

应用网络药理学探索丹参对近视的作用靶点及验证

路小楠¹ 李杰¹ 安广琪² 刘珍慧¹ 梁春雨² 戴淑真¹

¹河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 郑州大学人民医院, 郑州 450003; ²郑州大学第一附属医院眼科 郑州大学眼底病研究所, 郑州 450000

通信作者: 戴淑真, Email: dsz997300056@163.com

【摘要】 **目的** 应用网络药理学和分子对接技术探索丹参在近视中的作用靶点并验证。 **方法** 采用 TCMSp 数据库提取丹参作用靶点, 采用 GeneCards、DisGeNET、Malacard 和 OMIM 数据库提取近视相关靶点并取交集。选取交集靶点提取对应中药活性成分, 采用 Cytoscape 构建中药药理调控网络。采用 String 数据库对关键靶点基因构建蛋白质互作网络图, 选取相关蛋白从 PubChem 数据库下载活性成分的三维结构, 采用 AutoDockvina 软件进行分子对接。选取清洁级 3 周龄三色豚鼠 12 只, 右眼采用透镜离焦诱导型近视 (LIM) 进行实验性近视诱导, 采用计算机随机数法将其分为生理盐水和丹参素钠组, 每组 6 只, 分别在 LIM 维持同时每天球周注射 1 ml 生理盐水或丹参素钠, 对侧眼为阴性对照。实验第 0、14、28 天采用 A 型超声测量眼轴长度, 采用带状光检影镜检测屈光度。为规避个体差异, 采用相对等效球镜度数 (处理眼等效球镜度数-对侧眼等效球镜度数)、相对眼轴长度 (处理眼眼轴长度-对侧眼眼轴长度) 比较。实验第 28 天, 采用 Western blot 法检测缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 和转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 蛋白相对表达量。 **结果** 筛选出近视与源自丹参的中药成分靶点交集关键靶点 16 个, 构建以丹参为候选药物的中药网络药理图和蛋白质互作图, 筛选出基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、TGF β 1、MMP9 靶点基因的对应蛋白可与木犀草素、丹参素、丹参酮 II A 等活性成分进行分子对接。诱导后 14 d, 丹参素钠组和生理盐水组相对等效球镜度分别为 (-4.67 \pm 1.03) 和 (-6.30 \pm 1.22)D, 相对眼轴长度分别为 (0.67 \pm 0.26) 和 (1.08 \pm 0.34)mm, 丹参素钠组近视程度加深较轻, 眼轴长度增长较少, 差异均有统计学意义 ($t=2.412, P=0.039; t=2.750, P=0.049$)。阴性对照组、生理盐水组和丹参素钠组 HIF-1 α 蛋白相对表达量分别为 0.20 \pm 0.01、1.29 \pm 0.05 和 0.63 \pm 0.02, TGF- β 1 蛋白相对表达量分别为 0.93 \pm 0.05、0.25 \pm 0.01 和 0.74 \pm 0.05, 其中丹参素钠组 HIF-1 α 蛋白相对表达量高于阴性对照组, 低于生理盐水组, TGF- β 1 蛋白相对表达量低于阴性对照组, 高于生理盐水组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。 **结论** 源于丹参提取的天然化合物可作为抗巩膜缺氧和改善巩膜细胞外基质重塑的潜在候选药物。

【关键词】 近视; 巩膜重塑; 网络药理学; 丹参; 缺氧

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20231209-00205

Targets and validation of *Salvia miltiorrhiza* in myopia through network pharmacology

Lu Xiaonan¹, Li Jie¹, An Guangqi², Liu Zhenhui¹, Liang Chunyu², Dai Shuzhen¹

¹Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou 450003, China; ²Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou University Fundus Disease Institute, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: Dai Shuzhen, Email: dsz997300056@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore and validate the targets of *Salvia miltiorrhiza* in myopia using network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The TCMSp database was used to extract the targets of *Salvia miltiorrhiza*. GeneCards, DisGeNET, Malacard and OMIM databases were used to extract the myopia-related targets. The target intersection was taken, and the intersecting targets were selected to extract the corresponding active ingredients of traditional Chinese medicine (TCM) and construct the pharmacological regulatory network of TCM using Cytoscape. The protein interaction network map for the key target genes was constructed using the String database, and the relevant proteins were selected to download the three-dimensional structures of the active ingredients from the PubChem database, and molecular docking was performed using AutoDockvina software. Twelve 3-week-old

guinea pigs were induced with lens-induced myopia (LIM) in the right eye and randomly divided into normal saline group and sodium danshensu group, with 6 animals in each group. During the maintenance of LIM, periocular injection of 1 ml normal saline or sodium danshensu was performed daily. The contralateral eye was used as a negative control. On days 0, 14, and 28 of the experiment, the axial length of both eyes was measured by A-scan ultrasonography, and the refractive status was assessed with a streak retinoscope. To avoid individual differences, relative spherical equivalent (treated eye-contralateral eye) and relative axial length (treated eye-contralateral eye) were compared. On day 28, the relative expression levels of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) proteins were determined by Western blot. The feeding and use of laboratory animals followed the 3R principle, and the research program was approved by the Ethics Committee of Experimental Animal Center of Zhengzhou University (No. ZZU-LAC 202320405[02]).

Results Sixteen intersecting key targets were screened for myopia and TCM components derived from *Salvia divinorum*. A TCM network pharmacology map and protein interaction map were constructed with *Salvia divinorum* as a drug candidate, and the corresponding proteins of target genes, such as *MMP2*, *TGFB1*, and *MMP9* were screened to perform molecular docking with the active ingredients, such as lignocellulosic acid, danshensu, tanshinone II A, and so on. After 14 days of induction, the relative spherical equivalent and relative axial length were $(-4.67 \pm 1.03)D$ and $(0.67 \pm 0.26)mm$ in sodium danshensu group, and $(-6.30 \pm 1.22)D$ and $(1.08 \pm 0.34)mm$ normal saline group, indicating slower myopia progression and axial elongation in sodium danshensu group, and the differences were statistically significant ($t=2.412, P=0.039$; $t=2.750, P=0.049$). The relative expression levels of HIF-1 α protein were $0.20 \pm 0.01, 1.29 \pm 0.05$ and 0.63 ± 0.02 , and the relative expression levels of TGF- β 1 protein were $0.93 \pm 0.05, 0.25 \pm 0.01$ and 0.74 ± 0.05 in the negative control, normal saline and sodium danshensu groups, respectively. The expression of HIF-1 α protein was higher in sodium danshensu group than in negative control group but lower than in the normal saline group, and the expression of TGF- β 1 protein was lower in sodium danshensu group than in negative control group but higher than in the normal saline group, showing statistically significant differences (all at $P<0.05$).

Conclusions Natural compounds extracted from *Salvia divinorum* extracts may serve as potential drug candidates to combat scleral hypoxia and improve scleral extracellular matrix remodeling.

[Key words] Myopia; Sclera remodeling; Network pharmacology; *Salvia miltiorrhiza*; Hypoxia

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20231209-00205

据世界卫生组织报道,2020 年世界 30% 的人口罹患近视,预计到 2050 年近视患病率将上升至 50%^[1]。近视在东亚和东南亚国家发病率更高,在受教育的青年人中可达 70%~90%^[2]。随着人们生活方式改变等因素的影响,近视发病逐渐呈现低龄化,亟需安全有效的防控手段^[3]。近视的主要表现之一是眼轴伸长,而眼轴过度延伸导致的病理性近视已成为重要的致盲眼病^[4]。眼轴的过度伸长往往伴随着巩膜变薄,巩膜是维持眼球形态的重要组织。既往研究表明,巩膜细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重塑和 ECM 成分的改变影响巩膜框架结构,这与生长因子信号通路、金属蛋白酶等的表达有关^[5]。近年来,全基因组关联分析表明人类近视风险基因与缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 信号通路中基因相互作用^[6];此外,巩膜重塑机制的研究表明近视动物模型中 HIF-1 α 表达上调;这些研究表明巩膜缺氧影响巩膜 ECM 成分表达,是近视机制中的关键环节^[7-8]。抗巩膜缺氧治疗成为未来近视控制的可行方法。改善缺氧的红景天苷和芒柄花素可以通过下调 HIF-1 α 表达以

影响后续 ECM 中蛋白表达,从而抑制近视发展^[7]。传统医学认为中药丹参具有活血散淤、消肿生新、扩张冠状动脉、改善心肌缺血等作用^[9-10]。既往研究表明,丹参的多种活性成分,如丹参酮 I、丹参酮 II A、丹参素等可通过下调 HIF-1 α 改善不同组织缺氧状态,具有良好的抗缺氧、抗炎作用^[4,11-12]。本研究利用网络药理学方法探索丹参不同活性成分对近视的作用靶点,探讨丹参控制近视的潜在靶点和途径,并利用近视动物模型进行验证,以期后续控制近视的药物研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物来源 选取清洁级 3 周龄三色豚鼠 12 只,雌雄不限,体质量 $(124 \pm 13)g$,购自并饲养于郑州大学实验动物中心。于室温 $(25 \pm 2)^\circ C$ 、相对湿度 45%~55% 环境中昼夜交替饲养,豚鼠自由进水和摄食。实验动物的喂养和使用遵循 3R 原则,研究方案经郑州大学实验动物中心伦理委员会批准(批文号: ZZU-LAC 202320405[02])。

1.1.2 主要试剂及仪器 丹参素钠溶液(5 mg/ml, S817895, 上海麦克林生化科技有限公司); 盐酸奥布卡因滴眼液、复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社); RIPA(含 PMSF)高效裂解液(R0010, 北京索莱宝科技有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒(PT0001, 北京雷根生物技术有限公司); 兔抗 HIF-1 α 抗体、兔抗转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)抗体(美国博士德生物技术有限公司); 兔抗 β -actin 抗体(美国 Proteintech 有限公司); HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(美国 Invitrogen 公司); WB 显影液(BL161A, 合肥白鲨生物科技有限公司)。非球面凹透镜(-10.0 D, PMMA 材质, 南阳市晶亮光电科技有限公司); 眼科 A/B 型超声诊断仪(ODM-2200, 天津迈达医学科技股份有限公司); 带状光检影镜(YZ24, 苏州六六视觉科技股份有限公司); 荧光成像系统(ChemiDoc XRS, 美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 活性成分和疾病靶点获取、关键靶点筛选及中药药理调控网络图的构建 采用 TCMSP(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)数据库对丹参的靶点进行收集,并设定口服利用度>30 来筛选活性成分。采用 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET(<https://www.disgenet.org/search>)、Malacard(<https://www.malacards.org/>)和 OMIM(<http://www.omim.org>)检索近视相关靶点,筛选时对 GeneCards 中的数据设定阈值 Relevance.score>3。对获取的活性成分靶点基因、疾病靶点基因取交集。选取交集靶点提取对应中药活性成分,使用 Cytoscape(version3.8.2)进行可视化,构建中药药理调控网络。

1.2.2 蛋白质互作网络的构建和分子对接 采用 String(<https://string-db.org/>)数据库对候选关键靶点基因构建蛋白质互作网络图,使用 cytohubba 对网络各个节点的 degree 进行计算,并对所有节点进行排序,对排序前 3 的关键基因靶点进行分子对接。

从 PDB(<https://www.rcsb.org/>)数据库中下载靶点对应蛋白分子对应的晶体结构,从 PubChem 数据库下载活性成分的三维结构,采用 AutoDockvina 软件(V.1.1.2)进行分子对接。选取对接结合能小于 -1.2 kcal/mol、20 次对接结合能最低的构象绘制。采用 PyMol(V.2.1.4)软件进行可视化及美化。

1.2.3 豚鼠近视模型的制作及表型观察 选取右眼建立透镜离焦诱导型近视(lens-induced myopia, LIM)模型,采用魔术贴将 -10.0 D 透镜固定于豚鼠右眼,以不压迫眼球、不影响眼睑运动为佳,每 6 h 清洁镜片

1 次以保证镜片清晰。诱导后 14 d,采用计算机随机数法将上述豚鼠分为生理盐水组和丹参素钠组,每组 6 只,分别在 LIM 维持同时每天球周注射 1 ml 生理盐水或丹参素钠溶液。丹参素钠组豚鼠自然死亡 1 只。上述对侧眼为非诱导眼,作为阴性对照组。为规避个体差异,采用相对等效球镜度数(处理眼等效球镜度数-对侧眼等效球镜度数)、相对眼轴长度(处理眼眼轴长度-对侧眼眼轴长度)比较。处理后 0、14、28 d,用盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉豚鼠,采用 A 型超声测量眼轴长度;复方托吡卡胺滴眼液充分扩瞳后采用带状光检影镜检测屈光度,双检双录取平均值。

1.2.4 Western blot 法检测 HIF-1 α 和 TGF- β 1 蛋白相对表达量 诱导后第 28 天,采用断颈法处死豚鼠,各组随机取 3 只摘取眼球并分离视网膜-脉络膜-巩膜复合体,将组织于冰上剪切为 1 mm \times 1 mm 小块,磷酸盐缓冲液清洗后称质量,加入 3 倍体积 RIPA(含 PMSF)高效裂解液充分裂解。离心半径 8 cm,4 $^{\circ}$ C 条件下 16 000 r/min 离心 10 min,离心后将上清液吸入到新的离心管中,置于冰上备用。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶 90 V 电泳 2 h,200 mA 转印至 PVDF 膜 1.5 h,5%脱脂奶粉封闭液封闭 1 h。HIF-1 α 、TGF- β 1、 β -actin(均 1:1 000 稀释)一抗室温孵育过夜,HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)孵育 1 h;加入 WB 显影液,采用荧光成像系统显影条带。采用 ImageJ 进行灰度分析。以 β -actin 为内参,计算各目的蛋白相对表达量。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/内参条带灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析。测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组不同时间点等效球镜度数和眼轴长度比较采用重复测量两因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;生理盐水组与丹参素钠组相对等效球镜度、相对眼轴长度、HIF-1 α 和 TGF- β 1 蛋白相对表达量比较采用独立样本 *t* 检验;阴性对照组与丹参素钠组 HIF-1 α 和 TGF- β 1 蛋白相对表达量比较采用配对 *t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药物活性成分和疾病靶点与关键靶点及中药药理调控网络

从 TCMSP 数据库共筛选出丹参活性成分靶点 301 个;从 GeneCards、DisGeNET、Malacard、OMIM 数据

库筛选出 358 个近视相关靶点。对活性成分靶点基因、疾病靶点基因取交集,得到 16 个候选关键靶点基因。将交集靶点对应的活性成分提取出来,构建中药药理调控网络,网络共包含了 1 种中药、44 种活性成分和 16 个候选关键靶点,共构成 100 条相互关系作用对(图 1A,B)。

2.2 蛋白质互作网络和核心靶点分子对接

使用 16 个候选关键靶点基因构建蛋白质互作网络图,共计有 I 型胶原蛋白 α 链(type I collagen alpha chain, COL1A1)、COL18A1、MMP2、TGF- β 1 等 53 个蛋白相互作用对(图 1C)。排序前 3 的关键基因靶点基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)、TGFB1 和 MMP9 相互作用。

MMP2、TGF- β 1、MMP9 及与复方中口服利用度最高的对应活性成分进行分子对接,关键活性成分与关键靶点对接结果显示分子结合力均 ≤ -5 kcal/mol,说明关键活性成分与关键靶点的对接较好(表 1)。

分子名称	蛋白质名称	PDB/AlphaFold ID	分子结合力(kcal/mol)
木犀草素	MMP2	1ck7	-8.9
丹参酮 II A	MMP9	1gkc	-8.2
丹参素	TGF- β 1	1kla	-5.6

注: MMP:基质金属蛋白酶;TGF:转化生长因子
Note: MMP:matrix metalloproteinase;TGF:transforming growth factor

2.3 各组等效球镜度数和眼轴长度比较

诱导眼组与非诱导眼组不同时间点等效球镜度和眼轴长度总体比较差异均有统计学意义(等效球镜度: $F_{组别} = 25.540, P < 0.001; F_{时间} = 112.840, P < 0.001$ 。眼轴长度: $F_{组别} = 66.706, P < 0.001; F_{时间} = 26.965, P < 0.001$),其中各组诱导后 14 和 28 d 近视程度均较 0 d 时加深,眼轴长度均长于 0 d;诱导后 14 和 28 d,诱导眼组近视程度均较非诱导眼组加深,眼轴长度长于非诱导眼组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)(表 2,3)。

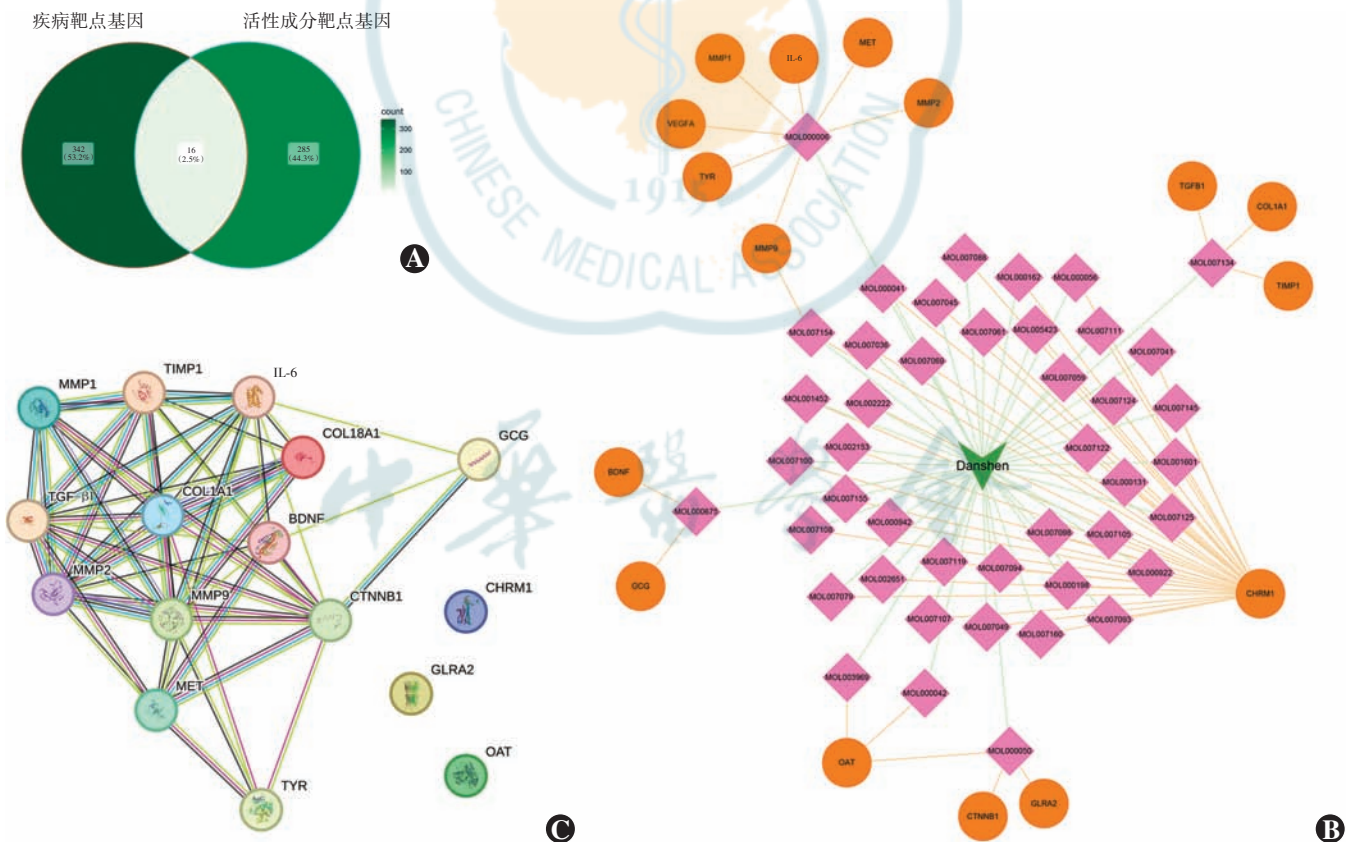


图 1 丹参与近视的网络药理学分析 A:关键靶点基因韦恩图 301 个丹参活性成分靶点与 358 个近视相关靶点取交集,得出 16 个关键靶点 B:重要中药药理调控网络图的构建 网络共包含了 1 种中药、44 种活性成分和 16 个候选关键靶点,共构成 100 条相互关系作用对 C:蛋白质互作网络图 包括 COL1A1、COL18A1、MMP2、TGF- β 1 等 53 个蛋白相互作用对 COL1A1: I 型胶原蛋白 α 链;MMP:基质金属蛋白酶;TGF:转化生长因子;IL:白细胞介素

Figure 1 Network pharmacology analysis of *Salvia miltiorrhiza* in myopia A: Venn diagram of key target genes An intersection of 301 *Salvia miltiorrhiza* active component targets and 358 myopia-related targets revealed 16 key targets B: Construction of an important pharmacological regulation network The network diagram contained 1 traditional Chinese medicine, 44 active ingredients, and 16 key target candidates, representing 100 mutual interaction pairs C: Protein interaction network The network diagram contained interaction pairs among 53 proteins such as COL1A1, COL18A1, MMP2, TGF- β 1 etc. COL1A1: type I collagen alpha chain; MMP: matrix metalloproteinase; TGF: transforming growth factor; IL: interleukin

球周注射后 14 d,丹参素钠组和生理盐水组相对等效球镜度分别为(-4.67±1.03)和(-6.30±1.22)D,差异有统计学意义($t=2.412, P=0.039$);相对眼轴长度分别为(0.67±0.26)和(1.08±0.34)mm,差异有统计学意义($t=2.750, P=0.049$)。

2.4 各组 HIF-1 α 和 TGF- β 1 蛋白相对表达量比较

与阴性对照组相比,生理盐水组 HIF-1 α 表达条带增强,TGF- β 1 表达条带减弱;丹参素钠组 HIF-1 α 和 TGF- β 1 表达条带强度均介于生理盐水组和阴性对照组之间(图 2)。丹参素钠组 HIF-1 α 蛋白相对表达量高于阴性对照组,TGF- β 1 蛋白相对表达量低于阴性对照组,差异均有统计学意义($t=-78.624, 10.587$, 均 $P<0.05$)(表 4)。丹参素钠组 HIF-1 α 蛋白相对表达量低于生理盐水组,TGF- β 1 蛋白相对表达量高于生理盐水组,差异均有统计学意义($t=20.799, -17.515$, 均 $P<0.05$)(表 5)。

表 2 诱导眼组与非诱导眼组不同时间点等效球镜度比较 ($\bar{x}\pm s, D$)

Table 2 Comparison of spherical equivalent at various time points between two groups ($\bar{x}\pm s, D$)

组别	眼数	不同时间点等效球镜度数		
		0 d	14 d	28 d
非诱导眼组	11	+2.25±0.92	+0.13±0.57 ^a	-0.06±0.52 ^a
诱导眼组	11	+2.35±0.73	-4.56±1.25 ^{ab}	-5.48±1.48 ^{ab}

注: $F_{\text{组别}} = 25.540, P<0.001$; $F_{\text{时间}} = 112.840, P<0.001$; $F_{\text{交互作用}} = 62.500, P<0.001$ 。与同组 0 d 比较, ^a $P<0.001$; 与非诱导眼组比较, ^b $P<0.001$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验)
 Note: $F_{\text{group}} = 25.540, P<0.001$; $F_{\text{time}} = 112.840, P<0.001$; $F_{\text{interaction}} = 62.500, P<0.001$ 。Compared with respective 0 day, ^a $P<0.001$; compared with non-induced eye group, ^b $P<0.001$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD- t test)

表 3 诱导眼组与非诱导眼组不同时间点眼轴长度比较 ($\bar{x}\pm s, mm$)

Table 3 Comparison of axial length at various time points between two groups ($\bar{x}\pm s, mm$)

组别	眼数	不同时间点眼轴长度		
		0 d	14 d	28 d
非诱导眼组	11	7.21±0.14	7.84±0.18 ^a	8.20±0.21 ^a
诱导眼组	11	7.21±0.12	8.46±0.29 ^{ab}	9.05±0.35 ^{ab}

注: $F_{\text{组别}} = 66.706, P<0.001$; $F_{\text{时间}} = 26.965, P<0.001$; $F_{\text{交互作用}} = 300.720, P<0.001$ 。与同组 0 d 比较, ^a $P<0.001$; 与非诱导眼组比较, ^b $P<0.001$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验)
 Note: $F_{\text{group}} = 66.706, P<0.001$; $F_{\text{time}} = 26.965, P<0.001$; $F_{\text{interaction}} = 300.720, P<0.001$ 。Compared with respective 0 day, ^a $P<0.001$; compared with non-induced eye group, ^b $P<0.001$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD- t test)

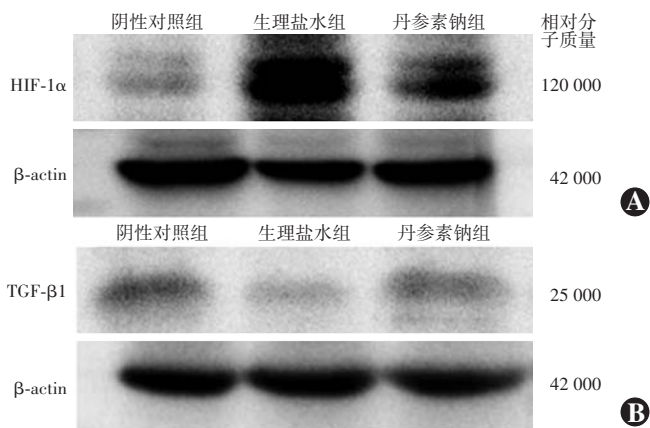


图 2 各组豚鼠视网膜-脉络膜-巩膜复合体 HIF-1 α 和 TGF- β 1 蛋白表达电泳图 与阴性对照组相比,生理盐水组 HIF-1 α 表达条带增强,TGF- β 1 表达条带减弱,丹参素钠组 HIF-1 α 和 TGF- β 1 表达条带强度均介于生理盐水组和阴性对照组之间 A: HIF-1 α B: TGF- β 1 HIF: 缺氧诱导因子; β -actin; β -肌动蛋白; TGF: 转化生长因子

Figure 2 Electrophoretogram of HIF-1 α and TGF- β 1 protein expression in retina-choroid-sclera complex of guinea pigs in three groups Compared with the negative control group, the expression band of HIF-1 α was enhanced and the expression band of TGF- β 1 was weakened in the normal saline group. The expression bands intensity of HIF-1 α and TGF- β 1 in the sodium danshensu group were between the normal saline group and the negative control group A: HIF-1 α B: TGF- β 1 HIF: hypoxia-inducible factor; TGF: transforming growth factor

表 4 阴性对照组与丹参素钠组 HIF-1 α 和 TGF- β 1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of relative expression of HIF-1 α and TGF- β 1 proteins between negative control and sodium danshensu groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	HIF-1 α	TGF- β 1
阴性对照组	3	0.20±0.01	0.93±0.05
丹参素钠组	3	0.63±0.02	0.74±0.05
t 值		-78.624	10.587
P 值		<0.001	0.009

注: (配对样本 t 检验) HIF: 缺氧诱导因子; TGF: 转化生长因子
 Note: (Paired samples t -test) HIF: hypoxia-inducible factor; TGF: transforming growth factor

表 5 生理盐水组与丹参素钠组 HIF-1 α 和 TGF- β 1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of relative expression of HIF-1 α and TGF- β 1 proteins between normal saline and sodium danshensu groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	HIF-1 α	TGF- β 1
生理盐水组	3	1.29±0.05	0.25±0.01
丹参素钠组	3	0.63±0.02	0.74±0.05
t 值		20.799	-17.515
P 值		0.001	<0.001

注: (独立样本 t 检验) HIF: 缺氧诱导因子; TGF: 转化生长因子
 Note: (Independent samples t -test) HIF: hypoxia-inducible factor; TGF: transforming growth factor

3 讨论

巩膜重塑在近视的发生和发展进程中起到至关重要的作用,近视发展进程中主要的形态变化是眼轴过度伸长。目前,近视防控的主要策略是控制眼轴增长,即影响巩膜重塑^[13]。基于人群的研究表明,脉络膜血流灌注影响近视的进展^[14];全基因组关联分析和连锁分析证实,近视风险基因与 HIF-1 α 信号通路中的基因相互作用,即与缺氧相关^[7];此外,实验研究证实近视动物巩膜中选择性诱导 HIF-1 α 表达上调,是近视发生的重要因素^[8]。因此,针对改善巩膜缺氧的药物是未来近视防控的重要研究方向^[15]。

丹参是常用的扩张冠状动脉的中药,针对丹参抗缺氧的机制研究显示,丹参的多种提取物,如丹参酮、丹参素等可通过多种通路改善心脏、肺、肾脏等多种器官的血供和细胞缺氧状态,并具有抗炎、改善缺血-再灌注损伤的作用^[9]。基于以上研究,考虑具有改善缺氧、增加血流灌注的丹参可以作为控制近视的候选药物,而单味中药往往包含复杂的化合物成分,明确丹参中不同成分中药单体对近视的作用靶点有助于后续药物的筛选及作用分析。

本研究应用网络药理学和分子对接明确丹参和近视的相互作用靶点,主要集中在 *MMP2*、*TGF β 1*、*MMP9* 基因,并未筛查到 *HIF-1 α* 基因,因为 *HIF-1 α* 基因在近视数据库中尚未收录,这有待于未来进一步的近视基因测序研究和数据库的丰富。但本研究证实,*MMP2*、*TGF β 1*、*MMP9* 基因表达均与 ECM 重塑相关。

MMP 家族是一组含有 Zn²⁺ 的蛋白水解酶,作用于 ECM,参与组织修复和纤维化等生物过程^[16]。MMP2 可降解 I 型胶原纤维,而 I 型胶原纤维是巩膜的主要成分,*MMP2* 基因表达的增加可引起 I 型胶原纤维降解,眼轴延长^[17-18]。根据网络药理学研究结果,木犀草素可靶向结合 MMP2,理论上可能影响 MMP2 的活性,调节对 I 型胶原纤维的分解。MMP9 能分解呼吸道和肺内的结构复合物,如 ECM 和基底膜,调节其他蛋白酶及细胞因子活性,与 MMP2 具有协同性。既往研究表明,中国汉族人群中 *MMP9* 基因多态性 rs2236416 与近视有关,但其有关机制并未进一步阐明^[19]。丹参酮 II A 可靶向结合 MMP9,理论上可能影响 MMP9 的活性,继而影响近视进展。Zhang 等^[20] 研究证实丹参的另一种提取物隐丹参酮可以抑制结肠癌细胞系中 MMP2 和 MMP9 的活性,抑制结肠癌的生长和侵袭,木犀草素和丹参酮 II A 可能具有相似的作用。

TGF- β 1 蛋白具有调节细胞增生、分化,促进 ECM

形成的作用。TGF- β 1 可直接促进成纤维细胞代谢,增加 ECM 合成,其还可作用于 MMP 家族来抑制 MMP 对 ECM 的降解^[21]。根据网络药理学研究结果,丹参素可靶向结合 TGF- β 1,理论上可能影响 TGF- β 1 的活性,继而影响近视进展。

木犀草素、丹参酮 II A 均为天然黄酮类化合物,难溶于水,生物利用度低,往往需要改性后提高其利用度。丹参素为可溶性有机化合物,易溶于水,但性质不稳定,故本研究采用其稳定化合物丹参素钠作为干预药物进行后续验证。丹参素钠溶于水后不改变丹参素本身的性质,且成分更稳定。本研究结果显示,LIM 诱导近视后,HIF-1 α 表达增高而 TGF- β 1 表达降低,这一系列变化与 HIF-1 α 相关的缺氧和 TGF- β 1 相关的 ECM 改变相关。而相较于生理盐水组,注射丹参素钠后豚鼠眼中 HIF-1 α 表达降低而 TGF- β 1 表达增高,改善了近视诱导导致的缺氧和 ECM 降解状态。根据以上研究结果,推测丹参素可靶向结合 TGF- β 1,增强其活性,从而影响近视进展,而丹参素钠对 HIF-1 α 有抑制作用,这与在骨关节炎中和小鼠动物实验中的研究结果相似^[22-23]。

本研究存在一定的局限性:首先,根据现有的数据库内容,并未找到丹参与近视共同的关于缺氧的靶点,有赖于后续实验数据对数据库的充盈。其次,对于丹参素钠对 HIF-1 α 和 TGF- β 1 影响的后续机制并未进一步探讨,其在近视巩膜重塑过程中的确切关系及作用机制仍不清楚,有赖于后续根据本次网络药理学结果进行进一步的通路验证。此外,因子在分子对接阶段与丹参素对接的靶蛋白是 TGF- β 1,所以未检测 MMP 相关蛋白,在后续研究中会进一步验证其与巩膜 ECM 重塑的关系。总之,本研究结果表明丹参提取的天然化合物可作为抗巩膜缺氧和改善巩膜 ECM 重塑的潜在候选药物,为近视的防治研究提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 路小楠:参与选题、实施网络药理学分析、分析数据、起草和修改文章;李杰:参与选题、实验指导、文章知识性内容的审阅和修改;安琪琪、刘珍慧:实施研究、分析数据;梁春雨:实施研究;戴淑真:参与选题、实验指导、文章知识性内容的审阅及定稿

参考文献

- [1] Sankaridurg P, Tahhan N, Kandel H, et al. IMI impact of myopia [J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(5): 2 [2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33909036/>. DOI: 10.1167/iov.62.5.2.
- [2] 国际近视研究院. 刘康, 高建华, 陈卓, 译. 国际近视研究院关于近视危险因素的报告 [J]. 中华实验眼科杂志, 2022, 40(6): 562-573. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210611-00355. International Myopia Institute. Liu K, Gao JH, Chen Z. IMI risk factors for myopia [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2022, 40(6): 562-573. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210611-00355.



- [3] Jonas JB, Ang M, Cho P, et al. IMI prevention of myopia and its progression[J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(5): 6 [2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33909032/>. DOI: 10.1167/iovs.62.5.6.
- [4] Ohno-Matsui K, Wu PC, Yamashiro K, et al. IMI pathologic myopia [J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(5): 5 [2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33909033/>. DOI: 10.1167/iovs.62.5.5.
- [5] Boote C, Sigal IA, Grytz R, et al. Scleral structure and biomechanics [J/OL]. Prog Retin Eye Res, 2020, 74: 100773 [2023-12-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31412277/>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2019.100773.
- [6] Yang J, Ouyang X, Fu H, et al. Advances in biomedical study of the myopia-related signaling pathways and mechanisms [J/OL]. Biomed Pharmacother, 2022, 145: 112472 [2023-12-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34861634/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112472.
- [7] Zhao F, Zhang D, Zhou Q, et al. Scleral HIF-1 α is a prominent regulatory candidate for genetic and environmental interactions in human myopia pathogenesis [J/OL]. EBioMedicine, 2020, 57: 102878 [2023-12-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32652319/>. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102878.
- [8] Wu H, Chen W, Zhao F, et al. Scleral hypoxia is a target for myopia control [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(30): E7091-E7100 [2023-12-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29987045/>. DOI: 10.1073/pnas.1721443115.
- [9] Ansari MA, Khan FB, Safdari HA, et al. Prospective therapeutic potential of Tanshinone II A: an updated overview [J/OL]. Pharmacol Res, 2021, 164: 105364 [2023-12-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33285229/>. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105364.
- [10] Han JY, Li Q, Ma ZZ, et al. Effects and mechanisms of compound Chinese medicine and major ingredients on microcirculatory dysfunction and organ injury induced by ischemia/reperfusion [J]. Pharmacol Ther, 2017, 177: 146-173. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.005.
- [11] Chen X, Yu J, Zhong B, et al. Pharmacological activities of dihydrotanshinone I, a natural product from *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J/OL]. Pharmacol Res, 2019, 145: 104254 [2023-12-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31054311/>. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104254.
- [12] Li J, Mi C, Ma J, et al. Dihydrotanshinone I inhibits the translational expression of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Chem Biol Interact, 2015, 240: 48-58. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.08.006.
- [13] Yu Q, Zhou JB. Scleral remodeling in myopia development [J]. Int J Ophthalmol, 2022, 15(3): 510-514. DOI: 10.18240/ijo.2022.03.21.
- [14] Li Z, Wang W, Liu R, et al. Choroidal thickness predicts progression of myopic maculopathy in high myopes: a 2-year longitudinal study [J]. Br J Ophthalmol, 2021, 105(12): 1744-1750. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2020-316866.
- [15] Ren Y, Yang X, Luo Z, et al. HIF-1 α aggravates pathologic myopia through the miR-150-5p/LAMA4/p38 MAPK signaling axis [J]. Mol Cell Biochem, 2022, 477(4): 1065-1074. DOI: 10.1007/s11010-021-04305-z.
- [16] Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted [J]. Physiol Rev, 2007, 87(1): 69-98. DOI: 10.1152/physrev.00022.2006.
- [17] Zhao F, Zhou Q, Reinach PS, et al. Cause and effect relationship between changes in scleral matrix metalloproteinase-2 expression and myopia development in mice [J]. Am J Pathol, 2018, 188(8): 1754-1767. DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.04.011.
- [18] Chen Z, Xiao K, Long Q. Intraperitoneal injection of MCC950 inhibits the progression of myopia in form-deprivation myopic mice [J/OL]. Int J Mol Sci, 2023, 24(21): 15839 [2023-12-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37958819/>. DOI: 10.3390/ijms242115839.
- [19] Li Y, Zhang Y, Zhang P, et al. Genetic susceptibility to high myopia in Han Chinese population [J]. Open Life Sci, 2022, 17(1): 512-516. DOI: 10.1515/biol-2022-0055.
- [20] Zhang L, Chen C, Duanmu J, et al. Cryptotanshinone inhibits the growth and invasion of colon cancer by suppressing inflammation and tumor angiogenesis through modulating MMP/TIMP system, PI3K/Akt/mTOR signaling and HIF-1 α nuclear translocation [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 65: 429-437. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.10.035.
- [21] 曾迎新, 金明. 生长因子在高度近视中的作用研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(6): 539-542. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200512-00334.
- Zi YX, Jin M. The role of growth factors in high myopia [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38(6): 539-542. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200512-00334.
- [22] Wu D, Xu J, Jiao W, et al. Suppression of macrophage activation by sodium Danshensu via HIF-1 α /STAT3/NLRP3 pathway ameliorated collagen-induced arthritis in mice [J/OL]. Molecules, 2023, 28(4): 1551 [2023-12-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36838542/>. DOI: 10.3390/molecules28041551.
- [23] Wang Y, Duo D, Yan Y, et al. Extract of *Salvia przewalskii* repair tissue damage in chronic hypoxia maybe through the RhoA-ROCK signalling pathway [J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(3): 432-439. DOI: 10.1248/bpb.b19-00775.

(收稿日期: 2023-12-09 修回日期: 2024-02-29)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

· 病例报告 ·

常染色体隐性遗传 Weill-Marchesan 综合征 1 例

唐玉容¹ 陈茂盛² 刘旭阳³ 贺翔鸽²¹重庆南坪爱尔眼科医院, 重庆 400020; ²重庆爱尔眼科医院, 重庆 400020; ³深圳市人民医院眼科, 深圳 518020

通信作者: 贺翔鸽, Email: hexiangge2011@126.com

Autosomal recessive Weill-Marchesan syndrome: a case report

Tang Yurong¹, Chen Maosheng², Liu Xuyang³, He Xiangge²¹Chongqing Nanping Aier Eye Hospital, Chongqing 400020, China; ²Chongqing Aier Hospital, Chongqing 400020, China;³Department of Ophthalmology, Shenzhen Municipal People's Hospital, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: He Xiangge, Email: hexiangge2011@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210922-00524

患者,男,17岁,汉族,因在当地医院体检发现双眼眼压升高,于2021年2月23日至重庆爱尔眼科医院就诊。既往史:患者双眼近视6年,且度数进行性加深;余全身各系统无特殊病

史。否认家族中有类似疾病及其他遗传性疾病史;父母系近亲结婚(表兄妹)。患者一般体格检查:身高158cm,体质量55kg;手指、脚趾及关节均无异常。眼部专科检查:(1)视力