

基于“中药作用机理辅助解析系统”的杜仲抗 高血压作用机制研究

叶小彤, 张百霞, 王慧慧, 何帅兵, 张小华, 王耘*

(北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 阐释杜仲治疗高血压的作用机制,为杜仲的进一步研究和开发提供依据。该文利用“中药作用机理辅助解析系统”从分子水平上分析杜仲化学成分与疾病靶点蛋白的相互作用关系,构建出杜仲抗高血压的生物网络,共包含602个节点,2354条边。通过对网络分析得到杜仲治疗高血压的3条作用途径,即通过抑制血管重塑改善高血压恶化病情、降低与原发高血压发病有关的多态性遗传基因的活性、抑制碳酸酐酶维持机体渗透压的途径实现抗高血压的作用。

[关键词] 杜仲;网络药理学;中药作用机理辅助解析系统;实体语法系统;抗高血压

Study on mechanism for anti-hypertension efficacy of Eucommiae Cortex through assistant analysis systems for acting mechanisms of traditional Chinese medicine

YE Xiao-tong, ZHANG Bai-xia, WANG Hui-hui, HE Shuai-bing, ZHANG Xiao-hua, WANG Yun*

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] Elucidate the mechanism of Eucommiae Cortex in treatment of hypertension, to provide the basis for further research and development of Eucommiae Cortex. Our study using the entity grammar systems inference rules to analyse the interactions of chemical constituents of Eucommiae Cortex and disease target proteins at the molecular level, and got a biological network of Eucommiae Cortex anti-hypertension which include 602 nodes and 2354 edges. We got 3 treatment of hypertension pathways of Eucommiae Cortex by analyzing biological network, that is, by inhibition of vascular remodeling to improve the deterioration of hypertension, reduce activity of polymorphism genetic genes related to essential hypertension, inhibition of carbonic anhydrase 1 to maintain the osmotic pressure, Eucommiae Cortex play the role of anti-hypertension.

[Key words] Eucommiae Cortex; network pharmacology; assistant analysis systems for acting mechanisms of traditional Chinese medicine; entity grammar systems; anti-hypertension

doi:10.4268/cjcm20151905

高血压病(hypertensive disease)是人类心脑血管疾病中发病率最高的一种慢性疾病,是危害人类健康的常见病之一。其脑卒中、心肌梗死、心力衰竭及慢性肾脏病等主要并发症,不仅致残、致死率高,而且严重消耗医疗和社会资源,给家庭和国家造成沉重负担^[1]。而且高血压是一种多因素疾病,涉及遗传与环境因素的综合作用影响,肾素-血管紧张

素-醛固酮系统、交感神经系统、体液容量系统、细胞膜离子转运系统等多系统参与其发生、发展,是一个典型的多靶点且需联合用药的复杂疾病。中药在高血压疾病治疗方面积累了大量经验,使用中药治疗高血压具有多途径、多环节、多靶点的作用,尤其是在改善高血压并发症时有一定疗效,这是中药治疗的优势,但尚需要大量的临床资料提供更为可靠

[收稿日期] 2015-06-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173568,81373985);教育部新世纪优秀人才支持项目(NECT-11-0605)

[通信作者] *王耘,教授,博士生导师,Tel:(010)84738620,E-mail:wangyun@bucm.edu.cn

[作者简介] 叶小彤,硕士研究生,Tel:17801085309,E-mail:yexiaotongs@163.com

的证据。

杜仲是一种我国特有的中药,为杜仲科植物杜仲 *Eucomia ulmoides* Oliver 的干燥树皮,具有补肝肾、强筋骨、安胎、轻身耐老等功效。研究表明杜仲含有多种活性成分,如脂素类、苷类、环烯醚萜类等,具有降压、利尿、镇静、抗菌、抗炎、止血、镇痛等作用^[2]。近代研究发现杜仲对原发性高血压和肾性高血压都具有功效,常单独使用或与其他药物联用来治疗高血压。但是,由于杜仲的多组分和多靶点的复杂作用机制特性,它的抗高血压功效没有得到广泛的临床应用。

在过去的10年里,生物信息学、网络药理学及系统药理学等方法被成功应用在发现中药的活性成分和作用机制当中,如利用整合的网络药理学和代谢组学方法研究大黄抗肾间质纤维化的作用机制^[3],基于网络药理学确定改良四妙丸的有效成分和治疗痛风的合理性^[4]等。而随着分子生物学研究在心血管病方面的深入探索,人们对高血压的认识和诊疗模式也发生了改变。本文针对杜仲治疗高血压的作用,利用基于实体语法系统所建立的“中药作用机理辅助解析系统”,来阐明其多成分多靶点的作用机制。

1 方法与数据来源

1.1 “中药作用机理辅助解析系统”中生物网络构建原理

实体语法系统(entity grammar systems, EGS)是针对生物复杂系统建模所建立的一种形式语法系统^[5]。通常情况下,实体语法系统用五元组 $G = (V_N, V_T, F, P, S)$ 表示,其中 V_N 和 V_T 指系统中的基本元素, F 表示基本元素之间的结构关系, P 代表由已知实体产生新实体的推理规则, S 表示系统初始状态,即推理的起点。当无需考虑或区分末端字符与非末端字符时,实体语法系统可用四元组 $G = (V, F, P, S)$ 表示,其中 $V = V_N \cup V_T$ 。

本研究基于实体语法系统构建杜仲作用于高血压疾病相关蛋白的生物网络。在本系统中 V 主要包含网络中各种类型的节点(中药名称,中药化学成分及其作用靶点,疾病名称及其相关蛋白,其他小分子和蛋白等), F 包括网络中的各种节点关系类型(include, interaction, neg, pos 等), P 为基于上述实体推断杜仲作用靶点与高血压疾病相关蛋白作用关系的推理规则,类似于基本的推理公式。基于实体语法系统的“中药作用机理辅助解析系统”原理和技术方法具体见参考文献[6-7]。最后将解析结果用 Cytoscape_v3.2.1 实现网络的可视化。

1.2 数据来源 “中药作用机理辅助解析系统”数据集成了 TCMD(中药化学成分数据库)、《中药活性成分手册》、STITCH; Chemical-Protein Interactions, Therapeutic Targets Database, Reactome, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database, human integrated Pathway DB with facile visualization 等数据库信息以及本实验室经过文献整理、数据挖掘技术所发现的中药化学成分与靶点间相互作用关系数据,其中包含杜仲 119 个化学成分及其作用靶点信息。

1.3 绘图软件 本文利用软件 Cytoscape_v3.2.1 绘制网络图,软件 Cytoscape_v3.2.1 (<http://www.cytoscape.org/>) 是一个可以用于可视化分子相互作用网络的开源软件平台^[8],可用于构建和分析复杂网络。

2 结果与讨论

2.1 杜仲治疗高血压的整体生物网络 为了从分子层面阐释杜仲治疗高血压的作用机制,作者基于“中药作用机理辅助解析系统”得到杜仲治疗高血压的整体生物网络图,见图 1。网络中共有 602 个节点,2 354 条边。图中绿色的圆形代表中药杜仲;黄色的箭头代表杜仲中 20 种化学成分,包括槲皮素、芦丁、山柰酚、咖啡酸、染料木黄酮、香豆酸、熊果酸等;橙色的菱形代表化学成分的靶点蛋白;粉色的三角形代表网络中的蛋白分子;天蓝色的平行四边形代表小分子化合物;紫色的正方形代表疾病靶点,分别为(Complement 3) C3 基因、(bradykinin β_2 receptor) BDKRB2 基因、(carbonic anhydrase) CA1 基因;黑色的六边形代表高血压疾病。黑色的边代表包含关系;绿色的边代表相互作用;粉色的边代表促进作用;蓝色的边代表抑制作用。节点的大小反应连通度的高低,其中连通度最高的节点为(guanosine triphosphate) GTP 和 Calcium,表明高血压的病理生理环境与能量的高低及钙通道影响有很大程度的关系。

针对杜仲的主要成分以及防治高血压的靶点进行分析,杜仲中的化学成分通过蛋白、小分子等的间接传递效应实现了对高血压的控制作用,最后获得了补体 C3(C3)抑制剂、缓激肽 β_2 受体(BDKRB2)抑制剂、碳酸酐酶(CA1)抑制剂,其与各化学成分连接信息见表 1。整体生物网络反应出杜仲治疗高血压包含以下 3 个作用途径:补体 C3 可促使血管重塑,加剧高血压病情,杜仲化学成分通过抑制血管重塑,治疗高血压病情恶化及并发症^[9];BDKRB2 基因是一种具有多态性的遗传基因,它的多态性与原发性高血压(essential hypertension, EH)的发病有关^[10],造成部分人群的 EH 遗传易感问题,杜仲通过抑制它的活性可预防原发性高血压易患人群的发病可能;杜仲还可作为碳酸酐酶抑制剂抑制碳酸酐酶活性从而维持机体渗透压来实现降低血压的作用^[11]。这些途径是相互交错的,在生物网络中杜仲的多种化学成分可以靶向多个蛋白靶标来实现调控网络和恢复网络平衡,实现控制高血压疾病的发生和发展。

2.2 杜仲治疗高血压的子网络 由于整体网络的复杂性,整体分析工作较难实现,现以分子网络的一条子网络为例进行杜仲治疗高血压的作用机制解析。子网络见图 2。

2.3 子网络分析 图 2 中子网络包括代表杜仲的节点,化学成分槲皮素;蛋白 TP53(tumor protein p53), EGFR(epidermal growth factor receptor), MASPI(mannan-binding lectin serine protease 1), C4B(complement component 4B), C3(complement 3);小分子 Calcium, GTP(guanosine triphosphate) 和代表高血压疾病的节点。

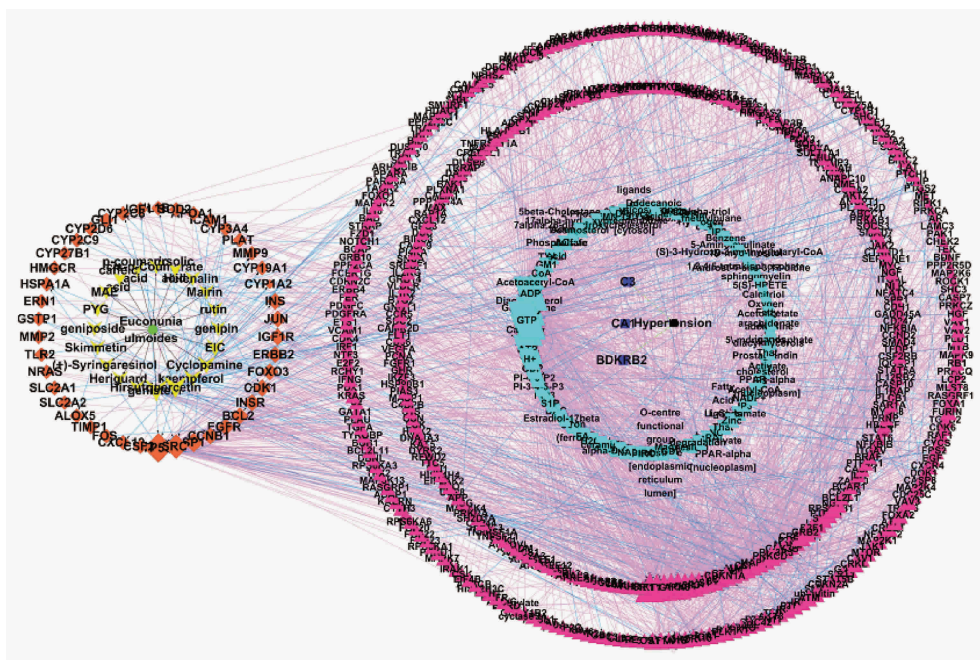


图1 杜仲治疗高血压的整体分子网络

Fig. 1 The overall molecular network of Eucommiae Cortex in treatment of hypertension

表1 疾病靶点与杜仲化学成分关联结果

Table 1 The associated result of disease targets and chemical constituents of Eucommiae Cortex

疾病靶点	作用成分	疾病靶点	作用成分	
BDKRB2	芦丁	CA1	京尼平	
	山柰酚		山柰酚	
	槲皮素		绿原酸	
	熊果酸		咖啡酸	
	亚油酸		熊果酸	
	京尼平		C3	芦丁
	马来酸			槲皮素
	绿原酸			亚油酸
	咖啡酸			京尼平
	环杷明			马来酸
	陆地棉苷			绿原酸
	丁子香萆			咖啡酸
	染料木黄酮			山柰酚
	堆心菊内酯			熊果酸
	焦性没食子酸			环杷明
CA1	槲皮素	陆地棉苷		
	亚油酸	京尼平苷		
	马来酸	对香豆酸		
	环杷明	丁子香萆		
	丁子香萆	染料木黄酮		
	染料木黄酮	堆心菊内酯		
	堆心菊内酯	7-羟基香豆素		
	7-羟基香豆素	右旋丁香脂素		
	焦性没食子酸	顺式对香豆酸		
		焦性没食子酸		

高血压等心血管疾病的病理生理基础之一是血管重塑，血管重塑可以导致血管结构和功能的变化，也是高血压恶化的主要病理机制。血管中层和外膜细胞的增殖、迁移和表型转化是新生内膜形成致血管重塑的关键。在血管重塑方面，研究发现 C3 会在血压尚未升高的自发性高血压大鼠 (SHR) 的血管中膜和培养血管平滑肌细胞 (VSMC) 中表达，且 C3 及其裂解片段 C3a 可促使 VSMC 表型的转化，直接诱导 VSMC 由收缩型表型向合成型表型的转化，并促进 SHR 大鼠的 VSMC 增殖，展现出血管活性物质样特性^[12]。另外 C3 也在血管外膜成纤维细胞转化为肌成纤维细胞，从而产生增殖和迁移能力的过程中被明显上调^[13]，除此之外来源于血管外周脂肪的补体 C3 也促进了盐敏感性高血压大鼠的血管外膜重塑^[14]。补体 C3 的水平增高也可以直接影响大动脉的功能，可能致使高血压患者动脉僵硬增加。以上研究均提示补体 C3 对血管的结构和功能改变有重要的影响。

槲皮素 (quercetin, QUE) 为杜仲中主要的天然黄酮类降压成分，具有舒张血管作用，研究发现槲皮素根据浓度高低的不同降压机制也有所不同。低浓度时，槲皮素的舒张血管作用具有内皮依赖性，主要通过促进内皮细胞释放 NO 舒张血管；而在高浓度时，其主要通过抑制血管平滑肌细胞的 Ca²⁺ 通道等途径舒张血管^[15]。体内研究表明槲皮素可抑制异常增生细胞的增殖，例如通过抑制 tp53 蛋白表达水平来抑制细胞增殖促进凋亡和调节 EGFR 的活动等方式。

tp53 是重要的肿瘤抑制因子，野生型的 tp53 具有促进凋亡，抑制或阻止细胞转化的功能，但是，tp53 在人体内极易发生突变失去抑癌作用使细胞发生恶性转化，突变的 tp53 抑制

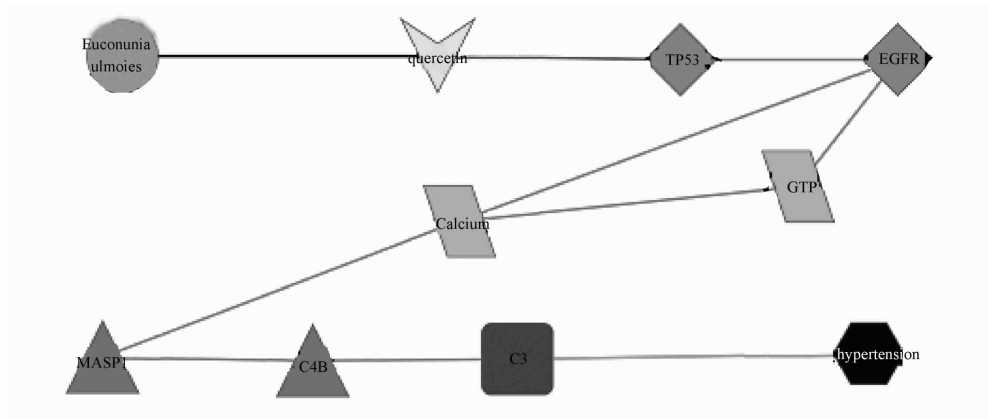


图2 杜仲治疗高血压的子网络

Fig. 2 The sub network of Eucommiae Cortex in treatment of hypertension

细胞凋亡作用与 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 抑制凋亡作用类似,槲皮素可通过抑制 Bcl-2 和 tp53 蛋白的表达来抑制恶性细胞的增生^[16]。p53-273H 是 tp53 的一个突变体,能够直接与 miR-27a 转录起始位点上游-2 899 ~ -2 675 的 DNA 区域结合,从而抑制 miR-27a 的表达^[17]。EGFR 是 miR-27a 下游的直接靶基因。MiR-27a 能够与 EGFR mRNA3' 端非翻译区结合而抑制 EGFR 的翻译。通过 miR-27a/EGFR 信号通路,突变的 p53-273H 能够引起 EGF 刺激 EGFR 下游信号蛋白 ERK 1/2 的持续活化,因此促进恶性细胞的增殖增生。

表皮生长因子受体 (EGFR) 普遍存在于哺乳动物的细胞膜上,是一种跨膜糖基化磷酸蛋白,能被酪氨酸酶激活而产生磷酸化并使许多底物蛋白磷酸化,提供持续分裂信号到细胞内,在细胞的恶性转化和异常增殖中起重要作用^[18]。槲皮素可作为酪氨酸激酶 (PTK) 抑制剂通过降低细胞蛋白磷酸化程度阻塞 EGFR 信号通路,从而显著地抑制异常增生细胞的生长并促进细胞的凋亡。

EGFR 是上皮生长因子 (EGF) 参与细胞增殖以及一系列其他信号传导的受体因子,EGF 是 EGFR 的配体之一,EGF 与 EGFR 的胞外区结合后相互作用形成二聚体,激活胞内酪氨酸激酶区,进而通过磷酸化等作用促使受体酪氨酸残基磷酸化并传导信号到细胞内,引起一系列相关基因的活化并促进细胞周期转化,对核内基因表达和细胞生长分化产生调节作用。细胞内的 Ca^{2+} 在细胞增殖中起着重要作用,在外源性 EGF 刺激大鼠 A 型精原细胞增殖实验中,加入 EGF 后,细胞内的 Ca^{2+} 浓度明显增加^[19]。因此,EGF 促进 A 型精原细胞增殖是通过激活 EGFR,从而进一步激活下游的 Ca^{2+} 信号通路来发挥作用的。在补体激活的 MBL 途径中, Ca^{2+} 、甘露糖结合凝集素丝氨酸蛋白酶 (MASP) 等都是主要参与成分。MBL 途径是由甘露聚糖结合凝集素 (MBL) 与细菌甘露糖残基和丝氨酸蛋白酶结合, Ca^{2+} 通道参与启动的补体激活途径^[20]。正常血清中 MBL 水平极低,在急性期反应时其水平明显升高。MBL 首先与细菌的甘露糖残基结合,然后与丝氨

酸蛋白酶结合,形成 MBL 相关的丝氨酸蛋白酶;而 MASP 可水解 C4 和 C2 分子形成 C4a, C4b, C2a, C2b,继而形成 C3 转化酶,C3 转化酶可将 C3 裂解为 C3a 和 C3b 片段,而 C3 和 C3a 片段如上述所提对血管重塑的过程有间接的促进作用。

这条子网络解释了槲皮素通过影响血管重塑这个病理过程来实现改善高血压恶化情况调节血压的机制,而能量代谢分子 GTP 的参与说明药物在体内作用与能量代谢过程密切相关。从整体网络上来看,杜仲中存在着化学成分与疾病靶点一对多和多对一的关系,本研究按照中药-中药化学成分-化学成分作用靶点-蛋白或小分子-疾病相关蛋白-疾病这条完整的生物学网络过程,在分子水平上解析了杜仲治疗心血管疾病的分子作用机制。

3 结论与展望

杜仲治疗高血压等疾病的历史悠久,但一直缺乏明确的作用机制研究。本文研究表明杜仲通过槲皮素、芦丁、山奈酚等化学成分作用于 C3, BDKRB2, CA1 疾病靶点来实现对高血压的治疗、调节、预防作用。本文所构建整体网络包括 602 个节点,2 354 条边,揭示出抑制血管重塑过程改善高血压的恶化病情、影响与原发高血压发病有关的多态性遗传基因的活性、抑制碳酸酐酶活性维持机体渗透压是杜仲抗高血压的 3 条主要途径。杜仲在高血压疾病上的治疗作用是多靶点多途径的,本研究为杜仲的进一步开发提供了新的线索,也为高血压的药物研发和辅助治疗提供了相应的数据基础。

【参考文献】

- [1] 刘力生. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8): 701.
- [2] 宋立人. 现代中药学大辞典. 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [3] Xiang Z, Sun H, Cai X, et al. The study on material basis and mechanism for anti-renal interstitial fibrosis efficacy of rhubarb through integration of metabolomics and network pharmacology

- [J]. *Mol BioSystems*, 2015, 11: 1067.
- [4] Zhao F, Guochun L, Yang Y, et al. A network pharmacology approach to determine active ingredients and rationality of herb combinations of Modified-Simiaowan for treatment of gout[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015(168): 1.
- [5] Wang Y. Entity grammar systems; a grammatical tool for studying the hierarchical structures of biological systems[J]. *Bull Math Biol*, 2004, 66(3): 447.
- [6] Yan J, Wang Y, Luo S, et al. TCM grammar systems: an approach to aid the interpretation of the molecular interactions in Chinese herbal medicine[J]. *J Ethnopharmacology*, 2011, 137(1): 77.
- [7] Luo J, Ren Y, Gu H, et al. dTGS: method for effective components identification from traditional Chinese medicine formula and mechanism analysis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi:10.1155/2013/840427.
- [8] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498.
- [9] 王泰蓉, 李燕, 汤宜婷, 等. 原发性高血压患者补体 C3 水平与血管结构和功能的关系研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2011, 10(9): 644.
- [10] 杭丽玮. 缓激肽 β_2 受体基因多态性与原发性高血压的相关性研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2009.
- [11] 彭春霞, 高艳明. 碳酸酐酶生理功能的研究进展[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2007, 39(2): 210.
- [12] Lin Z H, Fukuda N, Jin X Q, et al. Complement 3 is involved in the synthetic phenotype and exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2004, 44(1): 42.
- [13] 郭淑杰, 吴凌云, 沈伟利, 等. 血管外膜肌成纤维细胞分化的基因表达谱[J]. *生理学报*, 2006, 58(4): 337.
- [14] Ruan C C, Zhu D L, Chen Q Z, et al. Perivascular adipose tissue-derived complement 3 is required for adventitial fibroblast functions and adventitial remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2568.
- [15] 罗丽芳, 吴卫华, 欧阳冬生, 等. 杜仲的降压成分及降压机制[J]. *中草药*, 2006, 37(1): 150.
- [16] 王刚, 杜士明, 杨光义, 等. 槲皮素抗肿瘤的分子机制研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(4): 322.
- [17] 王文宇. P53 突变体获得性功能在肿瘤发生中作用机制的研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2013.
- [18] 向廷秀, 陶小红, 姜政, 等. 槲皮素对 SGC-7901 胃癌细胞生长及 HSP70 和 EGFR 表达的影响[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2007, 28(4): 411.
- [19] 余荣娇, 张凯. EGFR 和 Ca^{2+} 在外源性 EGF 刺激大鼠 A 型精原细胞增殖中的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(6): 601.
- [20] Megyeri M, Jani P K, Kajdácsi E, et al. Serum MASP-1 in complex with MBL activates endothelial cells[J]. *Mol Immunol*, 2014, 59(1): 39.

[责任编辑 马超一]