

应用网络药理学分析牛黄治疗角膜炎的作用机制

莫国艳¹ 陈吉军² 韩林涛¹ 田代志³ 罗继红⁴ 李杜军⁴

¹湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065; ²武汉天鹏医药有限公司, 武汉 430065; ³湖北中医药大学中医药实验中心, 武汉 430065; ⁴湖北省中医院眼科, 武汉 430073

通信作者: 李杜军, Email: 709659915@qq.com

【摘要】 目的 应用网络药理学分析方法, 从整体水平观察牛黄-靶点-角膜炎的复杂网络关系, 探讨牛黄治疗角膜炎的分子作用机制。方法 首先通过 DisGeNET 在线数据库收集角膜炎相关的基因, 构建角膜炎相关蛋白质的互作网络, 然后经中药系统药理学分析 (TCMSP) 平台、中国科学院化学数据库查询, 结合文献报道, 收集牛黄中分离鉴定的组成成分, 导出各成分 SMILES 结构式信息, 利用在线软件 SwissTargetPrediction 预测作用靶点, 进而构建牛黄活性成分-预测靶点网络图, 最后将角膜炎相关蛋白质的互作网络与牛黄活性成分-预测靶点网络进行合并, 得到牛黄活性成分-潜在靶点网络, 系统分析牛黄治疗角膜炎的潜在作用靶点及其在信号通路中的作用, 构建成分-靶点-通路网络图, 分析牛黄治疗角膜炎的作用机制。结果 共搜索到 39 个已分离鉴定的牛黄组成成分, 角膜炎相关靶点 65 个, 牛黄治疗角膜炎的潜在靶点 28 个; 28 个潜在靶点中包含 7 个直接作用靶点, 即肿瘤坏死因子、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1、Toll 样受体 9、C-X-C 基序趋化因子配体 8、白细胞介素 (IL) 6、丝裂原活化蛋白激酶 8 和神经营养受体酪氨酸激酶 1。28 个潜在靶点可被注释入 12 项生物过程、18 项细胞组分、13 个分子功能, 经京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 共纳入 10 条 KEGG 信号通路, 主要涉及人巨细胞病毒感染、阿米巴病、抗叶酸耐受性、PI3K-Akt 信号通路、类风湿性关节炎、凋亡、细胞因子-细胞因子受体相互作用、疟疾、非酒精性脂肪肝、IL-17 信号通路。结论 牛黄可能通过抗炎、抗菌、抗病毒、免疫调节和炎症调控等作用发挥对角膜炎的辅助治疗作用。

【关键词】 角膜炎; 网络药理学; 蛋白互作网络; 信号通路; 牛黄

基金项目: 湖北省卫生和计划生育委员会中医药、中西医结合科研指导性项目

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200723-00524

Mechanism of *Calculus Bovis* treating keratitis based on network pharmacology

Mo Guoyan¹, Chen Jijun², Han Lintao¹, Tian Daizhi³, Luo Jihong⁴, Li Dujun⁴

¹Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; ²Wuhan Tianpeng Pharmaceutical Company Ltd., Wuhan 430065, China; ³Center Laboratory of Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; ⁴Department of Ophthalmology, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430073, China
Corresponding author: Li Dujun, Email: 709659915@qq.com

[Abstract] **Objective** To investigate the complex *Calculus Bovis*-target-keratitis network and to explore the molecular mechanism of *Calculus Bovis* treating keratitis through network pharmacology. **Methods** Genes related to keratitis were searched in the online DisGeNET database and the protein-protein interaction (PPI) network of keratitis-associated proteins was constructed. The components isolated and identified in *Calculus Bovis* were collected through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP, <https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>), Chemistry Database by Shanghai Institute of Organic Chemistry of CAS (<http://www.organchem.csdb.cn>), and published literature. The canonical SMILES information of the collected components was exported, which were submitted to the SwissTargetPrediction platform to predict potential targets of the components. The active component-predicted target network of *Calculus Bovis* was constructed and merged with the PPI network of keratitis-associated proteins to build the active component-potential target network of *Calculus Bovis* and systemically investigate the potential targets and signal pathways of *Calculus Bovis* in treatment of keratitis. The component-target-pathway network was established to analyze the mechanism of *Calculus Bovis* treating keratitis. **Results** Thirty-nine components isolated and identified in *Calculus Bovis* were searched and 65 target genes related to keratitis were screened. Of the 28 potential targets involved in *Calculus Bovis* treating keratitis, there were 7 direct targets, including tumor necrosis factor, caspase 1, Toll-like receptor 9, C-X-C motif chemokine ligand 8, interleukin-6, mitogen-activated protein kinase 8, neurotrophic receptor tyrosine kinase 1. The 28 potential targets were annotated to 12 entries for biological process, 18 for cellular components and 13 for molecular function. In the Kyoto encyclopedia of genes and

genomes pathway enrichment analysis, 10 signal pathways were identified as enriched categories, which were mainly related to human cytomegalovirus infection, amoebiasis, antifolate resistance, PI3K-Akt signaling pathway, rheumatoid arthritis, apoptosis, cytokine-cytokine receptor interaction, malaria, non-alcoholic fatty liver disease, interleukin-17 signaling pathway. **Conclusions** *Calculus Bovis* may play an adjuvant therapeutic effect on keratitis through anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, immune regulation, inflammatory regulation and other functions.

[Key words] Keratitis; Network pharmacology; Protein-protein interaction network; Signal pathway; *Calculus Bovis*

Fund program: Guiding Projects of Scientific Research on Traditional Chinese Medicine and Integrated Traditional and Western Medicine in Hubei Provincial Health and Family Planning Commission

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200723-00524

牛黄(*Calculus Bovis*),我国传统名贵中药之一,始载于《神农本草经》,在我国药用历史已有两千多年,是多种知名复方制剂的重要组成部分之一,如安宫牛黄丸、牛黄解毒片、片仔癀等^[1]。研究显示,牛黄及其代用品有相似性状、成分、含量及临床疗效,为多种成分组成的复合物,目前已分离鉴定的成分主要为胆色素、胆汁酸、胆固醇、氨基酸和微量元素等^[2];其药理作用尤为广泛,包括解热、镇痛、抗炎、镇静、降压、利胆、保肝、抗过敏、抗氧化和抗肿瘤等,可影响中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统、消化系统、免疫系统和血液系统等^[2-3]。随着相关研究的大量开展与不断深入,牛黄具有的清心解毒、凉肝息风、豁痰开窍等传统功效也逐渐以现代医学、生物学方式进行阐释与挖掘,适应证得到拓展,近年临床应用牛黄或其复方剂治疗麦粒肿、细菌性角膜炎与单纯疱疹病毒性角膜炎也取得较好疗效^[4-6]。然而,这些研究多聚焦于少数传统中药复方,针对单味牛黄的研究宽泛而浅显,缺乏系统的多成分、多靶点、多功效分子作用机制研究。因此,有必要对牛黄治疗角膜炎的潜在活性成分、作用靶点及分子作用通路进行预测分析,为后续研究奠定基础,并为针对性实验研究的开展提供参考。网络药理学作为一种新的研究理念,既可强调中医药的整体性,又可体现中医药多成分、多靶点、多途径的特色,是一种可系统性研究中医药治疗机制的方法^[7]。本研究采用网络药理学分析方法,探究牛黄治疗角膜炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 角膜炎相关蛋白质靶点的收集

应用 DisGeNET 在线数据库^[8](<http://www.disgenet.org>),以“keratitis”为关键词进行搜索,收集与角膜炎相关的蛋白质靶点。

1.2 角膜炎相关蛋白质的互作网络构建

利用 STRING 11.0 数据库^[9](<https://string-db.org/>)提供的蛋白质之间直接和间接相互作用的排序信息,对在 DisGeNET 中收集到的角膜炎相关蛋白质

名称进行检索,并对每对蛋白互作信息进行评分,得分越高则说明蛋白质相互作用信息的置信度越高;选取得分高于 0.7 的高置信度蛋白质互作信息,得到角膜炎相关蛋白质的蛋白互作数据,将这些数据再导入生物信息分析软件 Cytoscape 3.7.2^[10-11](<http://www.cytoscape.org>),构建角膜炎相关的蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI)网络,实现可视化浏览和分析。

1.3 牛黄化学成分的收集

通过中药系统药理学分析(TCMSP)平台^[12](<https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、中国科学院化学数据库(<http://www.organchem.csdb.cn>)及文献报道^[2]查找牛黄的组成成分,通过 PubChem、ChemSpider 等数据库,收集各成分的 CAS 号、SMILES 结构式、InChIKey 名、IUPAC 名等信息。将牛黄各组成成分的 SMILES 结构式信息导入在线平台 SwissADME^[13](<http://www.swissadme.ch/>),预测其吸收、分布、代谢和排泄参数、药动学特性、类药性、药物化学友好性,筛选牛黄的活性化学成分。

1.4 牛黄潜在靶蛋白的预测

将上述所得活性成分的 SMILES 结构式信息上传至 SwissTargetPrediction 平台^[14-15](<http://www.swisstargetprediction.ch>),应用反向药效团匹配法进行预测,得到化学小分子潜在靶点和生物活性结果。鉴于所得的药物靶点蛋白质存在命名不规范的问题,应用 UniProt 数据库中的 UniProtKB 功能(<http://www.uniprot.org>)将其校正为官方名称(Official Symbol),获得活性成分潜在靶蛋白信息,导入软件 Cytoscape 3.7.2 中,构建活性成分-预测靶点网络。

1.5 牛黄治疗角膜炎的活性成分-潜在靶点网络的构建

利用软件 Cytoscape 3.7.2 中的 Merge 功能,将角膜炎的 PPI 网络与牛黄活性成分-预测靶点网络进行合并,删除其中没有交集的蛋白,构建牛黄治疗角膜炎的活性成分-潜在靶点网络,系统分析牛黄治疗角膜炎的活性成分与潜在作用靶点。

1.6 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

将牛黄治疗角膜炎的活性成分-潜在靶点网络中的靶点蛋白信息导入基因富集分析在线工具 WebGestalt (WEB-based GENE SET ANALYSIS TOOLKIT) [16] (<http://www.webgestalt.org>) 中,进行基因本体论 (gene ontology, GO) 分析与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析,从生物过程、分子水平和细胞水平 3 个方面分析、探讨所得的潜在作用靶点。

1.7 “成分-靶点-通路”网络的构建

将上述所得的 KEGG 信号通路、牛黄活性成分、潜在作用靶点数据整合,然后导入 Cytoscape 3.7.2 软件,构建牛黄治疗角膜炎的“成分-靶点-通路”网络。应用 Cytoscape 3.7.2 软件中的 Network Analysis-Analyze Network 功能,分析角膜炎相关的牛黄活性成分-潜在靶点网络中各靶点的度值;度值越大,表明作用于此靶点的牛黄活性成分数量或互作蛋白数量越多,提示牛黄活性成分通过该靶点发挥作用的可能性就越大。

2 结果

2.1 角膜炎相关的 PPI 网络

在 DisGeNET 数据库中,检索到 142 个与角膜炎相关的一级蛋白,角膜炎相关蛋白质的 PPI 网络,包含 65 个角膜炎相关蛋白质和 382 条角膜炎相关蛋白质的相互作用关系 (图 1,表 1)。

2.2 牛黄活性成分-预测靶点网络

共检索到已分离鉴定的牛黄组成成分 39 个,其基本信息见表 2。将所得 39 个组成成分纳入靶点预测分析,得到 38 个成分的靶点,构建的牛黄活性成分-预

测靶点网络包含 1 886 条活性成分-预测靶点联系、38 个化合物节点和 588 个靶点节点 (图 2)。

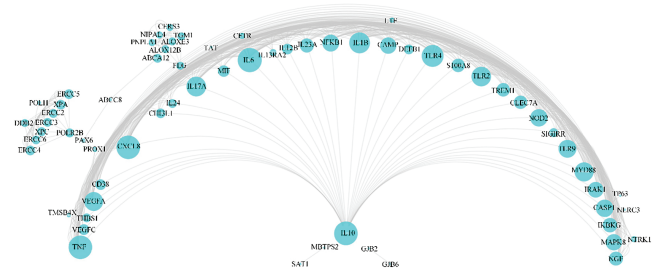


图 1 角膜炎相关蛋白质的 PPI 网络 亮蓝色圆形表示角膜炎相关的蛋白质,圆形大小随其互作蛋白质数量增加而变大。此 PPI 网络图由 65 个角膜炎相关蛋白质节点和 382 条蛋白质相互作用关系构成,相关蛋白质节点以蛋白互作得分 ≥ 0.7 标准筛选而得

Figure 1 Protein-protein interaction network of the keratitis-associated proteins Bright blue circles indicated keratitis-associated proteins, and the size of the circles increased with the number of proteins they interacted with. The PPI network consisted of 65 keratitis-associated protein nodes with an interaction score of ≥ 0.7 and 382 protein interactions

表 1 65 个角膜炎相关蛋白质
Table 1 65 keratitis-associated proteins

蛋白缩写	蛋白全称	蛋白缩写	蛋白全称
ABCA12	ATP binding cassette subfamily A member 12	MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8
ABCC8	ATP binding cassette subfamily C member 8	MBTPS2	membrane bound transcription factor peptidase, site 2
ALOX12B	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	MIF	macrophage migration inhibitory factor
ALOXE3	arachidonate lipoxygenase 3	MYD88	myeloid differentiation primary response 88
CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide	NFkB1	nuclear factor kappa B subunit 1
CASP1	caspase 1	NGF	nerve growth factor
CD38	CD38 molecule	NIPAL4	NIPA like domain containing 4
CERS3	ceramide synthase 3	NLRC3	NLR family CARD domain containing 3
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	NOD2	nucleotide binding oligomerization domain containing 2
CH13L1	chitinase 3 like 1	NTRK1	neurotrophic receptor tyrosine kinase 1
CLECT7A	C-type lectin domain containing 7A	PAX6	paired box 6
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	PNPLA1	patatin like phospholipase domain containing 1
DDB2	damage specific DNA binding protein 2	POLH	DNA polymerase eta
DEFB1	defensin beta 1	POLR2B	RNA polymerase II subunit B
ERCC2	ERCC excision repair 2,TFIIH core complex helicase subunit	PROX1	prospero homeobox 1
ERCC3	ERCC excision repair 3,TFIIH core complex helicase subunit	S100A8	S100 calcium binding protein A8
ERCC4	ERCC excision repair 4,endonuclease catalytic subunit	SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1
ERCC5	ERCC excision repair 5,endonuclease	SIGIRR	single Ig and TIR domain containing
ERCC6	ERCC excision repair 6,chromatin remodeling factor	TAT	tyrosine aminotransferase
FLG	Filaggrin	TGM1	transglutaminase 1
GJB2	gap junction protein beta 2	THBS1	thrombospondin 1
GJB6	gap junction protein beta 6	TLR2	Toll-like receptor 2
IKBK	inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit gamma	TLR4	Toll-like receptor 4
IL10	interleukin 10	TLR9	Toll-like receptor 9
IL12B	interleukin 12B	TMSB4X	thymosin beta 4 X-linked
IL13RA2	interleukin 13 receptor subunit alpha 2	TNF	tumor necrosis factor
IL17A	interleukin 17A	TP63	tumor protein p63
IL1B	interleukin 1 beta	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
IL23A	interleukin 23 subunit alpha	VEGFA	vascular endothelial growth factor A
IL24	interleukin 24	VEGFC	vascular endothelial growth factor C
IL6	interleukin 6	XPA	XPA, DNA damage recognition and repair factor
IRAK1	interleukin 1 receptor associated kinase 1	XPC	XPC complex subunit, DNA damage recognition and repair factor
LTF	lactotransferrin		

2.3 与角膜炎相关的牛黄活性成分-潜在靶点网络

构建的牛黄活性成分-潜在靶点网络包括 43 个总节点(含 15 个化合物节点和 28 个靶点节点),组成 108 条活性成分-潜在靶点联系(图 3)。其中,28 个靶点中含 7 个直接作用靶点,即白细胞介素(interleukin, IL)-6、C-X-C 基序趋化因子配体 8(C-X-C motif chemokine ligand 8, CXCL8)、Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR) 9、丝裂原活化蛋白激酶 8

(mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1(caspase 1, CASP1)、神经营养受体酪氨酸激酶 1(neurotrophic receptor tyrosine kinase 1, NTRK1);另 21 个间接靶点为髓性分化原发反应蛋白 88(myeloid differentiation primary response 88, MYD88)、IL-10、IL-17A、IL-1 β 、TLR2、TLR4、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,

表 2 牛黄组成成分的基本信息
Table 2 Information of components of *Calculus Bovis*

序号	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子量
1	oleanolic acid	508-02-1	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.70
2	ergosterol	57-87-4	C ₂₈ H ₄₄ O	396.65
3	ursolic acid	77-52-1	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.70
4	biliverdin	114-25-0	C ₃₃ H ₃₄ N ₄ O ₆	582.65
5	3-[2-[3-(2-carboxyethyl)-4-methyl-5-[(E)-(4-methyl-5-oxo-3-vinyl-2-pyrrolylidene)methyl]-1H-pyrrol-2-yl]methyl]-4-methyl-5-[(Z)-(3-methyl-5-oxo-4-vinyl-2-pyrrolylidene)methyl]-1H-pyrrol-3-yl]propanoic acid	93891-87-3	C ₃₃ H ₃₆ N ₄ O ₆	584.66
6	N-(3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-oyl)glycine	360-65-6	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	449.62
7	(2S)-2-[(2S,3S)-4-[3-[(1R)-1-(3,4-dihydroxybenzyl)-2-hydroxy-2-keto-ethoxy]-3-keto-propyl]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-carbonyl]oxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid	122021-74-3	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.61
8	methyl (4R)-4-[(3R,5S,7S,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoate	1448-36-8	C ₂₅ H ₄₂ O ₅	422.60
9	methyldeoxycholate	3245-38-3	C ₂₅ H ₄₂ O ₄	406.60
10	taurodeoxycholic acid	516-50-7	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	499.70
11	taurocholate	81-24-3	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	515.70
12	chenodeoxycholic acid	474-25-9	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392.57
13	cherianoine	-	C ₁₂ H ₁₃ NO ₄	235.24
14	methyl (4R)-4-[(3R,5S,7R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoate	25312-65-6	C ₂₅ H ₄₂ O ₄	406.60
15	deoxycholic acid	83-44-3	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392.57
16	ZINC01280365	64-85-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330.46
17	isogotamine	639-81-6	C ₃₃ H ₃₅ N ₅ O ₅	581.66
18	glycocholic acid	475-31-0	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	465.62
19	cholesterol	57-88-5	C ₂₇ H ₄₆ O	386.65
20	aspartic acid	6899-03-2	C ₄ H ₇ NO ₄	133.10
21	glycine	56-40-6	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07
22	alanine	56-41-7	C ₃ H ₇ NO ₂	89.09
23	methionine	3654-96-4	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.21
24	bilirubin	635-65-4	C ₃₃ H ₃₆ N ₄ O ₆	584.66
25	cholic acid	81-25-4	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408.57
26	leucine	61-90-5	C ₁₄ H ₁₉ NO ₄	265.30
27	vitamin D	67-97-0	C ₂₇ H ₄₄ O	384.64
28	glucuronic acid	6556-12-3	C ₆ H ₁₀ O ₇	194.14
29	arginine	142-49-4	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.20
30	palmitic acid	57-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.42
31	stearic acid	57-11-4	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.48
32	arachidonic acid	506-32-1	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.47
33	biliverdin	55482-27-4	C ₃₃ H ₃₄ N ₄ O ₆	582.65
34	lithocholic acid	434-13-9	C ₂₄ H ₄₀ O ₃	376.57
35	tauroursodesoxycholic acid	14605-22-2	C ₂₆ H ₄₄ NO ₆ S	498.70
36	glycochenodeoxycholate	640-79-9	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	449.62
37	taurochenodeoxycholic acid	516-35-8	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	499.70
38	ursodeoxycholic acid	128-13-2	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392.57
39	3 α ,12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholanolic acid	911-40-0	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	406.56



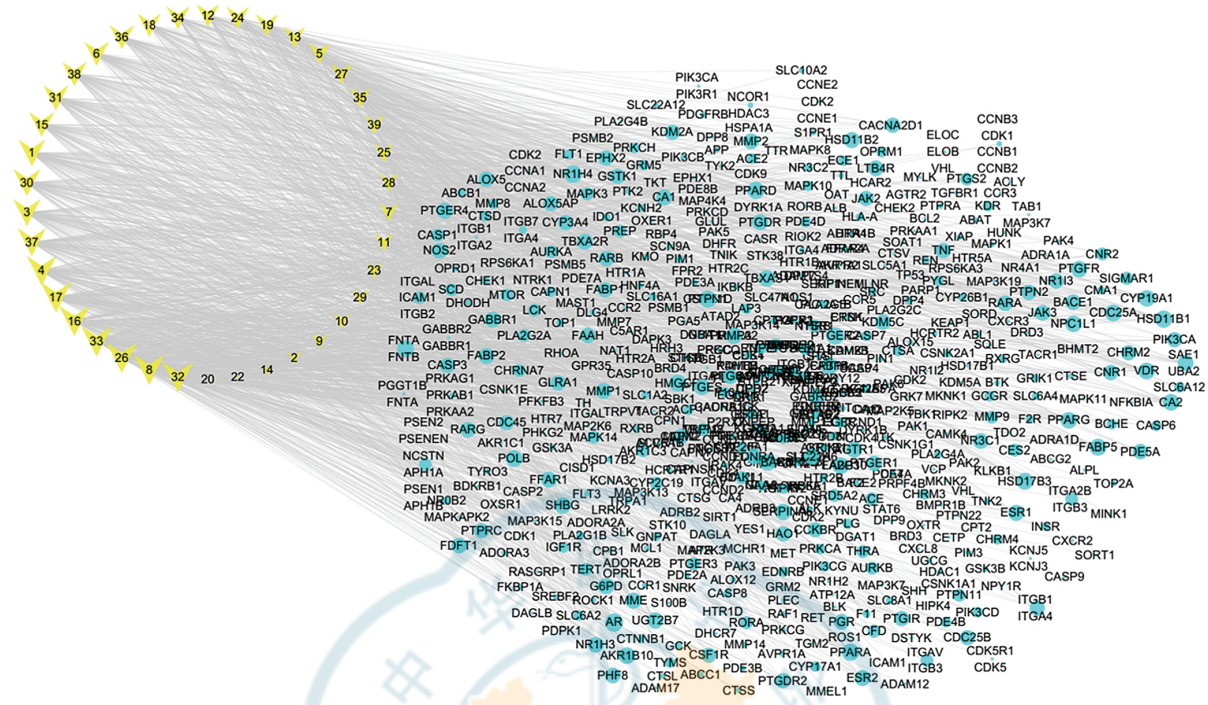


图 2 牛黄活性成分-预测靶点网络 黄色 V 字形表示活性成分,蓝色圆形表示预测靶点,大小随其度值变大而变大。阿拉伯数字为牛黄组成成分序号,具体见表 2。此网络图包含 38 个化合物节点、588 个靶点节点和 1 886 条活性成分-预测靶点联系

Figure 2 Active component-predicted target network of *Calculus Bovis* Yellow V shape indicated compounds and blue circles indicated predicted targets, which increased in size as their degree value increased. The numbers were the serial numbers of components as shown in Table 2. This network diagram contained 38 compound nodes, 588 target nodes and 1 886 active compound-predicted target edges

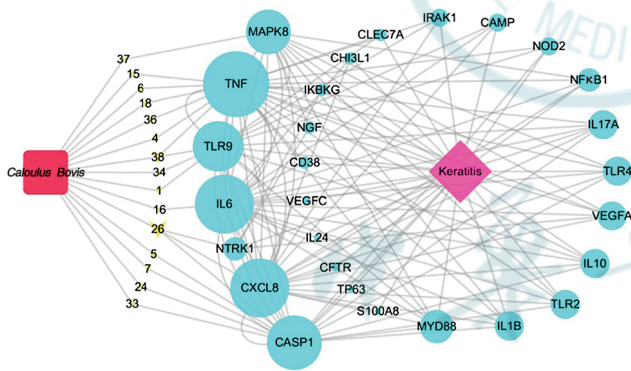


图 3 与角膜炎相关的牛黄活性成分-潜在靶点网络 红色方块代表中药牛黄,黄色 V 字形表示活性成分,蓝色圆形表示潜在靶点,粉色钻石形状代表角膜炎疾病。阿拉伯数字为牛黄组成成分序号,具体见表 2。图中 V 字形与圆形的大小与其度值成正比。网络包含 43 个总节点(含 15 个化合物节点和 28 个靶点节点),108 条活性成分-潜在靶点联系

Figure 3 Active component-potential target network of *Calculus Bovis* related to keratitis Red round rectangle indicated *Calculus Bovis*. Yellow V shape indicated active component. Blue circle indicated potential target. Pink diamond shape indicated keratitis. The numbers were the serial numbers of components as shown in Table 2. The sizes of V shape and circle were proportional to their degree values. This network diagram contained 43 nodes (including 15 compound nodes and 28 target nodes) and 108 active compound-predicted target edges

VEGF)-A、核因子 κ B 亚单位 1 (nuclear factor κ B subunit 1, NF κ B1)、组织蛋白酶抑制素型抗菌肽 (cathelicidin antimicrobial peptide, CAMP)、IL-1 受体相关激酶-1 (IL-1 receptor associated kinase 1, IRAK1)、核苷酸结合寡聚化结构域 2 (nucleotide binding oligomerization domain containing 2, NOD2)、CD38、类几丁质酶 3 蛋白 1 (CHI3L1)、C 型凝集素域 7 家族成员 A (CLEC7A)、NF κ B 激酶亚单位 γ 抑制子 (inhibitor of NF κ B kinase regulatory subunit gamma, IKBKG)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、囊性纤维化跨膜传导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)、IL-24、S100 钙结合蛋白 A8 (S100 calcium binding protein A8, S100A8)、肿瘤蛋白 p63 (tumor protein p63, TP63)、VEGF-C。

角膜炎相关的牛黄活性成分-潜在靶点网络中各靶点的度值显示,直接靶点 TNF 受 6 个牛黄成分作用,可与 23 个蛋白互相作用;直接靶点 CASP1 受 5 个牛黄成分作用,有 16 个互作蛋白;TLR9 受 3 个牛黄成分作用,互作蛋白有 15 个;直接靶点 CXCL8、IL-6、MAPK8、NTRK1 各受 1 个牛黄成分作用,互作蛋白数量分别为 23、23、13 和 3 个(表 3)。

表 3 与角膜炎相关的牛黄活性成分的潜在靶点
Table 3 Potential targets of active components of *Calculus Bovis* related to keratitis

基因名称	蛋白全称	度值	
		成分-靶点	互作蛋白
<i>TNF</i>	tumor necrosis factor	6	23
<i>CASP1</i>	caspase 1	5	16
<i>TLR9</i>	Toll-like receptor 9	3	15
<i>CXCL8</i>	C-X-C motif chemokine ligand 8	1	23
<i>IL-6</i>	interleukin 6	1	23
<i>MAPK8</i>	mitogen-activated protein kinase 8	1	13
<i>NTRK1</i>	neurotrophic receptor tyrosine kinase 1	1	3

2.4 GO 富集分析和 KEGG 信号通路富集分析

经 GO 富集分析,28 个靶点被注释入 12 项生物过程、18 项细胞组分、13 项分子功能(图 4)。经 KEGG 通路富集分析,28 个潜在靶点被富集入 10 条信号通路($P < 0.05$),每条信号通路所富集入的靶点数不小于 5 个,这 10 条信号通路为人巨细胞病毒感染(hsa05163)、阿米巴病(hsa05146)、抗叶酸耐受性

(hsa01523)、PI3K-Akt 信号通路(hsa04151)、类风湿性关节炎(hsa05323)、凋亡(hsa04210)、细胞因子-细胞因子受体相互作用(hsa04060)、疟疾(hsa05144)、非酒精性脂肪肝(hsa04932)、IL-17 信号通路(hsa04657)(表 4,图 5)。

2.5 牛黄治疗角膜炎的“成分-靶点-通路”网络

成分-靶点-通路网络包括 15 个活性成分、28 个潜在靶点及其所富集的 10 条 KEGG 信号通路,牛黄中去氢胆红素、甘氨脱氧胆酸、脱氧胆酸、甘氨胆酸、甘氨鹅去氧胆酸和熊脱氧胆酸共 6 种成分均可作用于同一个角膜炎靶点 TNF,靶点 TNF 可注释入 hsa05163、hsa05146、hsa01523、hsa05323、hsa04210、hsa04060、hsa05144、hsa04932、hsa04657 共 9 条 KEGG 信号通路中,表明多个成分可作用于同一靶点,同一靶点可参与多条信号通路;牛黄成分亮氨酸可作用于 CXCL8、CASP1、NTRK1 共 3 种靶点,其中 CXCL8 和 NTRK1 参与多条信号通路,CASP1 在本研究中没有富集入任何信号通路,但其与 TNF、TLR9、CXCL8 相互作用(图 6)。

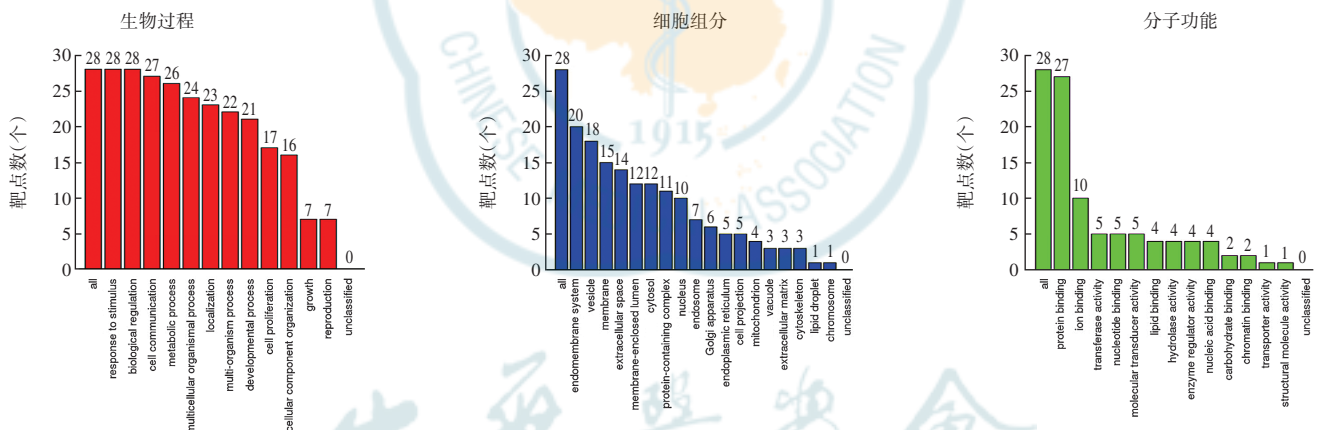


图 4 牛黄活性成分治疗角膜炎潜在靶点的 GO 功能富集分析

Figure 4 GO functional enrichment analysis of potential targets of active components of *Calculus Bovis* treating keratitis

表 4 牛黄活性成分治疗角膜炎潜在靶点富集的 KEGG 通路
Table 4 Enriched KEGG pathways for potential targets of active components of *Calculus Bovis* treating keratitis

编号	通路名称	靶点	P 值
hsa05163	human cytomegalovirus infection	IKBK, CXCL8, IL1B, IL6, TNF, NFκB1, VEGFA	<0.001
hsa05146	amoebiasis	IL10, CXCL8, IL1B, IL6, TNF, NFκB1, TLR4, TLR2	<0.001
hsa01523	antifolate resistance	IKBK, IL1B, IL6, TNF, NFκB1	<0.001
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	IKBK, NTRK1, IL6, NGF, NFκB1, VEGFA, TLR4, TLR2	0.001 6
hsa05323	rheumatoid arthritis	CXCL8, IL1B, IL6, TNF, VEGFA, TLR4, TLR2, IL17A	0.003 3
hsa04210	apoptosis	IKBK, NTRK1, NGF, TNF, NFκB1	0.006 6
hsa04060	cytokine-cytokine receptor interaction	IL10, CXCL8, IL1B, IL6, NGF, TNF	0.009 6
hsa05144	malaria	IL10, CXCL8, IL1B, IL6, TNF, TLR4, TLR2, TLR9, MYD88	0.010 1
hsa04932	non-alcoholic fatty liver disease	CXCL8, IL1B, IL6, TNF, NFκB1	0.011 4
hsa04657	IL-17 signaling pathway	IKBK, CXCL8, IL1B, IL6, TNF, NFκB1	0.025 5

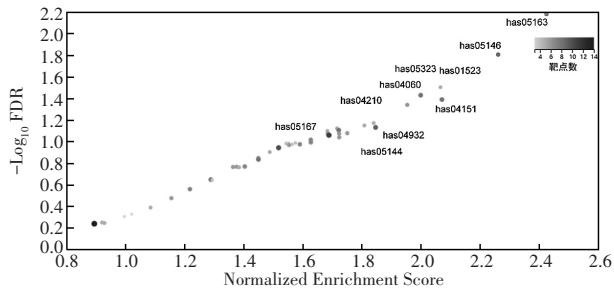


图 5 牛黄活性成分治疗角膜炎潜在靶点的 KEGG 信号通路富集分析 FDR: 错误发现率

Figure 5 KEGG pathway enrichment analysis of potential targets of active components of *Calculus Bovis* treating keratitis FDR: false discovery rate

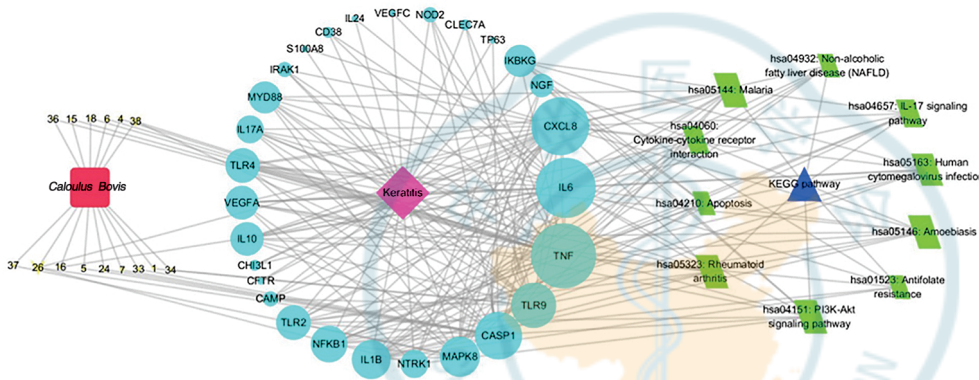


图 6 牛黄治疗角膜炎的“成分-靶点-通路”网络图 红色方块代表中药牛黄,黄色 V 形状表示活性成分,蓝色圆形表示潜在靶点,粉色钻石形状代表角膜炎疾病,绿色平行四边形表示信号通路,蓝色三角形代表 KEGG 通路。阿拉伯数字为牛黄组成成分序号,具体见表 2。图中形状的大小与其度值成正比。网络包含 53 个总节点,其中含 15 个化合物节点、28 个靶点节点、10 个通路节点,108 条节点联系

Figure 6 Component-target-pathway network of *Calculus Bovis* treating keratitis Red round rectangle indicated *Calculus Bovis*. Yellow V shape indicated active component. Blue circle indicated potential target. Pink diamond shape showed keratitis. Green parallelogram indicated signal pathways. Blue triangle indicated KEGG pathway. The numbers were the serial numbers of components as shown in Table 2. The sizes of the shapes were proportional to their degree values. This network diagram contained 53 nodes (including 15 compound nodes, 28 target nodes and 10 pathway nodes) and 108 edges of nodes

3 讨论

角膜炎是一种临床常见的眼科疾病,若治疗不及时易引发眼内炎、角膜穿孔等严重并发症,可出现角膜白斑、新生血管等后遗症,甚至致盲^[17]。临床上常根据所涉及病因将角膜炎划分为感染性、免疫性和药物性 3 种类型,治疗方法首选药物局部治疗,以消除病因、缓解症状为主。对感染性角膜炎致病病原的全面调查研究显示,致病病原种类复杂多样、地域差异显著、治疗预后较差,尤其是耐药性、多重耐药性致病病原的出现,使角膜炎诊治面临十分严峻的挑战,也使角膜炎发病机制繁杂不一、多变、更加不明确^[18]。综合现有研究报道,推测炎症、天然免疫反应及获得性免疫反应是各类角膜炎的共同反应,且贯穿发病始末。应用具有抗菌、抗炎、抗病毒或免疫调节作用的中药或其

复方或可改善临床症状,获得较好辅助治疗效果。牛黄具有抗炎、抗过敏、抗氧化应激作用,很可能具有治疗角膜炎的潜力。

本研究结果显示,现有数据库和文献中已分离鉴定 39 个牛黄组成成分,其中有 15 个成分可能是治疗角膜炎的活性成分;在 65 个角膜炎相关蛋白中,有 28 个为牛黄治疗角膜炎的潜在靶点,其中有 7 个直接作用靶点,即 TNF、CASP1、TLR9、CXCL8、IL-6、MAPK8、NTRK1。据报道,牛黄成分脱氧胆酸、去氧皮质酮具有镇静、抗惊厥、解热镇痛等中枢药理作用^[19],牛磺酸、鹅去氧胆酸、胆红素、胆绿素、甘氨酸胆酸等组分亦具有多种药理作用^[20]。研究表明,牛黄可通过降低 TNF 水平发挥抗炎、镇痛、抗心肌纤维化、保护血管内皮细胞、保护心脏、改善脂蛋白等多种药理作用,还可通过降低 IL-6 水平发挥抗炎、镇痛、改善脂蛋白作用^[21]。大量牛黄药理活性研究将 CASP1、IL-8、NF-κB、IL-1β、IL-17、IL-10 等用作检测的生化指标,以阐述牛黄的多重药理活性^[2]。另外有报道指出, TNF-α、IL-1β、IL-10、IL-8、IL-6、IL-17、CXCL10、CXCL2、VEGF-A、MYD88、NOD2、TLR2、TLR4、TLR9、IRAK、MMP-2、MMP-9 等与单纯疱疹性角膜炎、真菌性角膜炎直接相关^[22-23]。从靶点角度,以上研究从侧面证明牛黄可能对角膜炎有一定的治疗作用。

GO 分析结果显示,牛黄的潜在靶点具有蛋白结合的分子功能,是细胞内膜系统的细胞组分,主要参与刺激反应、生物调控、细胞间交流、代谢等多种生物过程,按其功能分为炎症反应、先天免疫、凋亡、炎症反应调控,推测牛黄治疗角膜炎的作用靶点涉及炎症反应、炎症调控、凋亡、免疫等多种作用。此外,本研究显示牛黄的潜在靶点富集于人巨细胞病毒感染、抗叶酸耐受性、PI3K-Akt 信号通路、类风湿性关节炎、凋亡、细胞因子-细胞因子受体相互作用、IL-17 信号通路等 10 条 KEGG 信号通路。据报道,牛黄通过多种机制发挥抗炎作用,包括抑制急性炎症渗出与白细胞趋化、抑制

蛋白间相互识别与作用、抑制白三烯和前列腺素产生、减少一氧化氮与组胺的合成及释放、干预炎症细胞因子风暴、调控糖皮质激素受体^[3],证实了牛黄参与细胞因子-细胞因子受体相互作用、IL-17 信号通路、凋亡、类风湿性关节炎等多种 KEGG 通路。另外有研究证实,牛黄对革兰阳性菌的抑制作用强于革兰阴性菌,并不同程度地抑制百日咳杆菌、白色念珠菌(真菌),甚至可直接灭活毒血症乙型脑炎病毒,提示牛黄对感染性角膜炎存在潜在治疗作用^[24-26]。网络药理学分析可从整体角度预测牛黄的活性成分、作用靶点、作用途径,为临床药物优化提供支持,但其在中药药效物质基础的阐释上仍存在高同质化、高偏倚性的缺陷^[27],未来需融合多种组学研究、动物实验等对结果进行验证,推动中医药现代化与中药物质基础研究。

综上所述,牛黄中的鹅去氧胆酸、甘氨胆酸、胆红素、胆绿素、熊脱氧胆酸等可能通过细胞因子-细胞因子受体相互作用、IL-17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、类风湿性关节炎、凋亡、人巨细胞病毒感染、抗叶酸耐受性等通路,作用于 TNF、CASP1、TLR9、CXCL8、IL-6、MAPK8、NTRK1 等靶点,发挥抗炎、抗菌、抗病毒、免疫调节、炎症调控等作用。因此,牛黄可能通过多成分、多靶点、多途径的作用网络发挥对感染性、外伤性及免疫源性角膜炎的治疗作用,为后续进一步开展实验研究及临床应用提供理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 莫国艳:采集数据、文章撰写及修改;陈吉军、罗继红:采集、整理数据;韩林涛:分析、解释数据;田代志:数据可视化;李杜军:酝酿、设计实验及审阅文章

志谢 感谢武汉大学生命科学院国家病毒重点实验室张祺老师提供指导与帮助,感谢湖北中医药大学中药资源与中药复方重点实验室全体教师协助,感谢湖北省中医院眼科全体医生、护士与工作人员的支持

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:26-173.
- [2] Yu ZJ, Xu Y, Peng W, et al. Calculus bovis: a review of the traditional usages, origin, chemistry, pharmacological activities and toxicology [J/OL]. J Ethnopharmacol, 2020, 254: 112649 [2022-05-25]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32068140>. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112649.
- [3] 李喜平, 张程亮, 刘东. 牛黄的现代研究(四): 药理作用[J]. 医药导报, 2017, 36(4): 355-360. DOI: 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.04.001.
Li XP, Zhang CL, Liu D. Modern research of *Calculus Bovis* (Fourth): pharmacological effects[J]. Herald Med, 2017, 36(4): 355-360. DOI: 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.04.001.
- [4] 贡献宇. 牛黄上清胶囊治疗麦粒肿经验[J]. 实用中西医结合临床, 2012, 12(4): 88-89. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4040.2012.04.061.
- [5] 李良长, 欧阳丽. 牛黄上清胶囊治疗细菌性角膜炎临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2010, 32(7): 19-20.
- [6] 欧阳丽. 体外培育牛黄治疗单纯疱疹病毒性角膜炎临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2014, 36(6): 39.
- [7] Li W, Yuan G, Pan Y, et al. Network pharmacology studies on the bioactive compounds and action mechanisms of natural products for the treatment of diabetes mellitus: a review [J/OL]. Front Pharmacol, 2017, 8: 74 [2022-06-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28280467>. DOI: 10.3389/fphar.2017.00074.
- [8] Piñero J, Bravo À, Queralt-Rosinach N, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D833-D839. DOI: 10.1093/nar/gkw943.
- [9] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D607-D613. DOI: 10.1093/nar/gky1131.
- [10] Kohl M, Wiese S, Warscheid B. Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks[J]. Methods Mol Biol, 2011, 696: 291-303. DOI: 10.1007/978-1-60761-987-1_18.
- [11] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498-2504. DOI: 10.1101/gr.1239303.
- [12] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J/OL]. J Cheminform, 2014, 6: 13 [2022-06-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735618>. DOI: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [13] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J/OL]. Sci Rep, 2017, 7: 42717 [2022-06-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28256516>. DOI: 10.1038/srep42717.
- [14] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364. DOI: 10.1093/nar/gkx382.
- [15] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Web Server issue): W32-W38. DOI: 10.1093/nar/gku293.
- [16] Wang J, Vasaiakar S, Shi Z, et al. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W130-W137. DOI: 10.1093/nar/gkx356.
- [17] 徐继红, 付昱, 陈明扬, 等. 无环鸟苷、阿托品联合维生素 C 注射剂治疗角膜炎、角膜溃疡 [J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2018, 36(3): 209-211. DOI: 10.15926/j.cnki.issn1672-688x.2018.03.012.
Xu JH, Fu Y, Chen MY, et al. Acyclovir and atropine combined with vitamin C injection in treatment keratitis and corneal ulcer [J]. J Henan Univ Sci Tech (Med Sci), 2018, 36(3): 209-211. DOI: 10.15926/j.cnki.issn1672-688x.2018.03.012.
- [18] 龚桦, 谭奕炜, 龚向明, 等. 中国华南地区真菌性角膜炎致病菌谱变化 [J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(2): 161-164. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.014.
Gong H, Tan YW, Gong XM, et al. Spectrum of fungal keratitis in South China [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(2): 161-164. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.014.
- [19] 马颖, 程紫嫣, 王博龙. 基于 BATMAN-TCM 在线分析平台研究牛黄药理机制 [J]. 邵阳学院学报: 自然科学版, 2019, 16(1): 89-97.
Ma Y, Cheng ZY, Wang BL. The pharmacological mechanism of calculus bovis was studied based on the BATMAN-TCM online analysis platform [J]. J Shaoyang Univ (Natural Science Edition), 2019, 16(1): 89-97.
- [20] 黄漠然, 赵文靖, 李晋生, 等. 牛黄及其代用品化学成分、分析方法和药理作用研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(7): 1116-1123. DOI: 10.16155/j.0254-1793.2018.07.03.

- Huang MR, Zhao WJ, Li JS, et al. Research advance of chemical constituents, analytical methods and pharmacological effects of cow-bezoar and its substitutes [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38 (7) : 1116-1123. DOI:10.16155/j.0254-1793.2018.07.03.
- [21] 吴涛, 张程亮, 蔡红娇, 等. 牛黄及体外培育牛黄的药理作用研究进展[J]. 中国药师, 2014, 17(8) : 1396-1399.
- Wu T, Zhang CL, Cai HJ, et al. Study progress in pharmacological actions of *Calculus Bovis* and *Calculus Bovis Sativus* [J]. China Pharm, 2014, 17(8) : 1396-1399.
- [22] 曹楠珏, 夏丽坤. 单纯疱疹性角膜炎发病机制的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(2) : 175-179. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.017.
- Cao NJ, Xia LK. Research progress in pathogenesis of herpes simplex keratitis [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(2) : 175-179. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.017.
- [23] 王露萍, 吴欣怡. Toll 样受体在真菌性角膜炎中的调控作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(10) : 953-956. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.019.
- Wang LP, Wu XY. Regulation of Toll-like receptors in fungal keratitis [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(10) : 953-956. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.019.
- [24] Zang QC, Wang JB, Kong WJ, et al. Searching for the main anti-bacterial components in artificial *Calculus bovis* using UPLC and microcalorimetry coupled with multi-linear regression analysis [J]. J Sep Sci, 2011, 34(23) : 3330-3338. DOI:10.1002/jssc.201100500.
- [25] 滕飞, 陈壮志, 张云, 等. 动物源类药物治疗真菌感染类疾病的历史与展望[J]. 广州化工, 2016, 44(12) : 15-22.
- Teng F, Chen ZZ, Zhang Y, et al. History and prospective of animal derived drugs for treatment of fungal infections diseases [J]. Guangzhou Chem Ind, 2016, 44(12) : 15-22.
- [26] 付本懂, 张继东, 钟秀会, 等. 牛黄药理学研究进展[J]. 中兽医学杂志, 2003, (2) : 29-32.
- [27] 曾鹏, 周航. 网络药理学“异病-异方”关键成分筛选同质化现象思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(18) : 177-191. DOI:10.13422/j.cnki.syfx.20221114.
- Zeng P, Zhou H. Homogenization of key components screening of “different disease and different prescriptions” in network pharmacology [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(18) : 177-191. DOI:10.13422/j.cnki.syfx.20221114.

(收稿日期:2022-07-25 修回日期:2023-01-20)

(本文编辑:张宇)

消息

《眼底病人工智能研究》正式出版

由南京医科大学附属眼科医院院长蒋沁教授、暨南大学附属深圳眼科医院院长张少冲教授担任顾问,南京航空航天大学万程副教授、江苏省医疗器械检验所钱湧高级工程师、南京医科大学附属眼科医院杨卫华主任共同主编的《眼底病人工智能研究》一书于 2022 年 7 月由湖北科学技术出版社正式出版发行。

眼科疾病尤其是眼底病的诊断以影像学表现为主,眼部图像精细复杂,医生需要结合丰富的理论知识与临床经验做出诊断。而人工智能在图像识别、自动诊断、大数据分析等方面优势显著,可用于诊断眼底病,能极大地减轻医生压力,有助于解决医疗资源供需失衡的问题。

该书是眼底病人工智能研究领域的第一本专著,共分为八个章节,主要从常见眼底病和影像检查、眼底病人工智能概况、眼底图像人工智能算法框架、眼底图像质量分析、眼底病的人工智能研究、眼底图像分割、基于眼底彩照的人工智能诊断平台、眼底病人工智能应用现状和展望等方面进行说明。该书紧密联系眼底病临床实际工作,向读者介绍了眼底病人工智能方面的基础知识、工作中的实际应用情况以及未来展望,适合眼科医生、人工智能眼科研究人员阅读。

该书为 16 开精装彩色印刷本,共 200 页,全书共 293 千字,定价 98.00 元。

(本刊编辑部)



读者·作者·编者

本刊对论文题目的要求

论文题目力求简洁、特异、明确,能准确反映文章主题和特定内容,具有可检索性。中文文题一般以 20 个汉字以内为宜,一般不设副标题,尽量不用标点符号,文题中避免使用不为同行熟知的符号、简称、缩略语和商品名。论著文章和综述须有与中文文题含意一致的英文文题。

(本刊编辑部)