

## • 数据挖掘与循证医学 •

## 基于数据挖掘、网络药理学与体外实验的中药治疗闭角型青光眼用药规律及作用机制探究

李钊铭<sup>1</sup>, 刘依诺<sup>1</sup>, 曹诗美<sup>1</sup>, 钟溢源<sup>1</sup>, 李晓钊<sup>2,4</sup>, 肖晓燕<sup>3</sup>, 胡珊<sup>2,4</sup>, 熊天琴<sup>1\*</sup>, 翟楠<sup>2,4</sup>

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510000

2. 中山市中医院, 广东 中山 528400

3. 广州中医药大学护理学院, 广东 广州 510000

4. 广州中医药大学第十临床医学院, 广东 中山 528400

**摘要:** **目的** 探究治疗闭角型青光眼中药的特点、用药规律和作用机制。**方法** 检索中国知网、万方、维普、中国生物医学文献数据库及古今医案云平台收录的有关中药治疗闭角型青光眼的文献和处方, 通过数据挖掘分析确定核心处方; 采用网络药理学, 利用 TCMSp 与 BATMAN-TCM 2.0 数据库筛选口服生物利用度 $\geq 30\%$ 且类药性 $\geq 0.18$ 的活性成分, 经 UniProt 数据库统一注释靶点, 并与 GeneCards、TTD、OMIM、CTD 4 大数据库整合去重获得的疾病靶点取交集, 得到药效靶点, 在 Cytoscape 3.10.2 中构建“核心处方-活性成分-药效靶点”互作网络。随后将药效靶点导入 Metascape 平台(限定人类物种, 以  $P < 0.05$  为阈值)进行基因本体(gene ontology, GO)(生物过程、分子功能、细胞组分)及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析, 并可视化前 20 条显著通路及功能; 同时利用 String 数据库构建蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络, 通过 Cytoscape MCODE 插件(cut-off=0.05)筛选核心靶点, 以解析核心处方治疗闭角型青光眼的潜在分子机制。通过分子对接考察活性成分与核心靶点的结合能。采用连二亚硫酸钠诱导建立小鼠视网膜神经节细胞 RGC 缺氧损伤模型, 运用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术检测上述活性成分对核心靶点 mRNA 表达的影响; 使用 ELISA 法检测上述活性成分对肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平的影响; 使用免疫荧光检测上述活性成分对磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT)、核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 蛋白水平的影响。**结果** 闭角型青光眼使用频数排名前 3 位的中药为茯苓、当归、柴胡, 核心证候以肝郁气滞与肝肾两虚为主, 核心处方为牡丹皮-当归-栀子-柴胡-菊花-白术-甘草-白芍-茯苓; 聚类分析得到 3 个聚类簇, 分别为柴胡疏肝散加减、益精补阳还五汤加减及杞菊地黄丸加减。网络药理学分析表明, 核心处方主要通过调控 TNF、磷脂酰肌醇-3-羟激酶(phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)-AKT、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等信号通路, 作用于 AKT1、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 等关键靶点, 参与炎症反应、氧化应激等生物学过程, 从而干预青光眼病理进程。通过分子对接确定槲皮素和木犀草素为核心处方干预闭角型青光眼的核心成分, 并进行体外实验验证。结果显示, 木犀草素各剂量(5、10、20  $\mu$ mol/L)组均可上调 AKT1 mRNA 表达( $P < 0.01$ ), 中、高剂量组可下调 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  mRNA 表达( $P < 0.05$ ), 并显著升高 p-AKT 蛋白表达, 降低 NF- $\kappa$ B 蛋白及 TNF- $\alpha$  水平( $P < 0.05$ ); 槲皮素中、高剂量(40、80  $\mu$ mol/L)组能显著上调 AKT1 mRNA 表达, 下调 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  mRNA 表达( $P < 0.05$ ), 低(20  $\mu$ mol/L)、中、高剂量组均可升高 p-AKT 蛋白表达, 降低 NF- $\kappa$ B 蛋白表达( $P < 0.05$ ), 中、高剂量组可显著降低 TNF- $\alpha$  水平( $P < 0.05$ )。**结论** 运用数据挖掘技术系统梳理古今治疗闭角型青光眼的文献与医案, 从用药频次、性味归经、功效类别、关联规则及核心组合等维度, 层层解析“高频-核心-差异”三维特征, 提炼核心方剂并揭示其配伍规律。网络药理学分析进一步证实核心方剂通过“多成分-多靶点-多通路”协同调控氧化应激、炎症反应及细胞凋亡等关键生物过程, 体现中药复方整体调节的治疗优势, 为临床辨证用药提供了科学依据, 具有一定的指导意义。体外实验证实, 在缺氧损伤模型中, 木犀草素和槲皮素能上调 AKT1 mRNA 及 p-AKT 蛋白表达, 抑制 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  mRNA 及蛋白表达, 有效降低炎症及细胞凋亡相关因子水平, 通过“抑炎-促存活”的双向机制对 RGC 细胞发挥保护作用。

**关键词:** 闭角型青光眼; 数据挖掘; 网络药理学; 用药规律; 核心处方; 丹皮-当归-栀子-柴胡-菊花-白术-甘草-白芍-茯苓; 槲皮素; 木犀草素

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)13-5148-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.13.018

收稿日期: 2026-02-03

项目基金: 中山市中医药传承创新发展科研专项(2024B3014)

作者简介: 李钊铭, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: 3272367142@qq.com

\*通信作者: 熊天琴, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中药药理。Tel: 18818578078 E-mail: 2390983574@qq.com

## Exploration of medication patterns and mechanisms of traditional Chinese medicine in treatment of angle-closure glaucoma based on data mining, network pharmacology, and *in vitro* experiment

LI Zhaoming<sup>1</sup>, LIU Yinuo<sup>1</sup>, CAO Shimei<sup>1</sup>, ZHONG Yiyuan<sup>1</sup>, LI Xiaochuan<sup>2, 4</sup>, XIAO Xiaoyan<sup>3</sup>, HU Shan<sup>2, 4</sup>, XIONG Tianqin<sup>1</sup>, ZHAI Nan<sup>2, 4</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

2. Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China

3. School of Nursing, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

4. The Tenth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China

**Abstract: Objective** To explore the characteristics, medication patterns, and the mechanisms of action of traditional Chinese medicines for treating angle-closure glaucoma. **Methods** Literature and prescriptions related to the treatment of angle-closure glaucoma with traditional Chinese medicine were retrieved from databases including CNKI, Wanfang, VIP, China Biology Medicine (CBM), and the Ancient and Modern Medical Case Cloud Platform. Through data mining and analysis, core prescriptions were identified. Subsequently, a network pharmacology approach was employed. Active ingredients with oral bioavailability (OB)  $\geq 30\%$  and drug-likeness (DL)  $\geq 0.18$  were screened using the TCMSP and BATMAN-TCM 2.0 databases. Targets were uniformly annotated via the UniProt database and intersected with disease targets obtained by integrating and deduplicating data from four major databases (GeneCards, TTD, OMIM, and CTD) to identify pharmacodynamic targets. A “core prescription-active ingredient-pharmacodynamic target” interaction network was constructed using Cytoscape 3.10.2. The pharmacodynamic targets were then imported into the Metascape platform (restricted to human species, with a threshold of  $P < 0.05$ ) for gene ontology (GO) (biological process, molecular function, cellular component) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, with the top 20 significant pathways and functions visualized. Additionally, a protein-protein interaction (PPI) network was constructed using the String database, and core targets were screened using the Cytoscape MCODE plugin (cut-off = 0.05) to elucidate the potential molecular mechanisms underlying the core prescriptions in treating angle-closure glaucoma. The binding energy between the active ingredient and the core target was investigated through molecular docking. Sodium dithionite was used to induce hypoxic injury in mouse retinal ganglion cells (RGCs) to establish an *in vitro* model. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed to detect the effects of these active components on mRNA expression of core target genes. ELISA was used to measure the impact of these active components on tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels. Immunofluorescence staining was applied to evaluate the effects of these active components on phosphorylated protein kinase B (p-AKT) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) protein expression. **Results** The top three most frequently used traditional Chinese medicines for angle-closure glaucoma were Fuling (*Poria*), Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*), and Chaihu (*Bupleuri Radix*). The core syndromes were mainly liver qi stagnation and liver-kidney deficiency. A core prescription consisted of Mudanpi (*Moutan Cortex*)-*Angelicae Sinensis Radix*-Zhizi (*Gardeniae Fructus*)-*Bupleuri Radix*-Juhua (*Chrysanthemi Flos*)-Baizhu (*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*)-Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*)-Baishao (*Paeoniae Radix Alba*)-*Poria*. Cluster analysis yielded three clusters: modified Chaihu Shugan San (柴胡疏肝散), modified Yijing Buyang Huanwu Decoction (益精补阳还五汤), modified Qiju Dihuang Pills (杞菊地黄丸). Network pharmacology analysis showed that the core prescription regulated key targets such as AKT1, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B by modulating signalling pathways such as TNF, phosphatidylinositol-3-hydroxykinase (PI3K)-Akt, and MAPK (mitogen-activated protein kinase), thereby participating in biological processes such as inflammatory response, and oxidative stress, and thus intervening in the pathological process of glaucoma. Quercetin and luteolin were identified as the core components of the core prescription for the intervention of angle-closure glaucoma through molecular docking, and *in vitro* experiments were conducted for verification. The results showed that all luteolin dose groups (5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$ ) upregulated AKT1 mRNA expression ( $P < 0.01$ ), while the medium and high dose groups downregulated NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  mRNA expression ( $P < 0.05$ ), significantly increased p-AKT protein expression, and decreased NF- $\kappa$ B protein and TNF- $\alpha$  levels ( $P < 0.05$ ). The medium and high dose groups of quercetin (40, 80  $\mu\text{mol/L}$ ) also significantly upregulated AKT1 mRNA expression and downregulated NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  mRNA expression ( $P < 0.05$ ). All low (20  $\mu\text{mol/L}$ ), medium, and high dose groups of quercetin increased p-AKT protein expression and decreased NF- $\kappa$ B protein expression ( $P < 0.05$ ), while the medium and high dose groups significantly reduced TNF- $\alpha$  expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Data mining techniques were systematically employed to analyze

ancient and modern literature and medical records concerning the treatment of angle-closure glaucoma. From multiple dimensions including medication frequency, nature-flavor-meridian tropism, efficacy categories, association rules, and core combinations, the “high-frequency-core-differential” three-dimensional characteristics were progressively analyzed to extract core prescriptions and reveal their compatibility patterns. Network pharmacology analysis further confirmed that the above high-frequency prescriptions synergistically regulate key biological processes such as oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis through a “multi-component-multi-target-multi-pathway” mechanism, reflecting the holistic therapeutic advantages of traditional Chinese medicine compound formulas, thereby providing scientific evidence for clinical syndrome differentiation and medication, with certain guiding significance. *In vitro* experiments simultaneously validated that, in the hypoxic injury model, both luteolin and quercetin significantly upregulated AKT1 mRNA and p-AKT protein expression, inhibited NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  mRNA and protein expression, effectively reduced levels of inflammation and apoptosis-related factors, and exerted protective effects on RGCs through a bidirectional mechanism of “anti-inflammatory and pro-survival” effects.

**Key words:** angle-closure glaucoma; data mining; network pharmacology; medication patterns; core prescription; *Moutan Cortex-Angelicae Sinensis Radix-Gardeniae Fructus-Bupleuri Radix-Chrysanthemi Flos-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-PAeoniae Radix Alba-Poria*; quercetin; luteolin

青光眼是全球范围内主要的不可逆致盲眼病，严重损害患者的视力和生活质量。随着人口老龄化进程加速，其发病率持续上升，已成为重大的公共卫生问题<sup>[1-3]</sup>。因此，探索有效的青光眼防治药物具有重要的临床与科研价值。

根据前房角解剖结构的不同，原发性青光眼在临床上主要分为开角型和闭角型 2 种类型<sup>[4]</sup>。目前，临床治疗以控制眼压为主要手段，包括药物和手术。然而，研究显示部分患者即使眼压控制在正常范围内，仍可能出现进行性视野缺损和视神经损伤<sup>[5]</sup>。据统计，15%~46%的患者在眼压控制良好的情况下，仍可能在 10~20 年内逐渐失明。因此，探寻眼压之外的可干预因素对于改善青光眼预后具有重要意义。

近年来临床与药理研究逐步证实，中医药在青光眼的防治中具有独特优势和确切疗效<sup>[6]</sup>。中医药通过活血化瘀、益气养血等治法，不仅能改善眼部微循环，还能发挥神经保护作用。在中医理论中，青光眼归属“五风内障”范畴，现代中医眼科学进一步将其分为“绿风内障”与“青风内障”，分别对应急性闭角型青光眼和原发性开角型青光眼。已有较多临床研究支持中药在青光眼治疗中的积极作用，并初步总结了相关证候分布与用药规律<sup>[7-9]</sup>，但目前多集中于整体辨证，缺乏针对单一类型青光眼的深入系统分析。

本研究聚焦于闭角型青光眼，系统收集相关中药文献与临床医案，运用数据挖掘、网络药理学及体外实验等方法，系统揭示其用药规律与作用机制，重点验证中药复方在抗氧化及神经保护方面的作用，为临床复方新药研发提供精准依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料来源

系统检索 2000 年 1 月—2024 年 12 月中国知网 (CNKI)、万方数据库 (WangFang)、维普数据库 (VIP) 及中国生物医学文献数据库 (SinoMed) 及古今医案云平台收录的文献，以“青光眼”或“绿风内障”为疾病检索词，联合“中医”“中药”“中草药”“中西医”“治疗”等干预措施相关术语进行主题词或关键词组合检索。以知网为例，在“专业检索”处，设定检索式为  $SU\%=(\text{原发性青光眼}+\text{青光眼}+\text{继发性青光眼}+\text{先天性青光眼}+\text{绿内障})$  AND  $SU\%=(\text{中医}+\text{中药}+\text{中草药}+\text{中西医})$  AND  $SU\%=\text{治疗}$ 。其余 3 个数据库采用相同的逻辑关系和检索词进行检索，汇总文献信息于文献管理软件 Endnote X9，去除重复文献，并人工筛选保留疾病类型为“闭角型青光眼”的文献。

### 1.2 纳入标准

①研究对象为经明确诊断符合青光眼 (包括各临床分型及病程阶段) 的临床病例；②干预措施为中药内服汤剂，且处方组成、剂量等信息记录完整；③研究结果具有明确的疗效评价，且数据前后逻辑一致；④研究类型包括临床病例报告、随机对照试验、双盲试验及名家经验医案 (后者需包含完整的诊疗过程记录)。

### 1.3 排除标准

①重复发表文献、综述类文章、动物实验研究、无临床案例的纯理论探讨及生物信息学研究；②联合使用中医外治法或西医疗法，但无法单独评估中药疗效的研究；③处方组成高度相似 (差异仅 1~2

味药物),且未明确说明其证候适应性的研究;④研究方法与结果讨论中存在药物名称不一致的文献。

#### 1.4 数据录入以及规范

将文献名、处方名、药材名录入 Excel 2019 进行数据汇总。对于处方的适应证,若文献中明确记载某处方对应特定证候,则直接录入;若为随机对照试验文献中描述患者存在的多种证候,则仅录入前 2 个证候,以简化研究复杂度。药名及性味归经参照《中国药典》2020 年版<sup>[10]</sup>及《中华本草》<sup>[11]</sup>进行规范,如“田七”规范为“三七”、“淮山”规范为“山药”等;药材功效参照《中药学》第 3 版<sup>[12]</sup>进行分类归纳。证候名称依据《中医临床诊疗术语第 2 部分:证候》<sup>[13]</sup>统一规范,如将“阴虚燥热证”规范为“阴虚热盛证”;若某证候出现频次过低,则规范为其上位证候,如将“心脾两虚证”归为“脏腑相兼证”。

#### 1.5 中药数据分析

**1.5.1 频次、频率、性味归经、功效的描述性分析** 按闭角型青光眼汇总处方中药以及每种中药的出现频数;每种中药的性味归经、功效乘以对应中药的出现频数后进行汇总统计;使用 Origin 2024 将药性、药味、归经、功效制成表并绘制雷达图进行可视化。

**1.5.2 聚类分析** 使用 SPSS Statistics 26.0 对治疗闭角型青光眼高频中药处方数据进行聚类分析,设置聚类方法为组间平均距离法,测量方法为二元杰卡德法,得到核心药物组合。

**1.5.3 关联规则分析** 设置频次 > 10 的中药为高频药物,运用 SPSS Modeler 18.0 进行二项、三项关联规则分析(置信度 90%、支持度 10、最大前项数 2),构建药物共现网络并可视化呈现。

#### 1.6 证候分析

统计各证候出现频率,采用 Cytoscape 3.10.2 软件构建“中药-证候”共现网络,揭示核心药物与证候的关联模式。

#### 1.7 核心处方筛选

鉴于本研究关联分析结果较多,为从众多关联分析结果中筛选出精炼、核心的处方,依据关联规则结果进行筛选。具体方法:先将关联规则分析所得全部药对转化为中药共现网络,再使用 Cytoscape 3.10.2 的 MCODE 插件(设置参数为默认参数,degree cutoff = 2, node score cutoff = 0.2, K-core = 2, max.depth = 100)进行聚类分析,提取网络中的核心

子网络,子网络所包含的中药即构成初步的核心处方。这一方法兼顾了单味中药的高频出现与中药组合的强关联性。最后,进一步运用拓扑学聚类方法对提取出的处方进行优化筛选,以保证最终所得核心处方具有良好的代表性。

#### 1.8 核心处方的网络药理学分析

**1.8.1 核心处方-活性成分-药效靶点网络构建** 设置口服生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$  和类药性(drug-like properties, DL)  $\geq 0.18$  作为筛选条件,在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)检索核心处方中每味药材的活性成分。对于 TCMSP 未收录的中药,采用 BATMAN-TCM2.0 数据库进行补充检索。活性成分的作用靶点通过 Uiprot 数据库进行注释。闭角型青光眼的疾病靶点从 GeneCards、Therapeutic Target Database、OMIM、CTD 数据库中检索获得,汇总后去除重复值。将药材活性成分的作用靶点与疾病靶点取交集,得到核心处方的药效靶点。最后将药材、活性成分及药效靶点导入到 Cytoscape 3.10.2 绘制核心处方-活性成分-药效靶点网络图,根据网络图中的节点的度(dgree)值进行排序,度值排名前 5 的成分为核心成分。

**1.8.2 基因本体(gene ontology, GO)功能及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析** 将核心处方的药效靶点提交至 Metascape 网站(<https://metascape.Org>),设置物种为“人类”,进行 KEGG 通路富集分析及 GO 功能分析,其中 GO 分析涵盖生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)与细胞组成(cell component, CC) 3 部分。结果以  $P < 0.05$  为具有统计学意义的标准。按  $P$  值排序后,取排名前 20 的条目进行可视化,以此阐释核心处方治疗闭角型青光眼的潜在作用通路。

**1.8.3 蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络核心靶点筛选** 将闭角型青光眼核心处方的药效靶点导入 String 数据库(<https://string-db.org/>, 版本 12.0),设定物种为“人类”生成 PPI 网络,再使用 Cytoscape 3.10.2 的 MCODE 插件(2.0.3),设置参数 cut-off 为 0.05 筛选核心靶点。

**1.8.4 分子对接验证核心处方与关键靶点作用** 将网络药理学确定的核心活性成分与关键靶点进行分子对接验证。在 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)获取核心活性成分的三

维结构文件 (SDF 格式)。在 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 下载关键靶点的三维晶体结构文件, 包括蛋白激酶 B1 (protein kinase B1, AKT1, PDB ID: 1H10, X 射线衍射, 分辨率 1.40 Å, 1 Å=0.1 nm)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , PDB ID: 2AZ5, X 射线衍射, 分辨率 2.10 Å) 和核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, PDB ID: 1SVC, X 射线衍射, 分辨率 2.60 Å), 上述结构均来自于人 (*Homo sapiens*), 具有良好的结构完整性可满足分子对接需求。

使用 MGLTools 软件对小分子配体进行预处理, 包括添加氢原子、计算 Gasteiger 电荷及能量最小化, 并保存为 pdbqt 格式; 对靶点蛋白进行去除结晶水、添加极性氢原子、计算 Gasteiger 电荷等预处理, 同样保存为 pdbqt 格式。分子对接采用 AutoDock Vina 软件完成。为全面、无偏地探索配体在受体蛋白上的潜在结合位点, 对接口袋采用全蛋白盲对接策略, 网格盒覆盖整个受体蛋白结构。为保证大空间范围内构象搜索的充分性与结果的可重复性, 将构象搜索深度 (exhaustiveness) 设置为 32, 最大能量差异 (energy\_range) 设为 3 kcal/mol (1 kcal=4.2 kJ), 每个对接任务输出 9 个最优结合构象 (num\_modes = 9)。最终选取结合自由能 (binding affinity) 最低的构象作为最优对接结果, 并使用 PyMOL 软件对对接结果进行可视化分析, 展示配体与受体之间的关键相互作用。

## 1.9 体外实验

**1.9.1 材料** 小鼠视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 购自亿奥邦北京生物科技研究有限公司。

槲皮素、木犀草素、连二亚硫酸钠均购自上海麦克林生化科技股份有限公司 (批号分别为 C17507821、C14479709、C17034145), 质量分数分别为 99.664%、98.736%、90.000%。胰蛋白酶、RGC 专用完全培养基 (亿奥邦北京生物科技研究有限公司)。CCK8 检测试剂盒 (美国 APEX BIO Technology LLC 公司), 2 × SYBR Green qPCR Premix (Universal) 通用型荧光定量试剂盒、反转录试剂盒 (广州欣凯莱生物技术有限公司), RNA 离心柱式提取试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司), TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司), HRP 标记山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 二抗、山羊抗小鼠 Cy3 二抗 (上海沃登生物科技有限公司), 磷酸化 AKT

(phosphorylated AKT, p-AKT) 抗体、NF- $\kappa$ B 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司)。

**1.9.2 分组及给药** RGC 采用 RGC 专用完全培养基置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养。取对数生长期的细胞, 加入连二亚硫酸钠, 置于培养箱中培养 24 h。分别以 DMSO 为溶剂, 配制终浓度均为 80 mmol/L 的木犀草素和槲皮素母液。实验分为对照组、缺氧模型组以及木犀草素低、中、高剂量组和槲皮素低、中、高剂量组。除对照组外, 其余各组进行缺氧损伤模型的制备。

**1.9.3 CCK-8 法筛选 RGC 缺氧损伤模型最佳造模条件及单体成分最佳干预浓度** 将 RGC 细胞按 1 × 10<sup>4</sup> 个/孔接种于 96 孔板, 培养 12 h 后, 造模筛选组加入 (0.5、1、2、4、8 mmol/L) 连二亚硫酸钠建立缺氧模型并处理 24 h, 单体成分筛选组分别加入 2.5、5、10、20、40、80、160 μmol/L 木犀草素和槲皮素处理 24 h; 随后吸去培养基, 每孔加入含 10% CCK-8 溶液的基础培养基孵育 4 h, 同时设置空白组 (不加细胞和药物) 和对照组 (不加药物), 于酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度 (*A*), 计算细胞存活率。

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

**1.9.4 qRT-PCR 法检测核心靶点在 RGC 细胞中的 mRNA 表达水平** 取处于对数期的 RGC 细胞, 按“1.9.2”项下分组及培养干预。收集各组细胞, 提取总 RNA, 根据逆转录试剂盒说明书步骤反转录为 cDNA。按照通用型荧光定量试剂盒说明书步骤进行 qRT-PCR 检测, 扩增条件: 95 °C、30 s, 95 °C、10 s, 60 °C、30 s, 共 40 个循环。以磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参基因, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算目的基因的相对表达水平。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

**1.9.5 ELISA 检测 TNF- $\alpha$  水平** 取处于对数期的 RGC 细胞, 按“1.9.2”项下分组及培养干预。收集各组细胞。1 000 × *g* 离心 20 min, 取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- $\alpha$  水平。

**1.9.6 免疫荧光法检测 NF- $\kappa$ B、p-AKT 蛋白表达水平** 各组细胞分别经新鲜二甲苯脱蜡水合、微波修复抗原、灭活内源性过氧化物酶、5%牛血清白蛋白封闭 30 min, 依次进行 NF- $\kappa$ B 和 p-AKT 免疫荧光双染, 加入 NF- $\kappa$ B 一抗 (1 : 200) 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗后加入 HRP 标记二抗室温孵育 50 min, PBS 清

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
<i>NF-κB</i>	CCCAGGAGTGTTACAGACC	GAGACATGGACACACCCTGG
<i>TNF-α</i>	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	AAGGTACAACCCATCGGCTG
<i>AKT1</i>	CGCTTCTATGGTGCGGAGAT	GTTCTCCAGCTTCAGGTCCC
<i>GAPDH</i>	TGATGGGTGTGAACCACGAG	AGTGATGGCATGGACTGTGG

洗后加入 TSA 荧光染料工作液室温避光孵育 10 min; 微波处理去除已结合的一抗、二抗后, 再经 5%牛血清白蛋白封闭 30 min, 加入 p-AKT 一抗 (1:200) 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗后加入 HRP 标记二抗室温孵育 50 min, PBS 清洗后加入 TSA 荧光染料工作液室温避光孵育 10 min; 微波处理去除已结合的一抗、二抗后, 加入 DAPI 染色液室温避光孵育 10 min, 滴加增强型抗淬灭封片剂封片, 于荧光成像设备下采集图像, 以相对荧光强度值评估蛋白表达量。

**1.9.7 统计学方法** 运用 Graphpad prism 8.0 软件进行统计分析, 所有实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 中药频次统计**

共收集到符合标准的青光眼文献 114 篇, 其中闭角型青光眼文献 41 篇。纳入中药 93 种, 出现频数排名前 10 的中药为茯苓、当归、柴胡、丹皮、泽泻、栀子、丹参、红花、菊花、川芎, 中药出现频次统计见表 2。

表 2 治疗闭角型青光眼的中药频次

Table 2 Frequency of traditional Chinese medicines (TCMs) in treatment of angle-closure glaucoma

中药	频次	中药	频次
茯苓	25	甘草	11
当归	24	白术	10
柴胡	16	葛根	10
丹皮	16	黄芪	10
泽泻	14	白芍	9
栀子	13	车前子	9
丹参	12	生地黄	9
红花	12	枸杞子	7
菊花	12	黄芩	7
川芎	11	山茱萸	6

**2.2 中药性味归经、功效的描述性分析**

对纳入文献的中药性味归经及功效进行了频次分析。结果显示治疗闭角型青光眼的中药药性总频次为 389 次, 以寒性药为主, 温性药次之; 药味总频次为 561 次, 以甘味为主, 苦味次之; 归经总频次为 996 次, 以肝经为主, 肺经次之 (图 1)。在功效分布方面, 主要涉及 16 种功效, 以补虚药为主, 清热药次之 (表 3)。

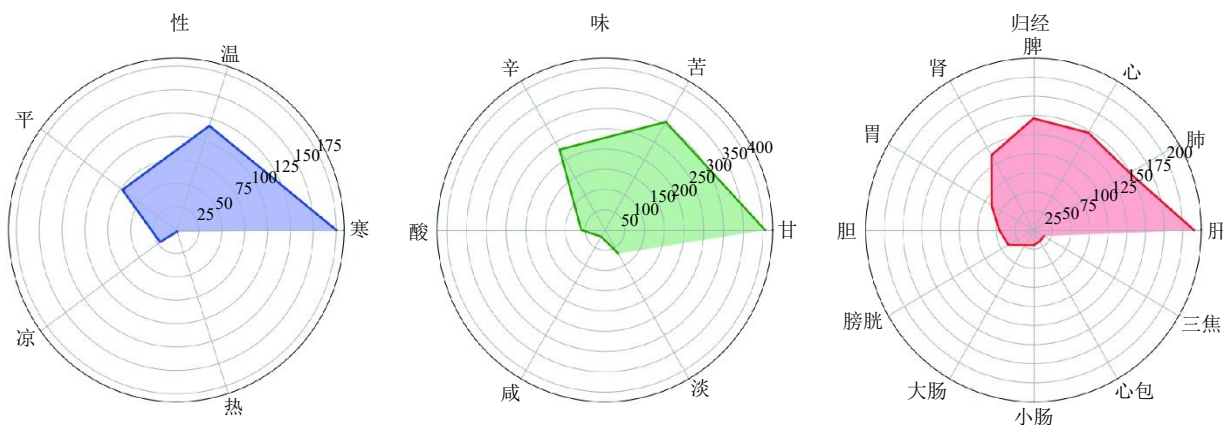


图 1 治疗闭角型青光眼中药的性味归经频次统计雷达图

Fig. 1 Radar chart of frequency statistics on properties, flavors and meridian tropisms of TCMs in treatment of angle-closure glaucoma

表3 闭角型青光眼用药功效分布

Table 3 Efficacy distribution of medications for angle-closure glaucoma

功效分类	频次	频率/%
补虚药	96	24.68
清热药	67	17.22
利水渗湿药	58	14.91
解表药	57	14.65
活血化瘀药	41	10.54
平肝息风药	13	3.34
化痰止咳平喘药	11	2.83
泻下药	9	2.31
止血药	9	2.31
开窍药	8	2.06
理气药	6	1.54
收涩药	6	1.54
安神药	3	0.77
温里药	2	0.51
止咳平喘药	2	0.51
驱虫药	1	0.26
总计	389	100.00

### 2.3 关联规则分析

使用 SPSS 软件的关联规则分析模块, 设置最大前项目数为 2, 最小支持度为 10%, 最小置信度为 90%, 对治疗闭角型青光眼的高频中药进行数据挖掘, 最后得到 120 对高频出现的药物组合, 高频药对包含含茯苓→枸杞子-丹皮、泽泻→熟地黄-菊花、泽泻→熟地黄-山茱萸等, 见表 4 和图 2。

### 2.4 聚类分析

聚类分析得到 3 个聚类簇, 具体包括柴胡-栀子-当归-牡丹皮-茯苓-白术-甘草、川芎-葛根-红花-丹参-黄芪、泽泻-菊花, 主要功效为疏肝解郁、活血通络、健脾益气等, 聚类结果见图 3 和表 5。

### 2.5 证候分析

经统计, 闭角型青光眼涉及 11 种证候, 总频次为 31, 排名前 4 的证候分别是肝郁气滞证 (35.48%)、肝肾两虚证 (16.13%)、肝火上炎证 (16.13%)、气血失调证 (9.68%), 见表 6。将高频中药处方数据及对应的证候数据转化为列间边权值矩阵, 边权值为共现次数; 再导入到 Cytoscape 软件中, 并设置节点连线粗细随边权值增大而增大, 见图 4。

### 2.6 核心处方筛选

将关联规则分析得到 120 个高频药物组合转化

表4 闭角型青光眼的高频中药关联规则分析 (top 20)

Table 4 Association rule analysis of high-frequency TCMs for angle closure glaucoma (top 20)

后项→前项	支持度/%	置信度/%	频次
茯苓→枸杞子-牡丹皮	16.22	100	12
牡丹皮→枸杞子-茯苓	16.22	100	12
泽泻→熟地黄-菊花	14.86	100	11
泽泻→熟地黄-茯苓	14.86	100	11
牡丹皮→熟地黄-茯苓	14.86	100	11
牡丹皮→山茱萸-泽泻	14.86	100	11
茯苓→山茱萸-丹皮	14.86	100	11
牡丹皮→熟地黄-山茱萸	13.51	100	10
茯苓→熟地黄-山茱萸	13.51	100	10
茯苓→山茱萸-当归	13.51	100	10
牡丹皮→熟地黄	12.16	100	9
茯苓→熟地黄	12.16	100	9
当归→柴胡	12.16	100	9
泽泻→熟地黄-山茱萸	12.16	100	9
熟地黄→山茱萸-泽泻	12.16	100	9
茯苓→熟地黄-牡丹皮	12.16	100	9
茯苓→山茱萸-泽泻	12.16	100	9
牡丹皮→山茱萸-茯苓	12.16	100	9
牡丹皮→山茱萸-当归	12.16	100	9
茯苓→薄荷	10.81	100	8

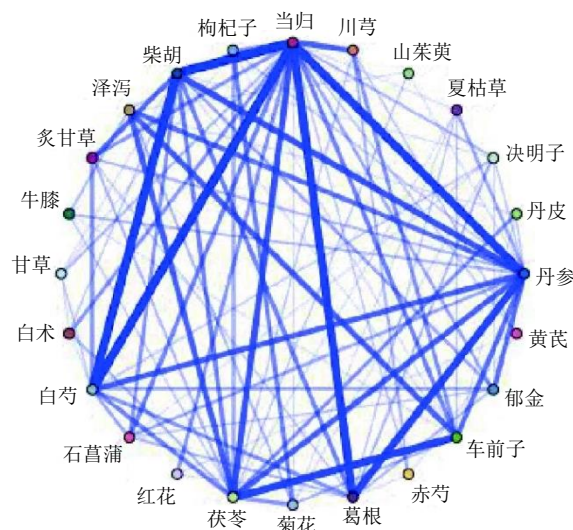


图2 治疗闭角型青光眼的高频中药共现网络

Fig. 2 Co-occurrence network of high-frequency TCMs in treatment of angle-closure glaucoma

为中药共现网络后, 导入 Cytoscape 软件, 随后使用 MOCODE 插件设置为默认参数 node score cutoff=0.2, 进行核心子网络筛选。最终发现治疗闭角型青光眼的核心处方为丹皮-当归-栀子-柴胡-菊花-白术-甘草-白芍-茯苓, 结果见图 5。



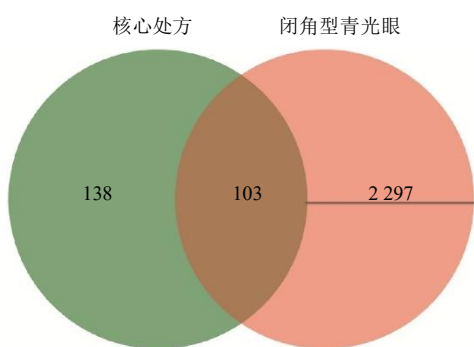


图6 闭角型青光眼核心处方药效靶点韦恩图

Fig. 6 Venn diagram of pharmacodynamic targets of core prescription in treatment of angle-closure glaucoma

**2.7.2 KEGG 通路富集分析和 GO 功能富集分析** 将闭角型青光眼核心处方 103 个药效靶点导入 Metascope 平台进行 KEGG 通路富集分析和 GO 功能分析 ( $P < 0.05$ ), 共富集到 167 条 KEGG 信号通路, GO 功能分析 BP 维度富集到 1 930 条、CC 维度富集到 51 条、MF 维度富集到 133 条。

富集结果显示, 核心处方药效靶点在 KEGG 通路中显著富集于 TNF、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K) -Akt 及丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等经典信号通路 ( $P < 1 \times 10^{-12}$ ), 具有极显著的统计学意义; 在 GO 功能条目中显著

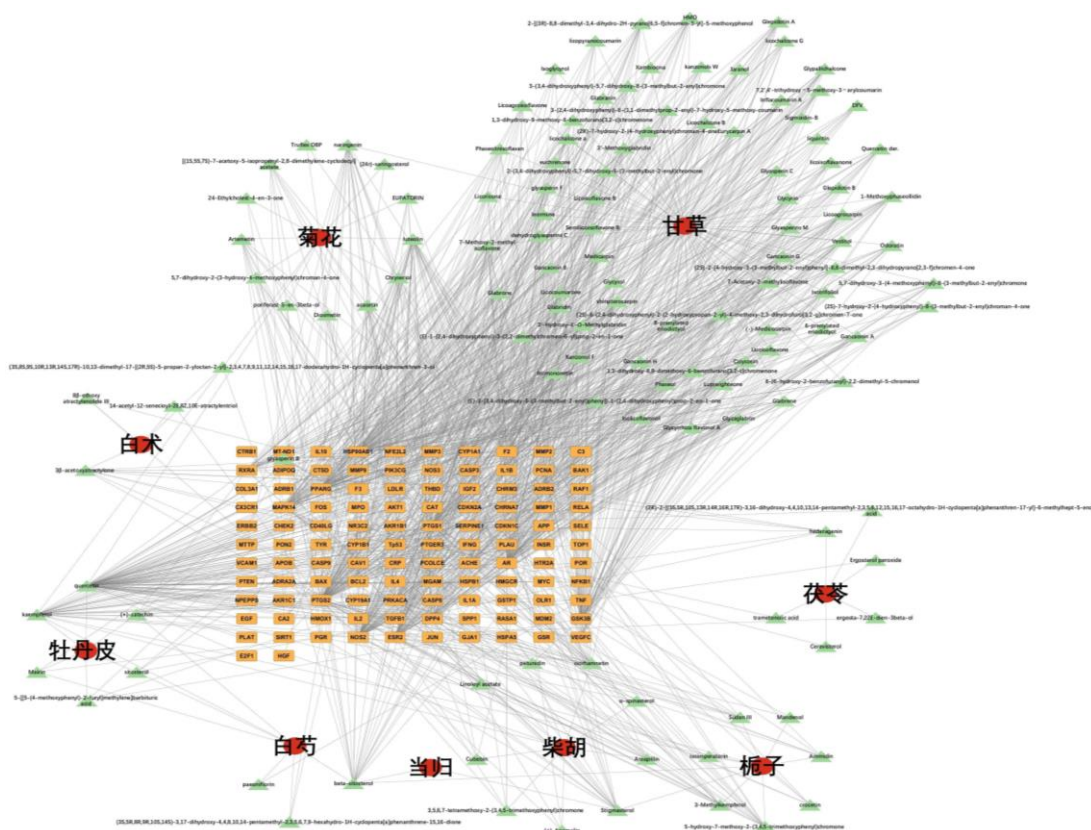


图7 闭角型青光眼核心处方“中药-成分-药效靶点”网络

Fig. 7 “TCMs-compounds-pharmacodynamic targets” network of core prescription for angle-closure glaucoma

富集于细胞因子受体结合、氧化应激反应和缺氧反应等关键条目 ( $P < 1 \times 10^{-30}$ ), 富集程度显著。

以上结果提示闭角型青光眼核心处方可能通过多靶点协同调控炎症反应、氧化应激损伤与细胞凋亡等关键信号通路, 多层次干预闭角型青光眼的发病与进展进程, 结果见图 8。

**2.7.3 核心靶点筛选** 将闭角型青光眼核心处方的药效靶点导入 String 数据库设定物种为“人类”

生成 PPI 网络, 使用 MCODE 插件数 cut-off 为 0.05 筛选核心靶点。结果显示, 核心处方治疗闭角型青光眼的核心靶点主要是 AKT1、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 等, 结果见图 9。

**2.7.4 分子对接** 结果 (表 7、图 10) 显示, 核心成分木犀草素、槲皮素与核心靶点 AKT1 (PDB ID: 1H10)、NF- $\kappa$ B (PDB ID: 1SVC) 及 TNF- $\alpha$  (PDB ID: 2AZ5) 均具有一定的结合潜力, 表现出较好的

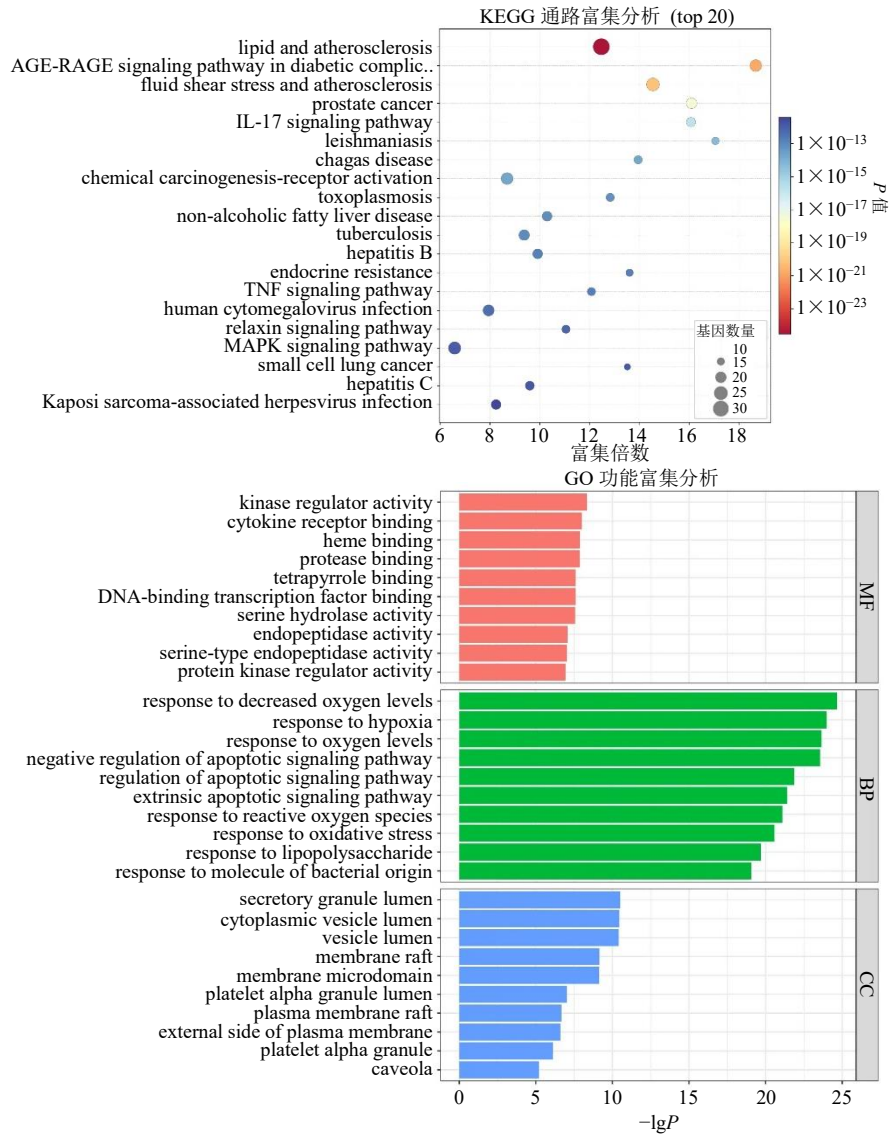


图 8 药效靶点 KEGG 通路和 GO 功能富集结果

Fig. 8 KEGG pathways and GO function enrichment results of pharmacodynamic targets

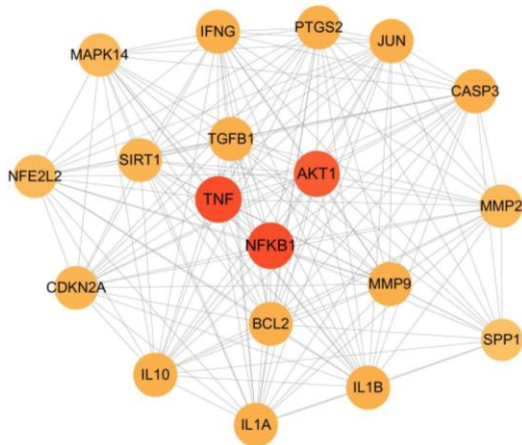


图 9 闭角型青光眼核心处方 PPI 网络及核心靶点

Fig. 9 PPI network and core targets of core prescriptions for angle-closure glaucoma

表 7 核心成分与核心靶点的结合能

Table 7 Binding energy between core components and core targets

核心成分	结合能/(kcal·mol <sup>-1</sup> )			
	AKT1	NF-κB	TNF-α	平均值
木犀草素	-6.2	-6.9	-9.0	-7.4
槲皮素	-6.1	-6.7	-8.7	-7.2
β-谷甾醇	-5.9	-6.6	-8.9	-7.1
柚皮素	-6.2	-6.8	-8.3	-7.1
山柰酚	-6.2	-6.5	-8.1	-6.9

计算亲和力。木犀草素与槲皮素的平均结合自由能分别为-7.4、-7.2 kcal/mol, 提示二者对 3 个靶点可能均具有一定的结合能力。其中, 二者对 TNF-α 的预测亲和力相对较高, 结合自由能分别为-9.0、-8.7

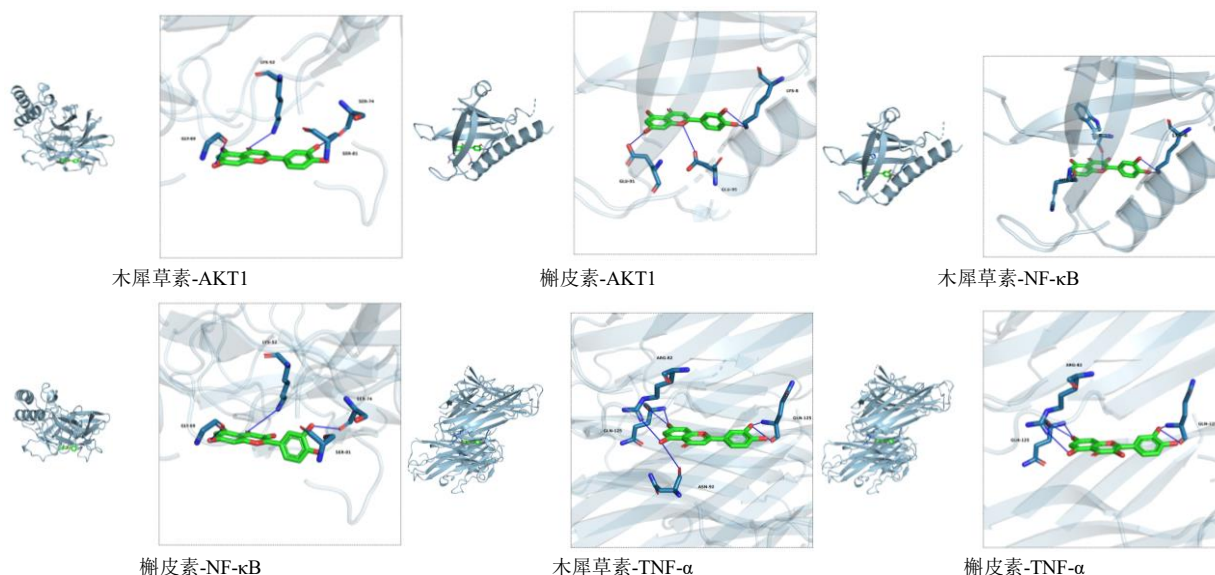


图 10 分子对接可视化结果

Fig. 10 Visualization results of molecular docking

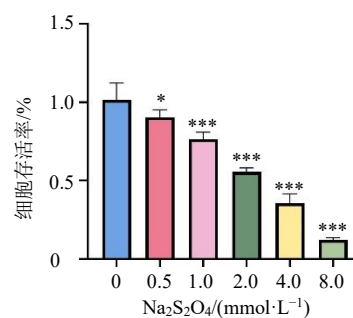
kcal/mol; 对 AKT1 和 NF-κB 的预测结合自由能亦均低于-6.1 kcal/mol, 提示具有潜在的结合活性。

上述计算结果初步预测, 木犀草素与槲皮素可能通过与 TNF-α、NF-κB 和 AKT1 3 个关键靶点发生作用, 参与抗炎及细胞生存信号通路的调节, 但其确切的分子机制尚需进一步实验验证。基于上述对接结果, 木犀草素与槲皮素被初步筛选为后续实验研究的候选活性成分, 开展体外药理学实验, 以验证其潜在的多靶点作用及治疗价值。

## 2.8 体外实验结果

**2.8.1 造模剂浓度确定** 称取连二亚硫酸钠适量, 以 PBS 溶液配制成 200 mmol/L 的母液, 现配现用。采用不同浓度 (0.5、1、2、4、8 mmol/L) 的连二亚硫酸钠溶液处理 RGC 细胞 24 h, 结果显示, 随着连二亚硫酸钠浓度的升高, 细胞存活率呈剂量相关性降低 ( $P < 0.05$ 、0.001)。当连二亚硫酸钠浓度达到 2 mmol/L 时, 细胞存活率接近 50%, 符合后续干预实验所需的缺氧损伤模型标准; 当浓度达到 8 mmol/L 时, 细胞存活率急剧下降至 20% 以下, 缺氧损伤程度过重不利于观察药物干预效果。因此后续实验选用 2 mmol/L 连二亚硫酸钠作为造模浓度。结果见图 11。

**2.8.2 活性成分浓度确定** 为筛选木犀草素和槲皮素的最佳给药浓度, 以 2.5、5、10、20、40、80、160 μmol/L 浓度梯度分别干预 RGC 细胞 24 h 并检测细胞活力。结果显示, 与对照组相比, 木犀草素



与对照组 (0 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) 比较: \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$ 。  
\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group (0 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

图 11 造模剂浓度的筛选 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 11 Screening of modeling agent concentrations ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

在 2.5 μmol/L 时显著促进细胞存活 ( $P < 0.01$ ), 5~10 μmol/L 时无显著影响 ( $P > 0.05$ ), 20~160 μmol/L 时则呈剂量相关性显著降低细胞存活率 ( $P < 0.001$ ); 槲皮素在 2.5~10 μmol/L 时显著促进细胞存活 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 20~40 μmol/L 时无显著影响 ( $P > 0.05$ ), 80~160 μmol/L 时呈剂量相关性显著抑制细胞活力 ( $P < 0.05$ 、0.001), 见图 12。后续选择 5、10、20 μmol/L 作为木犀草素低、中、高剂量, 20、40、80 μmol/L 作为槲皮素低、中、高剂量进行后续实验。

**2.8.3 木犀草素和槲皮素对缺氧损伤 RGC 细胞的关键靶点 mRNA 表达的影响** 与对照组比较, 模型组细胞中促炎因子 NF-κB、TNF-α mRNA 表

达显著上调 ( $P < 0.001$ ), 而细胞存活相关因子 *AKT1* mRNA 表达显著下调 ( $P < 0.001$ ), 提示缺氧模型成功诱导了 RGC 的炎症激活与存活抑制状态; 与模型组比较, 木犀草素低、中、高剂量组均可上调 *AKT1* mRNA 表达 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ 、

$0.001$ ), 且中、高剂量组可下调 *NF-κB*、*TNF-α* mRNA 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 槲皮素中、高剂量组能显著下调 *NF-κB*、*TNF-α* mRNA 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 同时上调 *AKT1* mRNA 表达 ( $P < 0.001$ ), 结果见图 13。

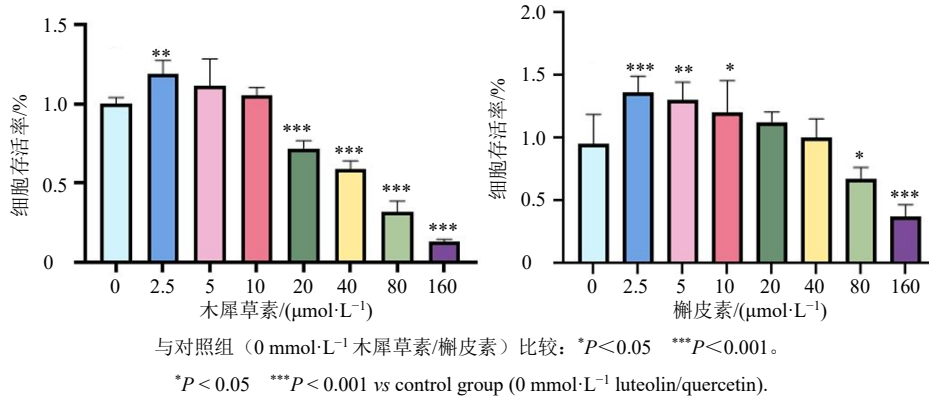
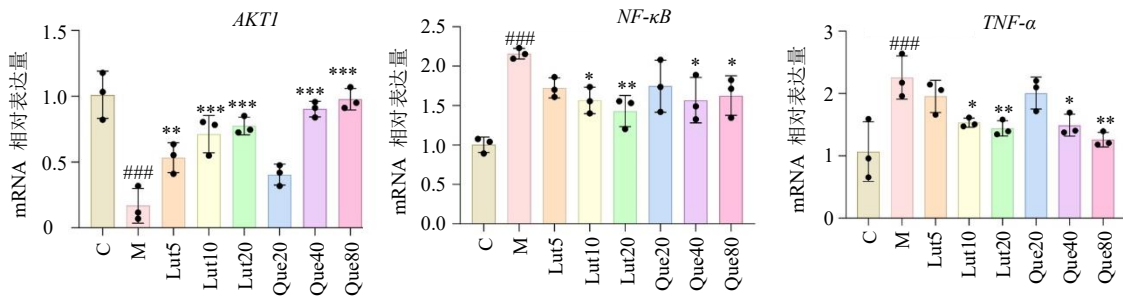


图 12 核心成分浓度的筛选 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 12 Screening of core compounds concentrations ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



C 表示对照组, M 表示模型组, Lut5、Lut10、Lut20 分别表示木犀草素的低、中、高剂量组, Que20、Que40、Que80 分别表示槲皮素的低、中、高剂量组; 与对照组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 下图同。

C represent control group, M represent model group, Lut5, Lut10 and Lut20 represent the low-dose, medium-dose and high-dose luteolin groups respectively, while Que20, Que40 and Que80 represent the low-dose, medium-dose and high-dose quercetin groups; ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as below figures.

图 13 木犀草素、槲皮素对连二亚硫酸钠诱导 RGC 细胞 *AKT1*、*NF-κB*、*TNF-α* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 13 Effect of luteolin and quercetin on mRNA expression of *AKT1*, *NF-κB*, and *TNF-α* in RGC cells induced by sodium dithionite ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**2.8.4 ELISA 法检测木犀草素和槲皮素对缺氧损伤 RGC 细胞 *TNF-α* 水平的影响** 与对照组相比, 模型组细胞中 *TNF-α* 水平显著升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比, 木犀草素中、高剂量组均可显著降低 *TNF-α* 水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 槲皮素中、高剂量组也显著降低 *TNF-α* 水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。见图 14。

**2.8.5 免疫荧光检测木犀草素和槲皮素对缺氧损伤 RGC 细胞 p-AKT1、*NF-κB* 蛋白表达水平的影响** 免疫荧光结果 (图 15) 显示, 与对照组比较, 模型组 p-AKT 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.001$ ), *NF-κB* 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 木犀草

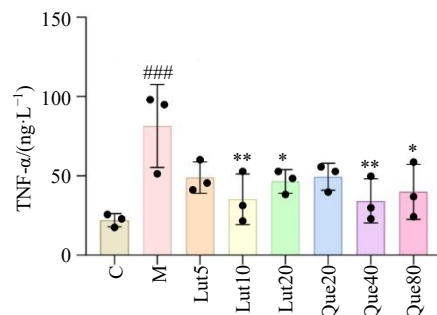


图 14 木犀草素和槲皮素对连二亚硫酸钠诱导 RGC 细胞 *TNF-α* 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 14 Effects of luteolin and quercetin on *TNF-α* level in RGC cells induced by sodium dithionite ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

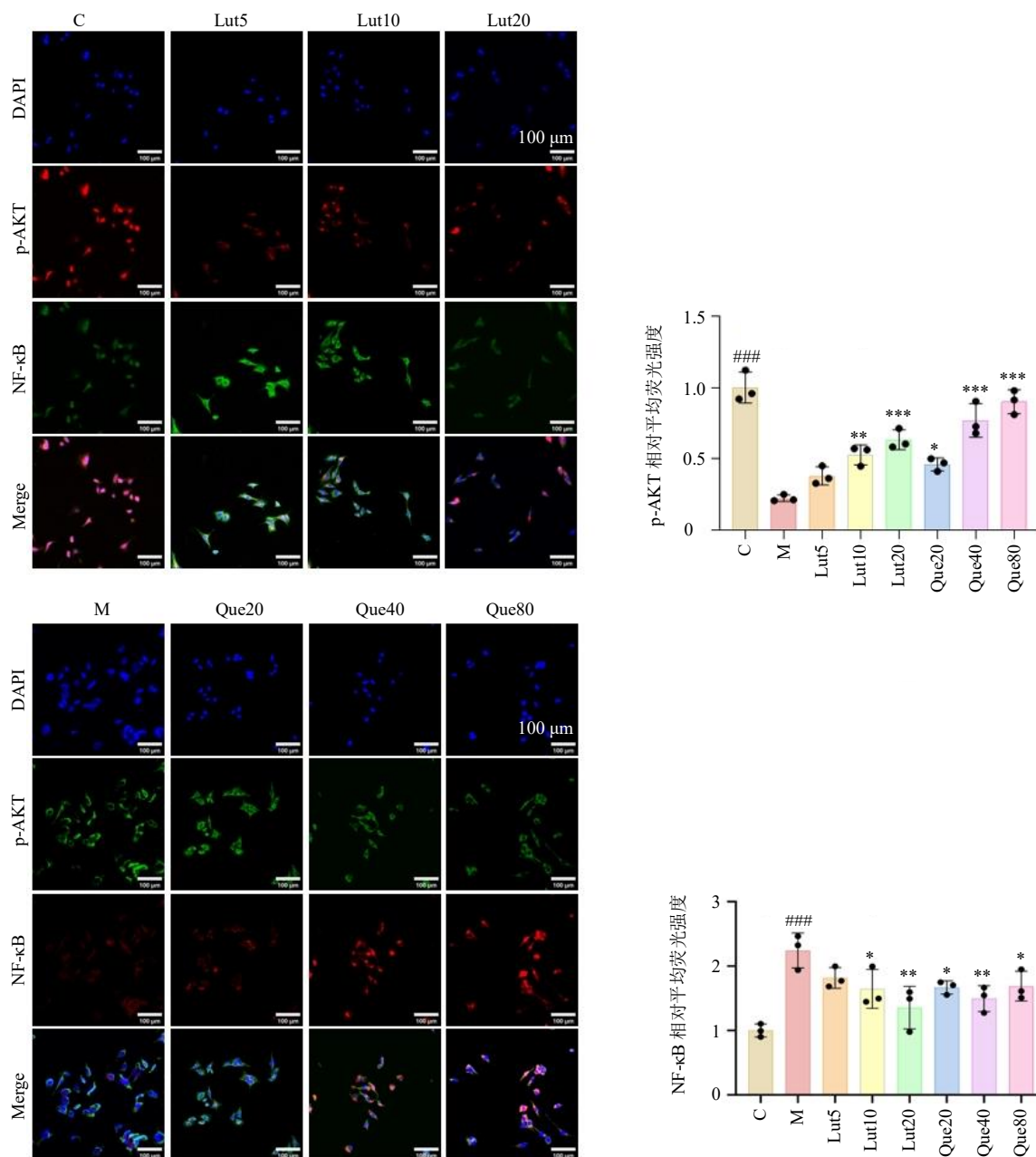


图 15 木犀草素和槲皮素对连二亚硫酸钠诱导 RGC 细胞 p-AKT、NF-κB 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 15 Effects of luteolin and quercetin on p-AKT and NF-κB protein levels in RGC cells induced by sodium dithionite ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

素中、高剂量组 p-AKT 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01, 0.001$ ), NF-κB 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 槲皮素各剂量组 p-AKT 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05, 0.001$ ), NF-κB 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 3 讨论

青光眼是一种临床上最常见的、不可逆的致盲性眼病,其主要特征为进行性视野缺损和视神经损伤,核心病理机制是 RGC 细胞发生不可逆的、选择

性的凋亡<sup>[14]</sup>。据世界卫生组织统计,2020 年全球青光眼患病人数约为 7 600 万,预计到 2040 年将增长至 1.118 亿<sup>[15]</sup>。庞大的患者群体给社会和医疗系统带来了沉重负担。然而,目前青光眼的防治仍面临诸多困难,治疗手段较为单一且局限:临床上主要通过药物或手术降低眼压,这是唯一被证实有效的治疗方法,但并非对所有患者均有效。大量临床观察发现,许多患者在眼压控制至正常范围后,依然会出现进行性视野缺损和视神经损伤<sup>[16]</sup>。

中医药学历史悠久,其理论体系以整体观念与辨证论治为核心,在多种疾病临床干预中表现出独特优势,具有不良反应少、预后良好、治疗成本相对较低等特点,有助于减轻患者经济负担。在青光眼治疗中,中医药已得到广泛应用<sup>[17]</sup>。然而,目前针对闭角型青光眼的辨证分型规律仍缺乏系统性对比研究。因此,系统开展闭角型青光眼中医药替代或补充疗法的循证整理与机制探索既能充分体现中医诊疗特色,也可为临床决策提供精准指导,对优化青光眼诊疗实践具有重要意义。

用药频次分析显示,青光眼治疗中使用频率最高的前3味中药兼具补虚与祛实之效,体现了补泻兼施、阴阳平衡的治疗原则。闭角型青光眼常用茯苓、当归、柴胡、丹皮、泽泻、栀子等中药防治,具有清热凉血、滋补肝肾、健脾利湿等功效。其病机体现中医整体观:肝开窍于目、肝郁气滞可致目窍瘀滞,引发“目失所养则视物昏花”;脾主运化,脾失健运可致“水湿内停,湿热上泛”,表现为眼胀头痛;湿热久灼耗伤肾阴,终致“目窍不通,神光内郁,视物不清”<sup>[18]</sup>。方中当归养血活血,促进肝气条达,缓解目窍瘀滞;柴胡疏肝解郁、调畅气机,兼有情志调节作用,二者协同发挥治疗效应。

性味归经分析显示,青光眼治疗中药以寒性为主、温性次之,药味以甘味为主、苦味为辅;归经分布以肝经为核心。闭角型青光眼用药亦以补虚药为主体,肺经作为次要归经。该病本质属本虚标实之证,符合“正气存内,邪不可干”之理论,治疗关键在于扶助正气,以补虚药与清热药配伍,强调扶正与祛邪协同。值得关注的是,青光眼治疗中甘味药使用广泛。由于目窍病变早期常无明显临床表现,待视功能损伤时多已发展为虚实夹杂证。甘味具有“能补、能和”的特性,与致盲性眼病“久病必虚”的病机高度契合<sup>[19]</sup>,因而成为核心药味的选择依据。

关联分析结果显示,治疗闭角型青光眼以泽泻→熟地黄-山茱萸、泽泻→熟地黄-牡丹皮等组合置信度最高,前者中山茱萸增强了熟地黄滋补肝肾的作用,后者中丹皮增强了熟地黄清热凉血的作用,泽泻分别具有利水渗湿、泄热下行的作用。其余如川芎→赤芍-当归、丹参→牛膝-泽泻等搭配组合体现了清热凉血与滋补肝肾、健脾利湿诸法的综合应用。

聚类分析表明,闭角型青光眼则呈现3个聚类

簇:第1簇含柴胡、栀子、当归、丹皮、茯苓、白术、甘草,为柴胡疏肝散加减,功效兼具疏肝清热与健脾养血,适用于肝郁化火及肝气郁结证型。第2簇含川芎、葛根、红花、丹参、黄芪,为益精补阳还五汤加减,功效强调益气活血、化瘀通络,适用于气虚血瘀证候。第3簇由泽泻、菊花组成,为杞菊地黄丸加减,功效涵盖滋补肝肾与清肝明目,适用于肝肾亏虚患者。各类组方协同实现疏肝清热、健脾养血、益气活血、化瘀通络、滋补肝肾、清肝明目的治疗目标。

证候分析显示,闭角型青光眼的核心病位在肝,主要证候为肝郁气滞与肝肾两虚。肝的病理表现以肝郁气滞为主,可进一步发展为气郁化火。与气机失调相关的证候还包括肝火上炎、肝经风热、肝阳上亢及气滞血瘀。阴虚火旺证较为常见,可能与体质或病程后期表现相关。病程迁延者多表现为肝肾亏虚,且常虚实夹杂,反映出“久病多郁”与“久病多虚”的病机特点。闭角型青光眼证候以肝郁化火、湿热内蕴为特征。经拓扑学筛选得出的核心处方“丹皮-当归-栀子-柴胡-菊花-白术-甘草-白芍-茯苓”,治则为清肝泻火、平肝潜阳,治法涵盖凉血清热、补益肝肾、健脾渗湿。其中丹皮、栀子清热凉血,柴胡疏肝解郁,白芍柔肝敛阴,通过清泻肝火、调和肝气改善肝火上炎的状态;当归滋养肝血改善因肝郁气滞导致的气血失衡状态;菊花清肝明目,白术健脾益气,茯苓健脾渗湿以助运化,甘草调和诸药,确保方剂发挥最佳的治疗效果。

网络药理学分析结果显示,核心处方治疗闭角型青光眼的主要活性成分有槲皮素、木犀草素等。这些活性成分作用于 AKT1、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 等关键靶点,协同调控炎症反应、氧化应激损伤与细胞凋亡等关键信号通路。木犀草素和槲皮素均为中药中富含的一种天然黄酮类小分子成分,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡及神经保护等多重药理活性。可通过抑制 TNF- $\alpha$  表达、阻断 NF- $\kappa$ B 信号通路,并上调 AKT1 磷酸化水平,起到抗炎抗凋亡、保护视网膜神经节细胞的作用<sup>[20-21]</sup>。TNF- $\alpha$  作为重要的促炎因子,其血清水平升高与视神经损伤程度呈正相关,并参与介导视网膜神经节细胞的炎症性损伤<sup>[22]</sup>。AKT1 是细胞存活信号通路的关键枢纽,其磷酸化激活可拮抗神经退行性病变,并通过调控下游靶点维持神经元稳态及相关信号通路的功能<sup>[23]</sup>。此外, TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 是炎症级联反应的核心调控因子,

急性发作期患者房水中 TNF- $\alpha$  水平显著升高, 可通过激活 NF- $\kappa$ B 通路促进 iNOS 等促炎因子释放, 加剧前房及小梁网的炎症反应, 导致房水流出阻力增加和眼压持续升高<sup>[24]</sup>。

综合 KEGG 通路富集分析和 GO 功能分析, 闭角型青光眼核心处方显著富集于 TNF、PI3K-AKT 及 MAPK 等关键信号通路, 并涉及细胞因子受体结合、氧化应激和缺氧反应等生物学过程。探究发现, 靶点与通路分析结果提示核心处方可能主要调控 TNF- $\alpha$ 、PI3K-AKT 及 MAPK 信号通路, 通过调控 TNF 信号通路抑制 TNF- $\alpha$  等促炎因子释放, 阻断下游 NF- $\kappa$ B 炎症级联反应, 从而减轻小梁网及视网膜炎症损伤, 缓解眼压升高介导的炎性损伤; 通过激活 PI3K-AKT 信号通路上调 AKT1 磷酸化水平, 增强视网膜神经节细胞存活能力, 抑制高眼压诱导的细胞凋亡; MAPK 通路是介导炎症、氧化应激、缺氧应激与细胞凋亡的关键信号轴, 可被高眼压、缺血缺氧及 TNF- $\alpha$  等促炎因子激活, 通过抑制 MAPK 通路过度激活, 能有效抑制由高眼压或急性发作触发的过度炎症级联反应, 同时减轻氧化应激介导的组织损伤, 并调控视网膜神经节细胞的凋亡进程, 从而干预闭角型青光眼的视网膜神经节细胞损伤及视神经病变进程。

体外实验表明, 木犀草素和槲皮素作为青光眼高频中药活性成分, 能够显著调控网络药理学分析所筛选核心处方的关键靶点: 一方面, 二者均可有效下调 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  mRNA 及蛋白表达水平, 抑制炎症信号通路的过度激活, 减少促炎因子释放, 从而减轻炎症对 RGC 的损伤; 另一方面, 可显著上调 AKT1 mRNA 及 p-AKT 蛋白表达, 激活 PI3K/AKT 细胞存活通路, 促进细胞增殖、抑制凋亡, 增强 RGC 在缺氧环境下的耐受能力。通过“抑炎-促存活”的协同作用机制, 木犀草素和槲皮素能够有效阻断缺氧诱导的炎症反应和细胞凋亡进程, 对 RGC 发挥保护作用。本研究从细胞水平验证了网络药理学预测结果的可靠性, 为阐明中药活性成分治疗青光眼的分子机制提供了实验依据, 也为临床辨证用药提供了科学依据。

综上所述, 本研究采用数据挖掘、网络药理学以及体外实验, 分析了治疗闭角型青光眼中药的特点, 得出核心处方, 并揭示其用药规律, 填补了闭角型青光眼辨证用药科学化研究的空白。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 曹迎雪, 麦小妹, 石乐, 等. 青光眼中神经退行性病变的机制研究和治疗进展 [J]. 眼科学报, 2024, 39(8): 402-408.
- [2] Snyder P J, Alber J, Alt C, *et al.* Retinal imaging in Alzheimer's and neurodegenerative diseases [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(1): 103-111.
- [3] Kashani A H, Asanad S, Chan J W, *et al.* Past, present and future role of retinal imaging in neurodegenerative disease [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 83: 100938.
- [4] 孙志超. 益气明目颗粒干预气虚血瘀型原发性开角型青光眼的临床和机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2024.
- [5] Landers J, Martin K, Sarkies N, *et al.* A twenty-year follow-up study of trabeculectomy: Risk factors and outcomes [J]. *Ophthalmology*, 2012, 119(4): 694-702.
- [6] 田梓廷, 孙河. 《证治准绳》中五风内障与青光眼现代认知辨析 [J]. 中国中医眼科杂志, 2024, 34(9): 857-861.
- [7] 朱丽颖, 黎晓冬, 谢学军. 基于古今医案云平台探究青光眼视神经保护用药规律 [J]. 亚太传统医药, 2024, 20(1): 189-193.
- [8] 于博, 董霏雪, 孙河. 基于数据挖掘探讨国家中药专利复方干预青光眼的用药规律 [J]. 中国中医眼科杂志, 2024, 34(4): 309-313.
- [9] 周日龙, 罗紫玉, 陈志松, 等. 基于数据挖掘探析国家专利中药复方治疗 PACG 的用药规律 [J]. 中国中医眼科杂志, 2024, 34(2): 110-117.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1-404.
- [11] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-1 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 234.
- [12] 唐德才, 吴庆光. 中药学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 324.
- [13] 中医临床诊疗术语 第 2 部分: 证候 [S]. GB/T 16751.2—2021. 2021: 156
- [14] Kang J M, Tanna A P. Glaucoma [J]. *Med Clin N Am*, 2021, 105(3): 493-510.
- [15] Steinmetz J D, Bourne R R A, Briant P S, *et al.* Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: The Right to Sight: An analysis for the global burden of disease study [J]. *Lancet Glob Health*, 2021, 9(2): e144-e160.
- [16] Bou Ghanem G O, Wareham L K, Calkins D J. Addressing neurodegeneration in glaucoma: Mechanisms, challenges,

- and treatments [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2024, 100: 101261.
- [17] 罗世春, 刘玉洁, 陈桂明, 等. 基于数据挖掘中药治疗青光眼的文献计量分析 [J]. *中医眼耳鼻喉杂志*, 2024, 14(4): 191-194.
- [18] 郑嘉琦, 俞莹. 中医治疗青光眼的研究进展 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2021, 31(5): 362-364.
- [19] 郭永胜, 黄书婷, 张震, 等. 叶天士“元气有伤当与甘药”理论钩玄 [J]. *江苏中医药*, 2020, 52(7): 4-7.
- [20] 李茜, 王红星, 傅强, 等. 木犀草素对视网膜缺血-再灌注损伤 (RIRI) 大鼠 TLR4/Syk/NF- $\kappa$ B 信号通路及视网膜的影响 [J]. *眼科新进展*, 2021, 41(4): 311-316.
- [21] 张艺展, 徐荣佳, 姜晨. 基于数据挖掘和网络药理学探究中医药治疗腹膜透析相关性腹膜炎的用药规律及作用机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(21): 7883-7895.
- [22] 魏子岳, 闫原野, 张铭. 原发性开角型青光眼患者血清硝基酪氨酸、褪黑素水平的表达及临床意义 [J]. *国际检验医学杂志*, 2022, 43(19): 2316-2320.
- [23] Thananthirige K P M, Chitranshi N, Basavarajappa D, *et al.* Tau modulation through AAV9 therapy augments Akt/Erk survival signalling in glaucoma mitigating the retinal degenerative phenotype [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2024, 12(1): 89.
- [24] 丁月, 林介, 刘洋, 等. 血清 MLT、Klotho 蛋白与原发性闭角型青光眼患者促炎症因子和疗效的关系 [J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(24): 3032-3036.

[责任编辑 潘明佳]