

# 夏桑菊防治干眼症的网络药理学机制及实验验证\*

李进良<sup>1</sup>, 胡双飞<sup>1</sup>, 蒙奋兆<sup>1</sup>, 李沛波<sup>1</sup>,  
吴灏<sup>1</sup>, 彭维<sup>1</sup>, 苏薇薇<sup>1</sup>, 王永刚<sup>1</sup>, 孙维广<sup>2</sup>

1. 中山大学生命科学学院 / 广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心 / 广东省热带亚热带植物资源重点实验室, 广东 广州 510275
2. 广州白云山星群(药业)股份有限公司, 广东 广州 510288

**摘要:** 采用网络药理学、分子对接及细胞实验探究了夏桑菊防治干眼症的作用机制。通过超快速高效液相色谱串联三重四极杆飞行时间质谱(UFLC-Triple-TOF-MS/MS)分析夏桑菊的化学成分, 借助网络药理学相关数据库与分析平台预测夏桑菊有效成分靶点及检索疾病相关靶点, 并利用cytoscape软件及STRING平台构建网络。采用DAVID数据库进行GO和KEGG通路富集分析, 将关键靶点前4位与其对应活性成分进行分子对接。体外构建干眼症高渗模型验证核心靶点。共鉴定出61种化学成分, 筛选得到24种有效成分可能与干眼症相关的315个潜在的靶点蛋白具有相互作用; 筛选出夏桑菊作用的关键活性成分迷迭香酸、蒙花苷及绿原酸等和关键靶点为TNF- $\alpha$ 、Caspase1、IL-6以及IL-1 $\beta$ ; 富集结果表明, 夏桑菊治疗干眼症靶点主要集中在AGE-RAGE、TNF等多个信号通路。3种有效成分在细胞实验中不仅显著抑制人角膜上皮细胞活性降低, 提升高渗下细胞的移行能力, 而且有效抑制高渗诱导下人角膜上皮细胞中Caspase1、IL-1 $\beta$ 基因的表达及TNF- $\alpha$ 蛋白分泌水平。结果表明夏桑菊中的迷迭香酸、蒙花苷及绿原酸3种主要的活性成分, 发挥了高渗诱导下对人角膜上皮细胞保护及修复作用, 降低了细胞TNF- $\alpha$ 蛋白水平及Caspase1、IL-1 $\beta$  mRNA的相对表达。

**关键词:** 夏桑菊; 干眼症; 网络药理学; 分子对接; 实验验证

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137(2024)01-0056-10

## Exploring the mechanism and function of Xiasangju in the treatment of xerophthalmia based on network pharmacology and experimental validation

LI Jinliang<sup>1</sup>, HU Shuangfei<sup>1</sup>, MENG Fenzhao<sup>1</sup>, LI Peibo<sup>1</sup>,  
WU Hao<sup>1</sup>, PENG Wei<sup>1</sup>, SU Weiwei<sup>1</sup>, WANG Yonggang<sup>1</sup>, SUN Weiguang<sup>2</sup>

1. Guangdong Engineering and Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-evaluation of Post-marketed TCM / Guangdong Key Laboratory of Plant Resources / School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China
2. Guangzhou Baiyunshan Xingqun Pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou 510288, China

**Abstract:** The study was to explore the mechanism of action of Xiasangju in the treatment of xerophthalmia by using network pharmacology, molecular docking method and cell experiments. The chemical components of Xiasangju were analyzed by ultra-fast high performance liquid chromatography tandem triple quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UFLC-Triple-TOF-MS/MS). Targets of active

\* 收稿日期: 2023-07-11 录用日期: 2023-08-07 网络首发日期: 2023-10-23

基金项目: 省部共建中医湿症国家重点实验室专项(SZ2021ZZ01)

作者简介: 李进良(1996年生), 男; 研究方向: 生物与医药; E-mail: lijliang7@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 孙维广(1974年生), 男; 研究方向: 中药质量控制; E-mail: sunwg@bysxq.com

王永刚(1974年生), 男; 研究方向: 天然产物的研究与开发; E-mail: wangyg@mail.sysu.edu.cn  
(孙维广、王永刚为共同通信作者)

components were predicted and disease related targets were retrieved with the help of network pharmacologic database and analysis platform. The network was built using cytoscape software and STRING platform. GO and KEGG pathway enrichment analysis was performed using the DAVID database, and the top 4 key targets were matched with their corresponding active component molecules. A hypertonic model of dry eye was constructed in vitro to verify the core target. A total of 61 chemical components were identified, and 24 effective components potentially related to xerophthalmia were selected for further screening. These 24 components were found to interact with 315 potential target proteins. Among them, the key active components of Xiasangju were identified as rosmarinic acid, linarin and chlorogenic acid, which targeted *TNF- $\alpha$* , *Caspase1*, *IL-6*, and *IL-1 $\beta$* . Enrichment analysis revealed that the therapeutic targets of Xiasangju for xerophthalmia were concentrated in multiple biological processes, including the AGE-RAGE signaling pathway, TNF signaling pathway, and others. In cell experiments, these three active components not only significantly inhibited cell viability reduction but also enhanced the migration ability of high osmolarity-induced corneal epithelial cells. They effectively suppressed the expression of *Caspase1* and *IL-1 $\beta$*  genes, as well as the secretion level of TNF- $\alpha$  protein in high osmolarity-induced human corneal epithelial cells. The main active components, rosmarinic acid, linarin and chlorogenic acid, in Xiasangju exerted protective and reparative effects on human corneal epithelial cells under high osmolarity conditions. They reduced the protein level of TNF- $\alpha$  and the relative expression of *Caspase1* and *IL-1 $\beta$*  mRNA.

**Key words:** Xiasangju; xerophthalmia; network pharmacology; molecular docking; experimental validation

干眼症称为角结膜干燥症(KCS), 具有干涩、异物感、烧灼感和流泪增多等多种症状, 全球干眼症患病率为5%~50%, 女性和老年人群中患病率更高, 严重影响了患者的工作效率与生活质量(Zhao et al., 2023)。目前, 干眼症治疗主要依靠西医治疗。西医治疗效果显著, 但副作用严重且价格昂贵, 给患者家庭乃至社会造成了沉重的经济负担(吴改萍, 2022; Demolin et al., 2023)。因此, 亟须寻找一种经济、有效、安全性好的治疗方法。中医药具有原材料取自天然药材, 临床表现为安全性高、副作用低等特点, 中医治疗备受干眼症患者的关注。中药具有多成分、多靶点整体调节效果, 可能是治疗干眼症的理想用药。

夏桑菊(XSJ, Xiasangju)是一种传统的中药复方, 主要由夏枯草、桑叶和野菊花组成, 源自清代著名温病学家吴鞠通《温病调辨》中的经典方剂“桑菊饮”(孙鹏等, 2016)。《中国药典》(2020版)中记载其具有清肝明目, 疏风散热功效, 能够用于头晕耳鸣、风热感冒等疾病的治疗; 且其原料取自药食两用药材, 安全可靠。夏桑菊以蒙花苷(linarin)、绿原酸(CA, chlorogenic acid)、迷迭香酸(RA, rosmarinic acid)等化合物为主要药效成分,

抗炎、抗氧化活性效果明显, 具备眼部疾病保健、预防、医疗潜力(Wu et al., 2022)。姚向超等(2015)将野菊花开发成滴眼液治疗蒸发过强型干眼, 发现可以减轻干眼眼表的炎症反应。石守礼(1978)从中草药中筛选出夏枯草、菊花等配制成红眼1号眼药水治疗急性结膜炎患者, 发现治疗2~4 d即可痊愈。鱼俊杰等采用中药菊花、桑叶等制成清明眼药水, 治疗电光性眼炎310例, 总有效率99.97%。临床结果表明, 清明眼药水是一种疗效好、疗程短的中药滴眼剂。以上表明, 夏桑菊具有治疗干眼症潜力(鱼俊杰等, 1992)。然而, 夏桑菊治疗干眼症的临床及作用机制研究尚未报道, 未充分发挥药典对临床用药的指导作用。

本研究采用广州白云山星群(药业)股份有限公司的夏桑菊浸膏, 利用网络药理学方法及分子对接技术, 探究夏桑菊防治干眼症相关的有效成分、关键靶点以及过程中可能涉及的生物过程和信号通路。在网络药理学分析结果的基础上, 采用分子对接验证, 通过体外细胞实验验证, 进一步探索夏桑菊有效成分对相关关键靶点的作用, 为夏桑菊的外用剂型开发提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

绿原酸(110753-202119)、蒙花苷(111528-202112)、迷迭香酸(111871-202007)均购于中国食品药品检定研究院,其他材料为:HCE-T人角膜上皮细胞系(富衡生物,FH1239)、夏桑菊浸膏(广州白云山星群(药业)股份有限公司,B220301)、TNF- $\alpha$ 检测试剂盒(云克隆 Cloud-clone,SEA133 Hu)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 夏桑菊化学成分检测** 色谱条件参照《中国药典》夏桑菊颗粒含量测定方法。离子源:ESI(正、负离子模式检测);喷雾电压正模式5 500 V,负模式-4 500 V;喷雾气为 55 psi(1 psi = 1/145 MPa);辅助加热气 50 psi;离子源温度 500 °C;气帘气 35 psi;碰撞器压力 10 psi;扫描范围  $m/z$  50~1 500。

**1.2.2 化学成分对应靶点及疾病相关靶点收集** 通过TCMSP数据库检索活性成分作用靶点,根据类药性(DL)  $\geq 0.18$ ,并结合文献对未纳入筛选标准但报道有生物活性和药理作用的成分也纳入候选活性成分,筛选得到夏桑菊浸膏活性成分的作用靶点。以“xerophthalmia”为关键词,在 GeneCards 数据库中检索干眼症相关靶点,整理合并得到干眼症对应的疾病靶点。

**1.2.3 “药物-成分-靶点-疾病”及 PPI 网络构建** 利用网站 Venny 2.1.0 得到夏桑菊浸膏活性成分主要作用靶点。将上述靶点导入 Cytoscape3.9.1 及 String 数据库构建“夏桑菊浸膏-成分-靶点-疾病”及 PPI 网络图。

**1.2.4 信号通路富集分析及分子对接** 利用 DAVID 数据库对作用靶点进行 GO(gene ontology) 及 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes) 富集分析,选取夏桑菊浸膏核心成分和 PPI 网络中 score 排名前 4 的核心靶点,利用 PubChem 数据库、ChemBioOffice Ultra 13.0.2-Chem3D、PyMOL 2.5.2、AutoDockTools-1.5.7 软件进行分子对接。

### 1.2.5 夏桑菊有效成分体外细胞模型验证

1) MTS 法检测细胞活力。细胞用不同浓度(30、50、70、90、110、130 mmol/L) NaCl 分别模拟(350、400、450、500、550、600 mOsm/L)渗透压处理人角膜上皮细胞 24 h,更换培养基,加入 20  $\mu$ L MTS 孵育 2 h 后,采用酶标仪测定波长 490 nm 处吸光度值,按公式计算得各组的细胞活力

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{实验组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$$

2) 研究有效成分对高渗透导下人角膜上皮细胞的保护作用。实验分设不同组,采用 600 mOsm/L(130 mmol/L NaCl)渗透压造模并同时给药,MTS 检测细胞活力。

3) 划痕实验。使用移液管在人角膜上皮细胞上划出数条划痕,倒置显微镜拍 0、24 h 图像,观察实验重复 3 次,并计算平均值。

4) Elisa 法检测各组细胞培养液上清中炎症因子 TNF- $\alpha$  的蛋白浓度。细胞按实验设计分组并做相应处理,每组处理 24 h,检测细胞培养液上清。

5) 对高渗透导下人角膜上皮细胞相关基因的表达的检测。细胞按实验设计分组并做相应处理,处理 24 h,提取总 RNA,逆转录成 cDNA 后于 -20 °C 条件下保存。采用实时荧光定量基因扩增仪扩增各组 cDNA 目的基因。

#### *IL-1 $\beta$*

上游引物: CACGATGCACCTGTACGATCA

下游引物: AGACATCACCAAGCTTTTTTTGCT

#### *Caspase1*

上游引物: AAGACCCGAGCTTTGATTGACTC

下游引物: AAATCTCTGCCGACTTTTGTTC

#### *$\beta$ -actin*

上游引物: GACATCCGCAAAGACCTG

下游引物: GGAAGGTGGACAGCGAG

以  *$\beta$ -actin* 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

6) 统计学分析。采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析实验数据,结果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 夏桑菊浸膏活性组分的 UFLC-Triple-TOF-MS/MS 分析

采用 UFLC-Triple-TOF-MS/MS 技术,分别在正、负离子模式下分析夏桑菊浸膏组成,其总离子流图如图 1 所示。通过与标准品和公开数据库的一级和二级质谱数据比对,共指认了 61 个化合物,其中包括 19 种黄酮类化合物,17 种有机酸及其酯类化合物,5 种氨基酸类化合物,3 种核苷类化合物以及 17 种其他化合物。为进一步利用网络药理学预测其治疗干眼症药效及药效作用机制提供了物质组成的基础数据。

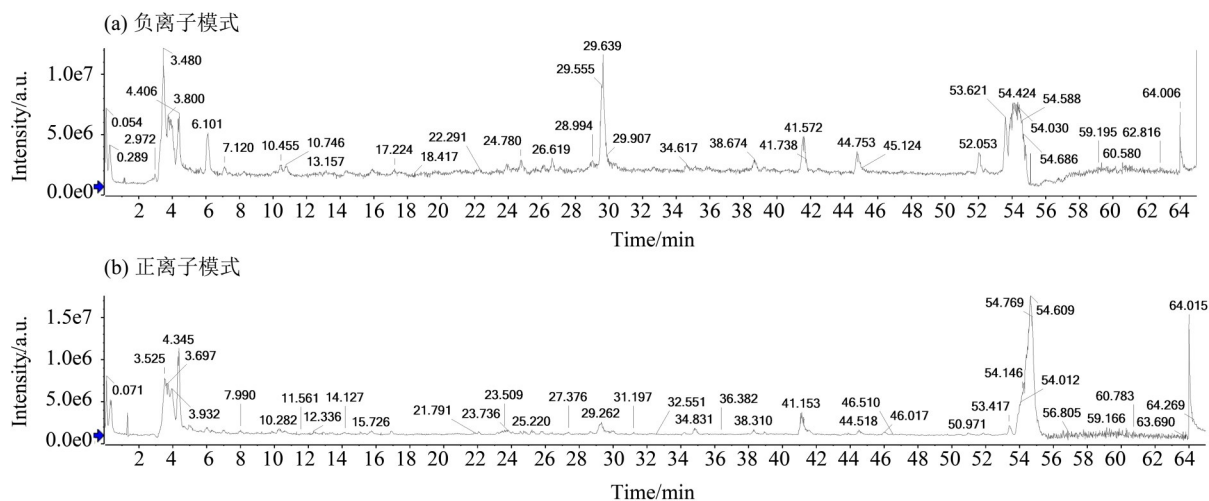


图 1 夏桑菊浸膏总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of Xiasangju extracts

### 2.2 活性成分及疾病相关靶点收集

根据 UFLC-Triple-TOF-MS/MS 结果, 采用  $DL \geq 0.18$  标准, 结合文献对未纳入筛选标准但报道有生物活性和药理作用的成分(高蒲星等, 2023),

共获得 24 个活性成分, 通过数据库搜索及可视化处理, 共得夏桑菊浸膏活性成分相关靶点 315 个及“夏桑菊-成分-靶点”网络(图 2)。该网络图中共有 339 个节点和 605 条边。

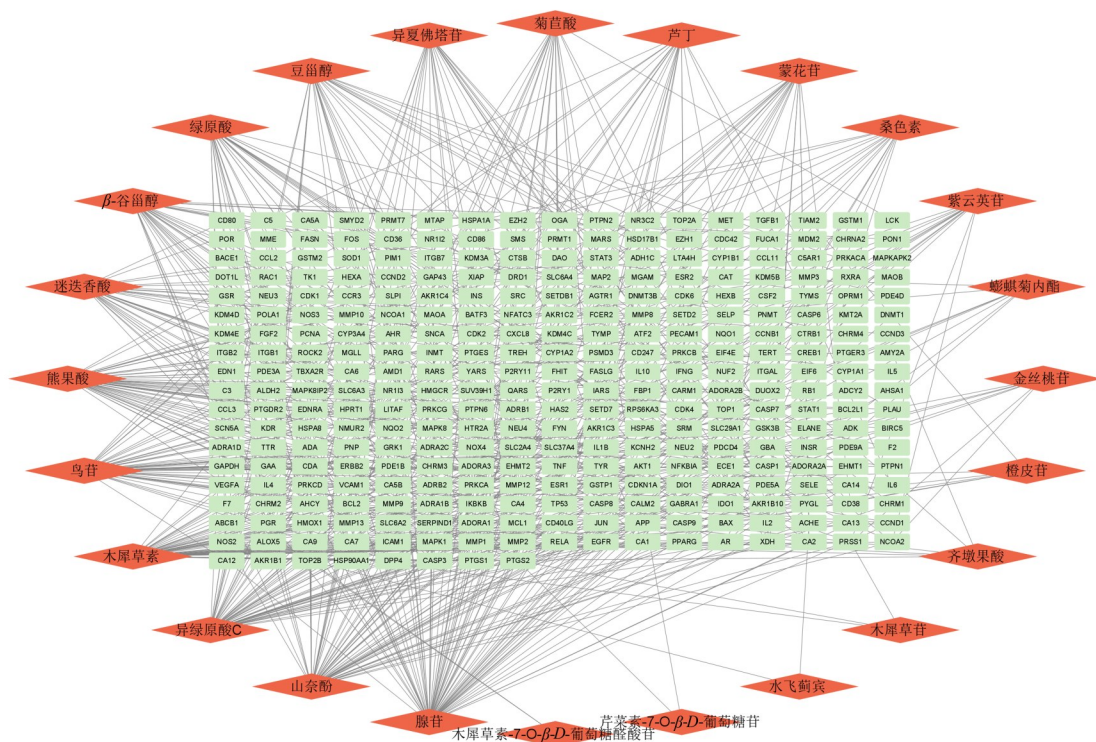


图 2 “夏桑菊浸膏-成分-靶点”网络图

Fig. 2 Xiasangju extracts-component-target network diagram

通过 Genecards 数据库检索得到干眼症相关靶点共 146 个, 与夏桑菊浸膏成分对应靶点取交集, 如图 3 所示, 得到夏桑菊浸膏治疗干眼症主要作用靶点 21 个。

### 2.3 网络构建与分析

2.3.1 “夏桑菊-成分-主要靶点-疾病”网络 将上述夏桑菊主要靶点及疾病靶点可视化处理, 构建“夏桑菊-成分-靶点-疾病”网络图, 如图 4 所示。

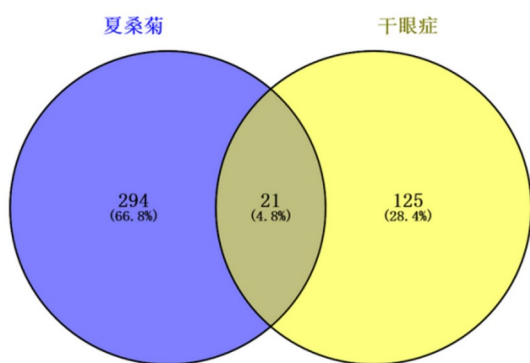


图3 夏桑菊浸膏成分潜在靶点与疾病靶点 Venny 图  
Fig. 3 Venny diagram of potential targets and disease targets of compounds of Xiasangju extracts

节点熊果酸、山柰酚、迷迭香酸、绿原酸、蒙花苷、芦丁的度值(degree)排名前6。这6种成分作用靶点数量较多,表明它们可能是夏桑菊中主要药理活性成分。参考2020年版《中国药典》选择夏枯草、桑叶、野菊花测定指标分别为迷迭香酸、绿原酸、蒙花苷作为夏桑菊颗粒成分定量测定的3个质量控制成分,因此选取这3种成分作为夏桑菊核心成分,后续进行分子对接操作及体外细胞实验验证。

**2.3.2 PPI 网络** 将21个交集靶点导入String数

据库分析,得到PPI蛋白互作图(图5)。其中度值排名前4的节点为MMP9、IL-1 $\beta$ 、Caspase1、IL-6,表明这些节点在PPI网络中处于核心位置,节点联系较为紧密,可能为夏桑菊治疗干眼症的核心靶点。因此选取这4个靶点作为核心靶点进行后续分子对接操作及体外细胞实验验证。

**2.3.3 GO 和 KEGG 富集分析** 利用DAVID数据库对作用靶点富集分析。靶点基因主要参与T细胞增殖的正调控细胞对脂多糖的反应、免疫反应、炎症反应、细胞表面受体信号通路等生物学进程,对应细胞外间隙、质膜外侧、细胞表面等细胞组分以及细胞因子活性、生长因子活性、信号受体活性等分子功能。GO分析结果按P值从小到大排序,排名前10的条目见图6。

此外,上述靶点共富集得到66条KEGG通路,相关通路有细胞因子-细胞因子受体相互作用、晚期糖基化产物-晚期糖基化终末产物受体(AGE-RAGE)信号通路、TNF信号通路、IL-17信号通路、NF- $\kappa$ B信号通路等。富集通路按P值从小到大排序,将上述结果导入R语言进行可视化,结果如图7所示。

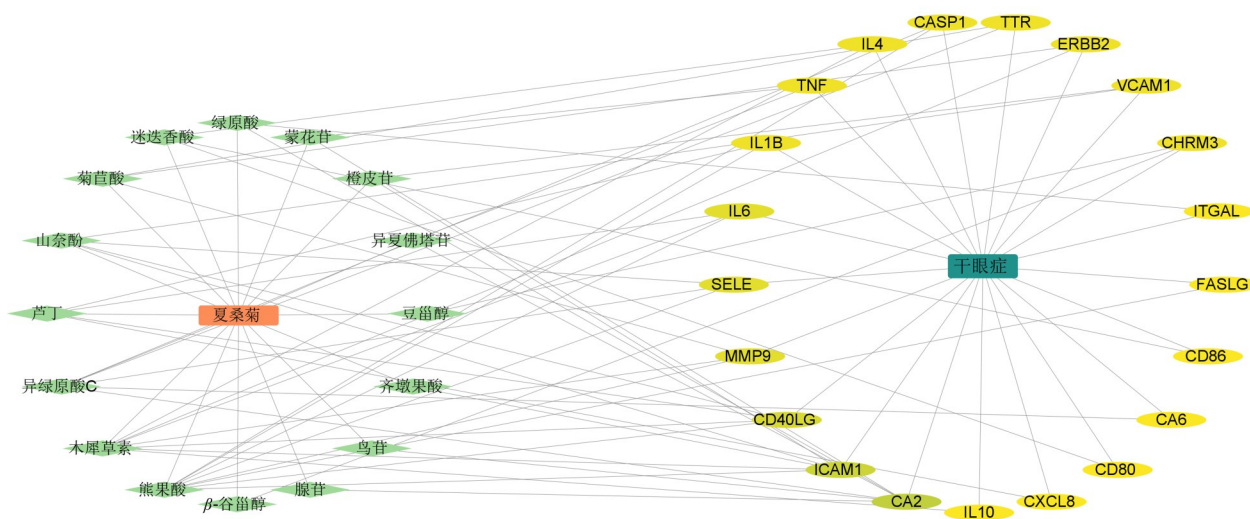


图4 “夏桑菊浸膏-成分-主要靶点-疾病”网络图  
Fig. 4 Xiasangju extracts-component-target-disease network diagram

## 2.4 分子对接

利用Vina软件将绿原酸、迷迭香酸、蒙花苷分别与MMP9、Caspase1、IL-1 $\beta$ 、IL-6这4个核心靶点对应的蛋白质建立分子对接模型,预测12种对接结果见表1。其中,结合能数值<-5.0 kJ/mol时表示结合较好,<-7.0 kJ/mol代表结合强烈(郑苏楠等,2022)。结果显示预测结合能均<-6 kJ/mol,

代表结合的可能性较高。如图8显示MMP9通过GLU-402、GLY-186、TYR-423与蒙花苷形成氢键结合,Caspase1通过ARG-240、GLU-241、ARG-391与蒙花苷形成氢键结合。

## 2.5 不同渗透压对人角膜上皮细胞活力的影响

MTS结果如图9所示,不同渗透压处理24 h,渗透压350、400、450 mOsm/L时对人角膜上皮细

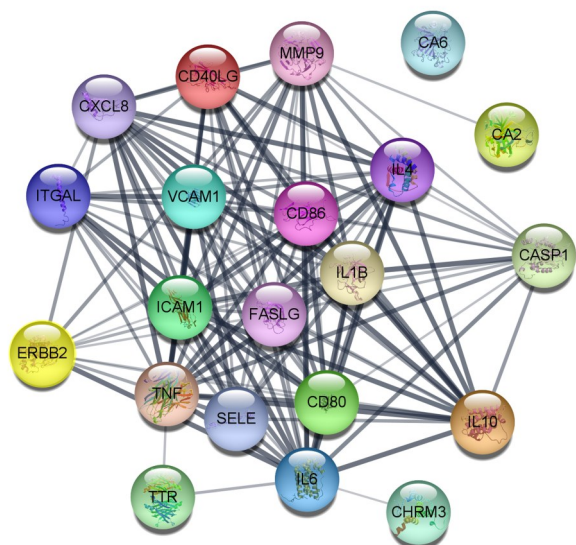


图 5 夏桑菊浸膏主要作用靶点的蛋白 PPI 网络图

Fig. 5 Protein PPI network of the main target of Xiasangju extracts

细胞的活性无显著性影响, 500~600 mOsm/L 时降低了人角膜上皮细胞活性。基于渗透压为 600 mOsm/L 时能够显著降低人角膜上皮细胞活力 ( $P < 0.01$ )。因此, 后续选用 600 mOsm/L 渗透压处理, 以探究迷迭香酸、绿原酸、蒙花苷 3 种有效成分对细胞的

保护作用; 渗透压  $\leq 450$  mOsm/L 时, 对人角膜上皮细胞的活性无显著性影响, 故选用 450 mOsm/L 渗透压造模探究迷迭香酸、绿原酸、蒙花苷对细胞的保护作用机制及迁移能力。

### 2.6 主要活性成分对高渗透诱导的人角膜上皮细胞的保护作用

将人角膜上皮细胞在 600 mOsm/L 渗透压培养基中培养 24 h 后, 与对照组相比, 600 mOsm/L 组的细胞活力降至 49.3% ( $P < 0.01$ )。与 600 mOsm/L 比较, 蒙花苷可显著提高人角膜上皮细胞活性, 细胞活性提高到 74.8% ( $P < 0.05$ ), 如图 10 所示。表明蒙花苷对高渗透压所致的细胞活性降低具有显著抑制作用。

### 2.7 对高渗透诱导的人角膜上皮细胞的迁移能力的影响

为探讨 3 种活性成分是否在体外对人角膜上皮细胞具有促进修复的功能, 通过划痕实验检测细胞的迁移能力。在 24 h 高渗刺激后, 正常对照组中角膜上皮细胞的迁移率为 54.55%, 450 mOsm/L 的刺激条件下仅为 9.04%, 正常组与模型组之间有统计学差异 ( $P < 0.01$ ); 在绿原酸及蒙花苷的作用

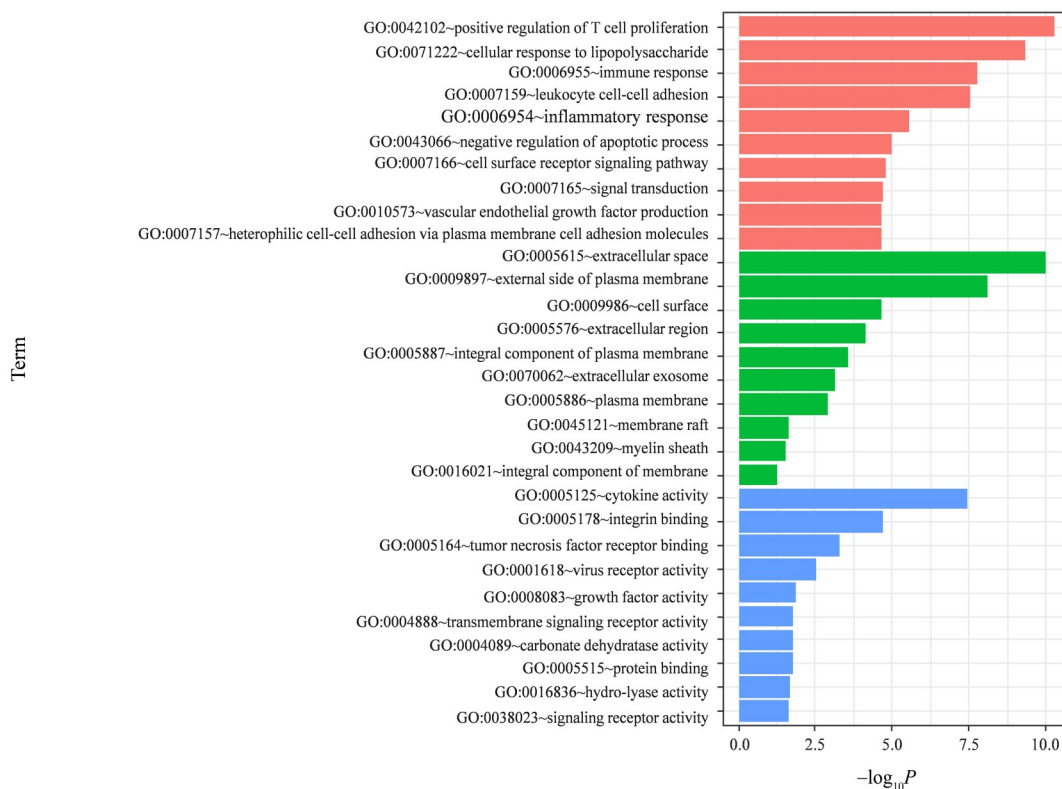


图 6 GO 分析结果

Fig. 6 GO analysis results

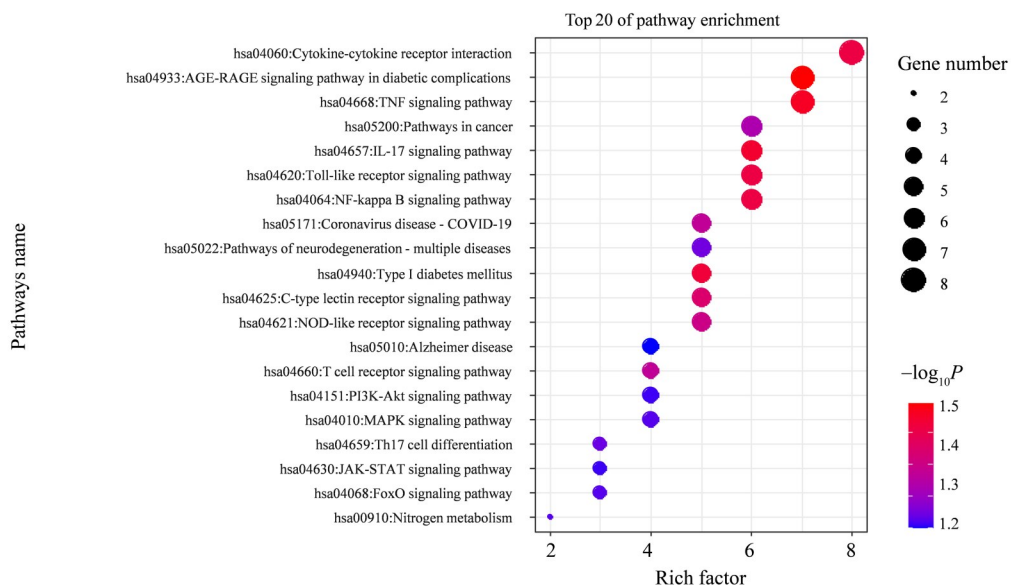


图7 KEGG分析

Fig. 7 KEGG analysis results

表1 分子对接最低结合能

Table 1 Minimum binding energy for molecular docking

靶点	绿原酸	迷迭香酸	蒙花苷	kJ/mol
MMP9	-7.7	-7.5	-8.9	
Caspase1	-7.3	-7.7	-7.8	
IL-1 $\beta$	-6.6	-6.4	-7.9	
IL-6	-6.3	-6.1	-7.5	

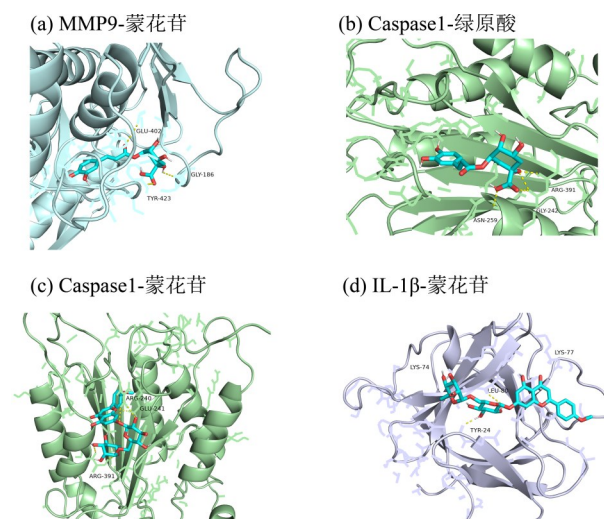
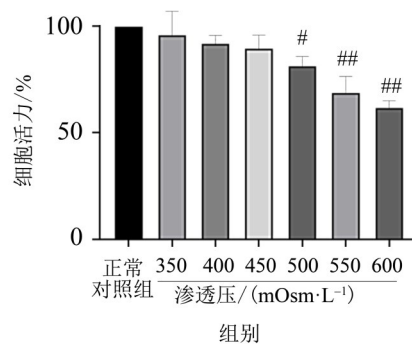


图8 分子对接模式图

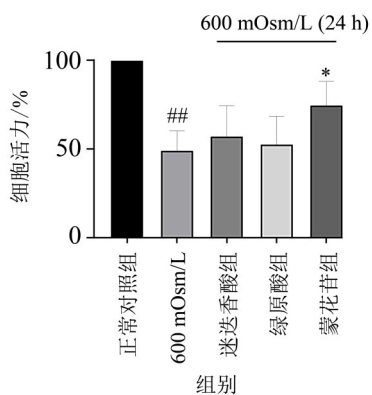
Fig. 8 Molecular docking model diagram

与正常对照组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ 。图9 不同渗透压处理24 h对人角膜上皮细胞细胞活性的影响 ( $n=3$ )Fig. 9 Effects of different hyperosmosis treatment for 24 h on the cell activity of human corneal epithelial cells ( $n=3$ )

下, 迁移率升高到32%及18%, 结果有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 研究表明 450 mOsm/L 的高渗刺激会降低角膜上皮细胞的迁移能力, 而绿原酸及蒙花苷能提升高渗下角膜上皮细胞的移行能力, 如图11显示。

## 2.8 对高渗透导下人角膜上皮细胞 *IL-1 $\beta$* 及 *Caspase1* 基因的表达

PCR结果显示, 450 mOsm/L组 *IL-1 $\beta$* 、*Caspase1* mRNA的相对表达量与正常对照组相比升高 ( $P < 0.01$ ); 与450 mOsm/L相比, 迷迭香酸、绿原



与正常对照组比较, <sup>##</sup>  $P < 0.01$ ;  
与 600 mOsm/L 比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ 。

图 10 3 种主要活性成分对高渗透诱导的人角膜上皮细胞的保护作用的影响 ( $n=3$ )

Fig. 10 Effects of 3 major active components on the protection of human corneal epithelial cells induced by hyperosmosis ( $n=3$ )

酸组中的 *Caspase1*、*IL-1 $\beta$*  mRNA 的相对表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 蒙花苷组中的 *Caspase1* mRNA 的相对表达量显著降低。如图 12 所示 3 种有效成

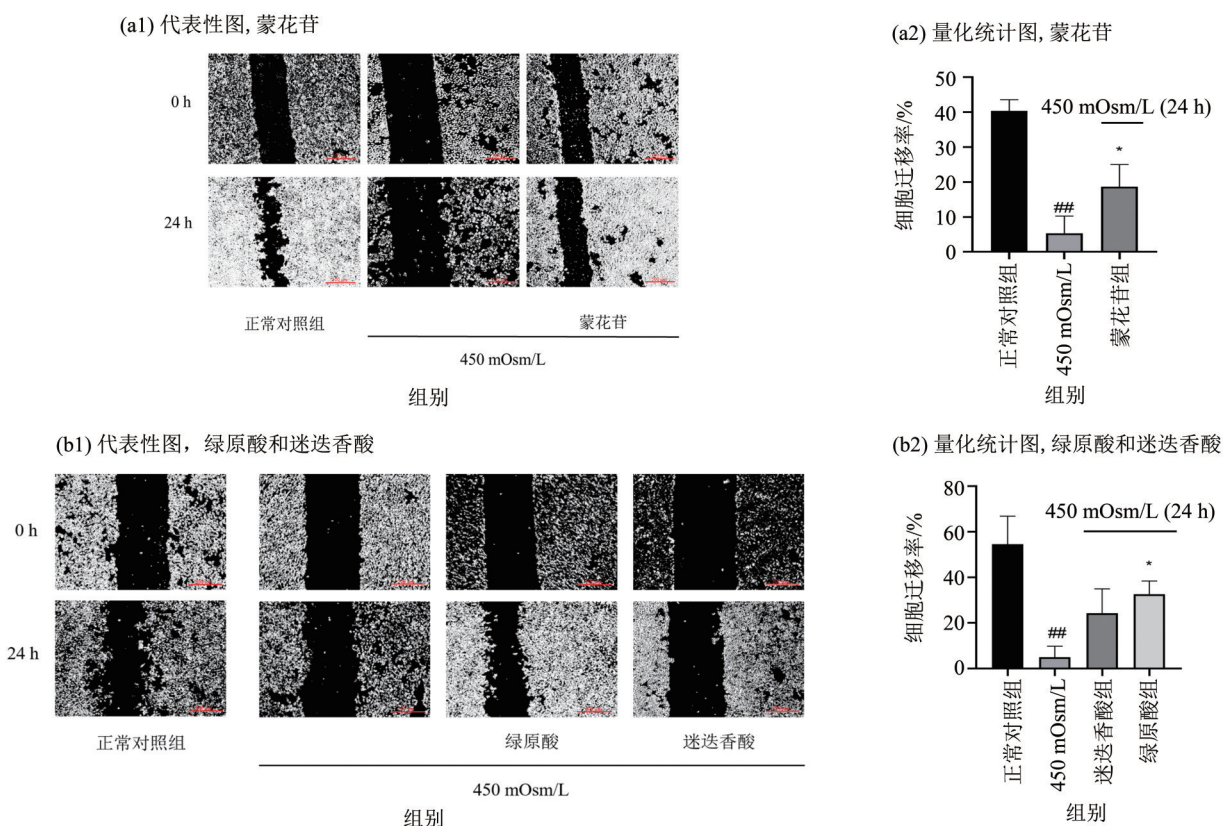
分能够有效抑制高渗透诱导下人角膜上皮细胞中 *IL-1 $\beta$*  及 *Caspase1* 基因表达。

### 2.9 对高渗透诱导下人角膜上皮细胞分泌 TNF- $\alpha$ 水平的影响

Elisa 结果显示, 与正常对照组相比, 450 mOsm/L 组中的 TNF- $\alpha$  蛋白浓度明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 450 mOsm/L 组相比, 迷迭香酸、绿原酸组的 TNF- $\alpha$  蛋白浓度明显降低 ( $P < 0.05$ ) 如图 13 所示。表明迷迭香酸、绿原酸有效抑制了细胞中炎症因子 TNF- $\alpha$  的分泌。

## 3 讨论

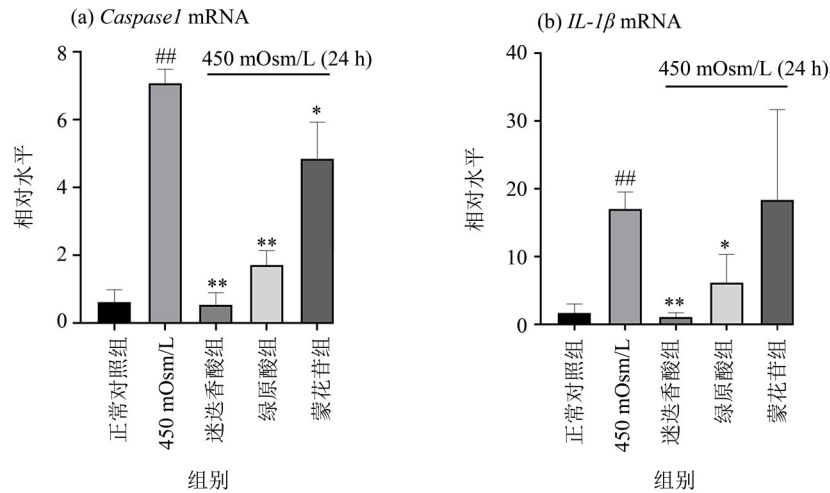
通过 UFLC-Triple-TOF-MS/MS 技术共指认 61 个化合物, 筛选获得夏桑菊中 24 种化合物成分, 在“夏桑菊-化合物-靶点”网络中, 发挥药效作用最活跃的成分为熊果酸、山柰酚、绿原酸、迷迭香酸、芦丁、蒙花苷。研究表明, 这 6 种化合物能够抑制炎症反应和氧化应激, 减轻眼部炎症和细胞损伤 (Chen et al, 2021; 李亚梅等, 2020; 胡盼盼, 2021; 罗飞等, 2021)。夏桑菊浸膏中的 6 种活跃成



与正常对照组比较, <sup>##</sup>  $P < 0.01$ ; 与 450 mOsm/L 比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ 。

图 11 实验条件下 24 h 后的 20 倍镜划痕实验的代表性图和量化统计图 ( $n=3$ )

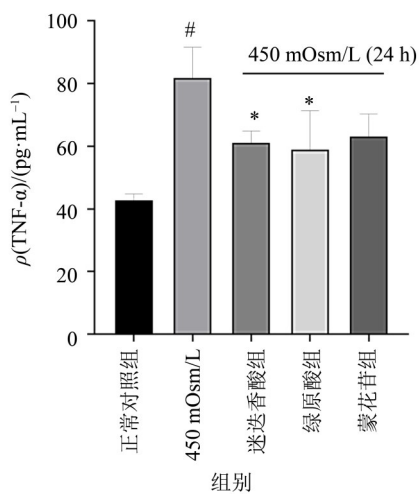
Fig. 11 Representative diagram and quantitative statistical plots of 20-fold mirror scratch experiment after 24 hours under experimental conditions ( $n=3$ )



与正常对照组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与 450 mOsm/L 比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图 12 3 种活性成分对高渗透导下人角膜上皮细胞 *IL-1β*、*Caspase1* 基因的表达的影响 ( $n=3$ )

Fig. 12 Effects of 3 major active components on the expression of *IL-1β* and *Caspase1* genes in human corneal epithelial cells induced by hyperosmosis ( $n=3$ )



与正常对照组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ;  
与 450 mOsm/L 比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

图 13 3 种活性成分对高渗透导下人角膜上皮细胞分泌 *TNF-α* 水平的影响 ( $n=3$ )

Fig. 13 Effects of 3 major active components on the secretion of *TNF-α* by human corneal epithelial cells induced by hyperosmosis ( $n=3$ )

分起到治疗干眼症的关键作用。

PPI 网络及关键靶点分析, 夏桑菊通过 *MMP9*、*IL-1β*、*Caspase1*、*IL-6* 等关键靶点发挥药效作用。该 4 个靶点与干眼症密切相关, 其中 *Caspase1*、*IL-1β* 为已报道 ROS-NLRP3-*IL-1β* 信号通路中的成分 (周洋等, 2020)。高渗产生的 ROS 可诱导 NLRP3 的激活, 进而促进 *Caspase-1* 激活导致 *IL-1β* 分泌增加, 突出了 ROS-NLRP3-*IL-1β* 信号轴在干眼症进

展过程中的启动作用 (Dai et al., 2019)。因此, 本研究利用氯化钠诱导的人角膜上皮细胞高渗模型研究发现, 迷迭香酸、绿原酸及蒙花苷对高渗透导下对人角膜上皮细胞具有保护及提升迁移能力作用; 在基因转录水平上, 3 种有效成分下调 *Caspase1* 和 *IL-1β* 的 mRNA 表达, 减少促炎介质产生; 这与本研究基于网络药理学的预测结果相互印证。

通过 GO、KEGG 结果分析, 细胞因子和其受体相互作用在干眼症的发生和发展中发挥着重要的作用。例如, *IL-1β*、*IL-6*、*IL-17*、*TNF* 等多种细胞因子及受体的水平在干眼症患者的泪液中明显升高, 这些细胞因子刺激角膜、结膜和泪腺上皮细胞分泌更多的炎症介质和细胞因子, 从而引起眼部组织的炎症反应和损伤 (Liu et al., 2020; Liang et al., 2020; Wei et al., 2014)。AGE-RAGE 信号通路在干眼症的发病过程中也发挥了重要作用。RAGE 是一种跨膜受体, 广泛表达于多种类型细胞上, 包括免疫细胞、血管内皮细胞、神经元和肌肉细胞等, 与 AGE 结合后可以激活多种信号通路, 从而引起炎症反应、氧化应激和细胞凋亡等 (Kaji et al., 2006)。研究表明, 在干眼症患者的泪液和角膜中, AGE 和 RAGE 的水平均明显升高, 这与疾病的发生和发展密切相关 (Wang et al., 2011)。AGE-RAGE 的激活使得炎症反应和氧化应激的发生, 从而导致眼部组织的损伤和炎症反应。本研究通过体外细胞模型验证了高渗透导下 *IL-1β* 基因表达及 *TNF-α* 蛋白分泌水平升高, 进一步揭示了

GO与KEGG结果的可靠性。

分子对接结果表明,3种化合物与4个靶点有较好的结合能力,此外,体外实验结果也显示3种化合物能对相关蛋白及基因发挥作用。进一步说明分子对接结果的可靠性。后续将对该研究进一

步探究,确定这些化合物的治疗剂量和途径。

综上,本研究联合网络药理学与体外细胞实验,初步阐释了夏桑菊的物质基础与其防治干眼症的作用机制,并挖掘了更多可能靶点,为进一步研究其机制提供了基础与方向。

#### 参考文献:

- 高蒲星,付乾芳,刘宇,等,2023.基于GEO芯片及网络药理学探讨夏桑菊颗粒治疗高血压病的机制研究[J].天津中医药,40(3):380-388.
- 国家药典委员会,2020.中华人民共和国药典一部:2020年版[M].北京:中国医药科技出版社:1450-1451.
- 胡盼盼,2021.基于网络药理学和分子对接研究绿原酸抗PRRSV的作用机制[J].黑龙江畜牧兽医,(19):79-83+151+152.
- 李亚梅,邹昊宇,胡鸿运,等,2020.夏枯草水提物对过敏性结膜炎大鼠NLRP3/Caspase1/IL-1 $\beta$ 通路的影响[J].中国新药杂志,29(8):928-933.
- 罗飞,张明辉,陈立珂,等,2021.迷迭香酸抑制NLRP3炎性小体的活化对创伤性颅脑损伤大鼠脑组织损伤和海马区神经元凋亡的影响[J].免疫学杂志,37(7):568-574.
- 石守礼,1978.红眼1号眼药水治疗急性结膜炎[J].赤脚医生杂志,(6):11.
- 孙鹏,李贵节,朱凯,等,2016.夏桑菊凉茶中多成分含量测定方法的研究[J].食品工业,37(4):278-281.
- 吴改萍,2022.道生散治疗肝郁阴虚型干眼的临床疗效评价及泪液蛋白质组学研究[D].北京:中国中医科学院.
- 姚向超,王延东,黄楚龙,2015.野菊花滴眼液治疗兔蒸发过强型干眼的疗效评价[J].中国药师,18(3):404-406.
- 鱼俊杰,贺振圻,王钰,等,1992.清明眼药水治疗电光性眼炎310例[J].陕西中医,(5):206.
- 张明发,沈雅琴,2018.熊果酸的药动学研究进展[J].药物评价研究,41(1):169-173.
- 郑苏楠,彭维,苏薇薇,等,2022.基于网络药理学与分子对接技术探讨健骨注射液治疗骨质增生及类风湿性关节炎的作用机制[J].药学研究,41(10):631-638+649.
- 周洋,陈婷妍,美丽巴努·玉素甫,2020.金雀异黄素通过ROS-NLRP3-IL-1 $\beta$ 途径保护角膜上皮细胞免受高渗刺激诱导的损伤[J].医学研究杂志,49(4):80-86.
- CHEN M, LI J, PENG J et al. 2021. Linarin ameliorates innate inflammatory response in an experimental dry eye model via modulation of the NLRP3 inflammasome [J]. Digit Chin Med, (1): 42-53.
- DEMOLIN L, ES-SAFI M, SOYFOO M S, et al, 2023. Intense pulsed light therapy in the treatment of dry eye diseases: A systematic review and meta-analysis [J]. J Clin Med, 12(8): 3039.
- DAI Y, ZHANG J, XIANG J, et al, 2019. Calcitriol inhibits ROS-NLRP3-IL-1 $\beta$  signaling axis via activation of Nrf2-antioxidant signaling in hyperosmotic stress stimulated human corneal epithelial cells [J]. Redox Biol, 21: 101093.
- KAJI Y, USUI T, ISHIDA S, et al, 2006. Advanced glycation end products in human cornea, sclera, and lens [J]. Exp Eye Res, 82(2):289-293.
- LIANG Q, ZHANG M, ZHENG T, et al, 2020. Regulation of dry eye disease by regulatory T cells: A review [J]. Ocul Immunol Inflamm, 28(3):369-376.
- LIU Q, LUO X, WANG J, et al, 2020. The role of cytokines in the pathogenesis of dry eye disease [J]. Ocul Immunol Inflamm, 28(3):491-497.
- WANG Y, CHEN Y, LIU Y, et al, 2011. RAGE/NF- $\kappa$ B pathway mediates high glucose-induced secretion of MCP-1 in rat retinal pigment epithelial cells [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 249(5):675-682.
- WEI Y, ASBELL P A, 2014. The core mechanism of dry eye disease is inflammation [J]. Eye Contact Lens Sci Clin Pract, 40(4): 248-256.
- WU S, LUO H, ZHONG Z, et al, 2022. Phytochemistry, pharmacology and quality control of xiasangju: A traditional Chinese medicine formula [J]. Front Pharmacol, 13: 930813.
- ZHAO D, ZHAO H, HE Y, et al, 2023. BMSC reduces ROS and inflammation levels by inhibiting TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling axis to alleviate dry eye [J/OL]. Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2739871/v1>.

(责任编辑 张冰)