

骆驼蓬抑制高糖诱导的内皮细胞管道形成的作用机制研究

李宏丽¹, 孙惠惠¹, 刘汉滢¹, 季青璇¹, 田婧璿², 宋星卓², 王析瑞²,
蒋坤秀², 韩 静^{3*}

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029;
3. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029)

摘要: 探讨骆驼蓬对高糖诱导的视网膜血管内皮细胞管道形成的调节作用及其机制。建立高糖诱导的视网膜血管内皮细胞模型, 将细胞分为: 正常组 (葡萄糖浓度为 5.5 mmol·L⁻¹)、模型组 (葡萄糖浓度为 25 mmol·L⁻¹)、骆驼蓬给药高、低剂量组 (葡萄糖浓度为 25 mmol·L⁻¹ + 不同剂量骆驼蓬)。内皮管道形成方法观察细胞管道形成状态。网络药理学方法筛选骆驼蓬治疗糖尿病视网膜病变的药效成分、靶点和通路。Real-time PCR 法验证骆驼蓬治疗糖尿病视网膜病变相关靶点的 mRNA 表达水平。内皮管道形成实验结果显示, 与正常组相比, 模型组内皮细胞管道形成总长度显著增加; 与模型组相比, 骆驼蓬组内皮管道形成总长度显著减少。网络药理学结果提示, 骆驼蓬的作用靶点是细胞外调节蛋白激酶 2 (extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine-protein kinase 1, AKT1)、磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 α (phosphoinositide 3 kinase catalytic α polypeptide, PIK3CA) 等; 信号通路涉及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路等。Real-time PCR 结果显示, 与正常组相比, 模型组 ERK2、PIK3CA 和 AKT1 的 mRNA 表达水平均升高; 与模型组相比, 骆驼蓬组 ERK2、PIK3CA 和 AKT1 的 mRNA 表达水平均降低。骆驼蓬可能通过调节 MAPK 信号通路和 VEGF 信号通路等抑制高糖条件下视网膜血管内皮细胞管道的形成, 证实了它多靶点、多通路的作用特点。此研究为骆驼蓬治疗糖尿病视网膜病变奠定了工作基础。

关键词: 骆驼蓬; 糖尿病视网膜病; 视网膜血管内皮细胞; 管道形成; 网络药理学

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2544-09

The mechanism by which *Peganum harmala* L. inhibits high glucose-induced tube formation in endothelial cells

LI Hong-li¹, SUN Hui-hui¹, LIU Han-ying¹, JI Qing-xuan¹, TIAN Jing-yun², SONG Xing-zhuo²,
WANG Xi-rui², JIANG Kun-xiu², HAN Jing^{3*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: The study investigates the mechanism by which *Peganum harmala* L. (Luotupeng, LTP) inhibits tube formation in retinal vascular endothelial cells. Tube formation was induced by treatment of retinal vascular endothelial cells with glucose. The cells were divided into a normal group, model group, and an LTP group. The total length of tube formation was measured. The active components, targets, and pathway by which LTP acts in the treatment of diabetic retinopathy was explored by network pharmacology. The mRNA expression levels of targets

收稿日期: 2021-02-04; 修回日期: 2021-03-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873165, 82074238).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-64286404, E-mail: hanjing8585@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0194

[extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2), phosphoinositide 3 kinase catalytic alpha polypeptide (PIK3CA), serine/threonine-protein kinase 1 (AKT1)] related to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway was measured by real-time PCR. The results of tube formation indicated that compared with the normal group, the total tube length increased in the model group ($P < 0.01$); after the treatment with LTP, the total tube length decreased compared with the model group ($P < 0.01$). Network pharmacology revealed that the targets of LTP included PIK3CA, AKT1, and ERK2, and the pathways involved the MAPK signaling pathway and the VEGF signaling pathway. Real-time PCR indicated that compared with the normal group, the mRNA expression levels of ERK2, PIK3CA and AKT1 were elevated in the model group ($P < 0.05$); after treatment with LTP, the mRNA expression levels of ERK2, PIK3CA and AKT1 decreased compared with the model group ($P < 0.05$). LTP may inhibit retinal vascular endothelial cell tube formation by regulating the MAPK signaling pathway and the VEGF signaling pathway. This study confirms the multi-targets and multi-pathways of LTP and provides a basis for its use in the treatment of diabetic retinopathy.

Key words: *Peganum harmala* L.; diabetic retinopathy; retinal vascular endothelial cell; tube formation; network pharmacology

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病常见的微血管并发症之一, 目前世界上约有 1.45 亿人患有 DR。DR 患者早期症状表现为视力下降, 视野缺损, 晚期出现牵拉性视网膜脱离, 是致盲的首要因素, 严重影响患者的生活质量^[1]。糖尿病视网膜病变过程与炎症、氧化应激、免疫等多种因素有关^[2]。西医治疗糖尿病视网膜病变主要采取控制血糖、血压及血脂等综合疗法, 晚期则采用激光、玻璃体切除术等, 但治疗价格较贵, 多数患者无力承担, 且总体疗效并不理想^[3]。

近年来, 中药广泛应用于 DR 的临床治疗中。骆驼蓬 (*Peganum hannal* L., Luotuopeng, LTP) 系蒺藜科多年生草本植物, 已被列为标准的维吾尔药。骆驼蓬全草中含有多种成分, 主要有生物碱、甾体、黄酮、萘醌和氨基酸等, 其中生物碱的含量最高, 主要包括骆驼蓬碱和去氢骆驼蓬碱。现代研究发现, 骆驼蓬具有降血糖及改善糖尿病并发症的作用^[4]。文献报道, 不同剂量的骆驼蓬种子醇提取物 (150 和 250 mg·kg⁻¹) 降低正常大鼠和链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 诱导的糖尿病大鼠的血糖水平, 且降糖能力与二甲双胍基本一致^[5]。另外, 低剂量骆驼蓬种子的水醇提取物 (30、60 和 120 mg·kg⁻¹) 灌胃给药不仅降低 STZ 诱导的糖尿病大鼠的血糖水平, 并且促进三羧酸循环, 并降低血脂、丙二醛、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、 γ -谷氨酰转肽酶、胆红素和糖化血红蛋白等^[6]。此外, 骆驼蓬子水提物灌胃给药能够减轻糖尿病大鼠肝脏汇管区炎症和局灶性坏死, 改善肾小球硬化和系膜增宽^[7]。虽然骆驼蓬降血糖的报道较多, 但是它对于 DR 的疗效却少有研究。本课题组前期研究显示, 骆驼蓬水提物显著抑制高糖诱导的视网膜血管内皮细胞的活力和细胞迁移^[8], 初步提示骆驼蓬可能具有防治 DR 的作用。由于骆驼蓬化

学成分复杂, 靶点众多, 它治疗 DR 的机制尚未明确。

网络药理学是集生物信息学、网络生物学和传统药理学等多学科于一体的综合性研究方法, 涵盖了药物活性成分检索、作用靶点预测和信号通路分析等内容。它通过构建活性成分-靶点、靶点-靶点、成分-靶点-疾病和成分-靶点-通路等网络, 充分利用基因和靶点等大数据, 系统综合地阐明药物的作用机制^[9]。网络药理学的优势与中药成分复杂、靶点众多的特点相吻合, 已经广泛应用于中药研究中^[10]。Zhang 等^[11]通过网络药理学预测了芍药治疗溃疡性结肠炎的作用靶点, 并构建了活性成分-疾病-靶点网络, 发现其主要是通过肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路减轻炎症反应对肠道的刺激, 为芍药治疗溃疡性结肠炎的进一步药理研究提供了参考。Yu 等^[12]通过网络药理学的方法, 发现银黄清肺胶囊具有多成分、多靶点、多通路的作用特点, 并预测了其慢性支气管炎的潜在作用机制。

本研究计划采用体外高糖诱导的视网膜血管内皮细胞模型, 观察骆驼蓬对内皮细胞管道形成的影响, 结合网络药理学方法和 real-time PCR 方法, 研究骆驼蓬治疗 DR 的潜在机制, 为深入开展基础实验研究及临床合理应用提供实验依据, 为 DR 的治疗提供新的思路, 为骆驼蓬的开发利用奠定基础。

材料与方 法

细胞株 猴视网膜血管内皮 (RF/6A) 细胞由上海生命科学研究院研究中心提供。

药物与试剂 骆驼蓬药材 (新疆维吾尔自治区药材公司神州大药房) 经新疆医科大学张洪亮教授鉴定为蒺藜科植物骆驼蓬 (*Peganum harmala* L.) 的种

子; RPMI 1640 无糖培养基 (批号: 22400-089)、RPMI 1640 高糖培养基 (批号: A10491-01; 含有 25 mmol·L⁻¹ 葡萄糖) (Gibco 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司, 批号: GYG0116); 基质胶 (康宁公司, 356234); TRIzol (Thermo 公司, 批号: 15596018); 反转录试剂盒 (批号: 4897030001)、PCR 试剂盒 (批号: 4913914001) (罗氏公司)。

主要仪器及设备 3111 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); LD5-2B 台式低速离心机 (中国时代北利公司); IX71 型荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯株式会社); 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 万分之一电子天平 (JY6001, 上海精科公司天平厂)。

骆驼蓬水提物的制备 取适量骆驼蓬子, 粉碎, 置于提取容器中, 加入 10 倍量水, 回流提取, 过滤, 得到药渣; 药渣加 8 倍量水, 重复上述步骤, 得到骆驼蓬水提物。将水提物放入蒸发皿中, 然后置于 70 °C 水浴锅上浓缩制成浸膏; 然后将浸膏转移至真空管干燥箱中 60 °C 干燥, 干燥后放入粉碎机中粉碎即得到骆驼蓬水提物粉末; 准确称取 10.0 mg 骆驼蓬水提物粉末, 加入 0.1 mL 高压灭菌水配制成 100 g·L⁻¹ 原液, 经 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 得滤液 4 °C 保存备用。

细胞培养和内皮管道形成实验 RF/6A 细胞培养于完全培养基中 (含 10% 胎牛血清 + 90% 基础培养基 + 1% 青霉素和链霉素), 置于温度为 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

每天于显微镜下观察细胞生长状况, 当细胞融合度达到 85% 左右时, 将细胞用于实验。首先, 将细胞培养皿中原有培养基弃去, 加入 PBS 清洗 2 次; 然后加入胰酶消化细胞, 当细胞间隙变大、细胞变圆时, 立即用完全培养基终止消化; 将细胞转移至 1.5 mL 离心管中, 并离心。分别准备 4 种培养基, 包括正常组培养基 (葡萄糖浓度为 5.5 mmol·L⁻¹)、模型组培养基 (葡萄糖浓度为 25 mmol·L⁻¹)、骆驼蓬高剂量组培养基 (葡萄糖浓度为 25 mmol·L⁻¹ + 骆驼蓬 200 mg·L⁻¹) 与骆驼蓬低剂量组培养基 (葡萄糖浓度为 25 mmol·L⁻¹ + 骆驼蓬 150 mg·L⁻¹)。用各组对应培养基将细胞浓度调整为每毫升 2×10⁵ 个。将基质胶置于碎冰融化, 融化后用基础培养基以 1:1 的比例稀释基质胶; 将稀释后的基质胶加入 96 孔板中, 并置于 37 °C 培养箱中放置; 30 min 后取出 96 孔板, 置于超净台中; 每孔加入含有不同培养基的细胞悬液 200 μL, 每组 3 孔。将 96 孔板置于 37 °C 培养箱中孵育 5 h, 取出于倒置荧光显微镜下拍照, 并用 Image J 软件分析管道形成总长度。

骆驼蓬活性成分筛选及其作用靶点的筛选与预测 利用 TCMID (<http://119.3.41.228:8000/tcmid/>)、

BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 筛选骆驼蓬的主要有效成分。筛选方法: 在 TCMID、BATMAN-TCM 数据库选择 “herb or herb list” 选项, 然后输入 “LUO TUO PENG”, 并设定 score ≥ 20、P < 0.05 进行筛选^[13]。

通过 SuperPred (<http://prediction.charite.de/index.php?site=home>)、Binding DB (http://www.bindingdb.org/bind/searchby_smiles.jsp)、BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 筛选骆驼蓬药效成分的作用靶点。筛选方法: ① 在 SuperPred 数据库输入每一个活性成分的 “pubchem-name” 或 “smiles” 然后点击 “start” 开始预测活性成分的靶点; ② 在 Binding DB 数据库输入活性成分的 “smiles”, 然后点击 “search” 进行检索。

DR 相关靶点获取 以 “diabetic retinopathy” 为关键词在 OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>)、TTD 数据库 (<http://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>)、pharmGkb 数据库 (<https://www.pharmgkb.org/>)、DiGSeE 数据库 (<http://210.107.182.61/geneSearch/>)、GAD 数据库 (<http://geneticassociationdb.nih.gov/>) 进行检索, 得到 DR 相关靶点。

靶点名称矫正 在 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 数据库输入上述筛选获得的靶点, 得到相应的基因名称, 对蛋白名进行校正, 优先选择 Swiss-prot 收录并且匹配程度高的基因名称。

骆驼蓬治疗 DR 的潜在作用靶点筛选 为明确骆驼蓬与 DR 潜在靶点间的相互作用, 利用 Venn 在线软件 (版本 2.1.0, <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 将骆驼蓬靶点与 DR 靶点取交集, 通过 Venn 图展现骆驼蓬靶点与 DR 靶点间的交集靶点。

蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 将骆驼蓬治疗 DR 的潜在作用靶点上传至 String 在线平台数据库, 物种设置为 “人” (“homo sapiens”), 最低相互作用评分设置为最高置信度 “highest confidence (0.900)”, 其余参数保持默认设置, 构建蛋白质相互作用网络模型, 获得 PPI 网络。使用度值 (degree) 评价靶点的重要程度, 从而预测骆驼蓬治疗 DR 的潜在靶点。

KEGG 通路分析与 GO 分类富集分析 将骆驼蓬治疗 DR 的潜在作用靶点导入 David 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>), 限定研究物种为人类, 选择 Gene Ontology (GO) 下的分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP) 和细胞组成 (cellular component, CC) 3 个部分进行 GO 富集分析, 选择 Pathway 分析下的 KEGG pathway, 设定显著性为

$P < 0.05$, 寻找潜在作用靶点显著富集的主要功能注释与体内通路。导出文件, 并利用 Excel 和 Omicshare 平台绘制条形图和气泡图。

“药物成分-通路-作用靶点”网络图 将活性成分、通路、靶点上传至 Cytoscape 3.7.1 软件, 绘制“成分-通路-靶点”可视化网络图。网络中, 节点 (node) 表示化学成分、交集基因和通路。若某一靶点为某化合物的潜在作用靶点, 则以边 (edge) 相连, 该靶点参与某一通路时, 将靶点与作用通路也以边相连。通过构建网络揭示骆驼蓬治疗 DR 多成分、多靶点、多通路的特点。

qRT-PCR 实验 向每组细胞中加入 TRIzol 提取总 RNA。通过逆转录酶合成 cDNA。实时定量 PCR 反应条件为: 55 °C、5 min, 95 °C、10 min; 95 °C、15 s, 60 °C、30 s, 循环 40 次。溶解曲线确定产物的特异性, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

Table 1 Primers for qRT-PCR. ERK2: Extracellular signal-regulated kinase 2; AKT1: Serine/threonine-protein kinase 1; PIK3CA: Phosphoinositide 3 kinase catalytic alpha polypeptide

Gene	Forward primer	Reverse primer
ERK2	CGTCATCCACCTTGA CACGA	GGTAAACCTGGTGCA ACCCT
PIK3CA	TTAGCCAGAGGTTTG GCCTG	ATCTGGTCGCCTCATT TGCT
AKT1	CCACGGTAGCACTTG ACCTT	CAGCAGCAGTGGCAG CAT
β -Actin	TAATGAGCCTTCATGC CCCC	CAGGTACAGGTAAGC CCTGG

统计学方法 所有数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 当数据符合正态分布时, 组间比较采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析。若方差齐, 组间差异比较采用 LSD 法; 若方差不齐, 组间差异比较采用 Tamhane 法。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

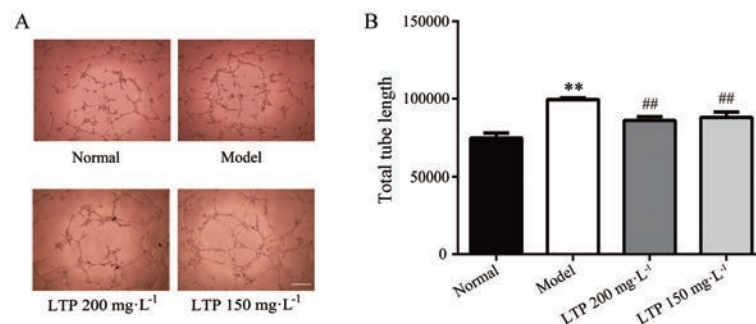


Figure 1 the effect of *Peganum harmala* L. (Luotuopeng, LTP) on the tube formation of the retinal vascular endothelial cells. A: RF/6A was treated with different concentrations of LTP and the tube formation was observed (scale bar: 100 μ m); B: Quantitative results of tube formation. $n \geq 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs normal group; ## $P < 0.01$ vs model group

结果

1 骆驼蓬对视网膜血管内皮细胞管道形成的影响

与正常组相比, 模型组内皮细胞管道形成总长度显著增加; 与模型组相比, 骆驼蓬给药后, 内皮细胞管道形成总长度显著减少。结果见图 1A、B。

2 骆驼蓬药效成分及靶点筛选结果

在 TCMID 和 BATMAN-TCM 数据库中得到骆驼蓬的活性成分共 21 个。然后通过 SuperPred、Binding DB、BATMAN-TCM 3 个数据库筛选骆驼蓬活性成分的可能靶点, 对筛选结果合并去重后, 得到骆驼蓬 17 个药效成分的作用靶点共 611 个 (表 2)。另外, 4 个活性成分未能在数据库中找到相应靶点。

Table 2 Active components of *Peganum hannal* L.

Number	Active ingredient	The number of targets
1	Harmol	263
2	Vasicoline	190
3	Pedunculoside	4
4	Harmalol	265
5	Deoxypeganine	190
6	Deoxypodophyllotoxin	4
7	Pegamine	10
8	Peimine	7
9	Peganine	5
10	Deoxyvasicinone	166
11	Harmaline	18
12	Peganol	5
13	Harmine	209
14	Rupestonic acid	20
15	Harman	8
16	Vasicinone	3
17	Vasicinol	4

3 DR 靶点筛选结果

通过对 OMIM 数据库、TTD 数据库、pharmGkb 数据库、DiGSeE 数据库、GAD 数据库进行检索, 得到 DR 相关靶点共 301 个, 包括血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、细胞外调节蛋白激酶 2 (extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2)、

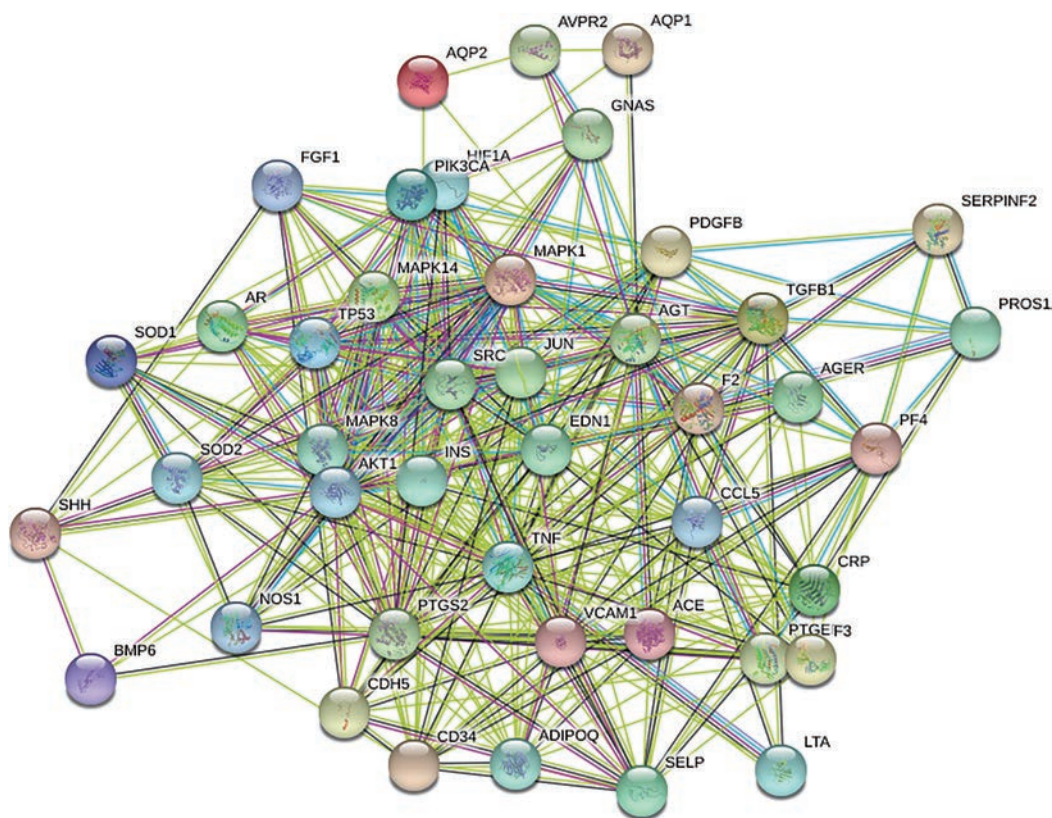


Figure 2 Protein-protein interaction (PPI) network of the targets of *Peganum hannal* L. in the treatment of DR

磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 α (phosphoinositide 3 kinase catalytic alpha polypeptide, PIK3CA) 等。

4 骆驼蓬治疗 DR 的潜在靶点预测及 PPI 网络构建

利用 Venn 在线软件将骆驼蓬活性成分的 611 个作用靶点与 DR 的 301 个靶点取交集, 得到 44 个共同靶点 (涉及 11 个活性成分)。将获得的 44 个药物-疾病共同靶点上传至 STRING 在线数据库平台得到 PPI 网络 (图 2)。设置置信度大于 0.4, 剔除 1 个游离的靶点, 得到关键靶点蛋白 43 个, 370 条边代表了蛋白之间的相互作用。

5 潜在靶点的 GO 功能富集分析

利用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并通过 Excel 和 Omicshare 平台将分析结果转化为条形图和气泡图。

在分子功能分析中 (图 3) 富集靶点较多的有蛋白结合 (protein binding)、酶结合 (enzyme binding)、特定蛋白结合 (identical protein binding); 丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine-protein kinase 1, AKT1)、ERK2、AP-1 转录因子 (AP-1 transcription factor subunit, JUN) 等基因参与其中。

在细胞组分分析 (图 4) 中富集靶点较多的有细胞外间隙 (extracellular space)、细胞外区域 (extracellular region)、质膜 (plasma membrane)、细胞外的外泌体

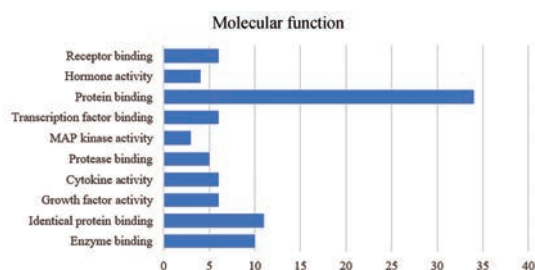


Figure 3 The count of genes and molecular function

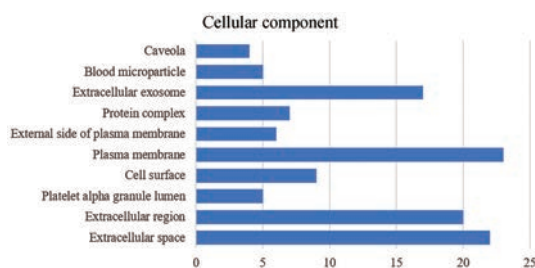


Figure 4 The count of genes and cellular component

(extracellular exosome); 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、ERK2、血管紧张素转化酶 (angiotensin I-converting enzyme, ACE) 等基因参与其中。

在生物功能分析 (图 5) 中富集靶点较多的有基因表达的正向调控 (positive regulation of gene expression)、炎症反应 (inflammatory response)、转录的正向调控

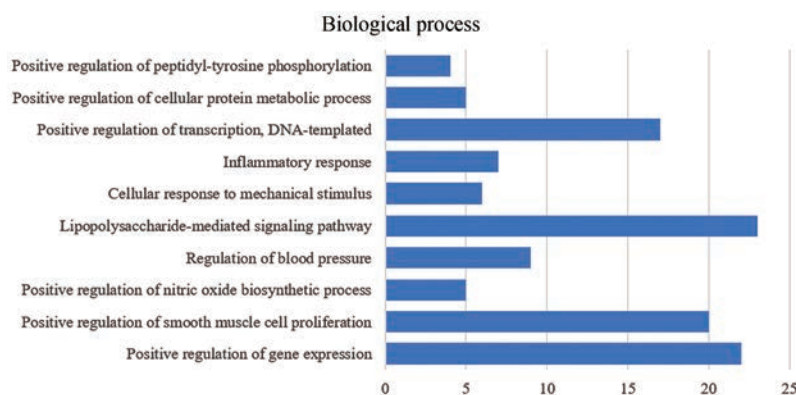


Figure 5 The count of genes and biological process

(positive regulation of transcription; DNA-templated); 雄激素受体 (androgen receptor, AR)、TNF、转化生长因子 B1 (transforming growth factor-beta 1, TGFβ1)、低氧诱导因子-1A (hypoxia inducible factor-1A, HIF1A) 等基因参与其中。

6 KEGG 通路富集分析结果

KEGG 通路富集分析共得到 90 条通路, 其中排名靠前的通路主要涉及 2 型糖尿病、VEGF 信号通路 (VEGF signaling pathway)、脂肪细胞的脂质代谢等; 富集靶点较多的通路有 MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、TLR 信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway) 等; AKT1、ERK2、丝裂原活化蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8)、PIK3CA 等基因参与其中 (图 6)。

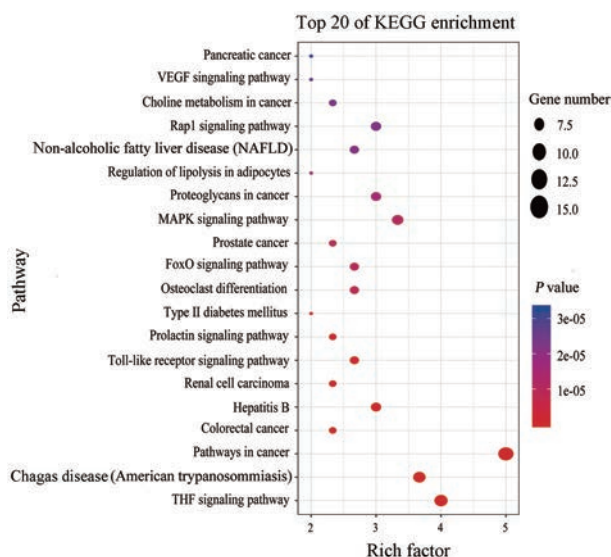


Figure 6 Enrichment of KEGG pathway

7 “成分-通路-靶点”的网络构建与可视化分析

将骆驼蓬的 11 个药效成分、交集靶点以及排名靠前的通路导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建“成分-通路-

靶点”作用关系网络图 (图 7), 网络中共有 65 个节点, 572 条相互作用的边。作用于 PIK3CA、AKT1、ERK2、MAPK8、TNF、JUN、ACE、AR、TGFβ1 和 HIF1A 的有效化学成分较多; 涉及的通路主要包括炎症通路、糖尿病相关通路、MAPK 信号通路、TNF 信号通路、VEGF 信号通路和 TLR 信号通路等。作用于上述靶点和通路的化学成分有去甲骆驼蓬碱 (harmalol)、哈尔酚 (harmol) 和去氢骆驼蓬碱 (harmine) 等。

8 qRT-PCR 结果

与正常组相比, 模型组 ERK2、PIK3CA 和 AKT1 的 mRNA 表达水平均升高; 而与模型组相比, 200 mg·L⁻¹ 骆驼蓬给药组 ERK2、PIK3CA 和 AKT1 的 mRNA 表达水平均降低 ($P < 0.05$)。结果见图 8A~C。

讨论

DR 的特征性病变是视网膜新生血管的形成。血管形成的过程为内皮细胞分裂增生形成突起的幼芽, 随着内皮细胞向前移动及后续细胞的增生而形成一条细胞索, 数小时后便可出现管腔, 形成新生的毛细血管, 进而彼此吻合构成毛细血管网^[14]。内皮细胞管道形成实验是衡量血管生成的一种经典的体外实验, 因此本课题采用内皮细胞管道形成实验观察骆驼蓬对 DR 的影响, 借助网络药理学的方法筛选骆驼蓬治疗 DR 的靶点与通路, 并通过 qRT-PCR 方法验证网络药理学结果, 揭示骆驼蓬治疗 DR 的药效及其分子机制。

管道形成实验结果显示, 与正常组相比, 模型组管道长度显著增加; 而与模型组相比, 骆驼蓬组显著降低管道长度。此结果提示, 高糖促进视网膜血管形成, 而骆驼蓬抑制高糖诱导的血管生成, 提示骆驼蓬具有治疗 DR 的潜力。

本文采用网络药理学方法预测了骆驼蓬治疗 DR 的可能作用靶点和通路, 并选取关键靶点进行了分子水平的验证。网络药理学结果提示, 骆驼蓬治疗 DR

胞代谢和调控细胞周期等多种生物学功能,参与炎症性疾病、糖尿病及癌症等多种疾病的发生发展。文献报道,高糖条件下人视网膜内皮细胞中AKT1表达显著升高,且通过触发细胞内相关信号通路影响内皮细胞的血管生成^[16]。ERK是一种细胞外信号调节激酶,分为ERK1和ERK2,两者具有相似的结构和相近的功能,常以ERK1/2并称。ERK1/2被激活后进入细胞核促进某些基因的转录和表达,是多数生长因子和细胞因子调控细胞增殖的重要途径;糖尿病发生后,该信号通路通过释放VEGF参与DR的发生发展^[17]。如在高糖条件下培养的小鼠周细胞内ERK1/2活性显著增强;ERK1/2信号通路激活诱导内皮细胞增生,促进新生血管的形成;抑制ERK1/2的磷酸化则减轻牛视网膜内皮细胞中VEGF诱导的血管新生;抑制ERK1/2亦可抑制小鼠早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)模型中血管通透性的增加^[18-21]。此外,PI3K、AKT1和ERK2在血管生成过程中相互联系。PI3K在VEGF受体下游的信号转导中处于核心地位,激活后促进AKT1磷酸化,加速内皮细胞发生迁移、增殖,形成新生微血管腔,最终形成稳定的血管^[22]。ERK2是MAPK信号通路的重要成员,激活后通过VEGF信号通路参与DR的发生发展^[23]。

本研究发现,在骆驼蓬的化学成分中,一种化学成分可以对应多个靶点,参与多条信号通路;如去氢骆驼蓬碱对应的靶点有AKT1、ERK2和HIF1A等,调控MAPK信号通路和VEGF信号通路等。文献报道,去氢骆驼蓬碱抑制胱硫醚 β 合酶敲除小鼠及双特异性酪氨酸-(Y)-磷酸化调节激酶[dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A, DYRK1A]转基因小鼠大脑组织中AKT和ERK的磷酸化^[24]。盐酸去氢骆驼蓬碱显著抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,同时降低肿瘤细胞中HIF1A的表达水平^[25]。另外,多个化学成分也可以对应一个共同靶点,如去甲骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱和哈尔酚共同作用于ERK2;去氢骆驼蓬碱和哈尔酚共同作用于PI3K和AKT1。文献报道,骆驼蓬 β 咔啉类生物碱(包括去甲骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱和哈尔酚)显著抑制人胃癌SGC-7901细胞的生长和促进SGC-7901细胞凋亡,并且显著降低胃癌细胞中ERK mRNA和蛋白表达水平^[26]。去氢骆驼蓬碱和哈尔酚延缓昆虫Sf9细胞生长,导致细胞边界模糊,促进自噬体形成以及自噬体与溶酶体的结合,并且显著抑制Sf9细胞中PI3K和AKT的蛋白表达^[27]。

在骆驼蓬的化学成分中,去氢骆驼蓬碱最受关注,它具有治疗糖尿病及其并发症的作用。文献报道,去氢骆驼蓬碱显著降低db/db小鼠的血糖水平,提高葡萄

糖耐受能力,改善胰岛素耐受,并且促进脂肪酸氧化和能量代谢^[28]。去氢骆驼蓬碱通过增强脑源性神经营养因子/酪氨酸激酶受体B信号通路减轻STZ诱导的糖尿病大鼠学习和记忆功能障碍,并且通过抑制NOD样受体家族3炎症小体的激活发挥神经保护作用^[29]。此外,去氢骆驼蓬碱亦是一种潜在的血管新生抑制剂。首先,体外实验显示去氢骆驼蓬碱能够抑制原代人脐静脉血管内皮细胞的增殖、迁移、管腔结构的形成以及诱导内皮细胞发生凋亡^[30]。其次,大鼠动脉环实验和小鼠角膜微囊袋实验证明去氢骆驼蓬碱抑制新生血管的形成^[31]。再次,肿瘤异位移植实验表明,去氢骆驼蓬碱抑制肺癌的生长,其机制可能是抑制肿瘤血管新生和肿瘤细胞的增殖^[32]。去氢骆驼蓬碱激活内皮细胞p53信号通路,诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞,抑制血管新生的发生并最终控制肿瘤的生长^[33]。而本文运用网络药理学方法证实,去氢骆驼蓬碱对DR有关的多条通路、多个靶点均有调控作用。综合文献及本课题的研究结果,作者推测去氢骆驼蓬碱可能是骆驼蓬发挥治疗DR作用的关键活性成分。

本研究系统揭示了骆驼蓬可能通过靶向PI3K、AKT1和ERK2等发挥治疗DR的作用,并且去氢骆驼蓬碱是其关键效应成分,为骆驼蓬治疗DR的临床应用及科学研究提供了坚实的依据。后期课题组将采用动物模型对去氢骆驼蓬碱治疗DR的药效进行深入研究,为DR的治疗提供新的选择。

作者贡献: 李宏丽负责实验设计及论文初稿撰写;孙惠惠和宋星卓负责细胞的培养等实验;刘汉莹、田婧莹参与实验操作以及文献的整理;季青璇、王析瑞、蒋坤秀负责文献的调研;韩静为本文的通讯作者,负责实验进程的把关、实验设计及稿件修改等工作。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Mendonca HR, Carpi-Santos R, da Costa Calaza K, et al. Neuroinflammation and oxidative stress act in concert to promote neurodegeneration in the diabetic retina and optic nerve: galectin-3 participation [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15: 625-635.
- [2] RübSam A, Parikh S, Fort PE. Role of inflammation in diabetic retinopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 942.
- [3] Mansour SE, Browning DJ, Wong K, et al. The evolving treatment of diabetic retinopathy [J]. *Clin Ophthalmol*, 2020, 14: 653-678.
- [4] Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, et al. Pharmacological and therapeutic effects of *Peganum harmala* and its main alkaloids [J]. *Pharmacogn Rev*, 2013, 7: 199-212.
- [5] Singh AB, Chaturvedi JP, Narender T, et al. Preliminary studies on the hypoglycemic effect of *Peganum harmala* L. seeds ethanol

- extract on normal and streptozotocin induced diabetic rats [J]. Indian J Clin Biochem, 2008, 23: 391-393.
- [6] Komeili G, Hashemi M, Bameri-Niafar M. Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic effects of *Peganum harmala* seeds in diabetic rats [J]. Cholesterol, 2016, 2016: 7389864.
- [7] Abedi Gaballu F, Abedi Gaballu Y, Moazenzade Khyavy O, et al. Effects of a triplex mixture of *Peganum harmala*, *Rhus coriaria*, and *Urtica dioica* aqueous extracts on metabolic and histological parameters in diabetic rats [J]. Pharm Biol, 2015, 53: 1104-1109.
- [8] Wang ZL, Song YL, Xing W, et al. Effects and mechanism of Luotuopeng's aqueous extract on the high glucose induced-retinal vascular endothelial cells [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med (北京中医药大学学报), 2018, 41: 738-743.
- [9] Song YL, Wang ZL, Xing W, et al. Pharmacological mechanism of Compound Xueshuantong in treatment of diabetic retinopathy based on network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1442-1448.
- [10] Hao DC, Xiao PG. Network pharmacology: a Rosetta Stone for traditional Chinese medicine [J]. Drug Dev Res, 2014, 75: 299-312.
- [11] Zhang Y, Li X, Xu X, et al. Mechanisms of *Paeonia lactiflora* in treatment of ulcerative colitis: a network pharmacological study [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 7574-7580.
- [12] Yu G, Zhang Y, Ren W, et al. Network pharmacology-based identification of key pharmacological pathways of Yin-Huang-Qing-Fei capsule acting on chronic bronchitis [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2016, 12: 85-94.
- [13] Zhang G, Jiang X, Liu Y, et al. Therapeutic efficiency of an external Chinese herbal formula of mammary precancerous lesions by BATMAN-TCM online bioinformatics analysis tool and experimental validation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 2795010.
- [14] Cao L, Song Y, Wu Y, et al. Effects of ginsenoside Rg3 on human retinal capillary endothelial cells cultured in normal and high glucose conditions [J]. Int Eye Sci (国际眼科杂志), 2013, 13: 1965-1969.
- [15] Zhou M, Song X, Huang Y, et al. Wogonin inhibits H₂O₂-induced angiogenesis via suppressing PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. Vascul Pharmacol, 2014, 60: 110-119.
- [16] Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis [J]. Front Mol Neurosci, 2011, 4: 51.
- [17] Ye X, Xu G, Chang Q, et al. ERK1/2 signaling pathways involved in VEGF release in diabetic rat retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51: 5226-5233.
- [18] Hoshi S, Nomoto K, Kuromitsu J, et al. High glucose induced VEGF expression via PKC and ERK in glomerular podocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290: 177-184.
- [19] Muñoz-Chápuli R, Quesada AR, Angel Medina M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells [J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61: 2224-2243.
- [20] Ojima T, Takagi H, Suzuma K, et al. Ephrin A1 inhibits vascular endothelial growth factor-induced intracellular signaling and suppresses retinal neovascularization and blood-retinal barrier breakdown [J]. Am J Pathol, 2006, 168: 331-339.
- [21] Bullard LE, Qi X, Penn JS. Role for extracellular signal-responsive kinase-1 and -2 in retinal angiogenesis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44: 1722-1731.
- [22] Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis [J]. J Intern Med, 2013, 273: 114-127.
- [23] Fish JE, Cantu Gutierrez M, Dang LT, et al. Dynamic regulation of VEGF-inducible genes by an ERK/ERG/p300 transcriptional network [J]. Development, 2017, 144: 2428-2444.
- [24] Abekhouk S, Planque C, Ripoll C, et al. Dyrk1A, a serine/threonine kinase, is involved in ERK and Akt activation in the brain of hyperhomocysteinemic mice [J]. Mol Neurobiol, 2013, 47: 105-116.
- [25] Tan B, Li Y, Zhao Q, et al. The impact of harmine hydrochloride on growth, apoptosis and migration, invasion of gastric cancer cells [J]. Pathol Res Pract, 2020, 216: 152995.
- [26] Fan Y, Patima A, Chen Y, et al. Cytotoxic effects of β -carboline alkaloids on human gastric cancer SGC-7901 cells [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8: 12977-12982.
- [27] Cui G, Shu B, Veeran S, et al. Natural β -carboline alkaloids regulate the PI3K/Akt/mTOR pathway and induce autophagy in insect Sf9 cells [J]. Pestic Biochem Physiol, 2019, 154: 67-77.
- [28] Waki H, Park KW, Mitro N. The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPAR γ expression [J]. Cell Metabolism, 2007, 5: 357-370.
- [29] Liu P, Li H, Wang Y, et al. Harmine ameliorates cognitive impairment by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and enhancing the BDNF/TrkB signaling pathway in STZ-induced diabetic rats [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 535.
- [30] Dai FJ. Study on the Effect and Mechanism of Small Molecules in Angiogenesis Related Diseases (小分子化合物在血管新生相关疾病中的功能与机理研究) [D]. Shanghai: East China Normal University, 2014.
- [31] Cai HR, Huang X, Zhang XR. Harmine suppresses bladder tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis [J]. Biosci Rep, 2019, 39: BSR20190155.
- [32] Shen J, Wang B, Zhang T, et al. Suppression of non-small cell lung cancer growth and metastasis by a novel small molecular activator of RECK [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45: 1807-1817.
- [33] Dai F, Chen Y, Song Y, et al. A natural small molecule harmine inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth through activation of p53 in endothelial cells [J]. PLoS One, 2012, 7: e52162.