

• 数据挖掘与循证医学 •

基于异病同治理论从卵巢早衰角度探究治疗干眼症的天然活性成分

龙 茜^{1,2}, 刘 培¹, 田赛男¹, 刘文娥², 林 洁², 彭清华^{1,2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

摘要: 目的 基于异病同治理论通过生物信息学的方法从卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 角度探究干眼症 (dry eye disease, DED) 的关键基因及作用机制, 并进一步寻找治疗干眼症的天然活性成分, 以期拓展干眼症的治疗策略及药物开发途径。方法 通过基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 对卵巢早衰与干眼症相关基因和数据集进行鉴定, 对获得的数据集分别进行加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)。随后, 通过构建蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 筛选出该网络中的关键基因。对关键基因进行基因本体论 (gene ontology, GO) 及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。同时, 利用机器学习方法及受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 分析获得具有更有诊断价值的特征基因。将关键基因用于天然活性成分预测, 构建天然活性成分-靶标网络。利用分子对接技术验证具有潜在治疗效果的天然活性成分, 并对预测的天然活性成分进行体外实验验证。结果 通过筛选确定 GSE44101 及 GSE39501 作为基础数据集, 获得 151 个卵巢早衰与干眼症共表达基因靶点, 获得 37 个关键靶基因, 主要富集于细胞循环、DNA 修复、卵细胞减数分裂等过程。通过机器学习及 ROC 分析进行筛选后获得 7 个特征基因。预测发现染料木素为关键的天然活性成分。细胞实验验证结果表明, 角膜上皮细胞干眼症模型在 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 染料木素干预 24 h 后细胞生存率最高, 其发挥作用的机制与抑制 Polo 样激酶 1 (Polo-like kinase 1, PLK1)、DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1)、丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4, MAP2K4) 的表达及促进细胞分裂周期蛋白 20 (cell division cycle 20, CDC20) 的表达相关。结论 卵巢早衰可与干眼症共病发生, 其机制与炎症及细胞凋亡相关, 染料木素可减少炎症损害与异常细胞凋亡的发生, 从而达到治疗卵巢早衰并发干眼症的作用。

关键词: 异病同治; 卵巢早衰; 干眼症; 染料木素; 生物信息学

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)10-3585-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.10.017

Exploring natural active ingredients in treatment of dry eye disease from perspective of premature ovarian failure based on theory of same treatment for different diseases

LONG Xi^{1,2}, LIU Pei¹, TIAN Sainan¹, LIU Wen'e², LIN Jie², PENG Qinghua^{1,2}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: Objective Based on the theory of “the same treatment for different diseases” (异病同治), this study aims to explore the key genes and mechanisms of dry eye disease (DED) from the perspective of premature ovarian failure (POF) using bioinformatics methods, and to search for natural active ingredients for treating DED, with the goal of expanding targeted treatment strategies and drug development avenues for DED. **Methods** POF- and DED-related genes and datasets were identified from the gene expression omnibus (GEO) database. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was performed on the obtained datasets. A protein-protein interaction

收稿日期: 2025-02-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81574031); 2021 年度“刘良院士工作站”指导项目 (21YS002); 中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目 (2017TP1018); 国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目 (ZK1801YK015); 湖南省教育厅科研基金重点项目 (23A0300); 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科建设项目; 湖南中医药大学研究生创新课题项目 (2024CX041)

作者简介: 龙 茜, 博士研究生, 研究方向为专科病证诊断创新。E-mail: lx_5564@163.com

***通信作者:** 彭清华, 教授, 博士生导师, 博士后合作导师, 从事病证诊断创新与中西医结合治疗眼病研究。E-mail: pengqinghua@hnuucm.edu.cn

(PPI) network was constructed to screen key genes, followed by gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses. Machine learning methods and receiver operating characteristic (ROC) analysis were used to identify diagnostically significant characteristic genes. These genes were applied to predict natural active ingredients, and a natural active ingredient-target network was constructed. Molecular docking was employed to observe natural active ingredients with potential therapeutic effects. *In vitro* experiments were conducted to validate the predicted natural active ingredients. **Results** The GSE44101 and GSE39501 datasets were selected as the basis for analysis. A total of 151 shared genes between POF and DED were identified, and 37 key target genes were obtained. These genes were primarily enriched in biological processes such as cell cycle, DNA repair, and oocyte meiosis. Machine learning and ROC analysis revealed seven characteristics genes. Genistein was predicted as a key natural active ingredient. The verification results of cell experiments showed that 12.5 $\mu\text{mol/L}$ genistein significantly enhanced the viability of corneal epithelial cells in a DED model at 24 h, mechanistically linked to downregulation of Polo-like kinase 1 (PLK1), DNA methyltransferase 1 (DNMT1), and mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAP2K4) and upregulation of cell division cycle 20 (CDC20). **Conclusion** POF may comorbidly occur with DED, where shared mechanisms involve inflammatory dysregulation and aberrant apoptosis. Genistein can reduce the occurrence of inflammatory damage and aberrant apoptosis, thereby achieving the therapeutic effect of treating POF complicated with DED.

Key words: same treatment for different diseases; premature ovarian failure; dry eyes; genistein; bioinformatics

“异病同治”理论源自《素问·五常政大论篇》的“同病异治”思想，即同一疾病若病机不同则应采用不同的治疗方法。后明确将其解释为不同的疾病若促使发病的病机相同，可用同一种方法治疗^[1]。卵巢早衰是一种多病因所致的卵巢内卵泡耗竭或被破坏而发生的卵巢功能衰竭。卵巢早衰的发病率为 1%~2%，且有上升趋势^[2]。在中医古籍中，虽无关于“卵巢早衰”的记载，但可将其归为“血枯”“闭经”“不孕”“血隔”等范畴。目前普遍认为卵巢早衰的主要病位在肝肾，其主要病机为肝失疏泄，郁而不畅，肝血无法滋养肾阴，肾阴不足，无血化生而出现闭经，或胞宫失养而出现不孕。临床根据辨证论治，可将其分为肝肾阴虚型、脾肾阳虚及肾虚血瘀^[3]。干眼症是眼部失去正常的环境并且表现出多种多样的眼部不适症状的眼病^[4]，是近年来发病率逐年攀升的眼科常见病，其发病率 5.5%~33.7%^[5]，流行病学研究表明，女性和老年人群更容易患此病^[6]，尤其围绝经期女性^[7]。其发病因素与炎症因素、性激素分泌异常等关系密切^[8-9]。中医古籍《审视瑶函》有关于类似干眼症的明确记载，称其为“白涩症”，也在“神水将枯”“干涩昏花”等范畴。所谓“肝受血则能视”，当肝的疏泄功能失常，肝气不舒、郁而化火、气火上逆、肝血耗伤，或肾气虚衰、肝肾同源、一泄一藏、水不涵木、肝血渐亏，终至肝肾二脏皆阴虚，则两目津液亏损，目失所养则干涩昏花。临床分型可分为肺阴不足、肝经蕴热、肝肾阴虚、气阴两虚^[10]。

在中医理论中，干眼症以肝肾阴虚证多见，而卵巢早衰的病位在肝肾，亦以肝肾阴虚证多见，二

者异病同治，临床上皆常以一贯煎加减治疗^[11-13]。在现代研究中，干眼症的发生发展与卵巢早衰有一定关联，其主要的发生机制与雌激素水平的下降相关。卵巢早衰患者中干眼症的发生率显著高于普通人群。1 项研究检测了 65 例卵巢早衰患者和 36 例年龄匹配的对照组，发现卵巢早衰患者的眼表不适症状和泪液参数异常更为显著^[14]。此外，研究发现卵巢早衰与干眼症也存在共同的发病机制如氧化应激^[15-16]、炎症^[17-18]、细胞凋亡^[19-20]等。由卵巢早衰导致的干眼症将大大降低卵巢早衰女性的生活质量。目前关于干眼症的治疗以人工泪液或抗炎为主，其形式以滴眼的局部治疗，有一定的缓解作用但并不能解决由于性激素的缺乏所导致的干眼症的发生。天然活性成分在干眼症以滴眼治疗方式的临床应用中具有广阔前景。基于中医理论，结合现代研究手段寻找治疗卵巢早衰或雌激素水平下降所致干眼症的天然活性成分，再进一步探索干眼症的发生机制及寻找临床新药具有重要意义。本研究在复杂的生物信息网络分析下从卵巢早衰的角度寻找治疗干眼症的天然活性成分，以期丰富干眼症的治疗药物，研究流程见图 1。

1 材料

1.1 细胞株

人角膜上皮细胞-转化 (human corneal epithelial cells-transformed, HCE-T) 细胞系 (批号 20240514) 购自广州赛库生物技术有限公司。细胞于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养，每 2 天更换 1 次 DMEM 培养基，培养至细胞密度 90% 或更高密度后进行传代。

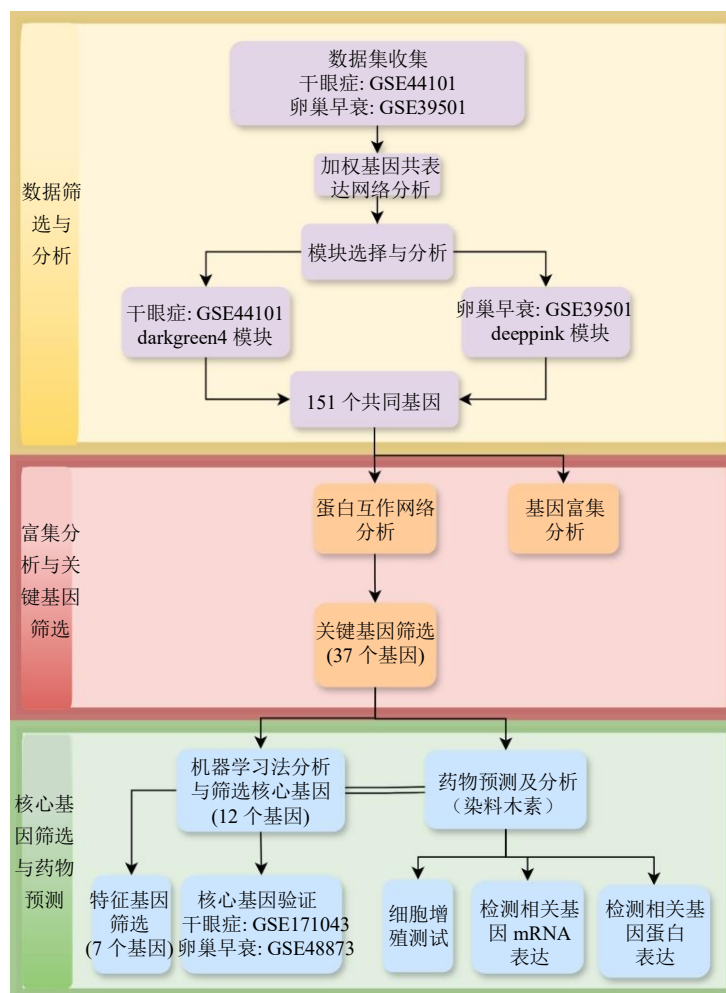


图 1 研究流程

Fig. 1 Research process

1.2 药品与试剂

染料木素 (批号 T1737) 购自美国 TargetMol 公司; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) (批号 CT01A)、HCE-T 即用型完全培养基 (批号 CC4018S)、磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS, 批号 CM2018)、胰酶消化液 (批号 CM1006) 均购自 Cellcook 广州赛库生物; Polo 样激酶 1 (Polo-like kinase 1, PLK1) 抗体 (批号 AWA11236)、细胞分裂周期蛋白 20 (cell division cycle 20, CDC20) 抗体 (批号 AWA59190)、DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 抗体 (批号 AWA11325)、丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4, MAP2K4) 抗体 (批号 AWA59223) 均购自中国 Abiowell 公司; β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (批号 66009-1-Ig) 购自美国 proteintech 公司; HRP 标记的山羊抗鼠二抗 (批号 AWS0001)、HRP 标记的山羊

抗兔二抗 (批号 AWS0002) 购自中国 Abiowell 公司。

1.3 仪器

HR/T16M 型台式冷冻离心机 (赫西仪器装备有限公司); MoticBA410 型研究型显微镜 (北京荣兴光恒科技有限公司); RaytoRT-6100 型酶标分析仪 (埃登威自动化系统设备上海有限公司); DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-24DN 型电泳槽、DYCZ-40D 型转膜仪、DYCP-31DN 型水平琼脂糖电泳槽 (北京六一生物科技有限公司); BioPrep-24 型生物样品均质仪 (杭州奥盛仪器有限公司); ChemiScope6100 型化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 生物信息学分析

2.1.1 数据来源 通过基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 平台, 分别输入关键词 “premature ovarian failure” 以及 “dry eyes” 寻找与卵巢早衰及干眼症相关的数据集。设置筛选条件为

每组样本量 ≥ 3 , 中包含正常样本与疾病样本, 用于分析的 2 个数据集为同一物种。

2.1.2 加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 基于基因间表达相似性的基因网络构建算法。使用 R 软件包 WGCNA 剔除离群基因和样本。利用幂函数构建加权邻接矩阵, 构建无标度共表达网络。随后计算模块特征基因的相似性。挑选出分别与卵巢早衰和干眼症相关系数较高的模块, 并从这些模块中获取基因进行进一步分析。使用在线工具 Venn (<https://jvenn.toulouse.sra.fr/app/example.html>) 获得卵巢早衰与干眼症共同表达的基因。

2.1.3 基因蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络及富集分析 通过 STRING (<https://string-db.org>) 构建 PPI 网络, 并获得关键基因。物种设定为“智人”, 最低要求的相互作用得分设定为高置信度 (0.9)。为进一步阐明关键基因的功能, 对上述分析中所获得的与卵巢早衰及干眼症的交集基因进行基因本体论 (gene ontology, GO) 及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。使用 KEGG restAPI (<https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html>) 获取 KEGG Pathway 的最新基因注释, 并使用 R 软件包 clusterProfiler 3.14.3 进行富集分析。使用 R 软件包 org.Hs.eg.db 3.1.0 的进行 GO 功能注释, 包括生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。设定 $P < 0.05$ 和错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.1 均有统计学意义。

2.1.4 核心基因识别与诊断特征基因鉴定 为进一步探索关键基因的诊断价值, 利用机器学习构建预测模型已获得核心基因。使用 R 软件包 glmnet 中的最小绝对收缩和选择算子 (least absolute shrinkage and selection operator, LASSO) 算法进行回归分析。随后利用 e1071 软件包中的支持向量机-递归特征消除 (support vector machine-recursive feature elimination, SVM-RFE) 算法构建另一个模型。通过这些分析获取了机器学习算法下的核心基因。

采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 分析评估结果的预测性能和某一因素的诊断价值。曲线下面积 (area under the curve, AUC) 值在 (0.5, 0.7] 表示准确率低、AUC 在 (0.7~0.9] 表示准确率中等、AUC > 0.9 表示准

确率高。使用 R 软件包 pROC (v1.17.0.1) 对核心基因进行 ROC 分析获得特征基因。随后, 使用 R 软件通过其他卵巢早衰及干眼症相关的 GEO 数据集分别对特征基因进行外部数据集的验证。

2.1.5 天然活性成分预测 利用 HIT2.0 平台 (<http://www.badd-cao.net:2345/>) 在关键基因的基础上进行反向预测, 寻找具有靶向关键基因的潜在天然活性成分。通过构建活性成分-靶点网络发现二者之间的关联。利用网络的拓扑特性分析网络中最重要的基因节点和天然活性成分节点。随后通过 SwissAMD (<http://www.swissadme.ch/>) 检索基于 Lipinski 法则预测的天然活性成分的胃肠道吸收情况。

2.1.6 分子对接分析 对天然活性成分及其相应的靶点蛋白进行分子对接分析。靶点蛋白的三维结构 (PDB 格式) 通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载, 并通过 TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 收集其相应活性成分结构的 mol2 格式文件。利用 AutoDock 软件将活性成分和目标蛋白质格式转换为 pdbqt 格式后进行对接。对接结果被导入 PyMOL 软件进行可视化。本课题组在前期研究中发现槲皮素在干眼症的治疗中具有积极作用^[21], 其机制与调控蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 基因相关, 为便于分子对接分数的对比分析, 本研究采用槲皮素与现有文献研究中的靶点进行对接作为对照, 比较关键活性成分及槲皮素分别与其对应靶点的对接分数。

2.2 实验验证

2.2.1 细胞分组、造模与给药 将 HCE-T 细胞分为对照组、模型组及染料木素不同剂量 (3.125、6.250、12.500、25.000 $\mu\text{mol/L}$) 组进行药物细胞毒性测试。采用文献及本研究团队在前期研究中已验证的成熟模型^[21-23]进行造模。对照组加入 HCE-T 即用型完全培养基, 其余各组加入 94 mmol/L 氯化钠干预 24 h 建立干眼症模型。通过细胞形态及活力下降 (模型组存活率 $< 70\%$ 对照) 验证模型。造模完成后, 对照组、模型组加入 HCE-T 即用型完全培养基中培养, 各给药组加入相应浓度的染料木素, 分别孵育 24、48 h。

2.2.2 细胞存活率检测 取对数生长期的 HCE-T 细胞或干眼症模型细胞, 用胰蛋白酶消化, 按 5×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板, 分为对照组和染料木

素组,细胞按“2.2.1”项下方法处理和给药,每组 6 个复孔,同时设置空白孔(不接种细胞)。在 96 孔板的各个待测孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续孵育 1 h 后,用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.3 RT-qPCR 检测相关靶点 mRNA 表达 将干眼症模型细胞按 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板,分为对照组、模型组、染料木素最适浓度组(12.500 μ mol/L),按照“2.2.1”项方法进行处理和给药,使用 Trizol 试剂收集提取各组细胞总 RNA,测定 RNA 纯度后,使用逆转录试剂盒将 RNA 反转录为模板 DNA。以 β -actin 为内参,按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *CDC20*、*PLK1*、*DNMT1*、*MAP2K4* 的 mRNA 相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>CDC20</i>	F: GCTTTGAACCTGAACGGTTTTG R: TCTGGCGCATTTTGTGGTTTT
<i>PLK1</i>	F: CACCAGCACGTCGTAGGATTC R: CCGTAGGTAGTATCGGGCCTC
<i>DNMT1</i>	F: AGAACGGTGCTCATGCTTACA R: CTCTACGGGCTTCACTTCTTG
<i>MAP2K4</i>	F: GACGAGGAGCTTATGGTTCTGT R: TTTTCATCCACTGTTGACCGAA
β -actin	F: AAGATGGTGAAGGTCGGTGT R: AGCACAGCCTGGATAGCAAC

2.2.4 Western blotting 检测蛋白表达 将细胞按 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板,按照“2.2.3”项方法进行分组、造模及给药,收集细胞,加入 RIPA 裂解液裂解细胞提取蛋白,并经 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,使用脱脂奶粉封闭 2 h 后,分别滴加 *CDC20*、*PLK1*、*DNMT1*、*MAP2K4* 的一抗(1:500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后使用 TBST 清洗,然后加入二抗(1:5000)室温孵育 2 h,ECL 显色后进行曝光拍照,并以 β -actin 为内参进行灰度值分析。

2.2.5 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析,首先对样本进行正态性检验,若数据符合正态分布,则进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。若方差齐,使用 Bonferroni 法进行组间多重比较;若方差不齐,则采用 Tamheeni 法进行组间多重比较。

3 结果

3.1 WGCNA

通过筛选确定了用以分析卵巢早衰的数据集为 GSE39501,干眼症相关数据集为 GSE44101。对 GSE44101 和 GSE39501 数据进行预处理后,进行 WGCNA。分别选取 β 值 20 和 9 作为软阈值以构建共表达网络。在 GSE44101 数据集获得了 33 个模块,而数据集 GSE39501 获得了 50 个模块。通过将 GSE44101 和 GSE39501 数据集的模块与样本的临床特征(正常与疾病)相关联,发现 GSE44101 数据集 darkolivegreen4 模块与组织的临床特征($r=0.99$, $P=0.00$)高度相关, GSE39501 数据集 deeppink1 模块与临床特征高度相关($r=0.99$, $P=0.00$),如图 2、3 所示。取二者的交集获得了 151 个干眼症和卵巢早衰共表达的基因,见图 4。

3.2 基因蛋白互作网络及富集分析

随后对 151 个基因进行 PPI 网络分析,获得了具有相互作用的 37 个关键基因,见图 5-A。GO 和 KEGG 富集分析发现,关键基因主要涉及的 KEGG 通路包括细胞周期(cell cycle)、DNA 复制(DNA replication)、卵母细胞减数分裂(oocyte meiosis)等(图 5-B)。而 GO 功能分析涉及的主要 BP 为染色体分离(chromosome segregation),CC 为染色体区域(chromosomal region)以及 MF 的单链 DNA 解旋酶活性(single-stranded DNA helicase activity),见图 5-C。

3.3 核心基因识别与诊断特征基因鉴定

为进一步识别核心基因,对其进行了 LASSO 及 SVM-RFE 机器学习分析。结果表明,在 GSE44101 数据集中,基于 LASSO 算法有 5 个核心基因(图 6-A),而在 SVM-RFE 算法下则有 31 个核心基因(图 6-C),结合二者算法的共同核心基因有 31 个。在 GSE39501 数据集中,基于 LASSO 算法有 7 个核心基因(图 6-B),而在 SVM-RF 算法下则有 10 个核心基因(图 6-D),结合其二者算法的共同核心基因有 13 个。取交集后二者共有的核心基因有 12 个,分别为杆状病毒 IAP 重复序列包含蛋白 5(baculoviral IAP repeat-containing 5, BIRC5)、*CDC20*、*CDCA3*、微小染色体维持复合物组分 5(minichromosome maintenance complex component 5, MCM5)、拓扑异构酶 II α (topoisomerase II α , TOP2A)、含 PHD 和 RING 指结构域的泛素样蛋白 1(ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1, UHRF1)、微小染色体维持复合物组分

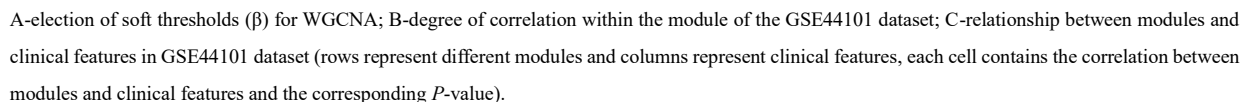
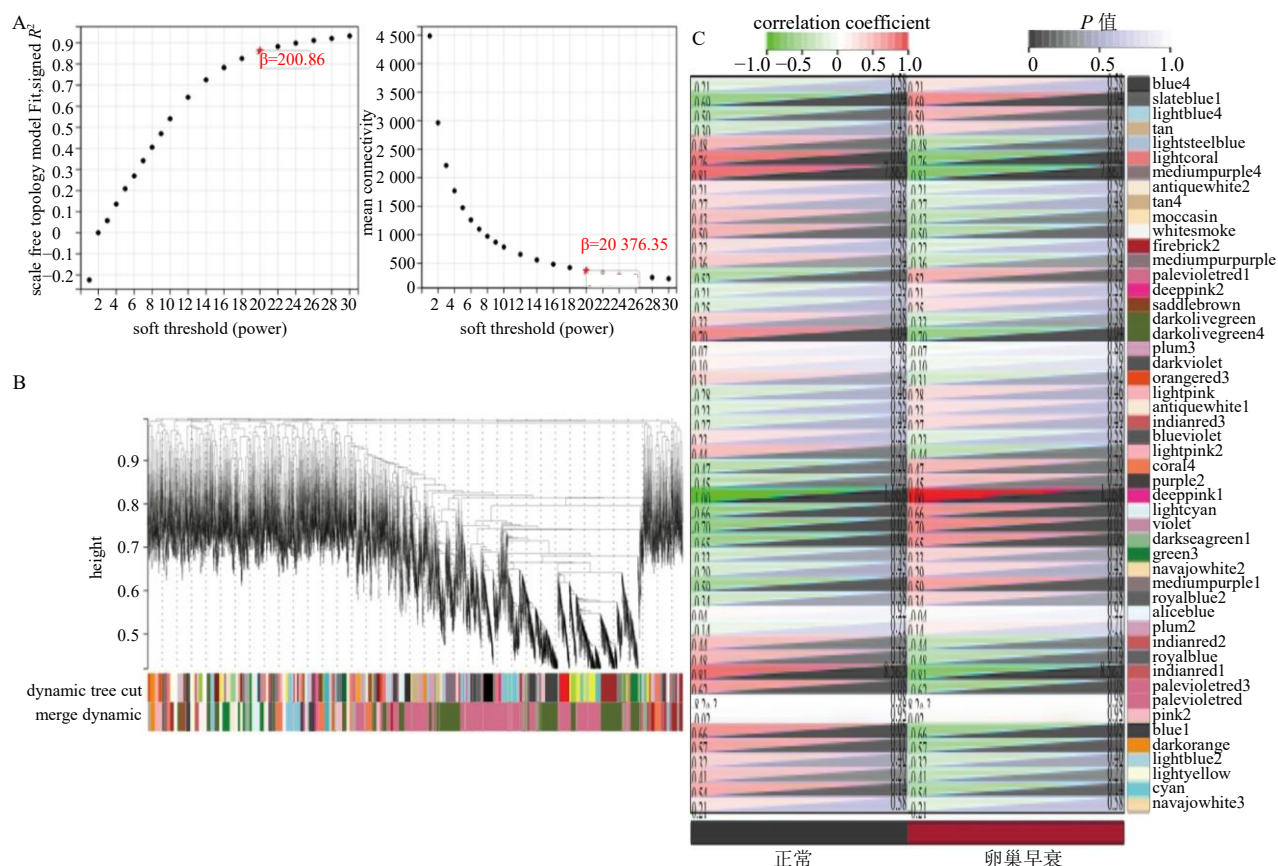


Fig. 2 Weighted gene co-expression network analysis of GSE44101 dataset

在确定关键基因的基础上,对天然活性成分进行了反向预测,构建了基因-天然活性成分网络,共包含 56 个节点,51 条相互作用的边。其中 15 个为基因节点,41 个为天然活性成分节点,见图 9。通过分析网络的拓扑学性质,发现在该网络中,天然活性成分染料木素 (genistein) 与基因关联数量最多。与 2 个以上基因相关的天然活性成分见表 2。经过 SwissAMD 分析,并筛选符合 Lipinski 五倍法则及高胃肠道吸收率的天然活性成分,结果表明,大多数活性成分符合 Lipinski 五倍法则且胃肠道吸收率高。



A-WGCNA 中的软阈值 (β) 选择; B-GSE39501 数据集中模块内的相关性程度; C-GSE39501 数据集中模块与临床特征的关系 (行代表不同模块, 列代表临床特征, 单元格内为模块与临床特征的相关系数及对应 P 值)。

A-election of soft thresholds (β) for WGCNA; B-degree of correlation within the module of the GSE39501 dataset; C-relationship between modules and clinical features in GSE39501 dataset (rows represent different modules and columns represent clinical features, each cell contains the correlation between modules and clinical features and the corresponding P -value).

图 3 GSE39501 数据集的 WGCNA

Fig. 3 Weighted gene co-expression network analysis of GSE39501 dataset

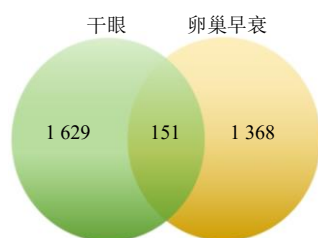


图 4 干眼症与卵巢早衰的共表达基因

Fig. 4 Co-expressed genes between dry eye disease and premature ovarian failure

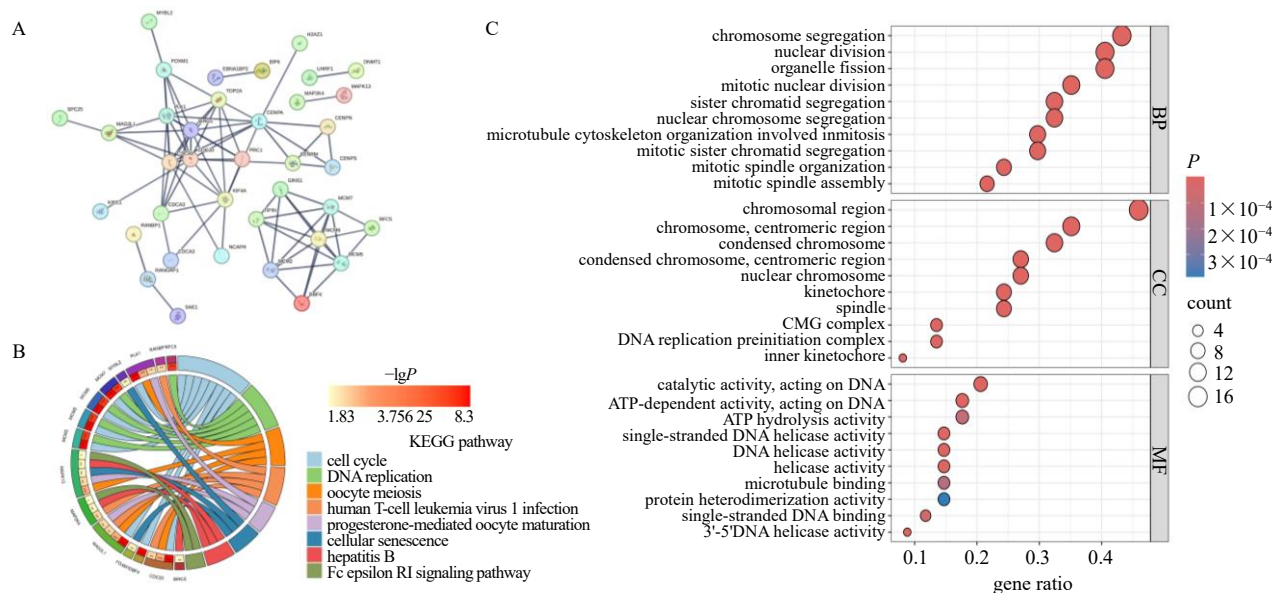
3.5 分子对接分析

如图 10、11 所示, 染料木素与 CDC20 (PDBID: 4ggc)、PLK1 (PDBID: 3d5x)、DNMT1 (PDBID: 3os5)、MAP2K4 (PDBID: 3vut) 的结合能均 < 0 kJ/mol, 表明染料木素与这些配体均可以自发结合。染料木素和 CDC20 的分子对接结合能最低为 7.12

kJ/mol。槲皮素与现有研究中的对应靶点 AKT (PDBID: 1q0r)、PI3K (PDBID: 8v8h)、PTEN (PDBID: 3awg) 进行分子对接结果显示, 染料木素的平均结合能均小于槲皮素, 表明染料木素与其对应靶点的对接更为稳定, 发挥作用的可能性更大, 具有研究价值。因此, 本研究通过细胞实验验证染料木素对于干眼症的药效作用。

3.6 CCK-8 检测细胞存活率

CCK-8 检测结果显示, 细胞给药 24 h 后, 染料木素浓度 $\leq 12.500 \mu\text{mol/L}$ 细胞存活率未受到显著抑制 (图 12-A); 细胞给药 48 h 后, 所有浓度的染料木素均显著抑制细胞存活率 ($P < 0.05$ 、 0.001), 见图 12-B。细胞给药 24 h 后, 不同浓度染料木素组角膜上皮细胞干眼症模型细胞存活率均具有增加的趋势, 其中 $12.500 \mu\text{mol/L}$ 染料木素组细胞存活

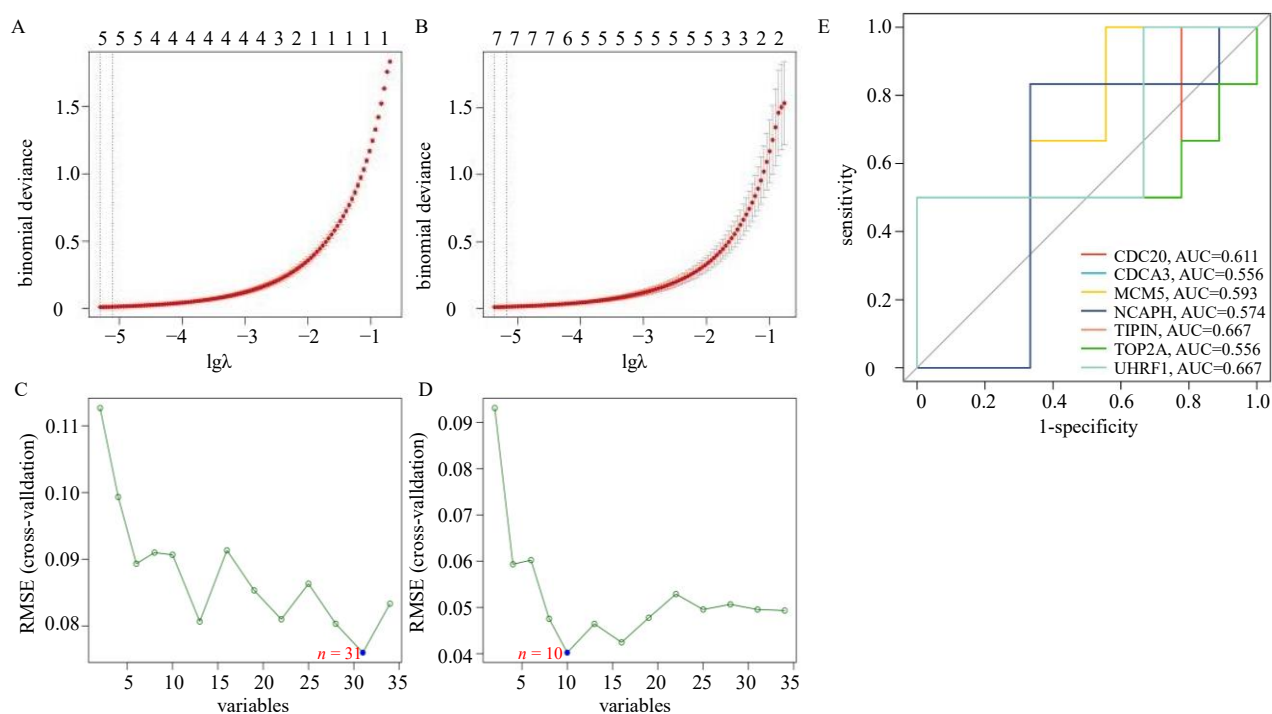


A-PPI 网络; B-KEGG 富集分析; C-GO 功能注释分析。

A-PPI network; B-KEGG enrichment analysis; C-GO functional annotation analysis.

图 5 关键基因的 PPI 网络及富集分析

Fig. 5 PPI network and enrichment analysis of key genes

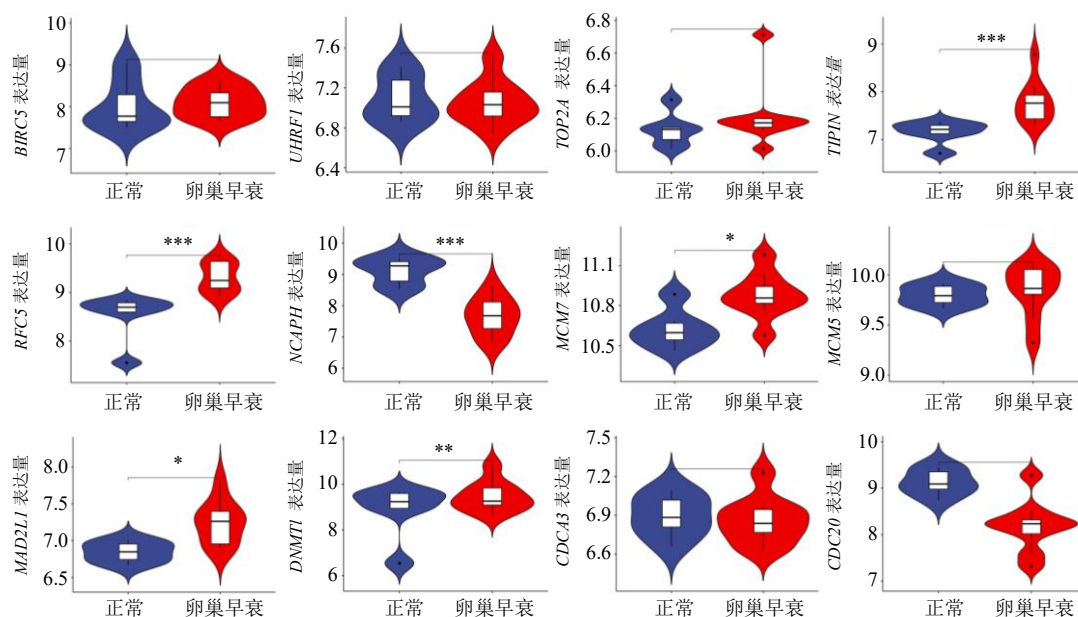


A-基于 LASSO 算法的干眼症特征基因分析; B-基于 LASSO 算法的卵巢早衰特征基因分析; C-基于 SVM-RFE 算法的干眼症特征基因分析; D-基于 SVM-RFE 算法的卵巢早衰特征基因分析; E-特征基因的 ROC 分析。

A-regression of characteristic genes using LASSO in DED; B-regression of characteristic genes using LASSO in POF; C-regression of characteristic genes using SVM-RFE in DED; D-regression of characteristic genes using SVM-RFE in POF; E-ROC analysis of characteristic genes.

图 6 机器学习法及 ROC 分析鉴定特征基因

Fig. 6 Machine learning method and ROC analysis to identify characteristics genes



* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 图 12 同。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, same as figure 12.

图 7 GSE48873 数据集验证核心基因差异表达分析

Fig. 7 Validation of differential expression analysis of core genes in GSE48873 dataset

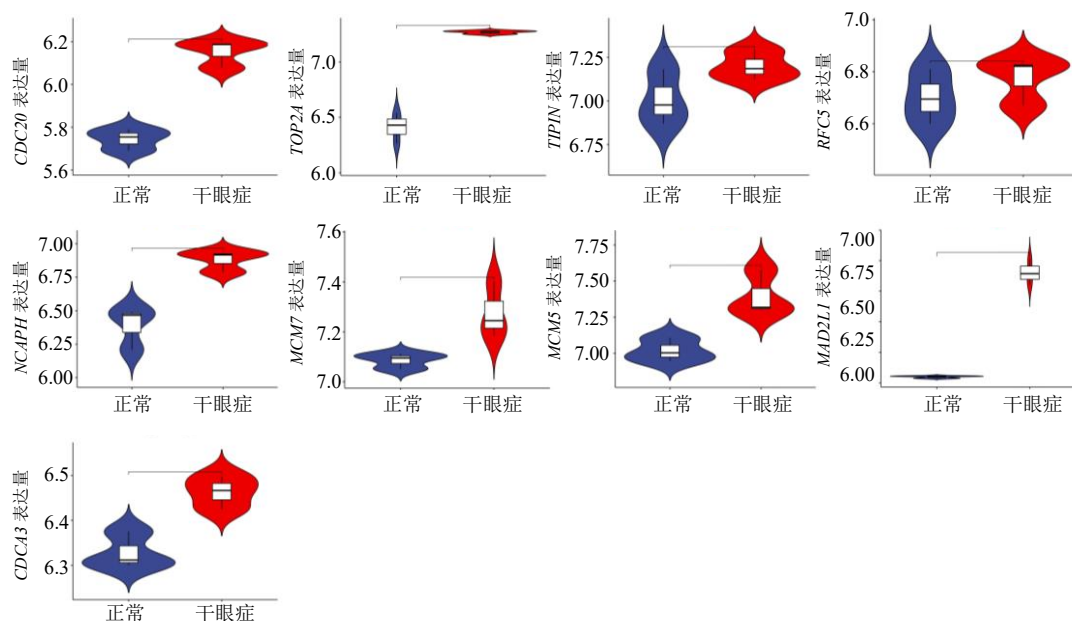


图 8 GSE171043 数据集验证核心基因的差异表达分析

Fig. 8 Validation of differential expression analysis of core genes in GSE171043 dataset

12-C); 细胞给药 48 h 后, 3.125 $\mu\text{mol/L}$ 染料木素组细胞存活率最高, 见图 12-D。因此, 后续选择 12.500 $\mu\text{mol/L}$ 染料木素对角膜上皮细胞干眼症模型干预 24 h, 进一步通过 RT-qPCR 和 Western blotting 实验验证其干预干眼症的作用机制。

3.7 RT-qPCR 及 Western blotting 检测

RT-qPCR 结果表明 (图 13), 与对照组比较, 模型组 *PLK1*、*DNMT1* 及 *MAP2K4* 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$), *CDC20* 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 染料木

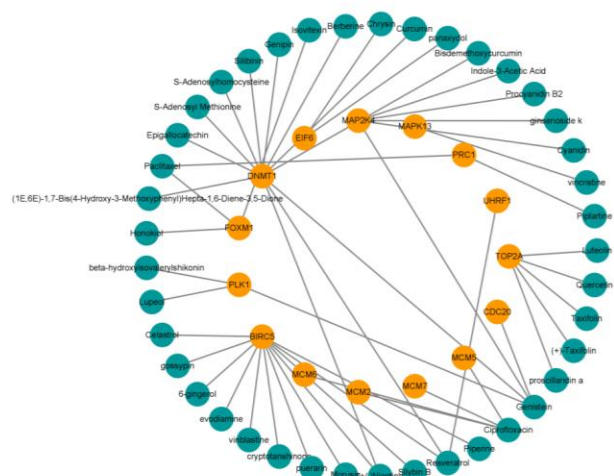


图 9 基因-天然活性成分互作网络
Fig. 9 Interaction network of gene-natural active ingredients

表 2 天然活性成分的筛选与分析

Table 2 Screening and analysis of natural active ingredients

天然活性成分	分子式	基因靶点
染料木素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	CDC20 PLK1 DNMT1 MAP2K4
白藜芦醇	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	BIRC5 DNMT1 UHRF1
(+/-)-烟碱	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	BIRC5 DNMT1

素可显著降低 *PLK1*、*DNMT1* 及 *MAP2K4* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)，显著升高 *CDC20* 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。同样，Western blotting 结果 (图 14) 表明，与对照组比较，模型组中 *PLK1*、*DNMT1* 及 *MAP2K4* 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)，*CDC20* 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，染料木素可显著降低 *PLK1*、*DNMT1* 及 *MAP2K4* 的蛋白表达，显著升高 *CDC20* 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

异病同治是中医基础理论中的经典理论，也是中医药在辨治疾病过程中的独特思路，其对于具有相同证型的不同疾病采取同样的治法，是现代中医理论科学化阐释的重要突破口^[24]。卵巢早衰与干眼症虽为不同的疾病，但是在中医理论中，其二者的发病部位以肝、肾为要，且发病病机离不开阴虚，因此在治法上大同小异，值得进一步的关注与研究。现代研究表明，干眼症的发生常常与共病相关。与卵巢功能正常的患者相比，卵巢早衰的患者的干眼症的发病率升高^[4]。然而，这 2 种疾病之间的潜在机制与相互联系并不清楚。卵巢早衰和干眼症共病的机制与基因之间的集体相互作用有待进一步探索。随着干眼症的发病率不断增加，找到一种安全、有效、方便的治疗方法非常重要。近年来，越来越多的研究表明，许多天然草药可以改善眼表疾病的症状，促进泪

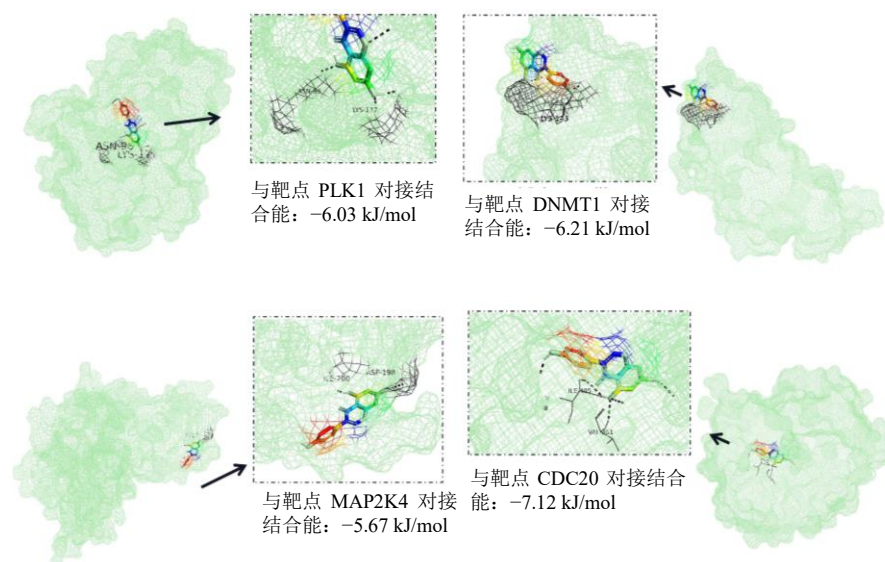


图 10 染料木素与其对应靶点的分子对接分析
Fig. 10 Molecular docking analysis of genistein and its corresponding targets

液分泌，调节角质层的结构和功能，从而改善干眼的症状^[25]。然而，寻找合适的天然草药产品仍处于初期

阶段，缺乏系统、可靠的研究方法。本研究通过从卵巢早衰角度，通过生物信息学对其二者共病模式进

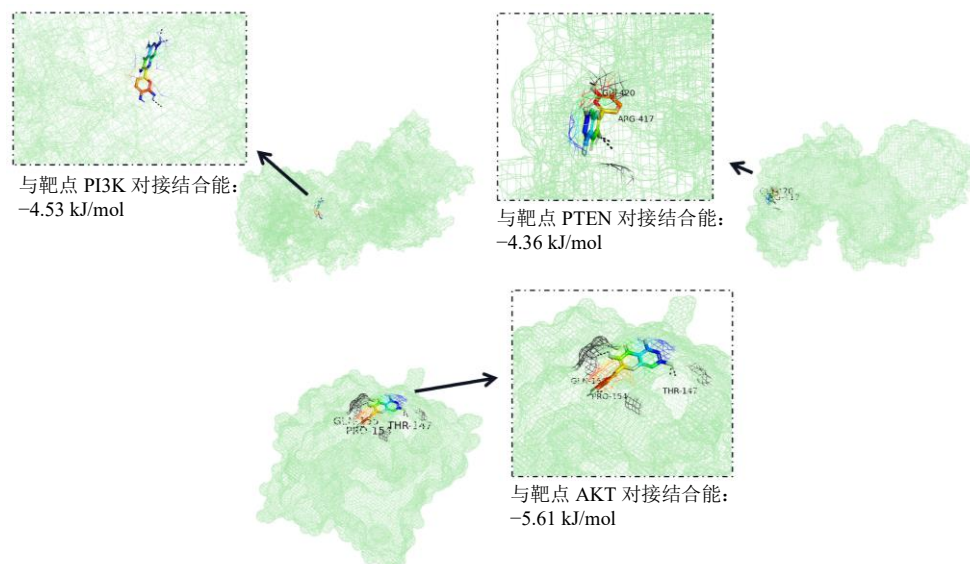


图 11 槲皮素与其对应靶点的分子对接分析

Fig. 11 Molecular docking analysis of quercetin and its corresponding targets

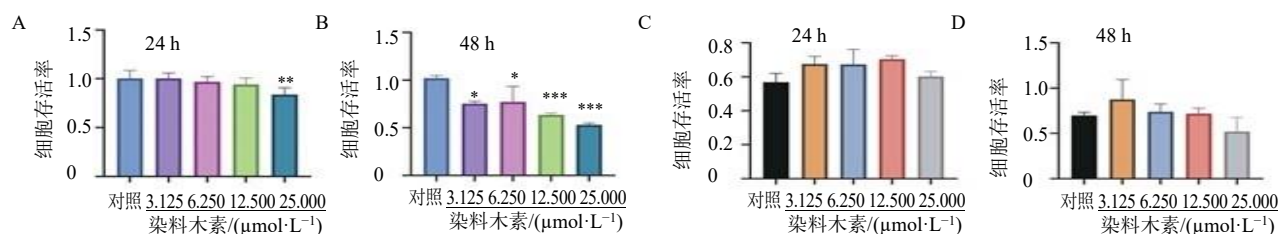
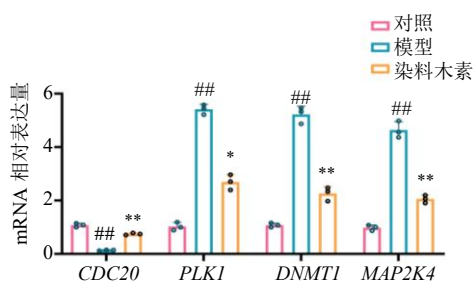


图 12 正常细胞在不同浓度染料木素干预 24 h (A) 及 48 h (B) 及角膜上皮细胞干眼症模型在不同浓度染料木素干预 24 h (C) 及 48 h (D) 的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Cell viability of normal cells treated with different concentrations of genistein for 24 h (A) and 48 h (B), and corneal epithelial cell dry eye models treated with different concentrations of genistein for 24 h (C) and 48 h (D) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

** $P < 0.01$, 图 14 同。

$P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as figure 14.

图 13 各组 *CDC20*、*PLK1*、*DNMT1* 及 *MAP2K4* 的 mRNA 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 13 mRNA relative expression of *CDC20*, *PLK1*, *DNMT1* and *MAP2K4* in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

行细致的探索, 从而促进精确靶向的干预措施的发展, 并对其靶向的天然活性成分进行挖掘, 从而为干眼症的治疗带来新的突破。

本研究发现, 卵巢早衰与干眼症的共同发病机制复杂, 主要涉及的过程包括细胞周期、DNA 修复、卵细胞减数分裂等, 而主要涉及的核心靶点包括 BIRC5、*CDC20*、*CDCA3*、*MCM5*、*TOP2A*、*UHRF1*、*MCM7*、*NCAPH*、*RFC5*、*DNMT1*、*MAD2L1*、*TIPIN*。染料木素为获得的关键活性成分, 其干预卵巢早衰干眼症的相关基因为 *CDC20*、*PLK1*、*DNMT1*、*MAP2K4*。通过实验验证发现染料木素干预角膜上皮细胞干眼症模型的机制与促进 *CDC20* 的表达以及抑制 *PLK1*、*DNMT1* 及 *MAP2K4* 的表达相关。*CDC20* 是参与细胞周期的关键角色。已有研究发现沉默 *CDC20* 的表达可激活细胞凋亡^[26], 其在细胞

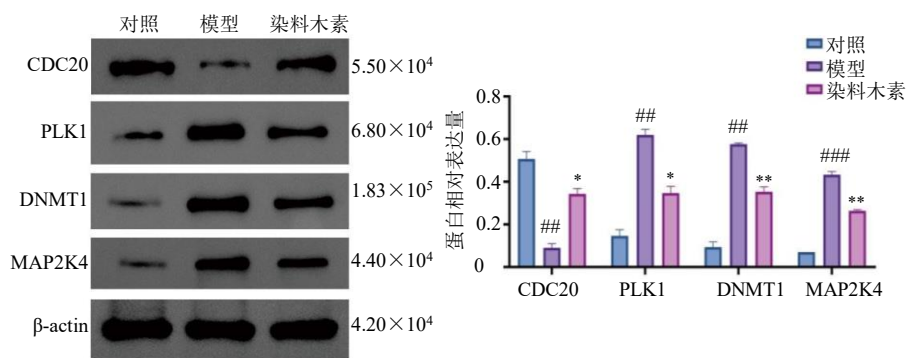


图 14 各组 CDC20、PLK1、DNMT1 及 MAP2K4 的蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 14 Protein relative expressions of CDC20, PLK1, DNMT1 and MAP2K4 in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

减数分裂发挥着重要作用,也是导致卵母细胞分裂异常的关键原因之一^[27]。也有研究发现,抑制 CDC20 的表达与细胞衰老过程相关^[28]。CDC20 也可受雌激素和孕酮的调节^[29]。同时,内源性雌激素水平对于绝经后妇女维持眼表稳态也至关重要^[30]。因此,CDC20 是女性雌激素变化导致干眼症的关键基因,其机制或与细胞凋亡相关。染料木素促进了 CDC20 的表达,减少异常的细胞凋亡进而缓解干眼的症状。PLKs 是 1 个广泛表达的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族^[31]。其中,PLK1 因其在有丝分裂中的作用而被广泛研究^[32-33]。研究发现,抑制 PLK1-CDC25c-CDK1 轴可减少白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的释放,改善干眼症^[34]。且炎症细胞因子与 CDC20 和 PLK1 的表达密切相关^[35]。这意味着二者可相互影响形成因果交替加剧干眼症的发生。另也有研究发现,抑制 PLK1 可抑制炎症性疾病模型中 NLRP3 炎性小体引发的反应^[36],其具体机制与活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 存在一定关系^[37]。DNMT1 即 DNA 甲基转移酶 1,是 DNMT 家族的主要成员,也是各种细胞类型中最丰富的 DNMT,与多种疾病有关,尤其在炎症中的机制引起了许多学者的关注。例如,DNMT1 的敲除抑制了细胞中 IL-7 和 TNF- α 的分泌表达^[38]。并且 DNMT1 的过表达促进巨噬细胞炎症的发生^[39]。程序性细胞死亡是调节细胞增殖并维持多细胞生物体发育和稳态的基本机制,而 DNMT1 在多种类型的程序性细胞死亡中发挥调节作用,包括细胞凋亡、自噬、坏死性凋亡、铁死亡等。研究表明,促进 DNMT1 的表达可介导 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 甲基化下调 Bcl-2 的表达来促

进小鼠心肌细胞损伤^[40]。其他研究表明,雌激素诱导的 DNMT1 导致日本鳗鱼卵巢卵泡中 Bcl-2 启动子甲基化,从而降低 Bcl-2 的表达^[41]。此外,DNMT1/细胞因子信号抑制物 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1) 可调节 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) /髓样分化蛋白 88 (myeloid differential protein 88, MyD88) /核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路引起细胞凋亡和炎症,也可通过 DNA 甲基化介导视网膜色素上皮细胞焦亡^[42]。在卵母细胞方面,也有研究发现 DNMT1 在协调卵母细胞发育的各个方面 (包括成熟、存活、自噬和 ROS 产生) 中发挥关键作用^[43]。MAP2K4 基因是编码丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族的成员,该家族的成员充当多种生化信号的整合点,并参与多种细胞过程,如增殖、分化、转录调控和发育。研究发现其与炎症反应和细胞凋亡相关^[44],抑制 MAP2K4 活性可导致结肠癌细胞增殖^[45],并且通过激活 MAP2K4 可介导促炎反应^[46]。染料木素是一种类黄酮类天然化合物,属于异黄酮类群,其结构与内源性雌激素相似,可以与雌激素受体 (ER α 和 ER β) 结合,尽管其亲和力低于雌二醇,也被认为是一种天然的植物雌激素,因此,染料木素可以通过雌激素受体发挥雌激素样作用^[47]。此外,染料木素还具有抗氧化和抗炎特性,调节细胞周期,并在年龄相关疾病中具有积极作用^[48]。研究发现,染料木素可减轻卵巢切除大鼠的干眼症状,其主要机制与在干眼症模型中抑制 IL-1 β 水平、触发 ER- β 和黏蛋白 5ac (mucin 5AC, MUC5AC) 表达上调有关^[49]。这都与上述分析中的染料木素干预卵巢早衰干眼症的关键基因 CDC20、PLK1、DNMT1、MAP2K4 的潜在机制不

谋而合。综上, 卵巢早衰与干眼症二者共同发病机制主要体现在炎症与细胞凋亡。这与现有研究中, 干眼症的主流发病机制相一致^[50]。染料木素通过促进 CDC20 的表达以及抑制 PLK1、DNMT1 及 MAP2K4 的表达, 减少眼表的炎症损害及异常的细胞凋亡。

本研究在异病同治的中医理论指导下, 通过复杂的生物网络从卵巢早衰角度寻找治疗干眼症的天然活性成分, 并对分析预测所获得的活性成分染料木素进行了细胞实验验证。发现卵巢早衰可与干眼症共病发生, 其发生机制涉及多靶点、多途径, 与炎症与细胞凋亡密切相关。适当浓度的染料木素可减少炎症与细胞凋亡从而达到对于卵巢早衰并发干眼症的治疗作用。目前在临床中干眼症的治疗方法较为单一, 多为人工泪液或抗炎等缓解干眼症的不适症状, 不能解决根本问题。对于卵巢早衰的女性而言, 干眼症的发生带来的眼部不适对生活质量带来了一定的影响。天然活性成分可结合滴眼外用的方法在干眼症的治疗上具有广阔的前景。本研究也存在一定的局限性, 虽基于体外实验对染料木素的干预作用进行了验证, 但对于关键基因的涉及的完整通路及生物过程的探索仍然有限, 也缺乏从体内实验的角度分析染料木素的药动学特性、生物利用度或组织渗透以及功能改善。未来可进一步丰富体外实验研究, 全面探索染料木素干预卵巢早衰干眼症的机制。本研究首次通过生物信息网络从卵巢早衰角度探讨干眼症的发生机制, 同时也科学地阐述了异病同治理论的内涵, 并通过可靠的途径分析预测治疗卵巢早衰及干眼症共病的天然活性成分, 通过体外实验进行了初步的验证。为后续的研究指明了方向, 对挖掘治疗干眼症的新药并应用于临床具有重要意义, 也为探讨中医药的科学性研究拓宽了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 《中医大辞典》编辑委员会. 简明中医辞典 (修订本) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 384.
- [2] 李娟, 徐琳, 高洋. 卵巢早衰病因机制与治疗研究进展及现状 [J]. 中国医药科学, 2021, 11(2): 58-61.
- [3] 张祁红, 李娜, 肖凤娟, 等. B 超配合金匱温经汤治疗卵巢早衰患者疗效及其生殖功能、血清雌激素的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(15): 2903-2907.
- [4] 中国干眼专家共识: 定义和分类 (2020 年) [J]. 中华眼科杂志, 2020, 56(6): 418-422.
- [5] Periman L M, Perez V L, Saban D R, et al. The immunological basis of dry eye disease and current topical treatment options [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2020, 36(3): 137-146.
- [6] Matossian C, McDonald M, Donaldson K E, et al. Dry eye disease: Consideration for women's health [J]. *J Womens Health*, 2019, 28(4): 502-514.
- [7] Jin X M, Lin Z Y, Liu Y F, et al. Hormone replacement therapy benefits meibomian gland dysfunction in perimenopausal women [J]. *Medicine*, 2016, 95(31): e4268.
- [8] Menon N G, Goyal R, Lema C, et al. Proteoglycan 4 (PRG4) expression and function in dry eye associated inflammation [J]. *Exp Eye Res*, 2021, 208: 108628.
- [9] 孙旭光. 解读国际泪膜与眼表协会 2017 年干眼专家共识中的性别及性激素与干眼 [J]. 中华眼科杂志, 2018, 54(2): 90-92.
- [10] 彭清华. 中医眼科学 [M]. 第 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 120-121.
- [11] 李群英, 曹兴伟, 李妍, 等. 一贯煎加味治疗围绝经期妇女干眼的疗效观察 [J]. 中国中医眼科杂志, 2019, 29(3): 215-218.
- [12] 叶玉枝, 王昕, 白云, 等. 中药一贯煎制剂对卵巢早衰大鼠血清中 E₂、FSH、 β -EP 水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8): 2098-2101.
- [13] 叶玉枝, 王昕, 刘明辉, 等. 一贯煎对卵巢早衰大鼠模型脂质过氧化状态的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(10): 2431-2434.
- [14] Smith J A, Vitale S, Reed G F, et al. Dry eye signs and symptoms in women with premature ovarian failure [J]. *Arch Ophthalmol*, 2004, 122(2): 151-156.
- [15] Yang L Q, Chen Y, Liu Y, et al. The role of oxidative stress and natural antioxidants in ovarian aging [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 617843.
- [16] Dogru M, Kojima T, Simsek C, et al. Potential role of oxidative stress in ocular surface inflammation and dry eye disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(14): DES163-DES168.
- [17] İlgen O, Yılmaz F, Kurt S. Protective and/or therapeutic effects of berberine in a model of premature ovarian failure induced by cyclophosphamide in rats [J]. *Turk J Obstet Gynecol*, 2023, 20(3): 227-233.
- [18] García-Catalán M R, Jerez-Olivera E, Benítez-Del-Castillo-Sánchez J M. Dry eye and quality of life [J]. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 2009, 84(9): 451-458.
- [19] Baudouin C, Liang H. Amplifying factors in ocular surface diseases: Apoptosis [J]. *Ocul Surf*, 2005, 3(4 Suppl): S194-S197.
- [20] Zhou W M, Chen A X, Ye Y J, et al. LIPUS combined with TFSC alleviates premature ovarian failure by promoting autophagy and inhibiting apoptosis [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2023, 39(1): 2258422.
- [21] Huang Y, Xia X, Li M J, et al. Quercetin inhibits hypertonicity-induced inflammatory injury in human corneal epithelial cells via the PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. *Tissue Cell*, 2024, 89: 102465.
- [22] Liu P, Jiang P, Tan K, et al. Linarine inhibits inflammatory responses in dry eye disease mice by modulating

- purinergic receptors [J]. *Front Immunol*, 2024, 15:1463767.
- [23] Liu Z, Chen D, Chen X, *et al*. Autophagy activation protects ocular surface from inflammation in a dry eye model *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 8966.
- [24] 黄竹, 张裕惠, 王慷瑶, 等. 基于生物信息学与数据挖掘探讨冠心病伴抑郁与胃癌伴抑郁“异病同治”的科学内涵 [J]. *中草药*, 2024, 55(15): 5189-5200.
- [25] Ling J W, Chan B C, Tsang M S, *et al*. Current advances in mechanisms and treatment of dry eye disease: Toward anti-inflammatory and immunomodulatory therapy and traditional Chinese medicine [J]. *Front Med*, 2022, 8: 815075.
- [26] Liu M Z, Zhang Y D, Liao Y J, *et al*. Evaluation of the antitumor efficacy of RNAi-mediated inhibition of CDC20 and heparanase in an orthotopic liver tumor model [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2015, 30(6): 233-239.
- [27] Jin F, Hamada M, Malureanu L, *et al*. Cdc20 is critical for meiosis I and fertility of female mice [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(9): e1001147.
- [28] Shin C H, Rossi M, Mazan-Mamczarz K, *et al*. Loss of HNRNPK during cell senescence linked to reduced production of CDC20 [J]. *Mol Cell Biol*, 2025, 45(3): 129-141.
- [29] Guo C J, Kong F D, Lv Y Y, *et al*. CDC20 inhibitor Apcin inhibits embryo implantation *in vivo* and *in vitro* [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(6): 810-816.
- [30] Kumar V, Sur V P, Guha R, *et al*. Estrogen modulates corneal nociception and maintains corneal homeostasis in rat eye [J]. *Cornea*, 2018, 37(4): 508-514.
- [31] Zitouni S, Nabais C, Jana S C, *et al*. Polo-like kinases: Structural variations lead to multiple functions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(7): 433-452.
- [32] Lens S M A, Voest E E, Medema R H. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(12): 825-841.
- [33] Kishi K, van Vugt M A T M, Okamoto K I, *et al*. Functional dynamics of polo-like kinase 1 at the centrosome [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(11): 3134-3150.
- [34] Zhang R F, Zou Y H, Li H, *et al*. NK1R antagonist, CP-99, 994 ameliorates dry eye disease via inhibiting the Plk1-Cdc25c-Cdk1 axis [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2025, 39(2): e70177.
- [35] Zhang J Z, Li X, Cheng W T, *et al*. Chronic carbon black nanoparticles exposure increases lung cancer risk by affecting the cell cycle via circulatory inflammation [J]. *Environ Pollut*, 2022, 305: 119293.
- [36] Baldrighi M, Doreth C, Li Y, *et al*. PLK1 inhibition dampens NLRP3 inflammasome-elicited response in inflammatory disease models [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(21): e162129.
- [37] Liu Y T, Zhang Y T, You G X, *et al*. Tangeretin attenuates acute lung injury in septic mice by inhibiting ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation via regulating PLK1/AMPK/DRP1 signaling axis [J]. *Inflamm Res*, 2024, 73(1): 47-63.
- [38] Ding J R, Jiang H B, Su B, *et al*. DNMT1/miR-130a/ZEB1 regulatory pathway affects the inflammatory response in lipopolysaccharide-induced sepsis [J]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41(5): 479-486.
- [39] Tang R Z, Zhu J J, Yang F F, *et al*. DNA methyltransferase 1 and Krüppel-like factor 4 axis regulates macrophage inflammation and atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 128: 11-24.
- [40] Zhang R, Niu Z Q, Liu J, *et al*. LncRNA SNHG1 promotes sepsis-induced myocardial injury by inhibiting Bcl-2 expression via DNMT1 [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(13): 3648-3658.
- [41] Zeng H H, Li T, He X, *et al*. Oxidative stress mediates the apoptosis and epigenetic modification of the Bcl-2 promoter via DNMT1 in a cigarette smoke-induced emphysema model [J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 229.
- [42] Li S, Zhang J Y, Ma M X, *et al*. NaAsO₂ regulates TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway through DNMT1/SOCS1 to cause apoptosis and inflammation in hepatic BRL-3A cells [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2024, 202(1): 258-267.
- [43] Xi X T, Wang M, Chen Q B, *et al*. DNMT1 regulates miR-20a/TXNIP-mediated pyroptosis of retinal pigment epithelial cells through DNA methylation [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2023, 577: 112012.
- [44] Uysal F, Sukur G, Bozdemir N, *et al*. Unveiling the impact of DNA methylation machinery: Dnmt1 and Dnmt3a in orchestrating oocyte development and cellular homeostasis [J]. *Genesis*, 2024, 62(1): e23579.
- [45] Malovic E, Ealy A, Miller C, *et al*. Epitranscriptomic reader YTHDF2 regulates SEK1(MAP2K4)-JNK-cJUN inflammatory signaling in astrocytes during neurotoxic stress [J]. *iScience*, 2024, 27(9): 110619.
- [46] Lu J, Zhou N N, Yang P, *et al*. microRNA-27a-3p downregulation inhibits inflammatory response and hippocampal neuronal cell apoptosis by upregulating mitogen-activated protein kinase 4 (MAP2K4) expression in epilepsy: *In vivo* and *in vitro* studies [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 8499-8508.
- [47] Guelfi G, Pasquariello R, Anipchenko P, *et al*. The role of genistein in mammalian reproduction [J]. *Molecules*, 2023, 28(21): 7436.
- [48] Mas-Bargues C, Borrás C, Viña J. Genistein, a tool for geroscience [J]. *Mech Ageing Dev*, 2022, 204: 111665.
- [49] Aldina R, Sujuti H, Permatasari N, *et al*. The effects of genistein on estrogen receptor-β, IL-1β levels, and MUC5AC expression in ovariectomized rats with dry eye [J]. *Clin Nutr Exp*, 2019, 27: 21-28.
- [50] Yeh S, Song X J, Farley W, *et al*. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(1): 124-129.

[责任编辑 潘明佳]