

基于网络药理学分析复方利血平氨苯蝶啶片降压作用机制与验证研究

刘 珊^{1,2}, 刘楠楠^{1,2}, 魏广义^{1,2}, 姜 瑜¹, 王守宝^{1*}, 杜冠华^{1,2*}

- (1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京市药物靶点研究与新药筛选重点实验室, 北京 100050;
2. 广东药科大学, 广东 广州 510006)

摘要: 复方利血平氨苯蝶啶片是由我国学者研发的复方降压药, 至今仍在临床广泛使用, 但其降压作用机制仍有待阐释。本文拟基于网络药理学分析其降压作用机制并在细胞水平进行初步研究验证。本文通过 Swiss Target Prediction 数据库收集复方利血平氨苯蝶啶片中 4 种化学成分的作用靶点; 通过 TTD、OMIM 数据库选取高血压病的相关蛋白靶标; 利用 STRING 数据库构建复方利血平氨苯蝶啶片-高血压病网络模型; 通过 Metascape 数据库对交集靶点进行 GO 富集分析和通路富集分析; 采用人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 和血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 分别经 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 血管紧张素 II (angiotensin II, AngII) 诱导处理, 低中高浓度复方利血平氨苯蝶啶片原料 (0.01 、 0.1 和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行干预, Western blot 法检测 HUVEC 中磷酸酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/内皮型一氧化氮合酶 (phosphatidylinositol-3-kinase/protein serine threonine kinase/endothelial nitric oxide synthase, PI3K/Akt/eNOS) 通路和 VSMC 中环磷酸鸟苷酸/环磷酸鸟苷酸依赖的蛋白激酶 G (cyclic guanosine monophosphate/cGMP-dependent protein kinase, cGMP/PKG) 通路的变化。网络药理学分析揭示, 复方利血平氨苯蝶啶片降压作用与血管张力调节、肾上腺素受体激活、蛋白激酶活性等密切相关, 其中涉及 cGMP/PKG 信号通路、血管平滑肌收缩、调控神经活动的配体-受体相互作用、心肌细胞肾上腺素信号传导、钙信号通路等信号通路。细胞水平研究证实, 复方利血平氨苯蝶啶片处理升高 HUVEC 中磷酸化磷酸酰肌醇-3 激酶 (phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase, p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein serine threonine kinase, p-Akt)、磷酸化内皮型一氧化氮合酶 (phosphorylated endothelial nitric oxide synthase, p-eNOS) 以及 VSMC 中 eNOS、磷酸化血管舒张剂刺激磷酸蛋白 (phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein, p-VASP)、PKG 蛋白水平。复方利血平氨苯蝶啶片通过多靶点、多通路发挥降压作用, 进一步研究证实, 激活 PI3K/Akt/eNOS 通路诱导内皮依赖的 NO/cGMP/PKG 信号, 从而舒张血管可能是其重要作用机制之一。

关键词: 高血压病; 复方利血平氨苯蝶啶片; 网络药理学; PI3K/Akt/eNOS 信号通路; cGMP/PKG 信号通路

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)12-3484-09

Use of network pharmacology to analyze compound reserpine and triamterene tablets in the treatment of hypertension

LIU Shan^{1,2}, LIU Nan-nan^{1,2}, WEI Guang-yi^{1,2}, JIANG Yu¹, WANG Shou-bao^{1*}, DU Guan-hua^{1,2*}

(1. Beijing Key Laboratory of Drug Target and Screening Research, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Compound reserpine and triamterene tablets (CRTT), a compound antihypertensive drug developed

收稿日期: 2021-05-26; 修回日期: 2021-06-21.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC0311003); 北京市自然科学基金面上资助项目 (7192131); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2018ZX09711001-010, 2018ZX09711001-012, 2018ZX09101003-007-009).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165313, E-mail: shoubaowang@imm.ac.cn;

Tel / Fax: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0797

by Chinese scientists, is still widely used in clinical practice. However, the mechanisms by which CRTT treats hypertension remain to be fully understood. This study used network pharmacology to analyze CRTT's antihypertensive mechanisms with *in vitro* experiments. The targets of the four chemical components of CRTT were collected from the Swiss Target Prediction database; 1 828 protein targets related to hypertension were collected from the Therapeutic Target Database (TTD) and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database. The CRTT-hypertension network model was constructed using a search tool for recurring instances of neighbouring genes (STRING). Gene ontology (GO) and pathway enrichment analysis of targets of interest was conducted with the Metascape database. In the *in vitro* study, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and vascular smooth muscle cells (VSMC) were treated with $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ angiotensin II (AngII) and CRTT was administered at concentrations of 0.01, 0.1, and $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Changes in the phosphatidylinositol-3-kinase/protein serine threonine kinase/endothelial nitric oxide synthase (PI3K/Akt/eNOS) pathway in HUVEC and the cyclic guanosine monophosphate/cGMP-dependent protein kinase (cGMP/PKG) pathway in VSMC were determined by Western blot. Network pharmacological analysis revealed that the antihypertensive effect of CRTT is closely associated with biological pathways such as vascular tone regulation, adrenergic receptor activation, protein kinase activity and signaling pathways such as the cGMP/PKG signaling pathway, vascular smooth muscle contraction, neuroactive ligand-receptor interaction, adrenergic signaling in cardiomyocytes and calcium signaling pathways. The *in vitro* study confirmed that CRTT increased the levels of phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase (p-PI3K), phosphorylated protein serine threonine kinase (p-Akt), phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS) in HUVEC and the levels of eNOS, phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein (p-VASP), and PKG in VSMC through multiple targets and pathways. These results suggest that the activation of PI3K/Akt/eNOS pathway and endothelial-dependent NO/cGMP signaling may be involved in the CRTT-mediated hypotensive effect.

Key words: hypertension; compound reserpine and triamterene tablets; network pharmacology; PI3K/Akt/eNOS pathway; cGMP/PKG pathway

高血压是以体循环动脉血压(收缩压和/或舒张压)增高为主要特征(收缩压 ≥ 140 mmHg,舒张压 ≥ 90 mmHg)的常见重大慢性病,可伴有心、脑、肾等器官的功能或器质性损害的临床综合征,发病率、致死率、致残率极高,严重危害人类健康。目前已认识到,降压药物降低高血压患者的血压,对降低患者的并发症和死亡风险具有重要意义。经过多年的临床研究证明,降压药物联合用药不仅可以有效控制血压,防控并发症,而且对于增加药物的依从性、安全性和耐受性也有重要意义。

复方药物制剂(single-pill combinations, SPC)可通过药物联合应用实现有效降压,已受到国内外各大指南推荐和研究者的关注^[1-4]。在20世纪60年代,国外还在使用单一药物降压时,我国药物学家就开展了长效复方降压药物的研发。作为其典型代表,复方利血平氨苯蝶啶片效果明确,适用性强,至今仍然是治疗轻中度高血压的常用药物之一。

虽然复方利血平氨苯蝶啶片在临床上应用广泛,但其综合作用机制仍不明确,限制了该药的进一步应用与再开发。本研究采用网络药理学方法,构建复方利血平氨苯蝶啶片的“成分-靶点-通路”网络模型,在此基础上,通过体外实验检测人脐静脉内皮细胞

(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)经 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 血管紧张素II(angiotensin II, AngII)诱导处理,低中高浓度(0.01、0.1和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)复方利血平氨苯蝶啶片干预后磷酸酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B/内皮型一氧化氮合酶(phosphatidylinositol-3-kinase/protein serine threonine kinase/endothelial nitric oxide synthase, PI3K/Akt/eNOS)通路和内皮型一氧化氮合酶/环磷酸鸟苷酸/环磷酸鸟苷酸依赖的蛋白激酶G(endothelial nitric oxide synthase/cyclic guanosine monophosphate/cGMP-dependent protein kinase, eNOS/cGMP/PKG)通路相关蛋白水平,以期探讨复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压病的特点与作用机制,为深入研究提供线索。

材料与方法

网络药理学分析

复方利血平氨苯蝶啶片各成分作用靶点的获取 复方利血平氨苯蝶啶片由利血平、氨苯蝶啶、氢氯噻嗪、硫酸双胍屈嗪4种化合物组成,根据4种成分的化学结构,以Chem Office Suite 2019软件制备标准延时格式文件(Standard Delay Format, SDF),利用Swiss Target

Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库获得4种化合物可能的作用靶点, 利用UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库^[5]校正靶点的名称, 对蛋白与基因信息进行标准化, 并去除重复靶点。

高血压疾病靶点的获取 选用TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库^[6]和OMIM (<https://www.omim.org/>) 数据库, 检索并获取与高血压病相关的靶点, 作为高血压病的疾病靶点。

复方利血平氨苯蝶啶片-高血压病靶点网络的构建 将复方利血平氨苯蝶啶片各成分的作用靶点与高血压病的疾病靶点取交集, 获得复方利血平氨苯蝶啶片与高血压共同作用靶点。将共同作用靶点导入蛋白互作网络分析数据库 (search tool for recurring instances of neighbouring genes, STRING) (<http://string-db.org/>), 构建靶点之间的相互作用关系, 生成复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压病的蛋白相互作用网络 (protein-protein interaction network, PPIN), 并进行可视化处理。

GO富集分析和通路富集分析 利用Metascape数据库对复方利血平氨苯蝶啶片和高血压病的共同作用靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 分析, 探讨药物作用的生物学过程; 进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析, 探讨药物作用的生物通路, 并进行可视化处理^[7]。

细胞水平验证研究

药物与试剂 复方利血平氨苯蝶啶原料总混粉购自华润双鹤药业股份有限公司, 批号200723; AngII购自美国Sigma公司, 货号05-23-0101; 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 货号S0021S; 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔IgG、HRP标记山羊抗小鼠IgG购自北京康为世纪生物科技有限公司, 货号分别为CW0116、CW0102A; 兔抗PI3K多克隆抗体、兔抗磷酸化磷脂酰肌醇3激酶 (phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase, p-PI3K) 多克隆抗体、兔抗Akt多克隆抗体、兔抗磷酸化蛋白激酶B (phosphorylated protein serine threonine kinase, p-Akt) 多克隆抗体、兔抗eNOS多克隆抗体、兔抗磷酸化内皮型一氧化氮合酶 (phosphorylated endothelial nitric oxide synthase, p-eNOS) 多克隆抗体、兔抗PKG多克隆抗体、兔抗磷酸化血管舒张剂刺激磷蛋白 (phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein, p-VASP) 多克隆抗体购自Cell Signaling公司, 货号分别为4257、4228、4691、2965、32027、9571、3248、3114。

细胞培养 HUVEC和VSMC在37 °C、5% CO₂、

80%湿度条件下, 以含10%胎牛血清、100 u·mL⁻¹青霉素和100 μg·mL⁻¹链霉素的DMEM培养基培养, 2天传代1次, 并更换新鲜的完全培养基, 取对数生长期细胞进行实验。

分组处理 将分化成熟的HUVEC和VSMC以1.5×10⁵个/孔接种于6孔板中, 随机分为正常组、AngII处理组 (1 μmol·L⁻¹)、复方利血平氨苯蝶啶片低浓度干预组 (0.01 μmol·L⁻¹)、中浓度干预组 (0.1 μmol·L⁻¹)、高浓度干预组 (1 μmol·L⁻¹)。

Western blot法检测相关蛋白水平 HUVEC和VSMC以1.5×10⁵个/孔接种于6孔板中, 24 h后加入1 μmol·L⁻¹ AngII进行诱导处理, 分别给予相应浓度复方利血平氨苯蝶啶片的DMEM培养液干预。干预24 h后, 弃培养上清液, 用生理盐水洗涤2次, 加入适量RIPA裂解液重悬, 冰上裂解30 min后转移到1.5 mL离心管中, 12 000 r·min⁻¹离心15 min, 取上清液。采用BCA法测定蛋白浓度后, 进行SDS-PAGE电泳后将蛋白转移至PVDF膜上, 用5% BSA的封闭液室温封闭, 加入PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、eNOS、p-eNOS、PKG、p-VASP蛋白的一抗于4 °C孵育过夜, TBST 10 min×3洗膜, 二抗室温孵育2 h, TBST 10 min×3洗膜, ECL显色并应用Gel-Pro Analyzer 4.0图像分析系统, 对所得条带进行分析统计, 计算条带灰度。

硝酸还原法检测NO含量 HUVEC以5 000个/孔接种于96孔板中, 24 h后加入1 μmol·L⁻¹ AngII诱导处理, 分别给予相应浓度复方利血平氨苯蝶啶片的DMEM培养基干预。干预24 h后收集细胞培养基, 按照NO试剂盒说明书操作, 用酶标仪于540 nm处测量吸光度值, 根据标准曲线计算NO含量。

统计学分析 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, CA, USA) 统计软件对各组数据进行处理, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 方法进行统计学分析。P < 0.05认为差异有统计学意义, P < 0.01认为差异有显著统计学意义。

结果

1 复方利血平氨苯蝶啶片4种化学成分作用靶点的收集

利用Swiss Target Prediction数据库收集复方利血平氨苯蝶啶片4种化学成分可能的作用靶点, 共获得137种药物潜在作用靶点。将这137种靶点进行分析, 发现4种药物分别与其他3种药物有共用靶点 (表1)。以上结果说明, 复方利血平氨苯蝶啶片在降压过程中存在两种及以上的药物共同作用于同一靶点而协同降压。

Table 1 The active components and their targets of compound reserpine and triamterene tablets

Compound	Number of targets	Number of common targets
Reserpine	39	7
Triamterene	34	9
Hydrochlorothiazide	32	9
Dihydralazine sulfate	32	9
Total	137	34

2 复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压病潜在作用靶点的获得

通过 TTD 数据库、OMIM 数据库收集得到高血压病相关靶点 1 828 个, 并将高血压相关靶点分为 β 受体拮抗和利尿相关靶点、血管紧张素转化酶抑制剂 (angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI) 和 AngII 相关靶点、高血压其他类相关靶点。利用 Venny 2.1 将复方利血平氨苯蝶啶片的 137 个作用靶点与治疗高血压疾病相关的 1 828 个靶点取交集, 发现复方利血平氨苯蝶啶片的作用靶点与高血压相关靶点取交集共获得 17 个共同作用靶点 (图 1)。将复方利血平氨苯蝶啶片化学成分与潜在作用靶点相对应, 导入 Cytoscape 中生成治疗高血压病的化学成分-潜在作用靶点网络 (图 2), 进一步证实了复方利血平氨苯蝶啶片存在两种及以上药物作用于同一靶点来降压, 氨苯蝶啶、利血平、氢氯噻嗪作用于人雷帕霉素靶蛋白 (human mammalian target of rapamycin, mTOR) 靶点, 利血平、硫酸双肼

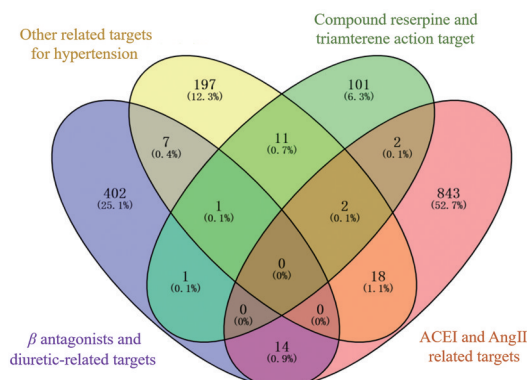


Figure 1 Venn diagram of target of compound reserpine and triamterene tablets and β -receptor antagonism and diuretic-related targets, other hypertension-related targets, angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI) and angiotensin II (AngII)-related targets. In the figure, purple indicates targets related to β receptor antagonism and diuresis, yellow indicates targets related to other hypertension, green indicates targets of compound reserpine and triamterene tablets, and red indicates targets related to ACEI and AngII

屈嗪、氢氯噻嗪都作用于糖原合酶激酶 3B (glycogen synthase kinase-3B, GSK-3B) 靶点, 4 种药物都作用于 Src 样非受体酪氨酸激酶 (src family tyrosine-protein kinase lck, LCK) 这一靶点。

3 复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压病蛋白相互作用网络的构建

将 17 个共同作用靶点导入 STRING 数据库, 生物物种选择 homo sapiens (human), 获取靶点之间的相互

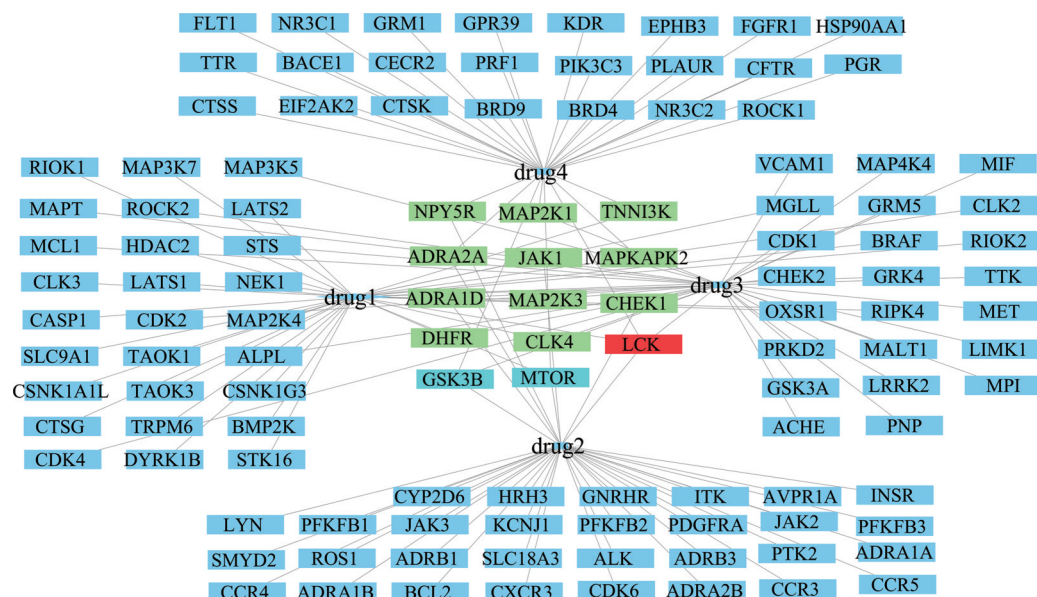


Figure 2 Chemical composition-potential target network of compound reserpine and triamterene tablets in the treatment of hypertension. In the figure, drug1, drug2, drug3, drug4 represents triamterene, reserpine, dihydralazine sulfate, hydrochlorothiazide, respectively, the ambient blue represents the targets of the four drugs acting alone, green represents the co-action targets of the two drugs, the central blue represents the co-action targets of the three drugs, and red represents the co-action targets of the four drugs

作用关系,生成复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压的蛋白质相互作用网络,并在Cytoscape软件中进行蛋白网络结构可视化处理(图3)。如图可知,隐藏网络图中游离节点后,图中共有12个节点,13条边,12个靶点之间的combined score均大于0.4,表明靶点之间的相互作用具有可靠性。12个节点表示12个靶点,12个靶点之间的相互作用由边表示。拓扑参数自由度(degree)表示每个节点的重要性,节点越大,degree值越大,表明与该靶点直接相关的靶点数越多,该靶点参与的生物学过程越多,在网络中越重要。边的粗细表示combined score,边越粗,combined score值越大。复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压的关键靶点中,按照degree值排名比较靠前的有肾上腺素受体、乙酰胆碱酯酶受体、Rho相关蛋白激酶受体,其中 α -1B肾上腺素受体(alpha-1B adrenergic receptor, ADRA1B)、 α -1D肾上腺素受体(alpha-1D adrenergic receptor, ADRA1D)、 α -1A肾上腺素受体(alpha-1A adrenergic receptor, ADRA1A)、 β -1肾上腺素受体(beta-1 adrenergic receptor, ADRB1)和乙酰胆碱酯酶受体(acetylcholinesterase receptor, ACHE)相互作用较强,Rho相关蛋白激酶1(rho-associated protein kinase 1, ROCK1)、Rho相关蛋白激酶2(rho-associated protein kinase 2, ROCK2)受体和钠/氢交换器1(sodium/hydrogen exchanger 1, SLC9A1)受体相互作用较强。

4 富集分析

为阐明复方利血平氨苯蝶啶片作用靶点参与的生命过程,本研究使用Metascape数据库对复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压病的17个靶点进行富集分析,包括生物学过程(biological process, BP)、分子功能

(molecular function, MF)以及细胞组分(cellular component, CC)3部分。最后获得BP、MF、CC富集条目分别为249、18、5条。根据 $P < 0.05$ 筛选出主要的生物过程,富集结果按照所富集的基因数对其进行排序,对富集结果进行可视化,部分富集结果见图4。图中条形的长度代表相应条目所富集基因数量。实心球大小代表 P 以10为底的负对数,实心球面积越大,所对应的 P 值越小。结果显示,复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压病作用靶点参与的生物学过程为管径调节(regulation of the diameter)、心肌肥大的正向调节(positive regulation of cardiac muscle hypertrophy)、MAPK级联反应的正向调控(positive regulation of MAPK cascade)、全身动脉血压的负向调节(negative regulation of systemic arterial blood pressure)等;分子功能主要为肾上腺素受体活性(adrenergic receptor activity)、蛋白激酶活性(protein phosphatase binding)、蛋白磷酸酶结合(protein phosphatase binding)、蛋白质结构域特异性结合(protein homodimerization activity)、蛋白质均二聚活性(protein domain specific binding)等;膜筏(membrane raft)、受体复合物(receptor complex)等细胞组分所占的比例最大。

5 通路富集分析

通过Metascape数据库进行通路富集分析获得复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压病的16条信号通路,对这些信号通路进行可视化处理(图5)。复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压病显著影响的信号通路为cGMP-PKG信号通路、血管平滑肌收缩、调控神经的配体-受体相互作用、心肌细胞中的肾上腺素信号传导、钙信号通路等。

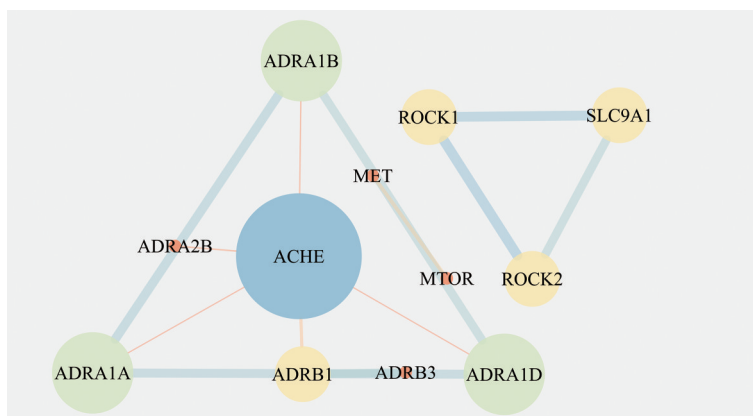


Figure 3 Protein interaction network of compound reserpine and triamterene tablets. SLC9A1: Sodium/hydrogen exchanger 1; ADRA1B: Alpha-1B adrenergic receptor; MET: Hepatocyte growth factor receptor; ROCK2: Rho-associated protein kinase 2; ADRB3: Beta-3 adrenergic receptor; ADRA1D: Alpha-1D adrenergic receptor; ADRA1A: Alpha-1A adrenergic receptor; ROCK1: Rho-associated protein kinase 1; ADRA2B: Alpha-2B adrenergic receptor; NR3C2: Mineralocorticoid receptor; MAP3K5: Mitogen-activated protein kinase 5; MTOR: Serine/threonine-protein kinase mTOR; ADRB1: Beta-1 adrenergic receptor; ACHE: Acetylcholinesterase

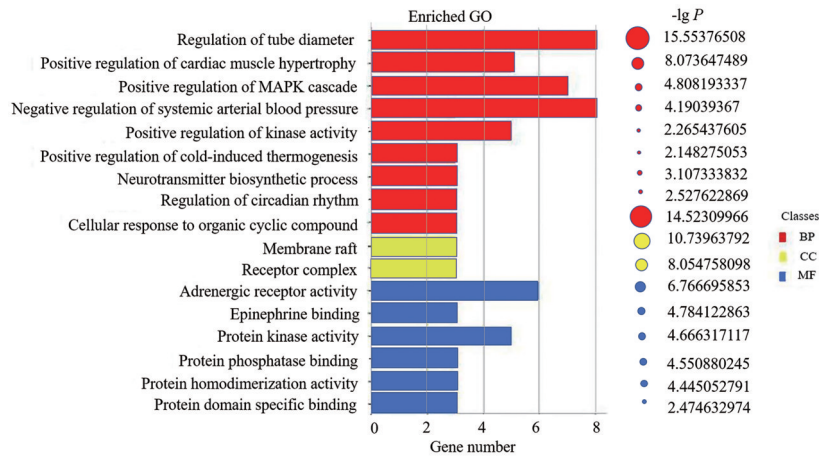


Figure 4 Gene ontology (GO) enrichment analysis

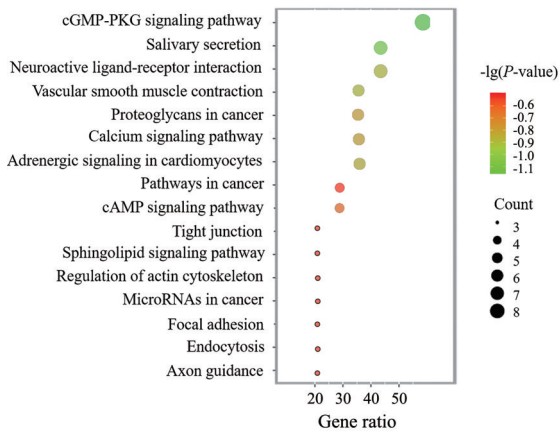


Figure 5 Pathway enrichment analysis

6 复方利血平氨苯蝶啶片对 PI3K-Akt-eNOS 通路的影响

与空白对照组相比, HUVEC 在 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AngII

诱导处理后, p-PI3K、p-Akt、p-eNOS 蛋白水平下降, 复方利血平氨苯蝶啶片 0.01 、 0.1 和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理后, p-PI3K、p-Akt、p-eNOS 蛋白水平升高; HUVEC 在 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AngII 诱导下, NO 含量显著下降, 复方利血平氨苯蝶啶片 0.01 、 0.1 和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理后, NO 含量升高 (图 6)。

7 复方利血平氨苯蝶啶片对 eNOS-cGMP-PKG 通路的影响

与空白对照组相比, VSMC 在 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AngII 诱导处理后 eNOS、PKG、p-VASP 蛋白水平下降, 复方利血平氨苯蝶啶片 0.01 、 0.1 和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理后, eNOS、PKG、p-VASP 蛋白水平升高 (图 7)。

讨论

高血压会诱发脑血管意外、心肌梗死、心功能不

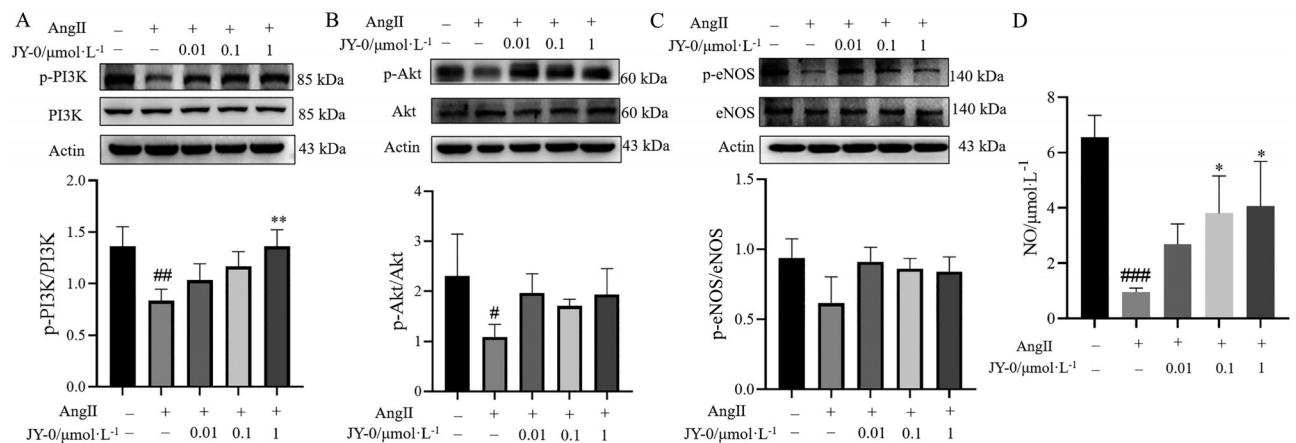


Figure 6 The levels of phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase (p-PI3K), PI3K, phosphorylated protein serine threonine kinase (p-Akt), Akt, phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS), eNOS were determined by Western blot analysis. Compound reserpine and triamterene tablets increased the levels of p-PI3K, PI3K (A), p-Akt, Akt (B), and p-eNOS, eNOS (C) in AngII-treated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC); D: Compound reserpine and triamterene tablets increases the production of NO in AngII-treated HUVEC. $n = 3$, mean \pm SEM. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs normal control group; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs model group

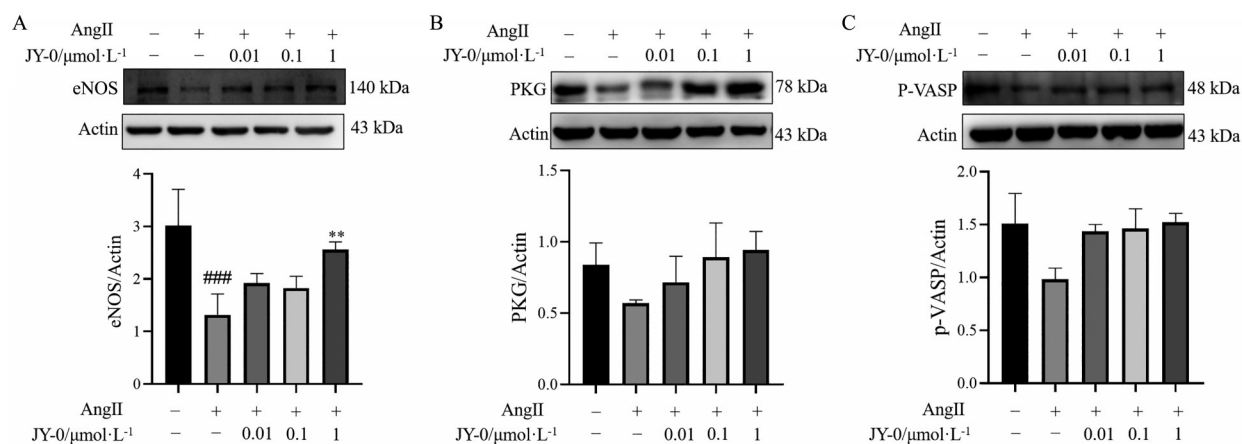


Figure 7 The levels of eNOS, cGMP-dependent protein kinase (PKG), and phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein (p-VASP) were determined by Western blot analysis. Compound reserpine and triamterene tablets increase eNOS (A), PKG (B), and p-VASP (C) protein levels in AngII-treated vascular smooth muscle cells (VSMC). $n = 3$, mean \pm SEM. ### $P < 0.001$ vs normal control group; ** $P < 0.01$ vs model group

全、肾功能不全及外周血管供血不足等心血管事件,因此,有效地控制血压是预防和减少心血管事件的重要手段^[8,9]。复方利血平氨苯蝶啶片降压效果明确、不良反应小、依从性高,其安全性和有效性已被研究证实^[10],得到了我国《高血压合理用药指南》第2版的Ia类推荐^[11]。复方利血平氨苯蝶啶片中4种化合物合用时,各成分协同降压:硫酸双肼屈嗪扩张小动脉,直接松弛小动脉平滑肌,降低外周阻力,与利血平抑制去甲肾上腺素能神经联合作用于血管张力和血管结构协同降压;氢氯噻嗪和硫酸双肼屈嗪可能联合作用于丝裂原活化蛋白激酶激酶和Rho相关蛋白激酶^[12,13],扩张血管和改善心脏状态,激活血管活性因子,协同降压^[14];钾的含量在高血压的发病机制中起重要作用^[15],氢氯噻嗪和氨苯蝶啶作为利尿药,前者排钠排钾,后者排钠保钾,通过联合作用于电解质调节而降压^[16,17]。一项研究通过对复方利血平氨苯蝶啶片与盐酸曲普利啶、硝苯地平片、苯磺酸氨氯地平片3种进口药物进行临床疗效分析和成本比较发现,复方利血平氨苯蝶啶片显示出更好的临床疗效并且治疗费用低^[18]。复方利血平氨苯蝶啶片的应用符合国情,充分响应指南的号召,有利于我国走高血压防控的自主创新的道路^[1,19]。

通过网络药理学方法可知,在治疗高血压的关键靶点中,肾上腺素受体排名第一,包括 β -3肾上腺素受体(beta-3 adrenergic receptor, ADRB3)、ADRA1D、ADRA1A等, β 肾上腺素受体是心脏功能的重要调节因子,有研究证实其通过eNOS/cGMP/PKG信号通路以抑制G蛋白依赖的方式介导负性变力,发挥降压作用^[20,21]。通过网络药理学分析,复方利血平氨苯蝶啶片降压的作用机制主要包括管径调节、肾上腺素受体活性、蛋白激

酶活性等,作用的信号通路主要包括血管平滑肌收缩、神经活性配体-受体相互作用、心肌细胞中的肾上腺素信号传导、钙信号通路等。复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压病的16条信号通路中cGMP/PKG这条信号通路上富集基因最多,所以本实验通过研究HUVEC和VSMC经AngII诱导处理,低中高浓度复方利血平氨苯蝶啶片干预后PI3K/Akt/eNOS通路和eNOS/cGMP/PKG通路相关蛋白水平来进行网络药理学的验证。

NO是一个能自由扩散影响多种病理生理过程的信号分子,其在体内极不稳定,半衰期仅为3~5 s,存在于多种细胞中,如巨噬细胞、肌细胞、内皮细胞等。NO具有调节血管舒张度、抑制血小板聚集和白细胞黏附、保护内皮细胞的作用。它是由NOS催化L-精氨酸与氧发生氧化还原反应而生成,其中eNOS主要存在于血管内皮细胞和心肌细胞中,通过影响NO的合成在局部调节血管张力方面发挥重要作用,促进血管扩张^[22,23]。通过在HUVEC中检测eNOS、p-PI3K、p-Akt蛋白水平以及HUVEC细胞上清液中NO的含量,发现在HUVEC中复方利血平氨苯蝶啶片可通过PI3K/Akt/eNOS通路增加NO的含量,调节内皮细胞,促进血管舒张。NO渗透进入血管平滑肌细胞,激活可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC),在sGC催化下,生成cGMP。胞内cGMP水平升高,进一步激活cGMP依赖的蛋白激酶PKG,发挥多种生物效应。PKG可增加血管通道活性,促进血管平滑肌舒张,从而降低血压。VASP是PKG的底物,磷酸化的VASP可以监视PKG的激活和信号转导^[24]。通过在VSMC中检测eNOS及其下游PKG、p-VASP蛋白水平,发现在VSMC中复

方利血平氨苯蝶啶片可通过NO/cGMP/PKG通路调节血管平滑肌细胞,促进血管舒张。本实验中,p-PI3K、p-Akt、p-eNOS、eNOS、PKG、p-VASP蛋白水平没有呈现明显的剂量依赖性,可能是因为发挥降压效果时,复方利血平氨苯蝶啶片通过间接作用调节p-PI3K、p-Akt、p-eNOS、eNOS、PKG、p-VASP蛋白,所以药物的剂量依赖性不明显;另一方面可能是由于复方利血平氨苯蝶啶片中4种组分分别作用于不同的靶点,每种组分针对各自靶点的量效关系并不平行,而且各靶点彼此之间也可能存在拮抗作用,这种情况下即便随其浓度升高,其引起的下游信号变化比如p-Akt、p-eNOS蛋白水平也不会增加甚至出现降低;也有可能是由于本次实验的药物剂量范围选择不够理想,所用药物浓度没有处于最佳的剂量依赖性区间内,之后仍需进行药物量效关系研究实验,进一步验证药物的剂量依赖性。

本文基于网络药理学分析给出了复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压病的可能的作用特点与机制,对于深入其药理研究具有重要的指导和借鉴意义。体外研究中,检测关键通路相关蛋白水平,验证了复方利血平氨苯蝶啶片的作用靶点,为复方利血平氨苯蝶啶片治疗高血压的临床应用进一步提供了理论依据。但是其具体的作用机制,仍然需进一步通过体内外药理学实验对作用靶点进行确证。对于组成该复方药物的4种化学成分来说,各成分之间是否存在拮抗作用仍然是亟待解答的问题。诚然,复方利血平氨苯蝶啶片虽然降低了不合理联合用药的风险,但是和其他药物联合应用时,仍然需要对治疗方案进行定期审查^[25]。同时,为了减少不良反应的发生,该复方药物如何更好地适应个体化治疗和精准医学的大趋势也是未来努力的方向之一。以上分析虽然也有部分文献支持^[8,11,26],但仍需要经过大量的实验研究证实,通过药物作用机制的研究,可以更好地指导临床用药,达到更好的治疗效果,保证患者的用药有效性和安全性。

作者贡献: 刘珊负责网络药理学分析和体外验证实验,对数据进行分析以及文章撰写;刘楠楠、魏广义、姜瑜参与了网络药理学分析;王守宝、杜冠华负责构思和设计实验、结果分析、基金获得、对文章进行审阅指导。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Unger T, Borghi C, Charchar F, et al. 2020 International Society of Hypertension global hypertension practice guidelines [J]. *J Hypertens*, 2020, 38: 982-1004.
- [2] Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH guidelines for the management of arterial hypertension [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39: 3021-3104.
- [3] Hua Q, Fan L, Li J, et al. 2019 Chinese guideline for the management of hypertension in the elderly [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2019, 16: 67-99.
- [4] Bangalore S, Kamalakkannan G, Parkar S, et al. Fixed-dose combinations improve medication compliance: a meta-analysis [J]. *Am J Med*, 2007, 120: 713-719.
- [5] Uniprot C. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D506-D515.
- [6] Wang Y, Zhang S, Li F, et al. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: D1031-D1041.
- [7] Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 615-621.
- [8] McCormack T, Krause T, O'Flynn N. Management of hypertension in adults in primary care: NICE guideline [J]. *Brit J Gen Pract*, 2012, 62: 163-164.
- [9] Feng YD, Feng HL. Development of antihypertensive drugs [J]. *Chin J Mod Drug Appl (中国现代药物应用)*, 2020, 14: 230-234.
- [10] Zhu GH, Sun XP, Li J. Results and analysis of a national multi-center survey on the efficacy and safety of compound reserpine and triamteridine tablets in the treatment of elderly hypertensive patients [J]. *Chin J Multiple Organ Dis Elder (中华老年多器官疾病杂志)*, 2019, 18: 758-764.
- [11] Expert Committee on Rational Drug Use of National Health and Family Planning Commission, Hypertension Committee of Chinese Medical Doctor Association. Guidelines for rational use of hypertension (2nd edition) [J]. *Chin J Front Med Sci (中国医学前沿杂志)*, 2017, 9: 28-126.
- [12] Baig MH, Baker A, Ashraf GM, et al. ASK1 and its role in cardiovascular and other disorders: available treatments and future prospects [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2019, 16: 857-870.
- [13] Hattori K, Naguro I, Runchel C, et al. The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases [J]. *Cell Commun Signaling*, 2009, 7: 325-331.
- [14] Beckers CM, Knezevic N, Valent ET, et al. ROCK2 primes the endothelium for vascular hyperpermeability responses by raising baseline junctional tension [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 70: 45-54.
- [15] Murillo-de-Ozores AR, Gamba G, Castañeda-Bueno M. Molecular mechanisms for the regulation of blood pressure by potassium [J]. *Curr Top Membr*, 2019, 83: 285-313.
- [16] Tu W, Decker BS, He Z, et al. Triamterene enhances the blood pressure lowering effect of hydrochlorothiazide in patients with hypertension [J]. *J Gen Intern Med*, 2016, 31: 30-36.
- [17] Paz PA, Mantilla BD, Argueta EE, et al. Narrative review: the holy grail: update on pharmacotherapy for heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9: 523.

- [18] Li S, Liu X, Li L. A multicenter retrospective analysis on clinical effectiveness and economic assessment of compound reserpine and hydrochlorothiazide tablets (CRH) for hypertension [J]. Clinicoecon Outcomes Res, 2020, 12: 107-114.
- [19] Xue SW. Lecture 58: old trees and new branches, Beijing No.0 ups and downs [J]. Chin J Rural Med Pharm (中国乡村医药), 2020, 27: 34-35, 39.
- [20] Arioglu-Inan E, Kayki-Mutlu G, Michel MC. Cardiac beta3-adrenoceptors-A role in human pathophysiology? [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176: 2482-2495.
- [21] Cao YX, Li J, Liu J, et al. Hypersensitization of α -adrenoceptor of artery smooth muscle in hypertensive rats and hypertensive patients [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 973-977.
- [22] Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2017, 120: 713-735.
- [23] Everaert BR, Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, et al. Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on PI3K/AKT/eNOS pathway [J]. Int J Cardiol, 2010, 144: 350-366.
- [24] Sheikholeslami MA, Ghafghazi S, Parvardeh S, et al. Analgesic effects of cuminic alcohol (4-isopropylbenzyl alcohol), a monocyclic terpenoid, in animal models of nociceptive and neuropathic pain: role of opioid receptors, *L*-arginine/NO/cGMP pathway, and inflammatory cytokines [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 900: 174075.
- [25] Campana E, Cunha V, Glaveckaite S, et al. The use of single-pill combinations as first-line treatment for hypertension: translating guidelines into clinical practice [J]. J Hypertens, 2020, 38: 2369-2377.
- [26] van Bussel E, Reurich L, Pols J, et al. Hypertension management: experiences, wishes and concerns among older people-a qualitative study [J]. BMJ Open, 2019, 9: e030742.