

基于网络毒理学和分子对接探讨苯扎氯铵致干眼角膜损伤毒性的机制

赵丽峰^{1,2}, 周美娇², 李 婷¹, 路雪婧¹

引用:赵丽峰,周美娇,李婷,等. 基于网络毒理学和分子对接探讨苯扎氯铵致干眼角膜损伤毒性的机制. 国际眼科杂志, 2026, 26(8):1323-1331.

基金项目:国家重点研发计划项目 (No.2023YFC3503000)
作者单位:¹(610000) 中国四川省成都市, 成都中医药大学眼科学院;²(719000) 中国陕西省榆林市中医医院眼科
作者简介:赵丽峰, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 中医药防治眼病的研究。
通讯作者:路雪婧, 博士研究生, 主任医师, 研究方向: 中医药防治眼病的研究. luxuejing@cdutcm.edu.cn
收稿日期: 2025-11-10 **修回日期:** 2026-06-16

摘要
目的:探讨苯扎氯铵(BAC)作为眼用制剂防腐剂导致干眼角膜损伤的毒性机制。
方法:采用网络毒理学方法, 通过 PubChem、CTD、ChEMBL、STITCH 等数据库获取 BAC 的化学结构、毒性靶点及干眼相关角膜损伤靶点; 利用 STRING 数据库构建蛋白-蛋白相互作用网络, 筛选关键毒性靶点; 通过 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析揭示 BAC 可能作用的生物学过程与信号通路; 进一步采用分子对接技术验证 BAC 与核心靶点(IL-6、IL-1 β 、TNF、EGF)的结合能力。
结果:BAC 毒性等级为 4 级, 具有显著眼部刺激性。共筛选出 85 个 BAC 与干眼角膜损伤的共同靶点, 其中 49 个为关键毒性靶点, 包括 TNF、IL-6、TP53、IL-1 β 、BCL2 等。KEGG 富集分析显示 BAC 主要作用于 IL-17、TNF、NF- κ B、JAK-STAT、PI3K-Akt、Rap1 和 MAPK 等 7 条与角膜损伤密切相关的信号通路。分子对接结果表明 BAC 与 IL-6、IL-1 β 、TNF、EGF 等靶点具有稳定的结合能力(结合能<0)。
结论:BAC 可能通过多靶点、多通路机制诱导干眼角膜损伤, 其作用涉及炎症反应、细胞凋亡、泪膜稳定性破坏及角膜修复延迟等过程, 提示长期使用含 BAC 眼用制剂可能加重眼表损害。
关键词:网络毒理学; 分子对接; 苯扎氯铵; 干眼; 角膜损伤; 毒性机制
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2026.8.04

Toxicological mechanism of benzalkonium chloride-induced corneal injury in dry eye based on network toxicology and molecular docking

Zhao Lifeng^{1,2}, Zhou Meijiao², Li Ting¹, Lu Xuejing¹

Foundation item: National Key R&D Plan (No.2023YFC3503000)

¹Eye School of Chengdu University of TCM, Chengdu 610000, Sichuan Province, China; ²Department of Ophthalmology, Yulin Traditional Chinese Medicine Hospital, Yulin 719000, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Lu Xuejing. Eye School of Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610000, China. luxuejing@cdutcm.edu.cn
Received: 2025-11-10 Accepted: 2026-06-16

Abstract

• **AIM:** To explore the toxicological mechanisms of benzalkonium chloride (BAC) as a preservative in ophthalmic preparations leading to corneal injury in dry eye.
• **METHODS:** Network toxicology was employed to obtain the chemical structure of BAC, its toxic targets, and targets associated with dry eye-related corneal injury from databases including PubChem, CTD, ChEMBL, and STITCH. The protein-protein interaction (PPI) networks were constructed using the STRING database to screen key toxicity targets. Gene ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed to elucidate the potential biological processes and signaling pathways affected by BAC. Furthermore, molecular docking techniques were employed to validate the binding affinity of BAC to its key targets (IL-6, IL-1 β , TNF, and EGF).
• **RESULTS:** BAC had a toxicity grade of 4 and exhibited significant eye irritation. A total of 85 common targets of BAC and dry eye corneal damage were screened out, of which 49 were key toxic targets, including TNF, IL-6, TP53, IL-1 β , BCL2, etc. KEGG enrichment analysis showed that BAC mainly acted on 7 corneal injury pathways closely associated with corneal injury, such as IL-17, TNF, NF- κ B, JAK-STAT, PI3K-Akt, Rap1, and MAPK. The results of molecular docking showed that BAC had stable binding ability to IL-6, IL-1 β , TNF, EGF, and other targets (binding energy <0).
• **CONCLUSION:** BAC may induce corneal damage in dry eye through multi-target and multi-pathway mechanisms, involving processes such as inflammatory response, apoptosis, disruption of tear film stability, and delayed corneal repair, which suggests that long-term use of ophthalmic preparations containing BAC may aggravate ocular surface damage.
• **KEYWORDS:** network toxicology; molecular docking; benzalkonium chloride; dry eye disease; corneal damage; mechanism of toxicity

Citation: Zhao LF, Zhou MJ, Li T, et al. Toxicological mechanism of benzalkonium chloride-induced corneal injury in dry eye based on network toxicology and molecular docking. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2026,26(8):1323–1331.

0 引言

干眼(dry eye disease,DED)是多因素导致的复杂的眼表疾病^[1],泪液成分改变或者泪膜稳态的失衡均会导致DED的发生。近年来,随着环境污染加剧^[2]、视频终端广泛使用^[3]、精神和心理疾病的逐年递增^[4-5]以及免疫相关疾病患病率上升^[6],DED患病人群也呈现不断上升趋势。全球范围内,DED发病率为5.5%–33.7%,且发病率呈现逐年上升趋势^[7]。DED已成为一个全球性的健康问题^[8],据保守估计,40岁以上人群中10%–20%患有DED^[9]。

苯扎氯铵(benzalkonium chloride, BAC)是一种滴眼液中广泛使用的防腐剂。研究显示,长期使用含有BAC的眼用制剂会对眼表健康产生不利影响。具体而言,它不仅会引起角膜上皮损伤甚至凋亡^[10],而且部分患者还会出现结膜上皮细胞损伤^[11],这种角膜、结膜细胞损伤进一步导致泪膜稳定性下降,从而加重DED的不适症状。

近年来,随着眼表疾病患者人数的增加,BAC对眼表的毒性作用引起了广泛关注,然而,关于其眼表损伤的具体机制研究仍然较少,毒性作用机制也不完全清楚。因此,探讨BAC对DED角膜损伤的毒性机制及其潜在影响具有重要的临床意义。本文通过网络毒理学和分子对接技术,深入探讨BAC对DED角膜损伤的毒性机制,旨在为后续关于防腐剂相关眼表毒性损伤机制的研究提供理论依据。

1 资料和方法

1.1 资料 基于网络毒理学和分子对接技术探讨BAC导致DED角膜损伤毒性机制研究流程及相关数据库,流程图见图1。

1.1.1 化合物信息获取 利用Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找化合物BAC的2D结构、3D结构及SMILES结构。

1.1.2 毒性数据库与疾病数据库 毒性预测使用ProTox数据库、ADMETlab数据库(<https://tox.charite.de>、<https://admetmesh.scbdd.com/>)。毒性靶点获取使用CTD、

ChEMBL、STITCH数据库(<https://ctdbase.org/>、<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>、<https://stitch.embl.de>)。干眼角膜损伤相关靶点来自Malacards、Genecards、OMIM数据库(<https://www.malacards.org/>、<https://www.genecards.org/>、<https://omim.org/>)。靶点标准化使用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)。

1.1.3 分析软件与工具 蛋白-蛋白相互作用(PPI)分析使用STRING数据库(<https://string-db.org>)和Cytoscape 3.9.1软件。GO功能注释和KEGG通路富集分析使用DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov>)。分子对接使用AutoDockTools(ADT)软件和RCSB PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)。可视化使用R语言的VennDiagram包、ggplot2包及PyMOL软件。

1.2 方法

1.2.1 化合物毒性分析方法 输入BAC的SMILES分子结构至ProTox和ADMETlab数据库,预测其毒性等级、毒性靶标及对眼部的刺激性等指标。

1.2.2 共同靶点筛选及PPI网络构建 利用R语言VennDiagram包对化合物毒性靶点和疾病靶点取交集,绘制韦恩图。将共同靶点导入STRING数据库,选择置信度 ≥ 0.4 PPI,去除游离节点后,通过Cytoscape 3.9.1进行可视化,并以节点度(Degree)大于平均值筛选关键毒性靶点。

1.2.3 GO功能注释与KEGG通路富集分析 利用DAVID数据库对关键毒性靶点进行GO功能注释和KEGG通路富集分析,限定物种为Homo sapiens,筛选条件为FDR<0.05且富集基因数 ≥ 5 。使用R软件ggplot2包绘制气泡图,并通过文献筛选出与干眼角膜损伤直接相关的信号通路。

1.2.4 “靶点-通路”网络构建 以筛选出的干眼角膜损伤相关KEGG信号通路为基础,构建“靶点-通路”网络,使用Cytoscape 3.9.1进行可视化,按Degree值评估靶点重要性。

1.2.5 分子对接验证 通过UniProt数据库获取关键靶点(IL-6、IL-1 β 、TNF、EGF)的蛋白结构(PDB ID分别为1ALU、5R8H、2AZ5、1JL9),从RCSB PDB数据库下载。使用AutoDockTools软件对化合物3D结构与靶点进行分子

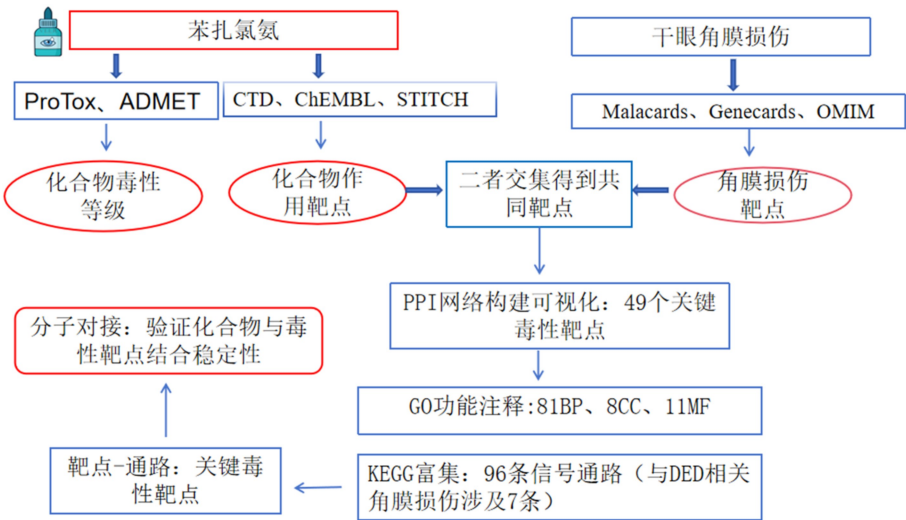


图1 研究流程图。

对接,结合能<0 表示可自发结合,结合能越低结合越稳定。对接结果通过 PyMOL 软件进行三维可视化。

2 结果

2.1 化合物化学结构 通过数据库得到化合物 BAC 的 2D、3D 结构,见图 2。其 SMILES 结构为:[2H]C1=C(C(=C(C(=C1[2H])[2H])C([2H])([2H])[N+](C)(C)CCCC[2H])[2H].[Cl-]。

2.2 化合物毒性分析 通过数据库预测得到化合物 BAC 毒性等级为 4 级,见图 3A。该化合物在免疫系统、神经系统、呼吸系统、酶与线粒体代谢中存在较高毒性,见图 3B。同时得到化合物对眼刺激性 0.84、呼吸系统毒性 0.997、精神疾病毒性 0.918,可能性均大于 0.8。

2.3 化合物毒性靶点与疾病靶点的预测结果 根据 BAC 化合物毒性靶点预测结果,从 CTD、ChEMBL、STITCH 等数据库中获得 599 个化合物潜在毒性靶点。根据疾病靶点收集结果,从 Malacards、Genecards、OMIMet 等疾病数据库中 得到 1 020 个 Dry eye-related corneal injury 的相关靶点。对化合物毒性靶点和疾病靶点进行取交集处理,利用 R 语言 VennDiagram 包进行可视化,获得 85 个共有的潜在毒性靶点,见图 4。

2.4 PPI 网络的构建与分析 将 85 个潜在毒性靶点导入 STRING 数据库获得 PPI,选择 score ≥ 0.4 的 PPI 利用 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化,结果见图 5。图中的节点代表潜在毒性靶点,共有 84 个(删除游离靶点 1 个),其大小及颜色深浅与 Degree 值成正相关。图中的边代表 PPI,共有 1 569 条。利用 Network Analyzer 功能对网络中节点的拓扑参数进行分析,通过计算,网络中 C_D的平均值为 37.36,以 C_D ≥ 37.36 作为筛选重要毒性靶点的条件,得到 TNF、IL-6、ALB、TP53、IL-1β、BCL2、SRC、TGFB1、IFNG、HIF1A 等 49 个关键毒性靶点,见表 1。

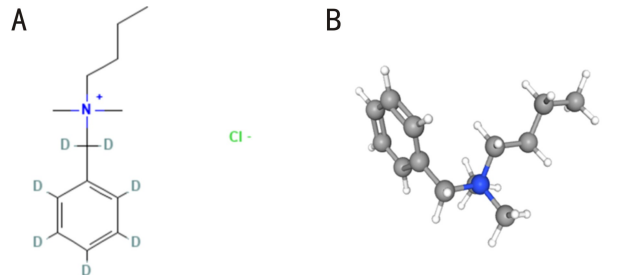


图 2 化合物 BAC 的 2D 与 3D 结构 A:BAC 2D 结构;B:BAC 3D 结构。

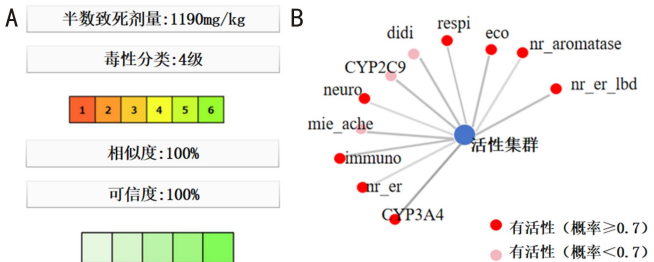


图 3 化合物 BAC 毒性分析 A:BAC 毒性等级图;B:不同系统中 BAC 毒性图。

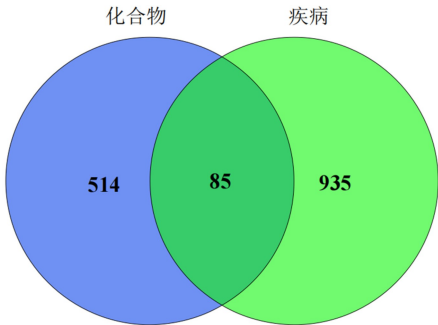


图 4 化合物毒性靶点和疾病靶点韦恩图。

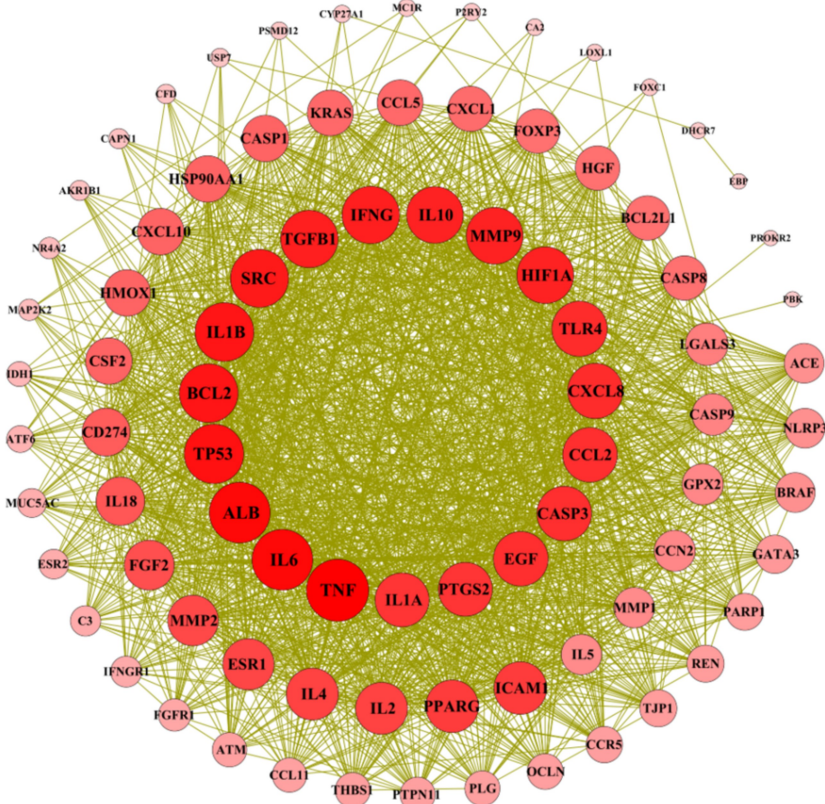


图 5 潜在毒性靶点 PPI 网络图。

表 1 化合物和疾病相关的 49 个关键毒性靶点

基因名称	Gene ID	蛋白名称	Degree
TNF	7124	肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor)	70
IL-6	3569	白细胞介素-6(interleukin-6)	68
ALB	213	白蛋白(albumin)	68
TP53	7157	肿瘤蛋白 p53(tumor protein p53)	66
IL-1β	3553	白细胞介素-1β(interleukin-1β)	65
BCL2	596	BCL2 凋亡调节剂(BCL2 apoptosis regulator)	65
SRC	6714	SRC 原癌基因(SRC proto-oncogene)	64
TGFB1	7040	转化生长因子 β1(transforming growth factor β1)	63
IFNG	3458	干扰素 γ(interferon γ)	63
HIF1α	3091	缺氧诱导因子 1 亚基 α(hypoxia inducible factor 1 subunit α)	62
IL-10	3586	白细胞介素-10(interleukin-10)	62
MMP9	4318	基质金属蛋白酶 9(matrix metallopeptidase 9)	62
TLR4	7099	toll 样受体 4(toll like receptor 4)	60
CXCL8	3576	C-X-C 基序趋化因子配体 8(C-X-C motif chemokine ligand 8)	60
CCL2	6347	C-C 基序趋化因子配体 2(C-C motif chemokine ligand 2)	59
CASP3	836	半胱天冬酶 3(caspase 3)	59
EGF	1950	表皮生长因子(epidermal growth factor)	59
IL-1α	3552	白细胞介素 1α(interleukin-1α)	58
PTGS2	5743	前列腺素内过氧化物合酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	58
ICAM1	3383	细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule 1)	56
PPAR-γ	5468	过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferator activated receptor-γ)	56
IL-2	3558	白细胞介素-2(interleukin-2)	55
IL-4	3565	白细胞介素-4(interleukin-4)	55
ESR1	2099	雌激素受体 1(estrogen receptor 1)	54
MMP2	4313	基质金属蛋白酶 2(matrix metallopeptidase 2)	53
FGF2	2247	成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2)	52
IL-18	3606	白细胞介素-18(interleukin-18)	50
CD274	29126	CD274 分子(CD274 molecule)	49
HMOX1	3162	血红素加氧酶 1(heme oxygenase 1)	47
CXCL10	3627	C-X-C 基序趋化因子配体 10(C-X-C motif chemokine ligand 10)	47
HSP90AA1	3320	热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1(heat shock protein 90α family class A member 1)	47
CASP1	834	半胱天冬酶 1(caspase 1)	47
CSF2	1437	集落刺激因子 2(colony stimulating factor 2)	47
KRAS	3845	KRAS 原癌基因(KRAS proto-oncogene)	46
CCL5	6352	C-C 基序趋化因子配体 5(C-C motif chemokine ligand 5)	46
CXCL1	2919	C-X-C 基序趋化因子配体 1(C-X-C motif chemokine ligand 1)	45
HGF	3082	肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor)	44
BCL2L1	598	BCL2 样 1(BCL2 like 1)	44
CASP8	841	半胱天冬酶 8(caspase 8)	44
FOXP3	50943	叉头框蛋白 P3(forkhead box P3)	44
LGALS3	3958	半乳糖凝集素 3(galectin 3)	41
CASP9	842	半胱天冬酶 9(caspase 9)	40
CCN2	1490	细胞通讯网络因子 2(cellular communication network factor 2)	39
GPX2	2877	谷胱甘肽过氧化物酶 2(glutathione peroxidase 2)	39
MMP1	4312	基质金属蛋白酶 1(matrix metallopeptidase 1)	38
IL-5	3567	白细胞介素-5(interleukin-5)	38
ACE	1636	血管紧张素 I 转换酶(angiotensin I converting enzyme)	37
NLRP3	114548	NLR 家族含 pyrin 结构域蛋白 3(NLR family pyrin domain containing 3)	37
BRAF	673	B-Raf 原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase)	37

2.5 GO 功能注释及 KEGG 通路富集GO 功能注释结果显示,49 个关键毒性靶点涉及 81 条生物过程(biological process,BP)、8 条细胞组分(cellular component,CC) 和 11 条分子功能(molecular function,MF),选择 TOP10 GO 功能

进行可视化,可视化结果见图6。

KEGG 通路富集结果显示,49 个关键毒性靶点富集于 96 条 KEGG 信号通路,选择 TOP20 的 KEGG 通路进行可视化,见图7。

通过查阅文献,在潜在作用靶点富集的 KEGG 信号通路中,IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、NF-κB 信号通路(NF-κB

signaling pathway)、JAK - STAT 信号通路(JAK - STAT signaling pathway)、PI3K - Akt 信号通路(PI3K - Akt signaling pathway)、Rap1 信号通路(Rap1 signaling pathway)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)等通路已被文献证实与 DED 相关的角膜损伤具有直接的关系,见表2,共涉及42个作用靶点。

2.6 “靶点-通路”网络的构建与分析 依据7条与DED

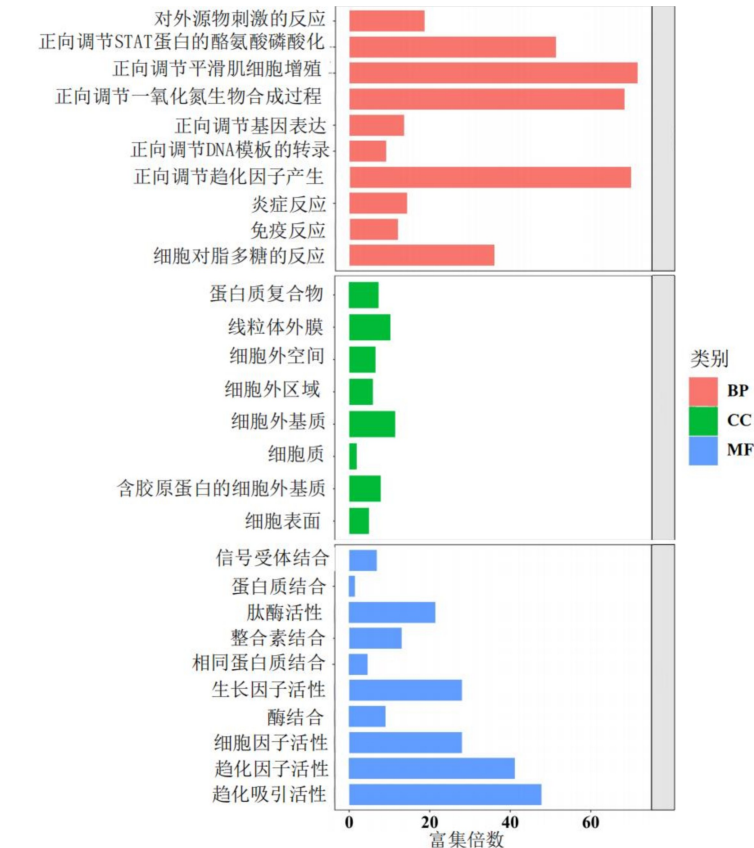


图6 潜在毒性靶点 GO 功能注释图。

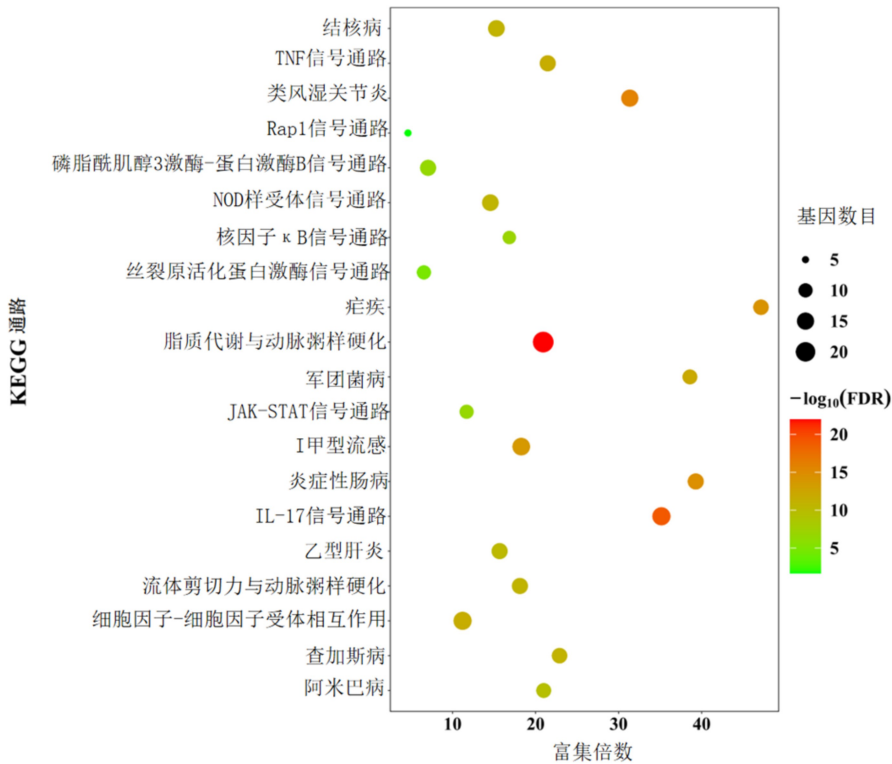


图7 潜在毒性靶点 KEGG 通路富集分析图。

相关的角膜损伤信号通路,我们构建了一个“靶点-通路”网络,“靶点-通路”网络由42个节点(包含35个靶点和7条KEGG通路)以及77条连接线组成。节点的大小与靶点C_p值成正比,靶点的C_p值越大,意味着它关联的信号通路数量越多,表明该毒性靶点的重要性越高,见图8。

2.7 分子对接 为了测试化合物与关键毒性靶点相互作用关系的可靠性,从靶点-通路网络图中可以得到IL-6、IL-1β、TNF、EGF关联信号通路最多,对化合物与IL-6、IL-1β、TNF、EGF进行分子对接验证,结合活性位点、氨基酸残基及结合能打分,见表3。并通过PyMOL软件构建蛋白与配体的相互作用3D图,见图9。

3 讨论

DED是仅次于屈光不正的临床第二大常见眼病^[12],随着生活方式的改变及接触镜的普及,发病率逐年增高且呈现低龄化趋势^[13-14]。BAC是一种季胺类化合物,广泛应用于眼科制剂中作为防腐剂,目前DED主要治疗方式仍然以局部滴眼为主,长期局部用药进一步引发眼表损害,导致眼部的不适感加重。

本研究通过网络毒理学相关数据库的预测分析发现,BAC毒性等级高达4级,其对眼睛有显著的刺激性(0.84),提示其可能通过直接损伤眼表上皮细胞而诱发或加重DED角膜损伤。尽管BAC常被视为眼科制剂中非活性成分,但近年来,大量研究已证实BAC可引发角膜及神经的损伤^[15]。实验观察到,表层角膜上皮紧密连接在接触BAC仅数秒后便遭到破坏^[16],且细胞功能障碍严重程度与BAC的剂量及暴露时间呈正相关^[17]。细胞试验发现,当人角膜上皮细胞系置于0.005%的BAC溶液中15 min,即可检测到角膜上皮细胞及三叉神经的毒性反应,值得注意的是,该浓度是滴眼液中检测到的最低浓度^[10]。此外,相似研究表明,长期使用含有常规剂量BAC的眼用制剂会导致角膜上皮神经密度降低,同时对角膜冷敏感神经纤维造成不可逆的损伤^[18]。进一步预测结果显示,BAC毒性作用不仅局限于眼部,它对免疫系统、神经系统、呼吸系统、软骨等多系统及组织均具有较高的毒性。

本研究根据网络毒理学筛选出599个化合物潜在的毒性靶点,结合疾病数据库中DED相关角膜损伤1020个

表2 DED角膜损伤的7条KEGG信号通路

KEGG 编号	通路	基因数	富集因子	富集值
hsa04657	IL-17 信号通路	17	35.153	1.14×10 ⁻¹⁹
hsa04668	TNF 信号通路	13	21.460	2.76×10 ⁻¹²
hsa04064	NF-κB 信号通路	9	16.838	1.02×10 ⁻⁷
hsa04630	JAK-STAT 信号通路	10	11.693	2.58×10 ⁻⁷
hsa04151	PI3K-Akt 信号通路	13	7.055	2.79×10 ⁻⁷
hsa04010	MAPK 信号通路	10	6.548	1.94×10 ⁻⁵
hsa04015	Rap1 信号通路	5	4.633	0.021

表3 核心蛋白名称与结合位点和氨基酸残基及结合能打分

核心蛋白名称	结合活性位点	氨基酸残基	结合能打分(kcal/mol)
IL-6	PDB ID:1ALU	Leu64、Leu62、Leu165、Arg168、Ser169、Lys66	-4.3
IL-1β	PDB ID:5R8H	Lys63、Leu62、Lys65、Met20、Gln38、Val40、Gln39、Val41	-4.2
TNF	PDB ID:2AZ5	Leu120、Tyr119、Ser60、Tyr59、Tyr151、Gly121、Leu120、Tyr119	-5.4
EGF	PDB ID:1JL9	Tyr13、Leu8、Gly12、Arg41、Trp50、His10	-4.1

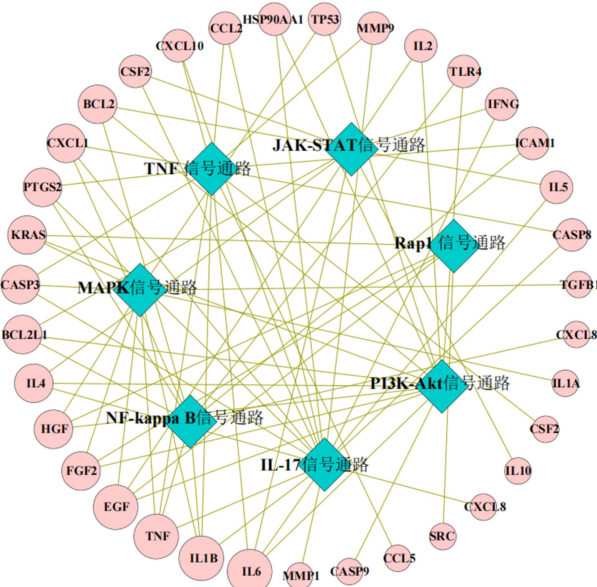


图8 DED相关角膜损伤与化合物“靶点-通路”网络图 图中红色圆形节点代表靶点,淡蓝色菱形节点代表通路。

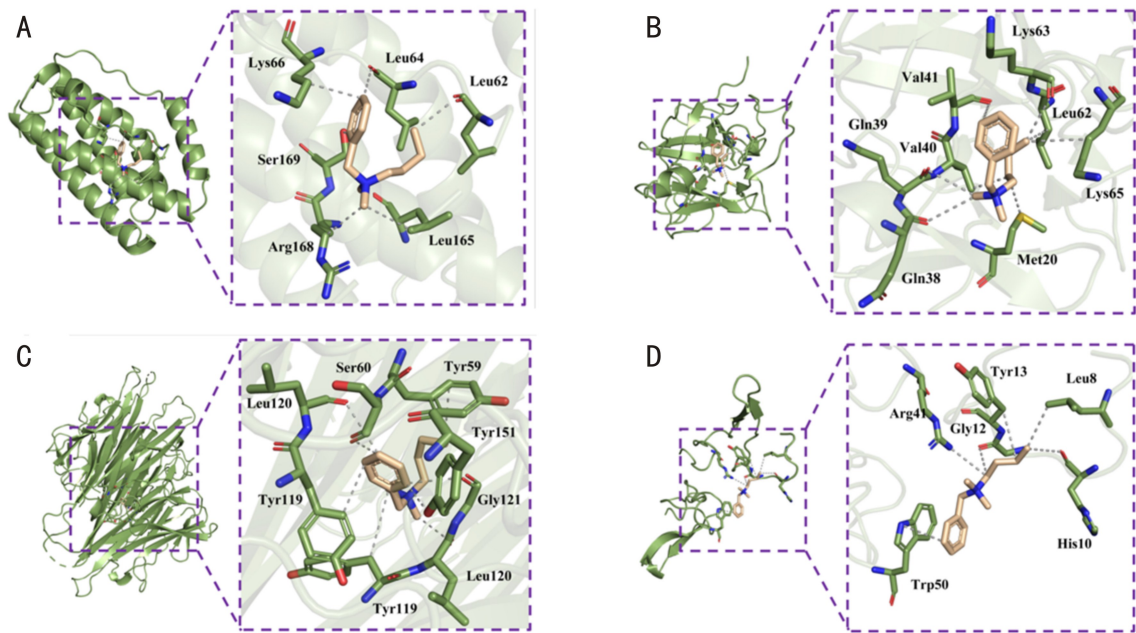


图 9 3D 结合模式图 A:BAC 与 IL-6 蛋白分子对接结果;B:BAC 与 IL-1β 蛋白分子对接结果;C:BAC 与 TNF 蛋白分子对接结果;D:BAC 与 EGF 蛋白分子对接结果。灰色虚线代表疏水作用。

靶点进行交集处理,最后得到 85 个潜在的毒性靶点。通过 PPI 网络拓扑分析,共得到 49 个关键性毒性靶点,其中位于前六位靶点蛋白分别为 TNF、IL-6、ALB、TP53、IL-1β、BCL2,这些靶点可能是 BAC 导致角膜损伤的关键性毒性靶点蛋白。值得注意的是,上述靶点在 PPI 网络中均具有较高的节点度 (Degree ≥ 65),提示其在 BAC 致角膜损伤过程中处于核心调控地位。TNF、IL-6、IL-1β 是常见的三种重要促炎细胞因子,在细胞凋亡、免疫反应、组织损伤及炎症反应中发挥关键作用^[19]。研究表明,DED 患者泪液中 TNF-α 水平升高,TNF-α 值与泪膜破裂时间 (tear break-up time, BUT) 呈显著负相关,与角膜荧光素染色 (corneal fluorescein staining, FL) 评分呈显著正相关^[20],进一步提示 TNF-α 在 DED 的发生和发展过程中起着重要作用。相反,通过抑制 TNF-α 可减轻 DED 眼表炎症^[21]和泪腺的炎症反应^[22],因此,调节 TNF-α 水平可能是治疗 DED 的一种新策略。IL-6、IL-1β 是角膜损伤后炎症和修复的关键因子,在 DED 角膜损伤中发现 IL-6、IL-1β 含量显著升高,引起角膜、结膜纤维化^[23],从而加重了眼表损伤,导致泪膜稳定性进一步下降,二者在角膜损伤的过程中起到促进作用。在炎症调控的过程中,TNF-α 与 IL-1β 协同作用,共同调控 IL-6 的表达^[24]。TP53 和 Bcl-2 在细胞凋亡、细胞周期调控中起着相互拮抗的作用^[25]。Zhang 等^[26]发现上调 Bcl-2 基因的表达,可以抑制 BAC 诱导的 DED 小鼠角膜上皮凋亡,促进损伤角膜的修复。TP53 通过调节细胞周期停滞来影响细胞的修复和细胞的凋亡^[27]。最新研究表明^[28],TP53 通过与 BH3 结合释放促凋亡 Bcl-2 家族蛋白来拮抗 Bcl-2 活性,从而促进细胞凋亡。ALB 是肝脏产生的一种白蛋白,虽然在 DED 角膜损伤中的直接作用尚不明确,但作为血浆中的主要蛋白质,ALB 可能通过维持血浆胶体渗透压和运输功能参与角膜损伤的修复过程。

GO 功能注释显示,化合物损伤角膜涉及 STAT 蛋白酪氨酸磷酸化、平滑肌细胞增殖、一氧化氮生物合成过程、

趋化因子生成、基因表达等正向调控作用。对刺激、炎症、免疫、细胞多脂多糖等应答过程,可能通过作用于细胞外基质、线粒体外膜、细胞表面、细胞质、含蛋白化合物等组分来影响趋化因子活性、趋化诱导剂活性、生长因子活性、细胞因子活性、肽酶类活性、信号受体蛋白结合等功能。

KEGG 富集分析得到与 DED 角膜损伤相关的 7 条主要信号通路:IL-17 信号通路、TNF 信号通路、NF-κB 信号通路、JAK-STAT 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Rap1 信号通路及 MAPK 信号通路。结合“靶点-通路”网络分析可见,IL-6、IL-1β、TNF、EGF 等关键靶点同时参与多条信号通路,提示 BAC 可能通过“多靶点-多通路”协同作用,诱导角膜损伤的发生与发展。IL-17 信号通路在角膜损伤中扮演着重要角色。动物研究表明^[29],角膜损伤通过激活 IL-17 通路而发生,在睡眠不足的 DED 小鼠模型中,阻断 IL-17 可以显著改善小鼠角膜的病理及生理变化,减少炎症反应和角膜损伤。TNF 信号通路参与炎症反应,不仅在角膜损伤中刺激角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 形成,还参与角膜创伤后细胞凋亡修复过程。有研究发现低剂量 TNF-α 能够促进碱烧伤 CNV 形成,而高剂量并未表现出该作用^[30]。此外,TNF-α 抑制剂,如阿达木单抗能够减少角膜手术后细胞凋亡和视神经轴突退化^[31]。MAPK/NF-κB 信号通路是炎症反应的关键通路,该信号通路激活后从不同层面影响角膜损伤及修复过程,MAPK 信号通路参与角膜损伤的发生和修复,其中,p38/MAPK 信号通路破坏高渗透压介导的角膜上皮细胞屏障紧密连接^[32]。p38 MAPK 磷酸化后可进一步激活 NF-κB 通路,激活血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF),调节眼部新生血管生成,加重角膜细胞损伤^[32-33],同时 NF-κB 信号通路激活加重炎症反应和促进细胞凋亡^[33]。JAK-STAT3 信号通路的激活与角膜上皮凋亡及泪腺上皮损伤密切相关。体内外实验研究表明,通过抑制 JAK-STAT3 信号通路,可抑制 DED 小鼠角膜上皮细胞凋亡,增加泪腺上皮的活力^[34]。

Li 等^[35]证实,PI3K/Akt 信号通路活化时,可促进高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)和谷氨酰胺氨基转移酶的表达,从而抑制眼表炎症因子的产生。Rap1 信号通路主要在细胞增殖和分化中发挥作用,Rap1 主要通过影响 NF-κB 信号通路来影响 DED 角膜损伤修复的过程^[36]。

综合上述分析,本研究初步提出 BAC 致 DED 角膜损伤的“多靶点-多通路”作用模型:BAC 通过直接作用于 IL-6、IL-1β、TNF、EGF 等关键靶点,激活 IL-17、TNF、NF-κB、JAK-STAT、PI3K-Akt、MAPK 等炎症与凋亡相关信号通路,进而诱导角膜上皮细胞凋亡、破坏泪膜稳定性、抑制角膜修复,最终导致或加重 DED 角膜损伤。该模型为进一步的实验验证提供了理论依据。

与现有研究的比较分析表明,本研究结果与既往报道具有较好的一致性,同时也展现出一定的差异性。Zhu 等^[37]通过决明素干预 BAC 诱导的 DED 大鼠模型,发现 BAC 可通过激活 MAPK/NF-κB 信号通路诱导角膜炎症反应,这与本研究中 MAPK 及 NF-κB 通路显著富集的结果高度一致,验证了这两条通路在 BAC 致角膜损伤中的核心作用。此外,Vitoux 等^[10]体外实验证实 BAC 可诱导角膜上皮细胞 TNF、IL-6 等炎症因子的表达,与本研究中 TNF、IL-6 作为关键毒性靶点(Degree 值分别为 70 和 68)的结果相吻合。然而,本研究首次系统识别出 Rap1 信号通路(hsa04015)在 BAC 致 DED 角膜损伤中的潜在参与(富集因子 4.633,FDR=0.021),并发现 EGF 可能是 BAC 毒性作用的重要靶点之一(Degree=59),这在以往研究中较少被报道。造成上述差异的可能原因包括:(1)本研究采用的网络毒理学方法能够系统性地预测多靶点、多通路交互作用,而传统实验研究多聚焦于单一通路或少数靶点;(2)不同研究采用的 BAC 浓度、暴露时间不同,可能导致毒性机制的侧重点存在差异。

分子对接结果进一步显示,化合物 BAC 与关键毒性靶点通过氢键、疏水作用及范德华力等发生了特定的相互作用,且结合稳定。在 DED 角膜损伤过程中,IL-6、IL-1β、TNF 与 BAC 结合后,主要介导炎症反应^[38-40],破坏泪膜稳定性并产生直接细胞毒性作用^[41]。此外,IL-1β 与 BAC 结合后,还可以激活 MAPKs 和 NF-κB 等信号通路,进而抑制角膜缘干细胞活性,影响角膜修复和再生^[42]。TNF 与 BAC 结合后,会改变角膜微环境,促进 TNF 诱导的免疫细胞募集,破坏角膜上皮层的紧密连接,导致角膜神经功能障碍,影响角膜敏感性^[10],同时诱导基质金属蛋白酶(MMPs)的表达,加剧角膜基质的降解和重塑,导致角膜透明度降低和结构破坏^[43]。而 EGF 是一种重要的表皮生长因子,在稳定泪膜及上皮的完整性方面发挥着关键作用,但与 BAC 结合后,其促进角膜细胞增殖和分化过程被减缓,从而导致损伤角膜延迟愈合^[44]。化合物 BAC 与关键毒性靶点稳定结合促进了相关信号通路激活,这些相互作用凸显 BAC 对角膜损伤潜在的作用机制,即 BAC 改变了关键细胞信号通路的功能,进一步引发眼表泪膜稳态失衡、结膜损伤、泪腺损伤、眼表炎性反应加重以及角膜损伤严重且修复迟缓等问题。此外,富集结果也表明,BAC 致 DED 角膜损伤涉及多靶点,多机制及不同信号通路共同作用,强调了长期使用含有防腐剂眼用制剂会加重眼表损伤,尤其是对 DED 角膜损伤及其修复过程的负面影响。

本研究聚焦于 BAC 作为眼科常用防腐剂自身的毒性作用,而非探讨药物干预 BAC 损伤的效果。Zhu 等^[37]探讨了决明素在 BAC 诱导的 DED 大鼠模型中的作用,发现其可通过抑制 MAPK/NF-κB 信号通路减轻炎症反应,与该研究相比,本研究虽未进行药物干预验证,但更系统地“从毒性机制”本身出发,深入阐述了 BAC 如何通过多靶点(IL-6、IL-1β、TNF、EGF 等)、多通路(IL-17、TNF、NF-κB、JAK-STAT、PI3K-Akt、Rap1、MAPK)协同作用导致 DED 角膜损伤,为理解 BAC 的毒性本质提供了更全面的理论基础。

本研究的创新点在于:(1)运用网络毒理学联合分子对接技术,系统揭示了 BAC 致 DED 角膜损伤的“多靶点-多通路”协同作用模型,突破了过去单一通路研究的局限性;(2)首次识别出 Rap1 信号通路及 EGF 靶点在 BAC 角膜毒性中的潜在作用,为后续机制研究提供了新方向。在临床应用价值方面,本研究提示:对于长期使用含 BAC 眼用制剂的 DED 患者,应警惕其通过多通路加重角膜损伤的风险;开发不含防腐剂或采用新型低毒防腐剂的眼用制剂具有重要临床意义;此外,靶向 TNF/IL-6/IL-1β 等关键炎症轴或激活 EGF 修复通路的干预策略,可能为减轻 BAC 相关眼表损害提供新的治疗思路。

本研究的不足之处:(1)只是在理论层面探讨了 BAC 致 DED 角膜损伤的毒性机制,未在动物模型或细胞水平上进行实验验证;(2)受限于网络毒理学数据库的覆盖度和准确性,部分潜在靶点或通路可能存在遗漏;(3)分子对接结果虽表明 BAC 与关键靶点具有稳定结合能力,但未进一步通过表面等离子体共振(surface plasmon resonance,SPR)等技术验证其结合亲和力。因此,后续研究需在体内外模型中对本研究发现的关键通路(特别是 Rap1 信号通路)和靶点(如 EGF)进行功能验证。

本文通过网络毒理学及分子对接技术探讨了 BAC 引起 DED 角膜损伤的潜在作用机制,阐明了 BAC 通过作用于 TNF、IL-6、ALB、TP53、IL-1β、BCL2 等关键毒性靶点,共同调控 IL-17、TNF、NF-κB、JAK-STAT、PI3K-Akt、Rap1、MAPK 等信号通路从而起到调控 DED 相关角膜损伤的作用机制。分子对接结果提示 IL-6、IL-1β、TNF、EGF 与化合物具有良好的结合能力,进一步说明了长期使用含 BAC 眼用制剂从多通路、多靶点引起角膜损伤,同时强调了 BAC 致 DED 角膜损伤潜在的毒性损伤机制。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

作者贡献声明:赵丽峰论文选题与修改,初稿撰写;周美娇软件作图,论文初稿;李婷参考文献检索;路雪婧选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] Gou QQ, Song Z, Gong Y, et al. TRPV1 in dry eye disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2024,29(5):175.
[2] Mandell JT, Idarraga M, Kumar N, et al. Impact of air pollution and weather on dry eye. *J Clin Med*, 2020,9(11):3740.
[3] Kamøy B, Magno M, Nøland ST, et al. Video display terminal use and dry eye: preventive measures and future perspectives. *Acta Ophthalmol*, 2022,100(7):723-739.
[4] Basilious A, Xu CY, Malvankar-Mehta MS. Dry eye disease and psychiatric disorders: a systematic review and meta-analysis. *Eur J*

- Ophthalmol, 2022,32(4):1872–1889.
- [5] Tsai CY, Jiesisibieke ZL, Tung TH. Association between dry eye disease and depression: an umbrella review. *Front Public Health*, 2022, 10:910608.
- [6] Wu KY, Kulbay M, Tanasescu C, et al. An overview of the dry eye disease in sjögren's syndrome using our current molecular understanding. *Int J Mol Sci*, 2023,24(2):1580.
- [7] 武佳敏, 刘文莲, 刘畅, 等. 我国青年学生干眼症患病率的 meta 分析. *职业与健康*, 2023,39(10):1397–1402.
- [8] Zhang ZR, Liu CX, Zhao LY, et al. Systems biology of dry eye: Unraveling molecular mechanisms through multi-omics integration. *Ocul Surf*, 2025,36:25–40.
- [9] Britten-Jones AC, Wang MTM, Samuels I, et al. Epidemiology and risk factors of dry eye disease: considerations for clinical management. *Medicina (Kaunas)*, 2024,60(9):1458.
- [10] Vitoux MA, Kessal K, Melik Parsadaniantz S, et al. Benzalkonium chloride-induced direct and indirect toxicity on corneal epithelial and trigeminal neuronal cells: proinflammatory and apoptotic responses *in vitro*. *Toxicol Lett*, 2020,319:74–84.
- [11] Nagstrup AH. The use of benzalkonium chloride in topical glaucoma treatment: an investigation of the efficacy and safety of benzalkonium chloride-preserved intraocular pressure-lowering eye drops and their effect on conjunctival goblet cells. *Acta Ophthalmol*, 2023,101 (Suppl 278):3–21.
- [12] 刘祖国. 干眼的临床诊断与治疗亟待规范化和精细化. *中华眼科杂志*, 2017,53(9):641–644.
- [13] 徐婉馨. 子母配穴针刺联合浅针治疗肝经郁热型干眼的临床疗效观察. 福建中医药大学, 2025.
- [14] Cifuentes-González C, Amaris-Martínez S, Reyes-Guanes J, et al. Ocular cicatricial pemphigoid, sjögren's syndrome, and Hashimoto's thyroiditis as a multiple autoimmune syndrome: a case report. *Eur J Ophthalmol*, 2022,32(4):NP52–NP55.
- [15] Gomes JAP, Azar DT, Baudouin C, et al. TFOS DEWS II iatrogenic report. *Ocul Surf*, 2017,15(3):511–538.
- [16] Uematsu M, Kumagami T, Kusano M, et al. Acute corneal epithelial change after instillation of benzalkonium chloride evaluated using a newly developed *in vivo* corneal transepithelial electric resistance measurement method. *Ophthalmic Res*, 2007,39(6):308–314.
- [17] Zhang R, Park M, Richardson A, et al. Dose-dependent benzalkonium chloride toxicity imparts ocular surface epithelial changes with features of dry eye disease. *Ocul Surf*, 2020,18(1):158–169.
- [18] Ivakhnitskaia E, Soubach V, Dallacasagrande V, et al. Benzalkonium chloride, a common ophthalmic preservative, compromises rat corneal cold sensitive nerve activity. *Ocul Surf*, 2022,26:88–96.
- [19] Yagci A, Gurdal C. The role and treatment of inflammation in dry eye disease. *Int Ophthalmol*, 2014,34(6):1291–1301.
- [20] 黄锐升, 林丽敏, 金泰, 等. 干眼症患者泪液 IL-1 β , TNF- α 、TSLP 水平与 BUT 值、FL 评分的相关性分析. *河北医科大学学报*, 2021,42(4):425–428.
- [21] Kelagere Y, Scholand KK, DeJong EN, et al. TNF is a critical cytokine in age-related dry eye disease. *Ocul Surf*, 2023,30:119–128.
- [22] Ji YW, Byun YJ, Choi W, et al. Neutralization of ocular surface TNF- α reduces ocular surface and lacrimal gland inflammation induced by *in vivo* dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(12):7557–7566.
- [23] Yu-Wai-Man C, Tagalakakis AD, Meng JH, et al. Genotype-phenotype associations of IL6 and PRG4 with conjunctival fibrosis after glaucoma surgery. *JAMA Ophthalmol*, 2017,135(11):1147–1155.
- [24] Al-Roub A, Al Madhoun A, Akhter N, et al. IL-1 β and TNF α cooperativity in regulating IL-6 expression in adipocytes depends on CREB binding and H3K14 acetylation. *Cells*, 2021,10(11):3228.
- [25] 姬峻芳, 詹启敏, 吴旻. Bcl-2 与 P53 的相互作用. *医学分子生物学杂志*, 2005,2(2):102–104.
- [26] Zhang WH, Li WJ, Zhang CY, et al. Effects of vitamin a on expressions of apoptosis genes bax and bcl-2 in epithelial cells of corneal tissues induced by benzalkonium chloride in mice with dry eye. *Med Sci Monit*, 2019,25:4583–4589.
- [27] Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ*, 2018,25(1):104–113.
- [28] Wei HD, Wang HL, Wang GX, et al. Structures of p53/BCL-2 complex suggest a mechanism for p53 to antagonize BCL-2 activity. *Nat Commun*, 2023,14:4300.
- [29] Xue YX, Xu PY, Hu Y, et al. Stress systems exacerbate the inflammatory response after corneal abrasion in sleep-deprived mice *via* the IL-17 signaling pathway. *Mucosal Immunol*, 2024,17(3):323–345.
- [30] 金辉. TNF- α 在碱烧伤诱导角膜新生血管中的作用及机制. 苏州大学, 2011.
- [31] Paschalis EI, Zhou CX, Sharma J, et al. The prophylactic value of TNF- α inhibitors against retinal cell apoptosis and optic nerve axon loss after corneal surgery or trauma. *Acta Ophthalmol*, 2024, 102(3):e381–e394.
- [32] 秦爽, 周文君, 李华, 等. p38/MAPK 信号通路在高渗透压破坏角膜上皮屏障功能中的作用. *第三军医大学学报*, 2017,39(23):2282–2288.
- [33] 李维纳, 杨玲玲, 谢立信. 核因子 κ B 信号通路在糖尿病角膜病变发生和发展中的作用. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(3):224–228.
- [34] 孙一洲. IL-6 受体抑制剂托珠单抗通过抑制 NLRP3 炎症小体激活调节 JAK/STAT3 信号通路在干眼症发病中的作用及机制. 中国医科大学, 2022.
- [35] Li H, Li JF, Hou CT, et al. The effect of astaxanthin on inflammation in hyperosmolarity of experimental dry eye model *in vitro* and *in vivo*. *Exp Eye Res*, 2020,197:108113.
- [36] Shan TT, Li XY, Xie WZ, et al. Rap1GAP exacerbates myocardial infarction by regulating the AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway. *Cell Signal*, 2024,117:111080.
- [37] Zhu D, Wu XY, Li LC. Obtusifolin ameliorates dry eye model in rats by reducing inflammation and blocking MAPK/NF- κ B pathways. *Int J Ophthalmol*, 2025,18(8):1426–1432.
- [38] 魏静静, 谢艳亭, 岳娟, 等. 腐皮镰孢菌对角膜上皮细胞 AMPK 磷酸化及 IL-6 表达的影响. *中华实验眼科杂志*, 2022, 40(2):133–138.
- [39] Li XJ, Peng H, Kang JS, et al. IL-1 β induced down-regulation of miR-146a-5p promoted pyroptosis and apoptosis of corneal epithelial cell in dry eye disease through targeting STAT3. *BMC Ophthalmol*, 2024, 24(1):144.
- [40] 周卫萍. IL-1 β 诱导人角膜上皮细胞产生 IL-6 和 IL-8 的分子机制及地塞米松对其抑制作用的研究. 浙江大学, 2015.
- [41] 徐枢枢, 钟一声. 局部抗青光眼药物中苯扎氯胺导致干眼症的研究进展. *国际眼科纵览*, 2021,45(5):420–425.
- [42] 董沐晨. 炎症和高渗因素对角膜上皮干细胞活性的影响及其机制的体外研究. 济南大学, 2014.
- [43] Jadczyk-Sorek K, Garczorz W, Bubała-Stachowicz B, et al. Matrix metalloproteinases and the pathogenesis of recurrent corneal erosions and epithelial basement membrane dystrophy. *Biology*, 2023, 12(9):1263.
- [44] 张成博, 刘雪英, 雷世婵, 等. 苯扎氯胺诱发小鼠角膜损伤模型的构建及损伤机制研究. *延安大学学报(医学科学版)*, 2023, 21(4):23–29.