

基于网络药理学和分子对接探讨黄连解毒汤治疗真菌性角膜炎的作用机制

姚晓峰, 丰竹慧, 李 翠*

青岛大学附属医院眼科, 山东 青岛

收稿日期: 2024年2月27日; 录用日期: 2024年3月21日; 发布日期: 2024年3月29日

摘要

目的: 应用网络药理学和分子对接方法深入研究黄连解毒汤治疗真菌性角膜炎(Fungal keratitis, FK)的作用机制。方法: 首先, 利用TCMSP、UniProt数据库收集黄连解毒汤的活性成分及相关靶点, 通过Cytoscape 3.9.1软件进行可视化, 检索GeneCards、与OMIM数据库获取FK的相关靶点。然后, 借助Venny 2.1平台绘制韦恩图, 利用STRING平台构建蛋白相互作用(PPI)网络, 并用Cytoscape进行可视化分析。将靶点信息导入Metascape数据库, 进行后续的GO功能和KEGG通路富集分析, 通过微生信平台进行可视化。最后使用AutoDock进行分子对接。结果: 共获得黄连解毒汤活性成分66个, 对应靶点247个, FK相关靶点1141个, 得到66个交集靶点; 网络分析的结果显示TNF、IL6、TP53、IL1B、CXCL8和CCL2为黄连解毒汤治疗FK的核心靶点, 槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、黄芩素、 β -谷甾醇和刺槐素为关键活性成分。共富集得到720条GO条目, 119条KEGG通路。分子对接结果表明六种核心活性成分与TNF和IL6均有较好结合活性。结论: 黄连解毒汤可能通过槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、黄芩素、 β -谷甾醇和刺槐素等核心活性成分作用于TNF、IL6等核心靶点治疗FK, 为黄连解毒汤治疗FK提供理论依据。

关键词

黄连解毒汤, 真菌性角膜炎, 网络药理学, 分子对接, 作用机制

Exploration on the Mechanism of Huanglian Jiedu Decoction in Treating Fungal Keratitis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

Xiaofeng Yao, Zhuhui Feng, Cui Li*

Department of Ophthalmology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

*通讯作者。

文章引用: 姚晓峰, 丰竹慧, 李翠. 基于网络药理学和分子对接探讨黄连解毒汤治疗真菌性角膜炎的作用机制[J]. 临床医学进展, 2024, 14(3): 1770-1782. DOI: 10.12677/acm.2024.143906

Abstract

Objective: To investigate the therapeutic mechanism of Huanglian Jiedu Decoction against fungal keratitis (FK) using network pharmacology and molecular docking. **Methods:** First, the active ingredients and related targets of Huanglian Jiedu Decoction were collected using TCMSP and UniProt databases. Visualization was performed using Cytoscape 3.9.1, while GeneCards and OMIM databases were searched to obtain FK-related targets. Then, Venn diagrams were generated using the Venny 2.1 platform. Protein-protein interaction (PPI) networks were constructed using the STRING platform, and analysis networks were built using Cytoscape. The Metascape database was utilized for GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis, with visualization performed through bioinformatics platforms. Finally, molecular docking was carried out using AutoDock. **Results:** A total of 66 active components were obtained from Huanglian Jiedu Decoction, corresponding to 247 target proteins, and obtained 1141 FK-related target proteins. Among them, 66 intersecting targets were identified through network analysis. The results of the network analysis revealed that TNF, IL6, TP53, IL1B, CXCL8, and CCL2 are the core targets for treating FK with Huanglian Jiedu decoction. quercetin, kaempferol, wogonin, baicalein, beta-sitosterol and acetin were identified as key active components. Additionally, a total of 720 GO terms and 119 KEGG pathways were enriched. Molecular docking results demonstrated favorable binding activities between the core active components and key targets. **Conclusion:** Huanglian Jiedu Decoction may provide a theoretical basis for the treatment of FK by acting on key active components such as quercetin, kaempferol, wogonin, baicalein, beta-sitosterol and acetin to target key factors like TNF and IL6.

Keywords

Huanglian Jiedu Decoction, Fungal Keratitis, Network Pharmacology, Molecular Docking, Mechanism

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

真菌性角膜炎(Fungal keratitis, FK)是一种感染性角膜疾病,在以农业为主的发展中国家发病率明显高于发达国家,其主要致病原因与植物性角膜损伤有关[1] [2]。FK的致病真菌多为酵母菌属、镰刀菌属和曲霉菌属[3]。FK的常见并发症为角膜溃疡、角膜穿孔,更严重的甚至发展为眼内炎,其预后通常很差,可能引起角膜瘢痕,严重影响患者视力[4] [5]。近年来,治疗FK的一线药物如那他霉素、伏立康唑等不仅有较强的耐药性[6],还存在眼表滞留时间较短、需要高频率给药、生物利用度较低和刺激性过大等问题[7],所以寻找新的治疗FK药物非常有必要。FK在中医中属于湿翳范畴,基本病机为湿热壅盛,熏蒸黑睛[8],其发病主要与患者外感湿毒、毒生内热以致湿热之毒上冲双目有关,在治疗上主张采用清热解毒,祛湿降热疗法[9]。

黄连解毒汤出自于《肘后备急方》,其作用主要为清热解毒[10]。有研究表明,黄连解毒汤有强大的体外抗真菌活性,并且与临床常用抗真菌药物有一定的协同作用[11] [12]。此外,黄连解毒汤在临床上

也常用于治疗感染性疾病,如泌尿系感染和脓毒血症等,这依赖于黄连解毒汤的多种药理作用,如抗炎、保护神经和抗肿瘤等[13]。刘保光等人发现,黄连解毒汤能够调节中性粒细胞的募集浸润和功能,从而影响炎症反应,还能够通过 TLR4/NF- κ B 信号通路影响炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 水平来调控炎症[14]。以上表明,黄连解毒汤具有治疗 FK 的潜力,并且其治疗作用及具体机制尚无人报道。

本研究利用网络药理学的方法及分子对接的技术,探究黄连解毒汤治疗 FK 相关的有效成分、关键靶点以及可能涉及到的生物过程与信号通路。在分析结果基础上,采用分子对接进行验证,进一步炎症有效成分对相关关键靶点的作用,为 FK 的治疗提供新思路。

2. 材料与方法

2.1. 黄连解毒汤的活性成分相关靶点的获取

利用 TCMSP 数据库(<https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>)查找黄连解毒汤四种中药成分:黄连、黄芩、黄柏、栀子相关的活性成分,根据口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 及类药性(DL) ≥ 0.18 筛选后,找到其对应的靶点蛋白。在 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)中,将物种选为“Human”,检索各蛋白所对应的的基因名称。将所得数据导入软件 Cytoscape 3.10.1 内,构建“药物-有效成分-靶点”网络图,图中各节点(Node)代表不同的药物、活性成分与靶点;而边(Edge)代表的是各节点之间的关联。

2.2. FK 相关靶点预测

使用 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<https://omim.org/>)检索 FK 靶点,以“Fungal keratitis”为关键词,获得 FK 疾病相关基因,之后整理并剔除掉重复基因。

2.3. 获取交集靶点并绘制韦恩图

将黄连解毒汤的相关靶点与 FK 的疾病靶点进行进一步对比分析,得到交集靶点,然后通过绘软件 venny 2.1 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)绘制药物靶点与疾病靶点韦恩图,其中图中交集部分即为交集靶点,是黄连解毒汤的活性成分中可能与 FK 相关的作用靶点。

2.4. 黄连解毒汤与 FK 蛋白互作(PPI)全局网络的构建

将黄连解毒汤治疗 FK 的作用靶点导入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>),进行 PPI 分析,将其物种选定为“Homo sapiens”,选择最高置信度(Highest Confidence, 0.900),去除网络中离散或无关联的蛋白,其余条件保持默认设置,得到蛋白相互作用关系,利用 Cytoscape 3.10.1 软件绘制 PPI 网络图,进行进一步数据分析,根据度值分析得到关键靶点。

2.5. GO 和 KEGG 富集分析

使用 Metascape (<http://metascape.org/>)数据库对关键靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,以 $p < 0.05$ 作为筛选条件。在微生物平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)中对结果进行可视化。

2.6. 构建成分-靶点-通路网络

将 KEGG 富集分析结果按照 count 值选取前 30 条,再根据富集通路涉及的核心靶点以及靶点对应的成分,运用 Cytoscape 3.10.1 软件构建成分-靶点-通路网络图,并进行可视化分析。

2.7. 分子对接

选取黄连解毒汤中度值前六的活性成分与前 2 位的核心靶点进行分子对接。分别在 PubChem 数据库

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得活性成分的复合物 CID, PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取核心靶点蛋白 3D 结构, 使用 AutoDock 软件去掉配体及溶剂、添加极性氢离子, 之后进行分子对接, 最后再使用 PyMoL 软件进行可视化。

3. 结果

3.1. 黄连解毒汤的活性成分及药物 - 成分 - 靶点网络

黄连解毒汤共有 4 味中药材, 分别为: 黄连、黄柏、黄芩、栀子。在 TCMSP 数据库中得到黄连的活性成分 48 种、黄柏的活性成分 140 种、黄芩的活性成分 143 种、栀子的活性成分 98 种, 根据 $OB \geq 30\%$ 及 $DL \geq 0.18$ 筛选后, 再剔除掉重复成分、无对应靶标成分, 共得到出黄连解毒汤的有效化合物成分 66 种, 成分及靶点信息见表 1。使用 UniProt 数据库进行转换后, 得到 247 个靶基因。将黄连解毒汤的药物、活性成分及靶基因导入 Cytoscape 3.10.1 软件中, 构建“药物 - 活性成分 - 靶点”网络图见图 1。黄连解毒汤活性成分 - 靶点网络包括 317 个节点、1213 条边, 其中菱形为 247 个靶基因节点、黄色六边形为 10 个重叠活性成分节点、淡绿色六边形为 16 个黄柏所含活性成分节点、绿色六边形为 3 个黄连所含活性成分节点、粉色六边形为 9 个栀子所含活性成分节点、橙色六边形为 28 个黄芩所含活性成分节点, V 字型为 4 个药物节点。

Table 1. Information on the effective components and target points of Huanglian Jiedu Decoction

表 1. 黄连解毒汤有效成分及靶点信息

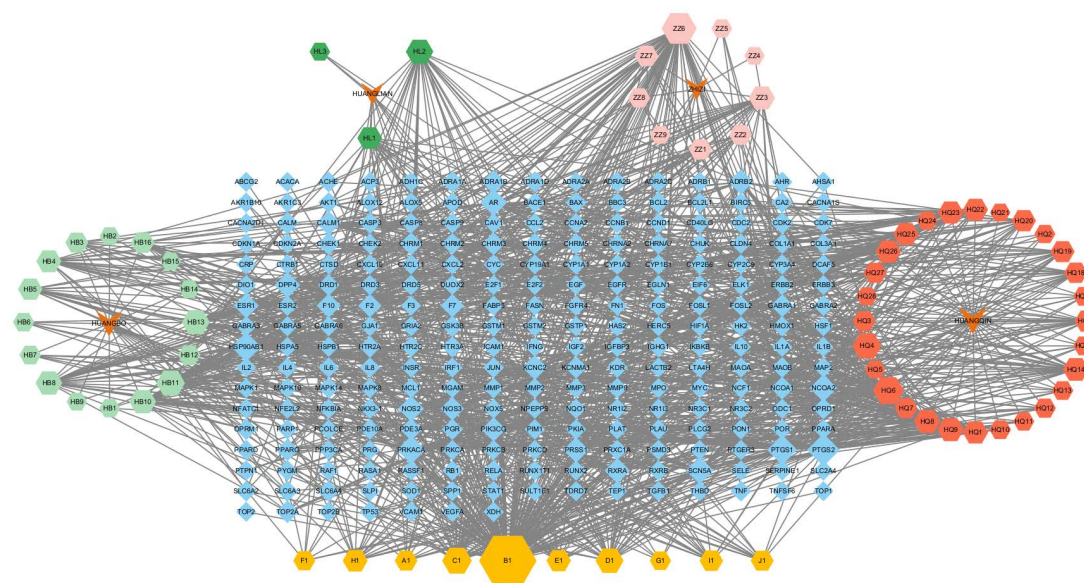
代码	化学名称	靶点数/个	来源
A1	coptisine	9	黄连 黄柏 黄芩
B1	quercetin	154	黄连 黄柏 栀子
C1	beta-sitosterol	38	黄柏 栀子 黄芩
D1	Stigmasterol	31	黄柏 栀子 黄芩
E1	berberine	17	黄连 黄柏
F1	Worenine	7	黄连 黄柏
G1	Magnograndiolide	4	黄连 黄柏
H1	palmatine	19	黄连 黄柏
I1	berberrubine	13	黄连、黄柏
J1	epiberberine	11	黄连、黄芩
HL1	Berlambine	20	黄连
HL2	(R)-Canadine	31	黄连

续表

HL3	Corchoroside A Qt	2	黄连
HB1	Phellavin Qt	3	黄柏
HB2	delta 7-stigmastenol	1	黄柏
HB3	Phellopterin	12	黄柏
HB4	Dehydrotanshinone II A	21	黄柏
HB5	rutaecarpine	18	黄柏
HB6	Skimmianin	5	黄柏
HB7	Chelerythrine	6	黄柏
HB8	Cavidine	28	黄柏
HB9	Hericenone H	1	黄柏
HB10	Fumarine	28	黄柏
HB11	Isocorypalmine	36	黄柏
HB12	phellamurin Qt	10	黄柏
HB13	(S)-Canadine	32	黄柏
HB14	poriferast-5-en-3beta-ol	2	黄柏
HB15	campesterol	1	黄柏
HB16	thalifendine	14	黄柏
ZZ1	Sudan III	13	栀子
ZZ2	3-Methylkempferol	11	栀子
ZZ3	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	26	栀子
ZZ4	isoimperatorin	1	栀子
ZZ5	Mandenol	3	栀子
ZZ6	kaempferol	63	栀子
ZZ7	crocetin	14	栀子
ZZ8	Ammidin	8	栀子
ZZ9	Ethyl oleate (NF)	1	栀子
HQ1	(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	22	黄芩
HQ2	Dihydrobaicalin Qt	4	黄芩
HQ3	Norwogonin	12	黄芩
HQ4	baicalein	37	黄芩
HQ5	11,13-Eicosadienoic acid, methyl ester	1	黄芩
HQ6	wogonin	45	黄芩
HQ7	DIHYDROOROXYLIN	11	黄芩
HQ8	oroxylin a	26	黄芩
HQ9	acacetin	26	黄芩
HQ10	ent-Epicatechin	6	黄芩

续表

HQ11	Carthamidin	4	黄芩
HQ12	Eriodyctiol (flavanone)	8	黄芩
HQ13	5,7,2',6'-Tetrahydroxyflavone	6	黄芩
HQ14	Moslosooflavone	25	黄芩
HQ15	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	6	黄芩
HQ16	5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone	18	黄芩
HQ17	5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	6	黄芩
HQ18	Panicolin	14	黄芩
HQ19	5,2',6'-Trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	17	黄芩
HQ20	Salvigenin	18	黄芩
HQ21	bis[(2S)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate	1	黄芩
HQ22	5,2'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	21	黄芩
HQ23	rivularin	22	黄芩
HQ24	Diop	3	黄芩
HQ25	Skullcapflavone II	21	黄芩
HQ26	NEOBAICALEIN	22	黄芩
HQ27	5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	13	黄芩
HQ28	sitosterol	3	黄芩



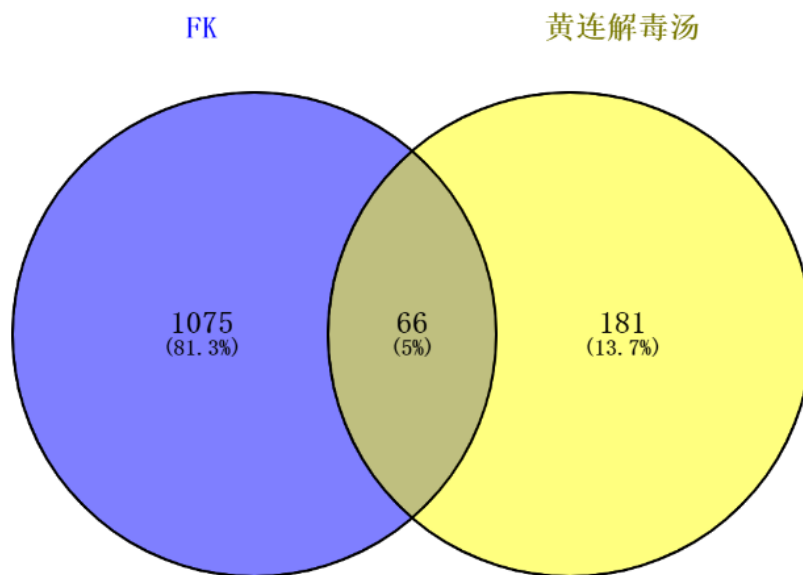
注：菱形代表靶点，六边形代表药物活性成分，V 字形代表药物。图形越大，代表度值越高。

Figure 1. Network diagram of Huanglian Jiedu Decoction "drug-active ingredient-target"

图 1. 黄连解毒汤“药物-活性成分-靶点”网络图

3.2. 黄连解毒汤与 FK 交集靶点的获取结果

运用 GeneCards 和 OMIM 数据库得到 FK 相关靶点共 1141 个，将黄连解毒汤的药物靶点与 FK 的疾病靶点输入 Venny 2.1 平台绘制 Venn 图见图 2，共得出 66 个药物-疾病交集靶点。

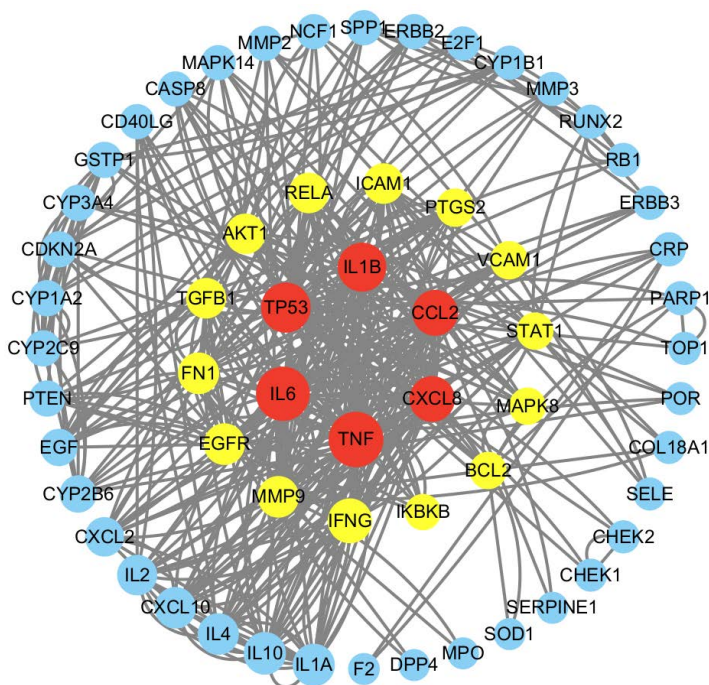


注：蓝色代表 FK 的疾病靶点，黄色代表黄连解毒汤的药物靶点，交集区域代表交集靶点。

Figure 2. Venn diagram of the intersection targets between FK and Huanglian Jiedu Decoction

图 2. FK 与黄连解毒汤的交集靶点韦恩图

3.3. PPI 网络构建结果



注：黄色与红色为筛选出的核心靶点，红色为度值排名前六的靶点，图形越大代表度值越高。

Figure 3. PPI network diagram

图 3. PPI 网络图

将黄连解毒汤与 FK 的交集靶点导入 STRING 中构建 PPI 网络。将得到的 TSV 文件导入 Cytoscape 3.10.1 进行可视化分析见图 3。图中有 60 个节点, 394 条边。“节点”代表蛋白, “边”代表蛋白间的关联作用; 图形越大则代表度值越大。运用 CytoNCA 对网络中所有蛋白进行分析, 满足每个靶点的度值、介数中心度(betweenness, BC)、接近中心度(closeness, CC)等参数值均大于中位数, 筛选出关键靶点[15]。图中节点的度值中位数为 10, CC 中位数为 0.37, BC 中位数为 28.41。共筛选出 20 个关键靶点, 其中度值排名前 6 为 TNF、IL6、TP53、IL1B、CXCL8、CCL2。

3.4. GO 富集分析结果

GO 功能富集分析共得到 673 个生物过程, 15 个细胞组分及 32 个分子功能($P < 0.05$), 按 Count 值及 P 值进行排序, 分别对前 10 个功能进行绘图见图 4。可以看出, 核心靶点主要涉及炎症反应、细胞迁移的正向调节、细胞运动的正向调节、运动的正向调节、细胞因子刺激的细胞反应、对脂多糖的反应、对细菌来源分子的反应、细胞因子介导的信号通路、对无机物质的反应和蛋白质磷酸化的正向调节等生物过程。核心靶点在细胞膜漂浮区域、细胞膜微颗粒、细胞膜的一侧、含有胶原质的细胞外基质、细胞外基质、外部包裹结构、质膜蛋白复合物、细胞膜的外侧、核脉络壁等均有分布。核心靶点主要具有细胞因子受体结合、信号受体激活活性、信号受体调节活性、细胞因子活性、受体配体活性、细胞黏附分子结合、蛋白激酶结合、激酶结合、蛋白质同源二聚体化活性和蛋白磷酸酶结合等分子功能。

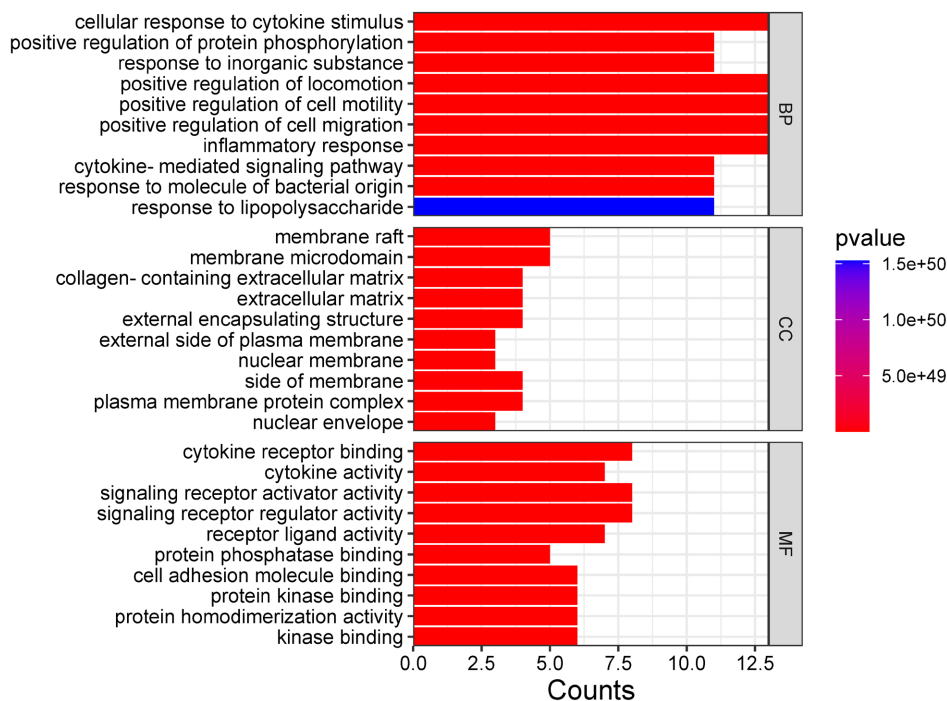


Figure 4. GO enrichment analysis

图 4. GO 富集分析

3.5. KEGG 通路分析结果

使用 Metascape 数据库对 20 个关键靶点进行 KEGG 通路分析, 得到 119 条通路($P < 0.05$), 按照 Count 值及 P 值进行排序, 选择前 30 条通路进行绘图见图 5。根据 KEGG 通路分析结果, 提示黄连解毒汤对 FK 起主要治疗作用的通路包括流体剪切应力与动脉粥样硬化、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中

的作用、脂质和动脉粥样硬化、IL17 信号通路、乙型肝炎、TNF 信号通路、癌症通路、C 型凝集素受体信号通路、恰加斯病、疟疾、Nod 样受体信号通路、甲型流感、鼠疫感染、人类巨细胞病毒感染、肺结核、NF-κB 信号通路和 Toll 样受体信号通路等。

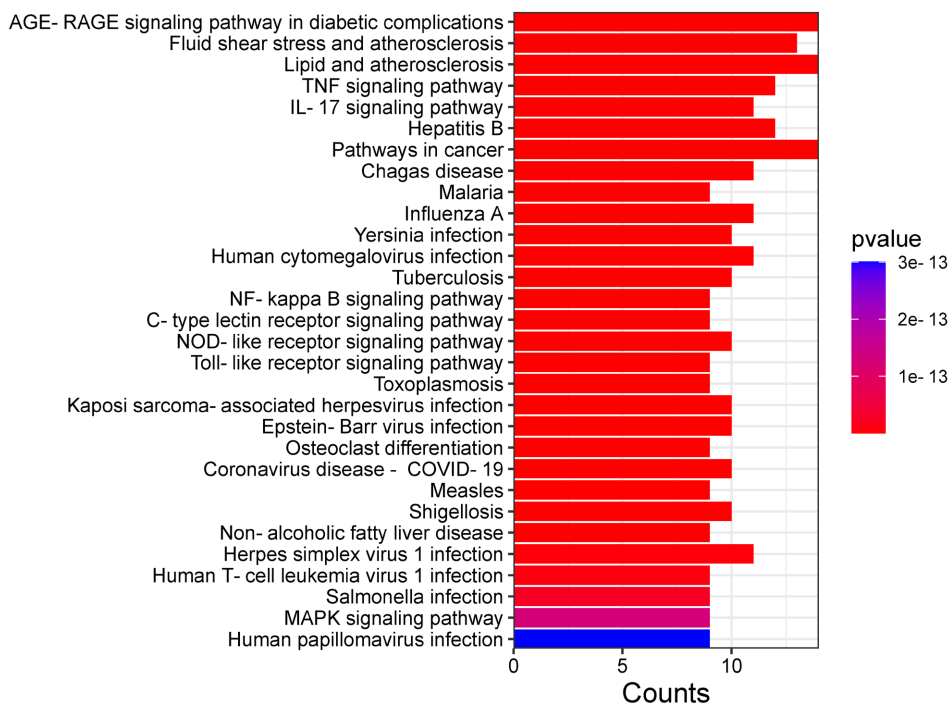
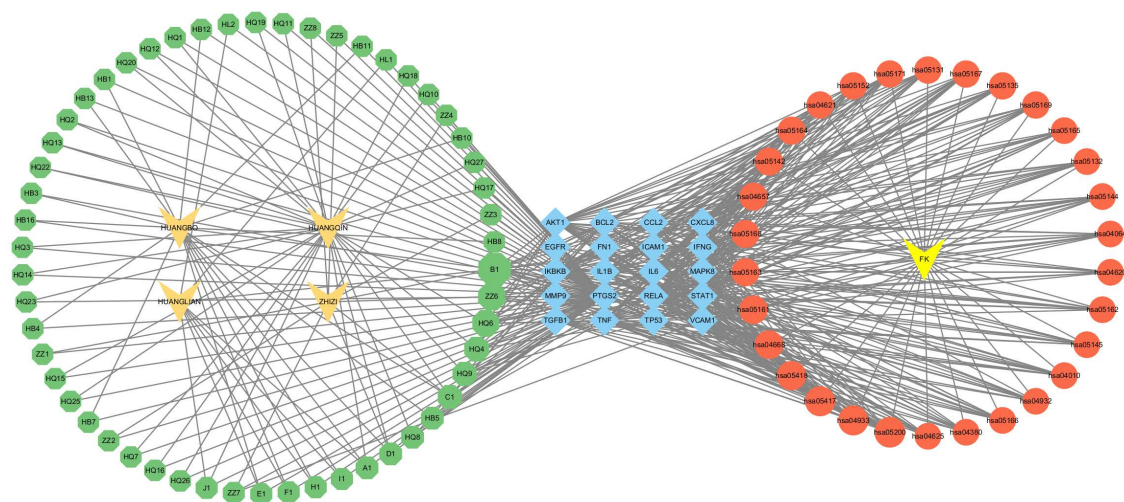


Figure 5. KEGG enrichment analysis
图 5. KEGG 富集分析

3.6. 成分 - 靶点 - 通路网络构建结果



注：棕黄色 V 字节点代表药物，亮黄色 V 字节点代表疾病，菱形节点代表靶点，绿色原型节点代表药物有效成分，橘红色圆形节点代表通路。

Figure 6. Network diagram of drug components-targets-pathways
图 6. 药物成分 - 靶点 - 通路网络图

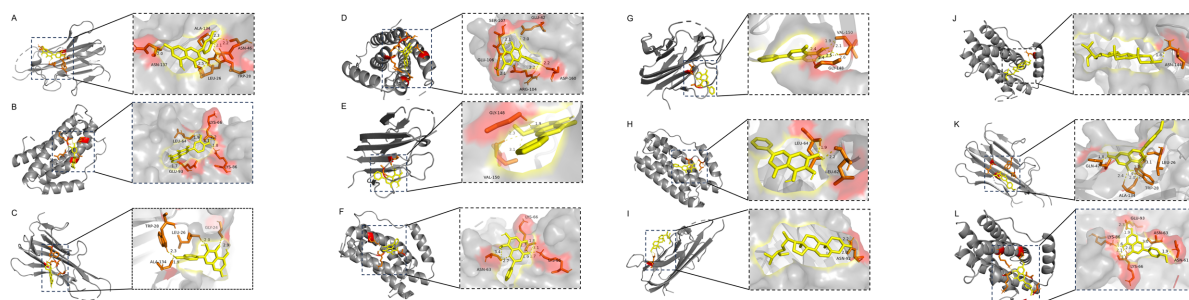
为了更加明确地展示黄连解毒汤的药物成分、疾病靶点和通路的关系，构建成分 - 靶点 - 通路网络图见图 6。该网络共有节点 109 个，其中，药物节点 4 个，有效活性成分节点 54 个，靶点节点 20 个，通路节点 30 个，疾病节点 1 个，共有 512 条边。该网络图中，度值较高的通路有癌症通路、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、流体剪切应力与动脉粥样硬化、脂质和动脉粥样硬化、TNF 信号通路等。度值比较高的靶点有 PTGS2、RELA、TNF、AKT1、IKBKB、IL6、MAPK8、IL1B、BCL2 等。度值较高的活性成分分别是槲皮素、山奈酚、汉黄芩素、黄芩素、 β -谷甾醇和刺槐素等。

3.7. 分子对接结果分析

通过从中药系统药理学分析平台 TCMSP 中获得了黄连解毒汤的多种药物共同的生物活性成分，上述结果中度值最高的 6 种活性成分分别是槲皮素、山奈酚、汉黄芩素和黄芩素、 β -谷甾醇和刺槐素。决定采用该 6 种活性成分与 PPI 蛋白互作中最重要的核心靶点 TNF 与 IL6 进行分子对接。结果显示，各组结合活性较好见表 2，并利用 PyMoL 软件进行可视化，见图 7。

Table 2. Binding activities of various components with target proteins
表 2. 各组成分与靶点结合活性

配体	受体	Compound CID	PDB ID	结合能/(kcal/mol)
槲皮素	TNF	5280343	5UUI	-5.59
槲皮素	IL6	5280343	1ALU	-5.78
山奈酚	TNF	5280863	5UUI	-5.31
山奈酚	IL6	5280863	1ALU	-6.04
汉黄芩素	TNF	5281703	5UUI	-6.39
汉黄芩素	IL6	5281703	1ALU	-5.43
黄芩素	TNF	5281605	5UUI	-6.68
黄芩素	IL6	5281605	1ALU	-5.47
β -谷甾醇	TNF	222284	5UUI	-7.07
β -谷甾醇	IL6	222284	1ALU	-6.72
刺槐素	TNF	5280442	5UUI	-6.37
刺槐素	IL6	5280442	1ALU	-6.24



注：A：槲皮素与 TNF，B：槲皮素与 IL6，C：山奈酚与 TNF，D：山奈酚与 IL6，E：汉黄芩素与 TNF，F：汉黄芩素与 IL6，G：黄芩素与 TNF，H：黄芩素与 IL6，I： β -谷甾醇与 TNF，J： β -谷甾醇与 IL6，K：刺槐素与 TNF，L：刺槐素与 IL6。

Figure 7. Molecular docking
图 7. 分子对接

4. 讨论

FK 是一种难治性感染性角膜病变, 当前治疗药物有限且炎症反应过度是疾病进展和预后较差的重要原因[16] [17]。本研究运用网络药理学分析方法, 发现黄连解毒汤具有大量活性成分, 分析后发现, 槲皮素、山奈酚、汉黄芩素和黄芩素、 β -谷甾醇和刺槐素可能在治疗 FK 的过程中发挥着重要作用。

大量研究表明, 槲皮素具有抗病毒[18]、抗真菌[19]、抗氧化[20]、抗癌[21]和抗炎[22]等作用。Yin J 等人发现, 槲皮素通过抑制真菌生长、抑制中性粒细胞募集和浸润、抑制 TLR2、TLR4、HMGB1、IL-1 β 和 TNF- α 的表达抑制炎症反应, 起到治疗 FK 的作用[19]。山奈酚具有抗癌、抗炎、抗真菌和抗原虫等作用[23]。Jia Y 等人发现, 在 FK 中, 山奈酚能够减轻小鼠模型的炎症反应、降低感染区域的真菌负荷、抑制免疫细胞募集、抑制模 Dectin-1 和 p38 MAPK 信号通路的激活发挥抗炎作用[24]。汉黄芩素具有抗氧化、抗菌、抗病毒、保肝和神经保护等作用[25]。有研究表明, 汉黄芩素通过抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 iNOS 和 COX-2 的基因表达而表现出良好的抗炎活性[26], 也可以通过激活 PPAR γ 来预防 LPS 诱导的肺部炎症[27]。黄芩素具有抗病毒、抗菌、抗炎、抗肿瘤和抗过敏等作用[28]。Zhu Y 等人发现, 黄芩素可以抑制烟曲霉菌的生长、生物膜的形成, 孢子的粘附作用; 同时抑制烟曲霉菌感染角膜的中性粒细胞浸润; 抑制烟曲霉菌性角膜炎中 TSLP、TSLPR 和炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达发挥抗炎作用[29]。 β -谷甾醇具有抗菌、抗炎、抗癌、抗氧化和护肝等作用[30], 其抗炎作用主要通过阻断 NF- κ B 信号通路的激活, 下调 TLR4 途径的表达, 降低 MyD88 的表达实现的[31]; 刺槐素具有抗氧化、清除自由基、抗炎、抗病毒和抗癌等作用[32]。有研究表明, 刺槐素可以抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中促炎细胞因子、iNOS 和 COX-2 的表达, 还可以通过 NF- κ B 信号通路抑制炎症反应[33]。

PPI 网络显示 TNF、IL6 等靶点度值排名靠前, 为黄连解毒汤治疗 FK 的主要靶点。有研究发现, TNF 是炎症反应中的核心炎症因子, 不仅能直接通过诱导炎症基因的表达来驱动炎症反应, 还能通过诱导细胞死亡、启动炎症免疫反应来间接驱动炎症反应[34]。IL6 参与免疫反应与炎症过程, IL6 在急性炎症与慢性炎症中均发挥作用[35]。有研究发现在小鼠 FK 模型中, 炎症因子 TNF- α 和 IL6 的表达均显著升高[36], 在 FK 患者的房水中, 炎症因子 IL6 与 TNF- α 也有升高[37]。本研究发现, 黄连解毒汤治疗 FK 可能是通过槲皮素、山奈酚、汉黄芩素和黄芩素、 β -谷甾醇和刺槐素等成分作用于 TNF、IL6 等主要靶点发挥抗真菌与抗炎作用, 分子对接的结果也证明了这一点。

GO 富集分析结果显示, 靶点主要涉及到炎症反应等生物过程, 细胞膜和细胞外基质等细胞组分, 细胞的信号转导等分子功能。KEGG 通路富集分析显示, 主要富集在 TNF、NF- κ B、Toll 样受体、NOD 样受体、C 型凝集素信号通路等。在 FK 中, 宿主可以通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs) 识别到真菌的入侵, 进而启动免疫细胞的聚集与浸润、启动免疫反应与炎症反应。PRRs 家族主要包括类 C 型凝集素蛋白受体(C-type lectin-like receptors, CLR)s、Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)、NOD 样受体(NOD like receptors, NLRs)和维甲酸诱导基因 I 样受体(retinoic acid-inducible gene-I-like receptors, RLRs)。PRRs 可以识别多种真菌细胞组分, 通过激活各种信号级联反应调节先天免疫反应, 通过产生促炎细胞因子和活性氧等过程杀灭真菌[38]。其中 TLR2 和 TLR4 的激活又可以导致促炎通路 NF- κ B 的激活。在杀死真菌的同时, 部分角膜细胞也会被杀死, 被破坏的细胞释放的内源性分子, 称为损伤相关分子模式(DAMPs), 而 DAMPs 同样也可以激活 TLR2, TLR4 和 NF- κ B 信号通路, 从而导致炎症加重[39]。黄连解毒汤可能通过这些通路控制 FK 的炎症反应, 促进角膜修复, 改善 FK 的预后。

综上所述, 本文运用网络药理学方法和分子对接技术, 发现黄连解毒汤治疗 FK 具有“多成分、多靶点、多通路”的作用特点, 黄连解毒汤主要通过槲皮素、山奈酚、汉黄芩素和黄芩素、 β -谷甾醇和刺槐素等活性成分, 作用于 TNF、IL6 等核心靶点, 通过 TNF、NF- κ B、Toll 样受体、NOD 样受体、C 型

凝集素信号通路治疗 FK。

参考文献

- [1] Brown, L., Leck, A.K., Gichangi, M., *et al.* (2021) The Global Incidence and Diagnosis of Fungal Keratitis. *The Lancet Infectious Diseases*, **21**, E49-E57. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30448-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30448-5)
- [2] Donovan, C., Arenas, E., Ayyala, R.S., *et al.* (2022) Fungal Keratitis: Mechanisms of Infection and Management Strategies. *Survey of Ophthalmology*, **67**, 758-769. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2021.08.002>
- [3] Khor, W.-B., Prajna, V.N., Garg, P., *et al.* (2018) The Asia Cornea Society Infectious Keratitis Study: A Prospective Multicenter Study of Infectious Keratitis in Asia. *American Journal of Ophthalmology*, **195**, 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2018.07.040>
- [4] Sharma, N., Bagga, B., Singhal, D., *et al.* (2022) Fungal Keratitis: A Review of Clinical Presentations, Treatment Strategies and Outcomes. *The Ocular Surface*, **24**, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2021.12.001>
- [5] Durand, M.L. (2017) Bacterial and Fungal Endophthalmitis. *Clinical Microbiology Reviews*, **30**, 597-613. <https://doi.org/10.1128/CMR.00113-16>
- [6] Aveyard, J., Deller, R.C., Lace, R., *et al.* (2019) Antimicrobial Nitric Oxide Releasing Contact Lens Gels for the Treatment of Microbial Keratitis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **11**, 37491-37501. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b13958>
- [7] Mascarenhas, M., Chaudhari, P. and Lewis, S.A. (2023) Natamycin Ocular Delivery: Challenges and Advancements in Ocular Therapeutics. *Advances in Therapy*, **40**, 3332-3359. <https://doi.org/10.1007/s12325-023-02541-x>
- [8] 何继武, 刘爽, 程俊平. 龙胆泻肝汤联合结膜瓣遮盖治疗真菌性角膜溃疡的临床观察[J]. 中国中医眼科杂志, 2014, 24(6): 423-425. <https://doi.org/10.13444/j.cnki.zgzyygz.003364>
- [9] 王琦, 谭亚芹, 赵凯. 丹溪玉屏风颗粒联合纳他霉素治疗真菌性角膜炎的临床效果观察[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(5): 110-113. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.2016.05.030>
- [10] 赵莹, 黄晓巍, 唐秋竹, 等. 黄连解毒汤研究进展[J]. 人参研究, 2022, 34(4): 40-44. <https://doi.org/10.19403/j.cnki.1671-1521.2022.04.013>
- [11] 阎力君, 吕欣晟, 张多, 等. 黄连解毒汤有效成分的提取及其对体内白色念珠菌的清除作用[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(11): 3414-3421. <https://doi.org/10.16431/j.cnki.1671-7236.2019.11.032>
- [12] 陶茂灿, 夏修蛟, 曹毅. 黄连解毒汤体外抗真菌活性及其与西药的联合药敏试验研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(3): 585-587. <https://doi.org/10.13193/j.archctm.2009.03.138.taomc.046>
- [13] 王宸罡, 齐新, 王丽, 等. 简述黄连解毒汤的药理作用及临床应用[J]. 天津中医药大学学报, 2018, 37(5): 433-436.
- [14] 刘保光, 谢苗, 董颖, 等. 黄连解毒汤作用机制研究进展[J]. 中医学报, 2022, 37(9): 1861-1868. <https://doi.org/10.16368/j.issn.1674-8999.2022.09.335>
- [15] 任爽, 倪力强, 孟迪, 等. 基于网络药理学探讨黄柏-透骨草治疗类风湿关节炎的机制[J]. 中国新药与临床杂志, 2019, 38(12): 757-766. <https://doi.org/10.14109/j.cnki.xyylc.2019.12.011>
- [16] Prajna, N.V., Lalitha, P., Krishnan, T., *et al.* (2022) Patterns of Antifungal Resistance in Adult Patients with Fungal Keratitis in South India: A Post Hoc Analysis of 3 Randomized Clinical Trials. *JAMA Ophthalmology*, **140**, 179-184. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2021.5765>
- [17] Ung, L., Bispo, P.J.M., Shanbhag, S.S., *et al.* (2019) The Persistent Dilemma of Microbial Keratitis: Global Burden, Diagnosis, and Antimicrobial Resistance. *Survey of Ophthalmology*, **64**, 255-271. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2018.12.003>
- [18] 吴伟, 吴俊汐, 纪旭旭, 等. 彝医药防疫古方的核心成分青蒿素和槲皮素抑制新冠病毒刺突蛋白的转录和翻译[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(11): 1314-1320. <https://doi.org/10.13461/j.cnki.cja.007598>
- [19] Yin, J., Peng, X., Lin, J., *et al.* (2021) Quercetin Ameliorates Aspergillus Fumigatus Keratitis by Inhibiting Fungal Growth, Toll-Like Receptors and Inflammatory Cytokines. *International Immunopharmacology*, **93**, Article ID: 107435. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107435>
- [20] 明艳, 余炫颀, 张丽君. 槲皮素联合山柰酚抑制 TNF 信号通路保护大鼠背根神经节细胞免受高糖损伤[J]. 牡丹江医学院学报, 2024, 45(1): 16-21+15. <https://doi.org/10.13799/j.cnki.mdjyxyb.2024.01.028>
- [21] 邹子川, 周霖, 陈寅瑜, 等. 槲皮素抗头颈部癌作用的研究新进展[J]. 口腔生物医学, 2023, 14(3): 206-210.
- [22] Alizadeh, S.R. and Ebrahimzadeh, M.A. (2022) Quercetin Derivatives: Drug Design, Development, and Biological Activities, a Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **229**, Article ID: 114068.

- <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114068>
- [23] Periferakis, A., Periferakis, K., Badarau, I.A., *et al.* (2022) Kaempferol: Antimicrobial Properties, Sources, Clinical, and Traditional Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article No. 15054. <https://doi.org/10.3390/ijms232315054>
- [24] Jia, Y., Li, C., Yin, M., *et al.* (2022) Kaempferol Ameliorate the Prognosis of Aspergillus Fumigatus Keratitis by Reducing Fungal Load and Inhibiting the Dectin-1 and P38 MAPK Pathway. *Experimental Eye Research*, **216**, Article ID: 108960. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.108960>
- [25] Banik, K., Khatoun, E., Harsha, C., *et al.* (2022) Wogonin and Its Analogs for the Prevention and Treatment of Cancer: A Systematic Review. *Phytotherapy Research: PTR*, **36**, 1854-1883. <https://doi.org/10.1002/ptr.7386>
- [26] Lee, J.Y. and Park, W. (2015) Anti-Inflammatory Effect of Wogonin on RAW 264.7 Mouse Macrophages Induced with Polyinosinic-Polycytidylic Acid. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **20**, 6888-6900. <https://doi.org/10.3390/molecules20046888>
- [27] Wu, J.-Y., Chen, L.-G., Hu, C.-W., *et al.* (2022) Immunotoxicity and Anti-Inflammatory Characterizations of Prenylated Flavonoids—The Lipophilic 7-O-Terpenylated Wogonin. *Life (Basel, Switzerland)*, **12**, Article No. 2116. <https://doi.org/10.3390/life12122116>
- [28] Chandrashekar, N. and Pandi, A. (2022) Baicalein: A Review on Its Anti-Cancer Effects and Mechanisms in Lung Carcinoma. *Journal of Food Biochemistry*, **46**, E14230. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14230>
- [29] Zhu, Y., Peng, X., Zhang, Y., *et al.* (2021) Baicalein Protects against Aspergillus Fumigatus Keratitis by Reducing Fungal Load and Inhibiting TSLP-Induced Inflammatory Response. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **62**, 26. <https://doi.org/10.1167/iovs.62.6.26>
- [30] Khan, Z., Nath, N., Rauf, A., *et al.* (2022) Multifunctional Roles and Pharmacological Potential of β -Sitosterol: Emerging Evidence toward Clinical Applications. *Chemico-Biological Interactions*, **365**, Article ID: 110117. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110117>
- [31] 刘雅谦, 李琳, 孙万成, 等. 植物甾醇的抗炎性研究进展[J]. 中国油脂, 2022, 47(5): 93-99. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.210210>
- [32] Singh, S., Gupta, P., Meena, A., *et al.* (2020) Acacetin, a Flavone with Diverse Therapeutic Potential in Cancer, Inflammation, Infections and Other Metabolic Disorders. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, **145**, Article ID: 111708. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111708>
- [33] Sun, L.-C., Zhang, H.-B., Gu, C.-D., *et al.* (2018) Protective Effect of Acacetin on Sepsis-Induced Acute Lung Injury via Its Anti-Inflammatory and Antioxidative Activity. *Archives of Pharmacal Research*, **41**, 1199-1210. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0991-1>
- [34] Van Loo, G. and Bertrand, M.J.M. (2023) Death by TNF: A Road to Inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, **23**, 289-303. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00792-3>
- [35] Hirano, T. (2021) IL-6 in Inflammation, Autoimmunity and Cancer. *International Immunology*, **33**, 127-148. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa078>
- [36] Yu, G.-R., Lin, J., Zhang, J., *et al.* (2018) Mincle in the Innate Immune Response of Mice Fungal Keratitis. *International Journal of Ophthalmology*, **11**, 539-547.
- [37] Zhang, Y., Liang, Q., Liu, Y., *et al.* (2018) Expression of Cytokines in Aqueous Humor from Fungal Keratitis Patients. *BMC Ophthalmology*, **18**, Article No. 105. <https://doi.org/10.1186/s12886-018-0754-x>
- [38] Fang, X., Lian, H., Bi, S., *et al.* (2022) Roles of Pattern Recognition Receptors in Response to Fungal Keratitis. *Life Sciences*, **307**, Article ID: 120881. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120881>
- [39] Fortingo, N., Melnyk, S., Sutton, S.H., *et al.* (2022) Innate Immune System Activation, Inflammation and Corneal Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article No. 14933. <https://doi.org/10.3390/ijms232314933>