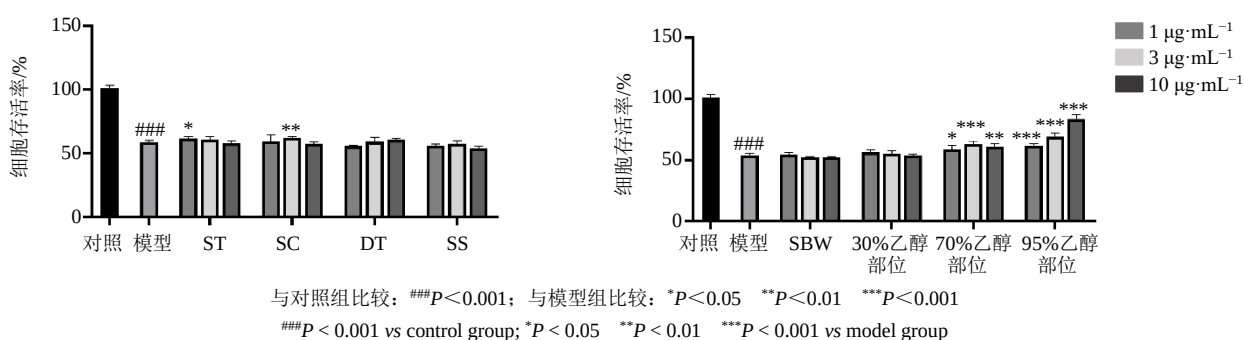


图 8 枸杞子提取物对碘酸钠诱导的 ARPE-19 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 Effect of extracts from *Lycii Fructus* on cell viability in ARPE-19 cells induced by sodium iodate ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

杞子 95% 和 70% 乙醇部位对碘酸钠诱导的 ARPE-19 细胞损伤有较好的保护作用。

2.7 枸杞子提取物对脂多糖诱导的 BV2 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组 BV2 细胞中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, ST 中、高剂量组及 SC 低剂量组及 SS 中、高剂量组、各剂量 SBW 组及 30% 乙醇部位低、中剂量组及 70% 乙醇部位低、中剂量组及 95% 乙醇部位各剂量组均能显著下调 BV2 细胞中 IL-6 mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); ST 高剂量组、SC 低剂量组、SS 高剂量组、SBW 高剂量组及 70% 乙醇部位中、高剂量组及 95% 乙醇部位中、高剂量组均能显著下调 BV2 细

胞中 IL-1 β mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); ST 低、高剂量组及 SC 各剂量组、DT 高剂量组、SS 高剂量组及 SBW 中、高剂量组及 30% 乙醇部位中剂量组及 70% 乙醇部位低、中剂量组及 95% 乙醇部位各剂量组均能显著下调 BV2 细胞中 TNF- α mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

3 讨论

研究表明, 部分患者对临床用于治疗湿性 AMD 的抗 VEGF 药物无应答反应, 且患者可能由于长期抑制视网膜血管生成, 导致萎缩性视网膜病变加重而丧失视力^[24]。中医学认为, AMD 早期以脏腑精气亏虚、目失濡养为主, 后期出现痰、湿、热、瘀, 其病理机制与肝肾亏虚、脾气虚弱有关, 调理脏腑、气血津液盈亏和脉络论治对 AMD 具有一定疗效^[25]。

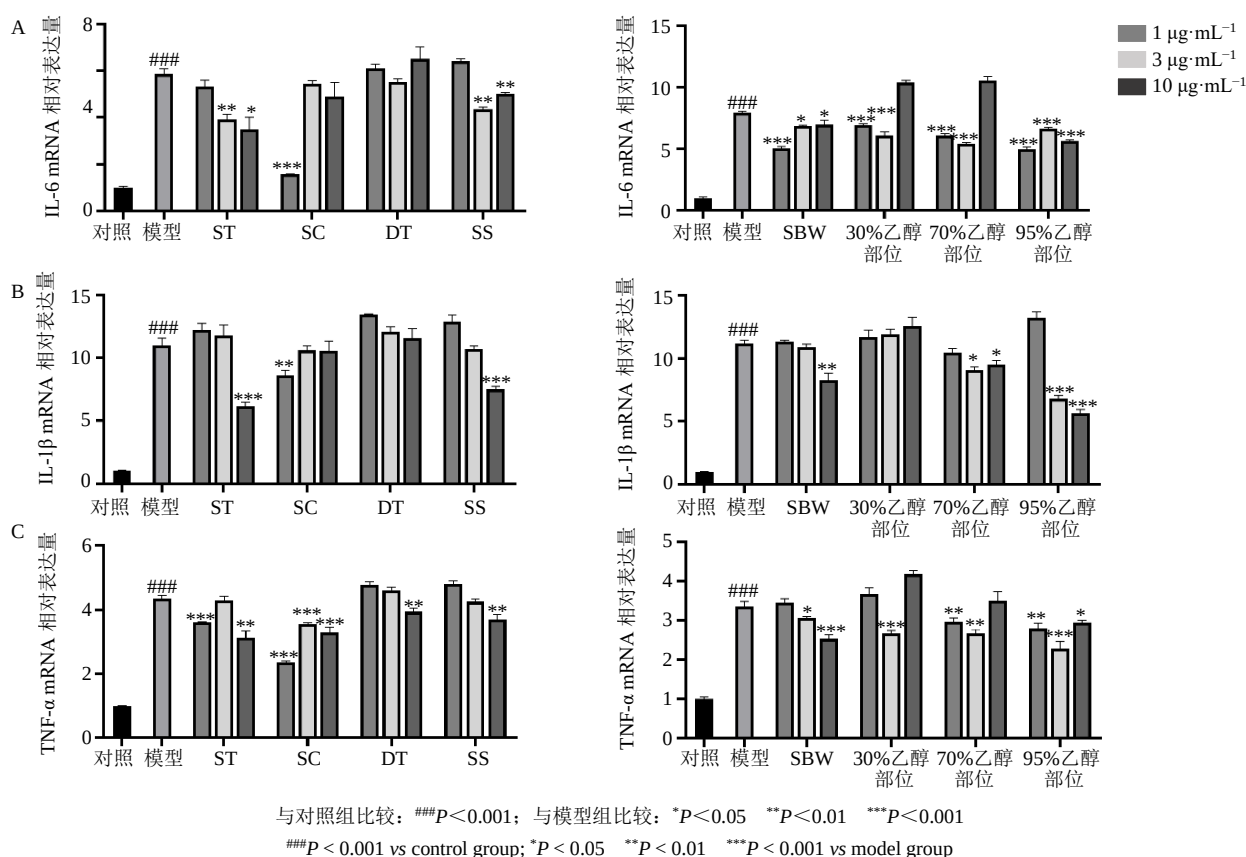


图9 枸杞子提取物对脂多糖诱导的BV2细胞IL-6(A)、IL-1 β (B)和TNF- α (C)mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 9 Effect of extracts from *Lycii Fructus* on mRNA levels of IL-6 (A), IL-1 β (B), and TNF- α (C) in BV2 cells induced by lipopolysaccharide ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

枸杞子作为传统的滋补肝肾、益精明目中药,用于治疗血虚萎黄、目昏不明等病症^[26]。基于中医传承辅助平台的AMD方剂中用药频次分析,发现枸杞子为使用频率排名前3的中药之一^[10]。本研究基于网络药理学的整体性与系统性,对枸杞子治疗AMD的药效物质基础及作用机制进行挖掘,以期对枸杞子的开发和AMD临床药物的研发提供参考。

AMD是一种以慢性炎症、氧化应激、衰老为特征的退行性疾病。视网膜色素上皮细胞RPE衰老过程中,由活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)引起的一系列进行性损伤,导致蛋白质错误折叠,引起细胞功能异常,RPE细胞丢失为干性AMD的特征病理表现^[27]。小胶质细胞作为视网膜上固有巨噬细胞,可以触发炎症反应和血管生成,在视网膜变性的发生发展中发挥重要作用^[28]。碘酸钠作为一种氧化性化合物,能够诱导RPE细胞内ROS产生^[29],被广泛用于RPE细胞和光感受器细胞死亡机制的研究^[30]。GO功能和KEGG通路分析结果表明,枸杞子主要通过调控活性氧代谢过程、

对氧化应激的反应,影响IL-17、TNF信号通路改善AMD,本研究以碘酸钠诱导ARPE-19细胞建立氧化损伤细胞模型,以脂多糖诱导BV2细胞建立炎症细胞模型,对枸杞子改善氧化应激和炎症反应进行初步验证。

由“成分-靶点-通路”网络可知,枸杞子中88个活性成分主要通过VEGFA、CXCL8、IL-6、TNF- α 、MMP-9等靶点,影响AGE-RAGE信号通路、IL-17信号通路、TNF信号通路、HIF-1信号通路,发挥改善AMD的作用。VEGFA为血管内皮生长因子,参与视网膜新生血管的形成,为湿性AMD药物作用的靶点。VEGF表达受HIF-1调控,当视网膜微血管网进行性损伤导致组织缺血,HIF-1表达上调,VEGF分泌增加,刺激新的视网膜前血管发育为特征的视网膜新生血管^[31]。枸杞子中的甜菜碱能够通过抑制蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)激活,下调糖尿病大鼠视网膜HIF-1 α 和VEGF的表达抑制糖尿病患者视网膜新生血管形成^[32]。细胞外基质金属蛋白酶系统失调与AMD病理中Bruch膜增厚和玻璃膜

疣的积累密切相关^[33], MMP-9 主要参与细胞外基质局部蛋白水解和白细胞迁移, 研究表明叶黄素和玉米黄质可能通过下调 RPE 细胞中基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase, MMP-2)、金属蛋白酶-2 组织抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinases-2, TIMP-2) 蛋白酶体的表达改善 AMD^[34]。由 KEGG 通路富集分析可知, 枸杞子主要通过 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路和 TNF 信号通路抑制 CXCL8、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等靶点蛋白的表达改善 AMD。研究表明, 枸杞子中类胡萝卜素成分能够降低 RPE 细胞 ROS、TNF- α 和 IL-1 α 的表达, 改善视网膜炎症^[8]。Bruch 膜内胶原蛋白层和 RPE 基底膜之间脂质-蛋白碎片的沉积, 以及细胞外基质交联度增加和 AGEs 的积累参与 AMD 病理形成^[32]; 枸杞多糖具有显著的神经保护作用, 能通过降低 AGEs 水平, 拮抗 AGEs 对神经细胞的损伤, 进而保护视网膜神经细胞^[35-36]。细胞实验结果显示, 枸杞子水提物经大孔树脂 70%乙醇和 95%乙醇洗脱部位对碘酸钠诱导的 ARPE-19 细胞有显著的保护作用, 且 95%乙醇洗脱部位可显著降低脂多糖诱导的 BV2 细胞中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平, 表明枸杞子可以通过抗氧化、降低视网膜炎症反应改善 AMD。

本研究采用网络药理学方法构建了“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络, 并通过体外实验对枸杞子改善氧化应激、抑制炎症反应的活性进行了初步验证, 为后续深入研究枸杞子中不同活性成分调节 AMD 的作用机制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nowak J Z. AMD-the retinal disease with an unprecised etiopathogenesis: In search of effective therapeutics [J]. *Acta Pol Pharm*, 2014, 71(6): 900-916.
- [2] Jonas J B, Cheung C M G, Panda-Jonas S. Updates on the epidemiology of age-related macular degeneration [J]. *Asia Pac J Ophthalmol*, 2017, 6(6): 493-497.
- [3] Wong W L, Su X Y, 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): 106-116.
- [4] Bourne R R, Stevens G A, White R A, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: A systematic analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2013, 1(6): 339-349.
- [5] Dolgin E. Age-related macular degeneration foils drugmakers [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(11): 1000-1001.
- [6] 李学晶, 唐由之. 年龄相关性黄斑变性的中医认识 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2008, 18(4): 240-242.
- [7] 金明. AMD 中医病因机制认识与现代研究相关性 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2016, 26(3): 141-143.
- [8] Liu L, Lao W, Ji Q S, et al. Lycium barbarum polysaccharides protected human retinal pigment epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8(1): 11-16.
- [9] 马琳, 张蓓, 胡秀娟, 等. 枸杞多糖对小鼠海马神经元细胞系缺糖缺氧损伤保护作用及机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(4): 683-687.
- [10] 秦程遥. 基于中医传承辅助平台的治疗年龄相关性黄斑变性的组方规律分析 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [11] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [12] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [13] Ru J L, Li P, Wang J N, 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. Swiss Target Prediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(1): 357-364.
- [15] Jung K, Chin Y W, Kim Y C, et al. Potentially hepatoprotective glycolipid constituents of *Lycium chinense* fruits [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(12): 1381-1385.
- [16] Zhou Z Q, Xiao J, Fan H X, et al. Polyphenols from wolfberry and their bioactivities [J]. *Food Chem*, 2017, 214: 644-654.
- [17] Li Q W, Zhang R, Zhou Z Q, et al. Phenylpropanoid glycosides from the fruit of *Lycium barbarum* L. and their bioactivity [J]. *Phytochemistry*, 2019, 164: 60-66.
- [18] Zhu P F, Zhao Y L, Dai Z, et al. Phenolic amides with immunomodulatory activity from the nonpolysaccharide fraction of *Lycium barbarum* fruits [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(10): 3079-3087.
- [19] Wang S, Suh J H, Zheng X, et al. Identification and quantification of potential anti-inflammatory hydroxycinnamic acid amides from wolfberry [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(2): 364-372.
- [20] Yao X, Peng Y, Xu L J, et al. Phytochemical and biological studies of *Lycium* medicinal plants [J]. *Chem Biodivers*, 2011, 8(6): 976-1010.

- [21] Gao Z, Ali Z, Khan I A. Glycerogalactolipids from the fruit of *Lycium barbarum* [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(16): 2856-2861.
- [22] Chen X M, You J M, Suo Y R, *et al.* Sensitive determination of taurine, γ -aminobutyric acid and ornithine in wolfberry fruit and *Cortex Lycii* by HPLC with fluorescence detection and online mass spectrometry identification [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(4): 492-497.
- [23] 冯美玲, 王书芳, 张兴贤. 枸杞子的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(3): 265-268.
- [24] Maguire M G, Martin D F, Ying G S, *et al.* Five-year outcomes with anti-vascular endothelial growth factor treatment of neovascular age-related macular degeneration: The comparison of age-related macular degeneration treatments trials [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(8): 1751-1761.
- [25] 段钰, 刘瑞宝, 吴艳霞, 等. 年龄相关性黄斑变性的中医治疗现状 [J]. *中医眼耳鼻喉杂志*, 2020, 10(1): 38-40.
- [26] 王忠忠, 鲁晓丽, 张自萍. 枸杞子明目作用的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(14): 1648-1651.
- [27] Kinnunen K, Petrovski G, Moe M C, *et al.* Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration [J]. *Acta Ophthalmol*, 2012, 90(4): 299-309.
- [28] 张鹏飞, 孙晓东. 视网膜小胶质细胞在年龄相关性黄斑变性中的免疫调节作用 [J]. *中华眼科杂志*, 2016, 52(5): 386-390.
- [29] Chan C M, Huang D Y, Sekar P, *et al.* Reactive oxygen species-dependent mitochondrial dynamics and autophagy confer protective effects in retinal pigment epithelial cells against sodium iodate-induced cell death [J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26(1): 40.
- [30] Balmer J, Zulliger R, Roberti S, *et al.* Retinal cell death caused by sodium iodate involves multiple caspase-dependent and caspase-independent cell-death pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(7): 15086-15103.
- [31] Sene A, Chin-Yee D, Apte R S. Seeing through VEGF: Innate and adaptive immunity in pathological angiogenesis in the eye [J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21(1): 43-51.
- [32] Kim Y G, Lim H H, Lee S H, *et al.* Betaine inhibits vascularization via suppression of Akt in the retinas of streptozotocin-induced hyperglycemic rats [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 1639-1644.
- [33] Hussain A A, Lee Y, Marshall J. Understanding the complexity of the matrix metalloproteinase system and its relevance to age-related diseases: Age-related macular degeneration and Alzheimer's disease [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2020, 74: 100775.
- [34] 黄冰林. 枸杞醇提物及其成分叶黄素/玉米黄质在体内外对年龄相关性黄斑变性防治的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [35] Zhang F, Zhang X, Guo S, *et al.* An acidic heteropolysaccharide from *Lycii fructus*: Purification, characterization, neurotrophic and neuroprotective activities *in vitro* [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 249: 116894.
- [36] 罗琼, 唐韦, 周银柱, 等. 枸杞多糖对糖基化终产物及视网膜神经细胞的影响 [J]. *营养学报*, 2012, 34(1): 64-67.

[责任编辑 李亚楠]