

• 数据挖掘与循证医学 •

基于生物信息学分析湿性年龄相关性黄斑变性的氧化应激相关基因及靶向防治中药筛选

崔高畅¹, Amy Yi Hsan Saik¹, 张新慧², 马玉玮¹, 杨 早^{1*}

1. 东姑阿都拉曼大学 M. Kandiah 医学与健康科学学院, 雪兰莪 加影 43000

2. 宁夏医科大学药学院, 宁夏 银川 750004

摘要: **目的** 利用生物信息学方法筛选湿性年龄相关性黄斑变性 (wet age-related macular degeneration, wAMD) 的氧化应激相关差异表达基因及靶向中药, 以期对 wAMD 的预防和治疗提供新思路。**方法** 从 GEO 数据库中筛选数据集, 利用 R 软件 limma 包筛选差异基因, 从 Genecard 数据库筛选氧化应激差异基因, 并利用韦恩图得到共有基因。应用 Metascape 对氧化应激差异基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析, 并通过 String 数据库构建蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 再通过 Cytoscape 软件筛选出 wAMD 中氧化应激的关键 (Hub) 基因。采用 GSE103060 数据集验证 Hub 基因的差异表达。利用 Coremine Medical 预测靶向中药。**结果** 经筛选共得到差异表达基因 1874 个, 其中上调基因 747 个, 下调基因 1127 个。KEGG 富集分析表明, 差异表达基因主要富集于细胞外基质受体相互作用、黏附斑激酶通路、河马 (Hippo) 信号通路、晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体 (advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products, AGE-RAGE) 信号通路、钙信号通路和磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路。通过 PPI 网络筛选得到与 wAMD 氧化应激密切相关的 8 个 Hub 基因, 分别为 *IL6*、*EGFR*、*HIF1A*、*APOE*、*FNI*、*PPARG*、*EDNI* 和 *NGF*。最后在 GSE103060 数据集中验证了以上 Hub 基因的显著差异表达。利用 Coremine Medical 预测人参、黄芪、枸杞子、丹参、银杏叶等可作为预防或治疗 wAMD 的靶向中药。**结论** 通过对 wAMD 芯片的挖掘和生物信息分析, 差异基因主要富集于氧化应激的相关通路与 wAMD 的氧化应激相关基因引起的。防治 wAMD 的首选中药为人参、黄芪、枸杞子、丹参和银杏叶等 26 种。这将对理解和探索 wAMD 的中医药防治策略有重要意义。

关键词: 生物信息学; 湿性年龄相关性黄斑变性; 氧化应激; 中药筛选; 人参; 黄芪; 枸杞子; 丹参; 银杏叶

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)01-0181-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.019

Analysis of oxidative stress-related genes in wAMD based on bioinformatics and screening of targeted traditional Chinese medicine for prevention and treatment

CUI Gaochang¹, Amy Yi Hsan Saik¹, ZHANG Xinhui², MA Yuwei¹, YANG Zao¹

1. M. Kandiah Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Tunku Abdul Rahman, Selangor Kajang 43000, Malaysia

2. Faculty of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: Objective Using bioinformatics methods to screen differential expression genes related to oxidative stress in wet age-related macular degeneration (wAMD) and to identify targeted traditional Chinese medicine strategies, in order to provide new insights into the prevention and treatment of wAMD. **Methods** Datasets were selected from the GEO database, and differential genes were screened using the limma package in R software. Differential oxidative stress genes were selected from the Genecard database, and common genes were obtained using a Venn diagram. Metascape was used for gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis of differential oxidative stress genes. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed through the String database, and hub genes related to oxidative stress in wAMD were screened using Cytoscape software. The differential expression of hub genes was validated using the GSE103060 dataset. Coremine Medical was used to predict targeted traditional Chinese medicines. **Results** After screening, a total of 1 874 differentially expressed genes (DEGs) were identified,

收稿日期: 2023-11-12

作者简介: 崔高畅 (1995—), 男, 陕西榆林, 博士研究生, 研究方向为中药药理研究。E-mail: cuigaochang@lutar.my

*通信作者: 杨 早, 副教授, 博士生导师, 从事中医药理研究。E-mail: yangz@utar.edu.my

including 747 upregulated genes and 1 127 downregulated genes. KEGG enrichment analysis indicated that DEGs were mainly enriched in extracellular matrix-receptor interactions, focal adhesion kinase pathways, the Hippo signaling pathway, the advanced glycation end products- receptor for advanced glycation end products (AGE-RAGE) signaling pathway, calcium signaling pathways, and phosphatidylinositol-3-hydroxykinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathways. Eight Hub genes closely related to oxidative stress in wAMD were selected through the PPI network: *IL6*, *EGFR*, *HIF1A*, *APOE*, *FN1*, *PPARG*, *EDN1*, and *NGF*. The significant differential expression of these Hub genes was validated in the GSE103060 dataset. Coremine Medical predicted that Renshen (*Ginseng Radix et Rhizoma*), Huangqi (*Astragali Radix*), Goqizi (*Lycii Fructus*), Danshen (*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*), Yinxingye (*Ginkgo Folium*), and other Chinese medicines could be used as targeted preventive or therapeutic measures for wAMD. **Conclusion** Through the exploration and bioinformatic analysis of wAMD chips, differential genes were mainly enriched in pathways related to oxidative stress and genes associated with oxidative stress in wAMD. *Ginseng Radix et Rhizoma*, *Astragali Radix*, *Lycii Fructus*, *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Ginkgo Folium* and 26 other traditional Chinese medicines were identified as preferred options for preventing or treating oxidative stress in wAMD. It will be of great significance for understanding and exploring traditional Chinese medicine approaches to the prevention and treatment of wAMD.

Key words: bioinformatics; wet age-related macular degeneration; oxidative stress; screening of traditional Chinese medicine; *Ginseng Radix et Rhizoma*; *Astragali Radix*; *Lycii Fructus*; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Ginkgo Folium*

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是全球老年人失明的主要原因之一^[1]。AMD 可分为 2 种亚型: 非渗出性 (干性, dry AMD, dAMD) 和渗出性 (湿性, wet AMD, wAMD)。其中, wAMD 对视力的损害程度远甚于 dAMD。在由 AMD 引起的严重视力损害的患者中, wAMD 占到了 80% 及以上^[2]。wAMD 发生后患者可表现为视物不清、视物变形、视力下降、中心暗点、眼前黑影等症状。视觉的改变是由于脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 所致。CNV 又称视网膜下新生血管, wAMD 发病过程中, CNV 穿过 Bruch 膜^[3], 进入到视网膜色素上皮或视网膜下, 发生视网膜下的出血、渗出等病理性改变, 对视网膜色素上皮细胞及视细胞造成损害。随着病情的发展, 还可发生视网膜色素上皮出血性脱离、玻璃体积血等导致视力突然减退, 严重者甚至导致失明^[4]。wAMD 发病机制尚未完全阐明, 可能与氧化应激有关。氧化应激可对视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞造成损害, 从而导致 wAMD 发生发展, 但少有其具体机制的相关研究。

目前, 推荐的 wAMD 标准治疗是基于血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抑制剂的使用, 这通常需要反复在玻璃体内注射, 但可能导致患者对治疗依从性较差^[5]。中药因其能作用于多个靶点以缓解各种症状、2 种或多种中药联合使用时的协同作用以及已被证实的安全性和有效性而闻名^[6]。而筛选出预防和治理 wAMD 的中药对于临床至关重要。综上所述, 本研究旨在利用生物信息学分析 wAMD 的氧化应激相关基因并筛选靶向防治中

药, 以期为临床决策提供更多的参考。

1 材料与方法

1.1 芯片数据采集

在 NCBI-GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 数据库中输入 “wet age-related macular degeneration” 检索词, 获得符合研究需求的基因表达芯片数据集 GSE103060。该数据集基于 GPL6480 芯片分析平台, 由 Ehlken 等^[7]于 2017 年提交, GSE103060 样本包含 16 个样本, 本研究选取其中 12 个, 其中 8 例 CNV 样本和 4 例人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 正常样本 (对照)。所有数据均可于 GEO 数据库直接获取, 本研究不涉及伦理问题。为了确保数据集的完整性和可比性, 使用 R 软件 4.3.1 对以上 2 组芯片数据进行背景校正、标准化和取对数的转换。并利用 factoextra 和 FactoMineR 包绘制聚类图、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和箱线图。

1.2 差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的筛选

利用 R 程序中 limma 包, 以 $|\log_2FC| \geq 1$ [FC 表示差异倍数 (fold change)] 且 $P < 0.05$ 为筛选条件进行 DEGs 分析。Pheatmap 和 ggplot2 软件包分别用于绘制可视化热图和火山图, 以显示重要 DEGs 的表达。

1.3 DEGs 的功能富集分析

为了进一步探索上述 DEGs 的潜在功能, 用 clusterProfiler R 软件包对 DEGs 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)

分析(筛选标准设定为 $P < 0.05$),以探究 DEGs 的生物过程(biological processes, BP)、细胞成分(cell component, CC)和分子功能(molecular function, MF)及相关通路。并利用微生信在线网站(<https://www.bioinformatics.com.cn>)进行可视化。

1.4 氧化应激相关基因的获取与筛选

从 GeneCard 数据库(<https://www.genecards.org>)筛选相关性评分 > 7 分的氧化应激相关基因,之后与 GSE103060 数据集 DEGs 取交集为 wAMD 中氧化应激相关 DEGs。

1.5 wAMD 中氧化应激差异基因的功能富集分析

用 Metascapes (<https://metascape.org/gp/index.html>)对 wAMD 中氧化应激相关 DEGs 进行了 GO 与 KEGG 分析(筛选标准设定为 $P < 0.01$),以探究 DEGs 的 BP、CC、MF 及相关通路。并利用微生信进行可视化。

1.6 蛋白相互作用 (protein-protein interaction networks, PPI) 网络构建和关键基因的筛选

将筛选出来的氧化应激差异基因导入 String 网站(<https://www.string-db.org>)进行分析,获得 PPI 网络。利用 Cytoscape 中的 CentiScaPe 2.2 插件,采用 3 种算法[度中心性(degree)、接近中心性

(closeness)、中介中心性(betweenness)]对氧化应激差异基因筛选关键基因(各种算法中均排前 10 的关键基因),之后取这些关键基因的交集,最终得到 8 个关键基因。

1.7 氧化应激相关关键基因验证

利用 GSE103060 作为验证数据集,验证关键基因在 2 组样本中的表达水平,并绘制柱状图。

1.8 wAMD 靶向防治中药的预测

利用 COREMINE Medical 在线数据库(<http://www.coremine.com/medical>)整合中药与基因互作关系,筛选出药食同源的中药材作为预防 wAMD 的策略。将关键基因输入数据库,按照中药中关键基因的频次 ≥ 7 来筛选出靶向防治中药。

2 结果

2.1 芯片数据质量

运用 R 语言对基因表达谱数据集 GSE103060 进行标准化正态处理,并绘制芯片数据相对表达值均一化箱线图(图 1-A)。结果显示,12 个样本的中位数基本位于 1 条水平直线,聚类图(图 1-B)和 PCA 图(图 1-C)显示 CNV 组与对照组有显著差异。提示基因芯片质量良好,无异常表达,两组之间的数据具有可比性,可继续用于下一步分析研究。

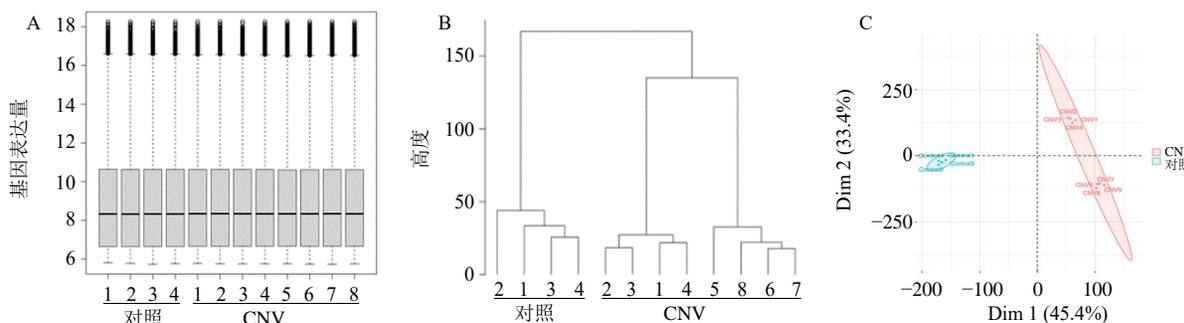


图 1 GSE103060 表达谱数据质量分析 (A)、聚类分析 (B) 和 PCA 分析 (C)

Fig. 1 Quality analysis (A), cluster analysis (B) and PCA analysis (C) of GSE103060 expression profile data

2.2 DEGs 的筛选

对 GSE103060 进行差异表达分析,得到 1 874 个 DEGs,其中上调基因 747 个,下调基因 1 127 个,DEGs 的火山图如图 2-A 所示,DEGs 的热图如图 2-B 所示。说明 CNV 组与对照组有显著差异。

2.3 DEGs 的功能富集分析

GO 分析显示,wAMD 差异基因主要富集在外部包裹结构组织(external encapsulating structure organization)、细胞外基质组织(extracellular matrix

organization)、细胞外结构组织(extracellular structure organization)、调控神经突触发育(regulation of neuron projection development)、轴突发育(axon development)等生物学过程。主要定位于胶原含有的细胞外基质(collagen-containing extracellular matrix)、内质网腔(endoplasmic reticulum lumen)、肌动蛋白细胞骨架(actin cytoskeleton)、谷氨酸能突触(glutamatergic synapse)、基底膜(basement membrane)等细胞成分。参与细胞外基质结构组分

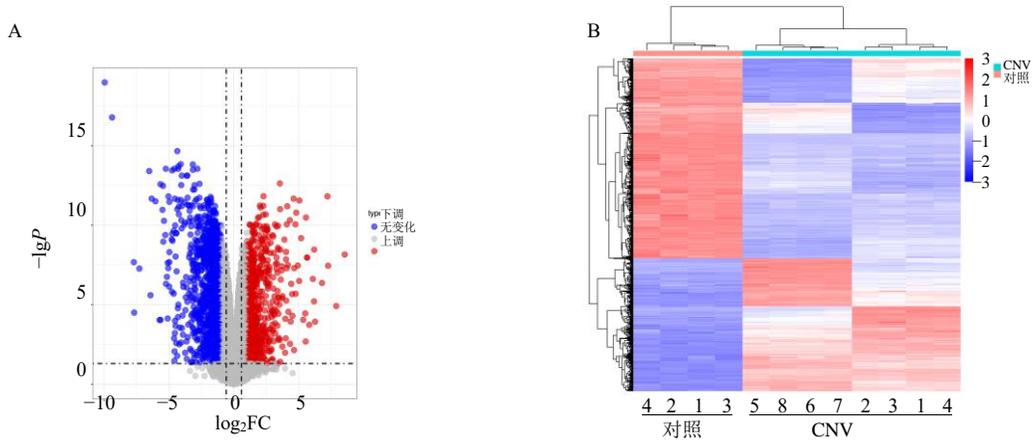


图 2 wAMD 差异基因的火山图 (A) 和热图 (B)

Fig. 2 Volcano map (A) and heat map (B) of wAMD differential genes

(extracellular matrix structural constituent)、整合素结合 (integrin binding)、糖胺聚糖结合 (glycosaminoglycan binding)、肝素结合 (heparin binding)、硫化物结合 (sulfur compound binding) 等分子功能。GO 富集柱状图展示了 BP、CC、MF 排名前 10 的 GO 术语 (图 3-A)。

KEGG 分析结果显示, wAMD 差异基因主要富集于细胞外基质受体相互作用 (ECM-receptor interaction)、黏附斑激酶 (focal adhesion)、蛋白质消化吸收 (protein digestion and absorption)、河马信号通路 (Hippo signaling pathway), 癌症信号通路 (proteoglycans in cancer)、糖尿病并发症糖尿病并发症晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体

(advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products, AGE-RAGE) 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、钙信号通路 (calcium signaling pathway)、近端小管碳酸氢盐回收 (proximal tubule bicarbonate reclamation)、轴突导向 (axon guidance) 和磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway) 等, 排名前 10 的信号通路见图 3-B。

2.4 wAMD 中氧化应激 DEGs 的功能富集分析

DEGs 富集分析从 GeneCards 中得到 1 189 个氧化应激相关基因, 将其与 GSE103060 的 1 874 个

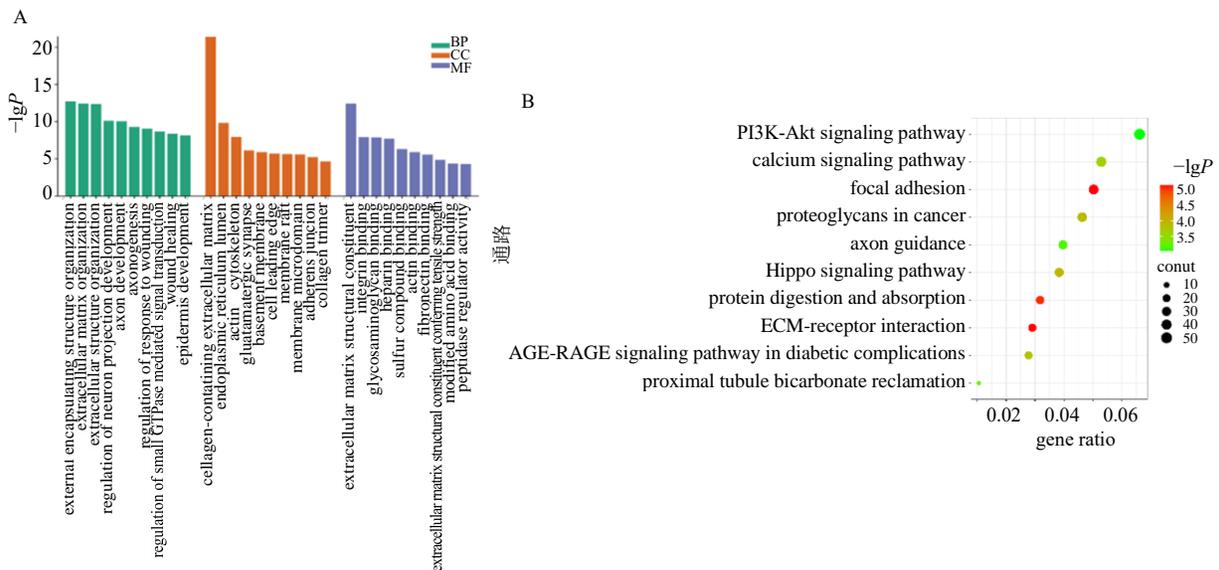


图 3 wAMD 表达谱差异基因的 GO (A) 和 KEGG (B) 分析

Fig. 3 GO (A) and KEGG (B) analysis of differential genes in wAMD expression profiles

DEGs进行韦恩分析,得到wAMD中氧化应激DEGs共117个(图4)。GO分析显示,wAMD差异基因主要富集在应对氧化应激(response to oxidative stress)、应对降低的氧气水平(response to decreased

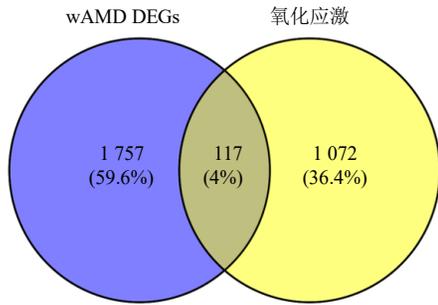


图4 氧化应激相关基因与wAMD差异基因的韦恩图
Fig. 4 Venn diagram of oxidative stress-related genes and wAMD differential genes

oxygen levels)、细胞对化学应激的反应(cellular response to chemical stress)、应对氧气水平(response to oxygen levels)、应对低氧症(response to hypoxia)等生物学过程,主要定位在氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)、信号受体激活活性(signaling receptor activator activity)、信号受体调节活性(signaling receptor regulator activity)、受体配体活性(receptor ligand activity)、蛋白质同源二聚体化活性(protein homodimerization activity)等细胞成分。参与囊泡腔(vesicle lumen)、分泌颗粒腔(secretory granule lumen)、胞浆囊泡腔(cytoplasmic vesicle lumen)、细胞外基质(extracellular matrix)、外部包围结构(external encapsulating structure)等分子功能。GO分析柱状图展示了BP、CC、MF排名前10的GO术语(图5-A)。

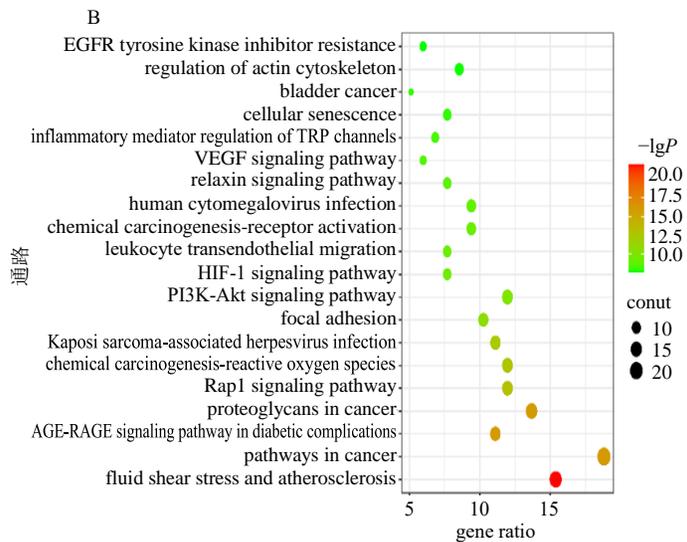
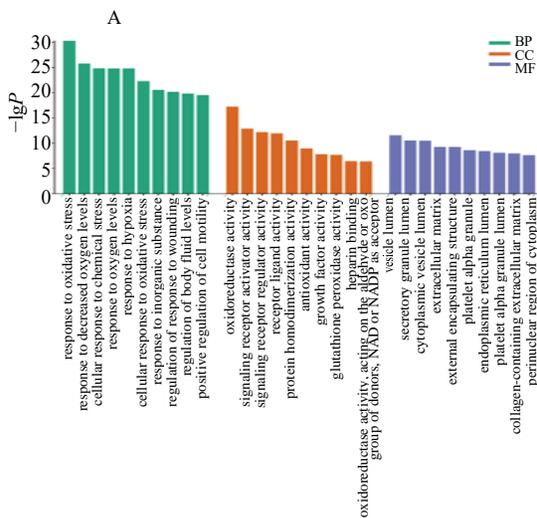


图5 wAMD中氧化应激相关的差异基因的GO(A)与KEGG(B)富集分析

Fig. 5 GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis of differential genes related to oxidative stress in wAMD

KEGG分析结果显示氧化应激相关差异基因主要富集在流体剪切应力与动脉粥样硬化(fluid shear stress and atherosclerosis)、癌症信号通路(pathways in cancer)、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、癌症中的蛋白聚糖(proteoglycans in cancer)、Rap信号通路(Rap signaling pathway)、活性氧物质化学诱癌(chemical carcinogenesis-reactive oxygen species)等。排名前20的信号通路见图5-B。

2.5 PPI网络构建及功能模块分析

将117个氧化应激差异基因导入String数据库

构建PPI网络,预测差异表达基因编码的蛋白质之间的相互作用。通过Cytoscape创建了一个共有108个节点、745条相互作用线的PPI网络图(图6)。

2.6 关键基因筛选

基于Cytoscape中的Centiscape2.2插件,利用其中3种不同的算法分别筛选出评分最高的关键基因。结果如表2所示,3种算法中的关键基因取交集,得到共有的8个关键基因:白细胞介素6(interleukin 6, IL6)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、低氧诱导因子-1α(低氧诱导因子-1α, HIF1A)、载脂蛋白E(apolipoprotein

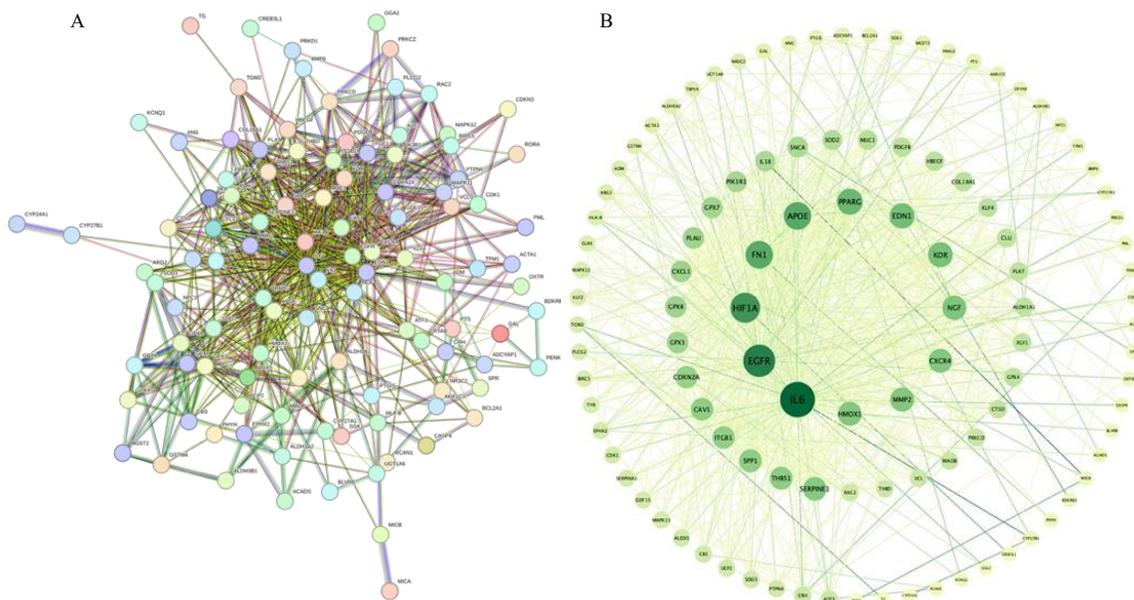


图 6 PPI 网络 (A) 及其优化 (B)
Fig. 6 PPI network (A) and its optimization (B)

表 2 wAMD 中氧化应激相关关键基因的筛选

Table 2 Screening of oxidative stress-related key genes in wAMD

度中心性	基因	中介中心性	基因	接近中心性	基因
65	IL6	0.184 684 83	IL6	0.713 333 33	IL6
56	EGFR	0.147 971 11	EGFR	0.648 484 85	EGFR
49	HIF1A	0.074 222 39	HIF1A	0.629 411 76	HIF1A
42	FNI	0.054 104 02	APOE	0.607 954 55	FNI
42	APOE	0.053 715 57	FNI	0.604 519 77	APOE
37	PPARG	0.053 377 85	PPARG	0.587 912 09	PPARG
35	EDN1	0.045 375 67	EDN1	0.575 268 82	EDN1
34	KDR	0.042 171 81	NGF	0.572 192 51	NGF
32	NGF	0.034 587 69	HMOX1	0.569 148 94	HMOX1
31	CXCR4	0.031 683 32	IL18	0.557 291 67	KDR

加粗的基因为筛选出来的核心基因。

The genes in bold are the core genes selected.

E, *APOE*)、纤维连接蛋白基 (fibronectin-1, *FNI*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor gamma, *PPARG*)、内皮素 1 (endothelin 1, *EDN1*) 和神经生长因子 (nerve growth factor, *NGF*)。

2.7 氧化应激相关关键基因验证

在数据集 GSE103060 中, 关键基因的表达水平结果 (图 7) 显示, 在 CNV 样本中 *IL6*、*HIF1A*、*EDN1* 和 *FNI* 的表达均显著高于对照组, *APOE*、*PPARG*、*NGF* 和 *EGFR* 的表达均显著低于对照组。

2.8 wAMD 防治中药的预测

利用 COREMINE Medical 在线数据库 (<http://www.coremine.com/medical>) 整合中药与基因互作关系, 筛选防治 wAMD 的中药。以 8 个氧化应激相关的关键基因作为筛选条件, 出现频次 ≥ 7 的中药见表 3, 可作为防治 wAMD 的新策略。

3 讨论

wAMD 被认为是代谢、功能、遗传和环境因素之间复杂的多因素相互作用的结果。其中衰老、光照和吸烟等因素已被证明通过诱导氧化应激来促进

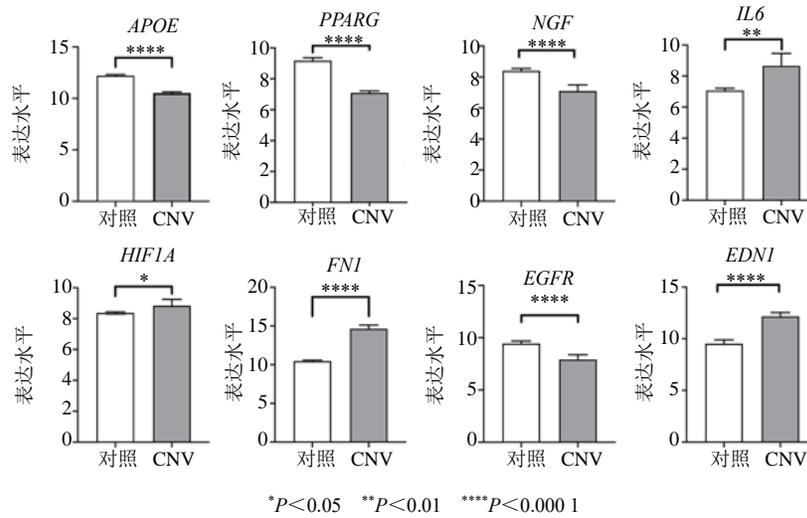


图7 8个氧化应激相关关键基因验证

Fig. 7 Verification of eight key genes related to oxidative stress

表3 靶向防治wAMD的中药预测

Table 3 Prediction of traditional Chinese medicine for targeted prevention and treatment of wAMD

中药	频次	中药	频次
人参花	8	枸杞子	7
人参叶	8	大黄	7
人参	8	当归	7
黄芪	8	红花	7
黄芩	7	银杏叶	7
丹参	7	白果	7
姜黄	7	杜仲	7
郁金	7	葛花	7
黄连	7	葛根	7
三七	7	抚芎	7
三七叶	7	藁本	7
三七花	7	川芎	7
海藻	7	全蝎	7

wAMD的发病机制，而氧化应激是目前被证实最直接的wAMD致病因素。由于阳光照射和高氧浓度，视网膜的氧化应激负担高于其他组织，从而导致视网膜中氧化脂质的水平增加。许多脂质氧化产物已被证明对光感受器和RPE细胞具有促炎和毒性^[8]。这与本研究结果一致，从Top 10的KEGG通路中得到与氧化应激有密切相关的通路有6个，分别是细胞外基质受体相互作用、黏附斑激酶通路、Hippo信号通路、AGE-RAGE信号通路、钙信号通路和PI3K-Akt信号通路。

通过对CNV样本中的氧化应激相关差异基因筛选，得出最关键的8个基因，分别是高表达的IL6、HIF1A、EDNI和FNI以及低表达的APOE、PPARG、NGF和EGFR。

IL-6是与炎症相关最为典型的细胞因子。在视网膜中，小胶质细胞通过释放并与一系列细胞因子和趋化因子的相互作用来保护视网膜；然而，当长时间暴露于IL-6等促炎细胞因子时，小胶质细胞活性会发生退行性变化，并促进循环免疫细胞的募集。这些活性促进内皮细胞迁移和小管形成，从而影响局部血管生成反应的幅度。Čolak等^[9]发现wAMD患者的IL-6水平相比早期的AMD值更高一点，而这主要是由于慢性低度炎症而导致，这与本研究结果一致。因此，认为降低慢性低度炎症是控制AMD的关键之一。

HIF1A是一种转录因子，能够在缺氧条件下激活多种基因的表达，包括VEGF，从而促进血管生成^[10]。氧化应激可以影响HIF1α的表达和功能，从而影响血管生成的平衡。在wAMD组织样本中，HIF1A的表达水平显著上调，可能加剧wAMD的发展。

EDN1在血管功能中是重要的调节因子，决定血管中的血流，可能参与血管生成。EDN-1的产生和释放可以受到氧化应激的影响。研究表明，氧源性自由基可以增加培养内皮细胞中内皮素-1的合成，但氧化应激诱导EDN1含量升高的机制尚不清楚。Choręziak等^[11]在一项早产儿视网膜病变相关研究

中,证明 EDN1 与视网膜病变有关,这与本研究结果一致,相比对照组,CNV 组的 *EDN1* 表达显著升高,表明 EDN-1 可能是防治 wAMD 的重要潜在靶点。

FN1^[12]是由纤维母细胞、内皮细胞、巨噬细胞和肝细胞等合成和分泌的一种糖蛋白,存于体液、细胞表面、结缔组织和基底膜中,也分布于眼组织细胞,具有促进组织细胞生长的作用, FN 已用于一些眼病的治疗,特别是用于促进角膜上皮修复,取得了较好效果。但目前鲜有 FN1 关于 wAMD 的报导。在本研究结果中,与对照组相比, *FN1* 在 CNV 组的表达显著上升,这可能与眼部自我修复的功能激活有关。

APOE 可以影响血管生成和血管完整性,从而影响视网膜的血液供应和氧气输送。尽管 APOE 是与阿尔茨海默病密切相关的基因,但 APOE 可以影响 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 的清除和纤维化,从而导致 A β 在视网膜中的沉积和损伤。并在 RPE 细胞中高度表达^[13]。一项研究表明,缺乏 APOE 的小鼠表现出脂质和糖代谢异常,并发展出布鲁赫膜增厚以及基底 RPE 细胞和布鲁赫膜中脂质沉积。Rasmussen 等^[14]研究也发现, APOE 结构的变异可能提高 AMD 的风险。由此证明, APOE 也是 wAMD 潜在的关键基因。

PPARG 是一类脂质激活转录因子,参与脂质代谢和炎症过程。在各种致盲疾病中的代谢、血管生成、纤维化、炎症和氧化应激等多种生理过程的控制中发挥重要作用^[2]。而在本研究结果中, *PPARG* 在 CNV 组样本中显著下调。提高 *PPARG* 的表达水平对防治 wAMD 有重要意义。

NGF 是一种促进交感神经和外周胆碱能神经生长以及神经感觉通路发育和生长的营养因子。研究表明在动物模型中^[15],眼内给药 NGF 可抑制视网膜神经节细胞变性从而改善 AMD 患者的视力。

EGFR 是一种膜酪氨酸激酶受体,能够调节细胞的增殖、迁移、分化和凋亡等过程, Chen 等^[16]报道氧化应激可破坏 EGFR/Akt 信号通路,从而抑制 ARPE-19 细胞的存活。这一发现提示 EGFR/Akt 信号通路可能是预防 RPE 细胞氧化损伤的重要靶点。在 CNV 组样本中, *EGFR* 的表达水平显著下调,可能导致血管生成和 RPE 细胞损伤,从而加剧 wAMD 的进展。

AMD 属于中医学“视瞻昏渺”的范畴,在《证治准绳》中首次提出这一病名,并说明了其眼外观

无异常,但出现视物昏朦、视如曲线的症状^[17]。一项临床探究统计得出 wAMD 的病位证素^[18]特征主要为肝、肾、脾,病性主要为阴虚、痰湿、血瘀、气虚,常见证型有肝肾阴虚、脾虚湿困、痰瘀互结、阴虚火旺、脾虚气弱。其中肝肾阴虚、精亏血少为主要的病因病机,治疗应以补益肝肾、滋阴明目为主。本研究结果与此不谋而同,预测到补益类中药有人参、人参叶、人参花、枸杞子、白果、黄芪、杜仲、郁金。这些中药具有滋补、提高免疫力、改善体质的作用,可用于防治 wAMD。而血行类中药丹参、川芎和红花有助于促进血液循环,可以用于一些与眼部血液供应不足相关的问题。清热解毒类中药大黄、黄连和黄芩通常用于清热解毒,可以在一些眼部感染或炎症的治疗中有一定的作用。葛花、金银花、红花和银杏叶富含抗氧化剂,有助于保护眼睛健康,可以用于一些与眼睛老化或疲劳相关的问题。因此,推荐使用以上中药来防治 wAMD,这对中医指导下的用药提供了新的方向。

4 结论

本研究基于基因芯片,通过对 wAMD 芯片的挖掘和生物信息分析,差异基因主要富集于氧化应激的相关通路(细胞外基质受体相互作用、黏附斑激酶通路、Hippo 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、钙信号通路和 PI3K-Akt 信号通路)。发现 wAMD 的氧化应激主要是由 *IL6*、*EGFR*、*HIF1A*、*APOE*、*FN1*、*PPARG*、*EDN1*、*NGF* 引起的。而防治 wAMD 氧化应激的首选中药为人参、黄芪、枸杞子、丹参、银杏叶等 26 种。这将对理解和探索 wAMD 的中医药防治有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Heesterbeek T J, Lorés-Motta L, Hoyng C B, et al. Risk factors for progression of age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2020, 40(2): 140-170.
- [2] Young C E. Mechanism of cholesterol-mediated retinal pigment epithelium dysfunction as a model for dry age-related macular degeneration [D]. Boston: Harvard Medical School, 2019.
- [3] 周尚昆. “明睛颗粒”治疗湿性老年性黄斑变性的临床及实验研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [4] Apte R S. Age-related macular degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(6): 539-547.
- [5] Galindo-Camacho R M, Blanco-Llamero C, da Ana R, et

- al. Therapeutic approaches for age-related macular degeneration [J]. *Int J Mole Sci*, 2022, 23(19): 11769.
- [6] Jiang W Y. Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: A perspective from modern science [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 26(11): 558-563.
- [7] Ehlken C, Guichard M M, Schlunck G, et al. Expression of angiogenic and inflammatory factors in choroidal neovascularisation-derived retinal pigment epithelium [J]. *Ophthalmic Res*, 2019, 61(3): 174-182.
- [8] Zor R K, Erşan S, Küçük E, et al. Serum malondialdehyde, monocyte chemoattractant protein-1, and vitamin C levels in wet type age-related macular degeneration patients [J]. *Ther Adv Ophthalmol*, 2020, 12: 2515841420951682.
- [9] Čolak E, Ignjatović S, Radosavljević A, et al. The association of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense parameters with inflammatory markers in patients with exudative form of age-related macular degeneration [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2017, 60(2): 100-107.
- [10] Barben M, Schori C, Samardžija M, et al. Targeting Hif1a rescues cone degeneration and prevents subretinal neovascularization in a model of chronic hypoxia [J]. *Mol Neurodegener*, 2018, 13(1): 12.
- [11] Choręziak-Michalak A, Gotz-Więckowska A, Chmielarz-Czarnocińska A, et al. Potential role of eNOS and EDN-1 gene polymorphisms in the development and progression of retinopathy of prematurity [J]. *BMC Ophthalmol*, 2023, 23(1): 78.
- [12] 刘孟丽, 马群. 纤维连接蛋白在眼科的应用 [J]. 广后医学, 1996, 10(2): 112-114.
- [13] Vessey K A, Jobling A I, Tran M X, et al. Treatments targeting autophagy ameliorate the age-related macular degeneration phenotype in mice lacking APOE (apolipoprotein E) [J]. *Autophagy*, 2022, 18(10): 2368-2384.
- [14] Rasmussen K L, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard B G, et al. Associations of alzheimer disease-protective APOE variants with age-related macular degeneration [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2023, 141(1): 13-21.
- [15] Amadoro G, Latina V, Balzamino B O, et al. Nerve growth factor-based therapy in Alzheimer's disease and age-related macular degeneration [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 735928.
- [16] Chen X D, Su M Y, Chen T T, et al. Oxidative stress affects retinal pigment epithelial cell survival through epidermal growth factor receptor/AKT signaling pathway [J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, doi: org/ 10.18240/ijo.2017.04.02.
- [17] 高园园, 李娟, 黄洁, 等. 《审视瑶函》视瞻昏渺辨证思想在年龄相关性黄斑变性治疗中的应用初探 [J]. 山西中医, 2020, 36(12): 1-4.
- [18] 王雨莎, 刘志敏, 陈超艳, 等. 湿性年龄相关性黄斑变性的中医证素特征研究 [J]. 中医药临床杂志, 2023, 35(7): 1375-1378.

[责任编辑 潘明佳]