

·数字中医药·

本文引用:田丰铭,余瑞宁,蔺晓源,胡国恒. 基于网络药理学探究祛瘀平肝化痰汤降压作用机制及实验验证[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(3): 410-417.

基于网络药理学探究祛瘀平肝化痰汤 降压作用机制及实验验证

田丰铭¹,余瑞宁¹,蔺晓源²,胡国恒^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

【摘要】目的 运用网络药理学探讨祛瘀平肝化痰汤治疗高血压病的可能靶点及作用机制,并选取部分关键靶点及通路进行实验验证,为其临床应用及后续研究提供理论支持。**方法** 运用 TCMSIP、BATMAN、TCMIP 网络药理学分析平台挖掘祛瘀平肝化痰汤的中药有效成分,运用 SWISS、STITCH 数据库整理其作用靶标;以 OMIM、TTD、GeneCards 数据库挖掘高血压病的相关靶标并与药物成分靶标取交集,整理后得到祛瘀平肝化痰汤的成分-疾病靶标;通过 STRING 数据库及 Cytoscape 软件,构建蛋白互作的网络图,并筛选关键靶点;最后将所得的靶标及通路进行富集分析。依据网络药理学所得结果,设置 4 组 SD 大鼠进行实验验证,包括空白组、模型组、中药组、西药组。除空白组外,其余组以 N'-硝基-L-精氨酸(N'-nitro-L-arginine, L-NNA)腹腔注射进行造模。空白组与模型组予纯净水灌胃,中药组予祛瘀平肝化痰汤 20.29 g/kg,西药组予卡托普利混悬液 2.11 mg/kg,每天灌胃 2 次,连续 4 周。HE 染色观察胸主动脉病理形态变化,ELISA 法检测血清中肾素(Renin)、血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)、醛固酮(aldosterone, Ald)的含量,免疫组化检测胸主动脉内皮素 1(endothelin-1, ET-1)的含量。**结果** 整理各网络药理学分析平台数据得到祛瘀平肝化痰汤治疗高血压病相关的靶点有 162 个,最终通过筛选得到 EDN1、NOS3、INS、TNF、VEGFA、ACE 等 34 个关键蛋白靶点,主要富集在血管收缩调节、血压调节等生物过程及钙、肾素-血管紧张素系统、肾素分泌等信号通路。动物实验结果显示,中药组和西药组大鼠胸主动脉内膜结构较模型组完善;空白组、中药组、西药组经灌胃 4 周后, Renin、Ang II、Ald 表达均较模型组降低($P<0.01$);镜下观察免疫组化结果,模型组的 ET-1 表达显著高于空白组及各给药组($P<0.05$)。**结论** 祛瘀平肝化痰汤可以通过多途径、多靶点调节血压,其药理作用可能通过干预肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin angiotensin aldosterone system, RAAS)、血管内皮舒缩等得以实现。实验结果表明祛瘀平肝化痰汤能够改善血管状态,降低血清中 Renin、Ang II、Ald 的表达,干预 RAAS,抑制血管内 ET-1 的释放,保护血管内皮。

【关键词】 祛瘀平肝化痰汤;网络药理学;肾素-血管紧张素-醛固酮系统;血管内皮损伤;内皮素-1

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.03.012

Discussion on antihypertensive mechanism and experimental verification of Quyu Pinggan Huatan Decoction based on network pharmacology

TIAN Fengming¹, SHE Ruining¹, LIN Xiaoyuan², HU Guoheng^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

【Abstract】Objective To explore the possible targets and mechanism of Quyu Pinggan Huatan Decoction in the treatment of hypertension by using network pharmacology, and select some key targets and pathways for experimental verification, so as to

【收稿日期】2021-09-25

【基金项目】国家自然科学基金项目(81573941);胡国恒名医传承工作室(湘中医药函[2018]37号);湖南省研究生创新项目(CX2018B491);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科。

【第一作者】田丰铭,男,博士研究生,研究方向:中医药防治脑血管疾病。

【通信作者】* 胡国恒,男,教授,博士研究生导师,E-mail:hugh9198@163.com。

provide theoretical support for its clinical application and follow-up research. **Methods** TCMSp, BATMAN, TCMIp network pharmacological analysis platforms were used to mine the effective components of Quyu Pinggan Huatan Decoction, and SWISS and STITCH databases were used to sort out its action targets; OMIM, TTD and GeneCards databases were used to mine the related targets of hypertension and the intersection with the drug component targets were obtained, and then the component-disease target of Quyu Pinggan Huatan Decoction was obtained; the network diagram of protein-protein interaction was constructed by STRING database and Cytoscape software, and the key targets were screened; finally, the obtained targets and pathways were enriched and analyzed. According to the results of network pharmacology, four groups of SD rats were set up for experimental verification, including blank group, model group, traditional Chinese medicine group and western medicine group. Except the blank group, the other groups were modeled by intraperitoneal injection of N-nitro-L-arginine (L-NNA). The blank group and model group were given purified water by gavage, the traditional Chinese medicine group was given 20.29 g/kg Quyu Pinggan Huatan Decoction, and the western medicine group was given 2.11 mg/kg captopril suspension by gavage, twice a day for 4 weeks. The pathological changes of thoracic aorta were observed by HE staining, the content of Renin, angiotensin II (Ang II) and aldosterone (Ald) in serum were detected by ELISA, and the content of endothelin-1 (ET-1) in thoracic aorta was detected by immunohistochemistry. **Results** After sorting out the data of various network pharmacological analysis platforms, it was found that there were 162 targets related to the treatment of hypertension by Quyu Pinggan Huatan Decoction. Finally, 34 key protein targets such as EDN1, NOS3, INS, TNF, VEGFA and ACE were obtained through screening, which were mainly concentrated in biological processes such as vasoconstriction regulation and blood pressure regulation, calcium signal pathway, renin angiotensin system, renin secretion and other signaling pathways. The results of animal experiments showed that the intimal structure of thoracic aorta in traditional Chinese medicine group and western medicine group was better than that in model group; the expression levels of Renin, Ang II and Ald in blank group, traditional Chinese medicine group and western medicine group were lower than those in model group ($P < 0.01$); immunohistochemical results were observed under microscope that, the expression of ET-1 in the model group was significantly higher than that in the blank group and each administration group ($P < 0.05$). **Conclusion** Quyu Pinggan Huatan Decoction can regulate blood pressure through multiple channels and targets, and its pharmacological effect may be realized by intervening renin angiotensin aldosterone system (RAAS), vascular endothelial relaxation and contraction, etc. The experimental results show that Quyu Pinggan Huatan Decoction can improve the vascular state, reduce the expression of Renin, Ang II and Ald in serum, intervene RAAS, inhibit the release of ET-1 in blood vessels and protect vascular endothelium.

[**Keywords**] Quyu Pinggan Huatan Decoction; network pharmacology; renin-angiotensin-aldosterone system; vascular endothelial injury; endothelin-1

原发性高血压病(essential hypertension, EH)是一种常见的慢性疾病,其发病与年龄、遗传、肥胖、精神压力、饮食习惯等多种因素有关。WHO与国际高血压学会联合声明中提到高血压占全球疾病经济负担的4.5%^[1]。随着我国人民生活水平的日渐改善, EH的发病率逐渐增长,并呈现年轻化的趋势^[2]。中国心血管病报告2018年数据显示, EH患者超过2.45亿,并以每年1000万人的速度递增^[3]。EH会引起机体的代谢紊乱,并能成为心脑血管疾病和糖尿病的独立危险因素^[4]。因此,提升EH的防治水平,将是我国社会长期面临的问题。临床治疗EH以血管紧张素转化酶抑制剂、钙离子通道拮抗剂、受体阻滞剂、利尿剂等西药为主,用药干预周期较长,副作用较多,若患者依从性欠佳,则难以达到预期的疗效,不能降低相关并发症的发病率^[5]。中医药基于整体观念,可以根据患者症状、体征,通过辨病辨证相结合

进行施治,对患者的血压调节及脏器保护均有作用。因此,围绕EH的中医病因病机,对其进行理法方药的探究,在EH的防治上具有重要的价值。祛瘀平肝化痰汤为胡国恒教授治疗EH的临床经验方^[6-7]。本研究通过网络药理学挖掘祛瘀平肝化痰汤中相关组方成分的中药作用靶点,并对该方进行动物实验验证,旨在初步揭示祛瘀平肝化痰汤的药理作用,为其应用于EH的防治提供相关依据。

1 方法

1.1 祛瘀平肝化痰汤化学成分的收集

以“钩藤”“蒺藜”“葛根”“茯苓”“泽泻”“石菖蒲”“丹参”“当归”“白芍”为关键词,通过TCMSp搜索化学成分,以口服药物生物利用度 $\geq 30\%$ 、药物相似性 ≥ 0.18 为标准进行筛选。以相同的关键词从BATMAN数据库搜索中药成分, BATMAN数据库中

以 $\text{Score} \geq 20$ 、 $P \geq 0.05$ 为筛选条件。运用相同关键词在 TCMIP V2.0 搜索中药成分,筛选靶标预测卡值 ≥ 0.8 的有效成分。汇总 3 个数据库得到的有效成分,经整理去重后,在 PubChem 数据库中搜索各个药物的化学成分,下载各成分的 Canonical SMILES 格式分子结构并保存。

1.2 祛瘀平肝化痰汤的靶点预测

将保存的化学成分,分别录进 SWISS、STITCH 数据库,并设置研究对象为“人类”,整理两个数据库有效成分作用靶点并降重后得到祛瘀平肝化痰汤的作用靶点。

1.3 高血压病靶点的获取

利用 OMIM、TTD、GeneCards、DisGeNET、CTD 5 个数据库,录入“Hypertension”为关键词,设置每个数据库中的靶点相关度为前 300,挑选出 EH 的相关作用靶点^[8],整理并降重后得到 EH 的作用靶点。

1.4 潜在作用靶点的获取

将祛瘀平肝化痰汤的作用靶点及 EH 的靶点分别录进 Venny 2.1 作图工具,绘成韦恩图,取交集,为祛瘀平肝化痰汤抗 EH 的潜在作用靶点,即成分-疾病靶点。

1.5 构建蛋白互作网络及筛选关键蛋白靶点

将前项所述靶点录进 STRING 11.0 数据库,设置限定“Homo sapiens”,整理得到蛋白交互信息,运用 Cytoscape 3.9 软件进行可视化分析,并筛选关键靶点^[9]。

1.6 通路富集分析

将成分-疾病靶点以 Gene Symbol 的格式录进 DAVID 6.8 数据库,分别选择分子功能、生物过程和细胞成分,而后进行 GO 富集分析,设置 Count 值为 2、 $P < 0.05$;选择 KEGG 进行基因通路注释分析,设置 Count 值为 2、 $P < 0.05$ 。然后运用 Bioinformatics 平台将富集分析符合条件的结果做成条形图。

1.7 动物实验

1.7.1 动物分组及造模处理 采用 SPF 级 SD 雄性大鼠 20 只,体质量 (220 ± 30) g,许可证编号:SCXK(湘)2016-0002,实验操作通过湖南中医药大学伦理委员会批准,伦理审批号:LL2021030505。运用 SPSS 统计分析软件中的随机数字法,将 20 只老鼠分为 4 组,每组 5 只。空白组以生理盐水 15 mL/(kg·d)进行腹腔注射。模型组、西药(卡托普利)组、

中药(祛瘀平肝化痰汤)组,进行 EH 大鼠造模:采用 L-NNA 水溶液,浓度 1 mg/mL,以 15 mg/(kg·d)剂量对单只大鼠进行腹腔注射,连续造模 21 d,每日注射药物两次^[10-11]。以大鼠的尾部动脉血压 $\text{SBP} \geq 160$ mmHg 持续稳定 1 周以上为造模成功的标准^[5]。

1.7.2 药物与试剂 祛瘀平肝化痰汤:天麻、钩藤、白蒺藜、泽泻、石菖蒲、丹参、当归、白芍各 20 g,全蝎 10 g,葛根 40 g,茯苓 30 g。传统方法煎煮后获得的煎液再浓缩成生药含量为 2 g/mL 的药液,放入 4 °C 冰箱中冷藏备用。卡托普利片剂(华中药业股份有限公司,国药准字:H42020384,批号:20200302,规格:25 mg/片)研碎掺和蒸馏水配制成 0.3 mg/mL 浓度的混悬液,放入 4 °C 冰箱中冷藏备用。L-NNA(大连美仑生物技术有限公司,批号:MB3299);Renin ELISA 试剂盒(批号:RA20331)、Ang II ELISA 试剂盒(批号:RA20065)、Ald ELISA 试剂盒(批号:RA20556)均购于武汉贝茵莱生物科技有限公司;ET-1 兔 pAb(ABclon 生物公司,批号:AB2757337);SABC-POD 兔 IgG 试剂盒(批号:SA1028)、DAB 显色试剂盒(批号:15F16BA00)、Mayor' 苏木素(批号:16C10A05)、中性树胶(批号:AR0038)均采购于 BOSTER 生物公司。

1.7.3 给药方法 空白组常规喂养,每次予以 3 mL 纯净水进行灌胃,早晨、下午各 1 次。模型组进行造模处理后,常规饮食,每次予以 3 mL 纯净水进行灌胃,早晨、下午各 1 次。中药组在造模成功后,予以浓缩含生药液 20.29 g/kg 进行灌胃,早晨、下午各 1 次。西药组予以含卡托普利混悬液 2.11 mg/kg 进行灌胃,早晨灌药,下午为纯净水。均连续干预 4 周。大鼠给药剂量换算参考公式: $\text{Db}' = \text{Da} * \text{Rab} * \text{Sb}$, Db' 为动物 b 实际体质量下所需药物剂量, Da 为动物 a 标准体质量下药物剂量, Rab 为标准体质量下的动物 a 到动物 b 的换算系数, Sb 为非标准体质量动物 b 的校正系数^[12]。得出大鼠灌胃剂量。成人取标准体质量 60 kg,给药前大鼠平均体质量约 280 g。

1.7.4 取材 4 组大鼠于末次灌胃后 2 h,运用 10%水合氯醛进行麻醉^[5],麻醉成功后置于冰台操作,行腹主动脉采血,静置半小时后离心 15 min,温度设定为 4 °C,速度 3000 r/min,离心半径 8.5 cm,离心后保留血清;大鼠采血后当场剥离胸主动脉经 PBS 冲洗,置于 4%多聚甲醛样本固定液中固存。

1.8 指标检测

1.8.1 HE染色观察大鼠胸主动脉组织病理改变 每组从4%多聚甲醛固定液中取出2个样本,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,浸蜡、包埋,切成薄片,经烘干后脱蜡,再行HE染色、树胶封片。最后低倍镜选择视野,200倍镜下摄片,观察胸主动脉组织病理变化。

1.8.2 血液生化指标检测 从冰箱中取出血清标本,室温下放置,进行解冻,按照试剂盒说明书步骤操作,采用ELISA法检测血浆Renin、Ang II、Ald的水平。用标准品的浓度与OD值计算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的OD值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度^[13]。

1.8.3 免疫组化法检测各组大鼠胸主动脉ET-1的表达 每组从4%多聚甲醛样本固定液中取出3个样本,进行免疫组化检测,遵照试剂盒说明书操作。每张切片随机取2个不同视野(400倍),棕黄色的成像即为阳性表达,使用图像分析软件分别计算组织面积(Area)、积分光密度值(IOD)及平均光密度值(AOD), $AOD=IOD/Area$ ^[5]。

1.9 统计学分析

所有数据采用SPSS 21.0统计学软件进行分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”的方式表示。多组间的比较满足正态分布及方差齐性时,采用单因素方差分析,两两比较用LSD法;不满足正态性分布或方差不齐性时,用非参数检验,两组比较采用秩和检验。检验水准设置 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 祛瘀平肝化痰汤的潜在化学成分

通过TCMSP、BATMAN、TCMIP数据库检索到祛瘀平肝化痰汤中11味中药化学成分共576个,其中泽泻31个、天麻25个、石菖蒲23个、全蝎3个、蒺藜20个、钩藤72个、葛根45个、茯苓54个、当归107个、丹参131个、白芍65个。其中,sitosterol为葛根、钩藤、当归、白芍、蒺藜、泽泻所共有,kaempferol为钩藤、蒺藜、石菖蒲、白芍所共有,20-hexadecanoylgingenol为天麻、全蝎所共有,整理去重后中药化学成分为310个。

2.2 祛瘀平肝化痰汤抗高血压病的可能作用靶点

SWISS、SRING数据库筛选的药物成分靶点为5348个,去重后得到1366个靶点,绘制中药-成分-靶点统计信息。见表1。通过OMIM、TTD、GeneCards、DisGeNET、CTD数据库查找EH病的靶点,去重复后得到343个。将药物可能作用靶点及EH相关靶点录入Venny平台绘制韦恩图。见图1。取交集后共162个,表明祛瘀平肝化痰汤可能调节多靶点来发挥作用。

表1 祛瘀平肝化痰汤中药-成分-靶点信息统计表

中药	成分数量/个	靶点数量/个
泽泻	31	312
天麻	25	593
石菖蒲	23	478
全蝎	3	84
蒺藜	20	306
钩藤	72	713
葛根	45	418
茯苓	54	398
当归	107	763
丹参	131	793
白芍	65	490

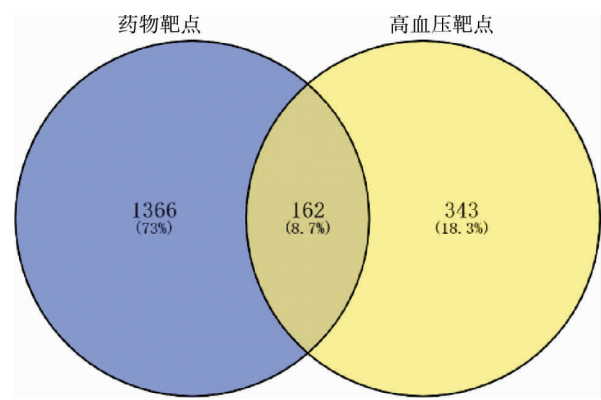


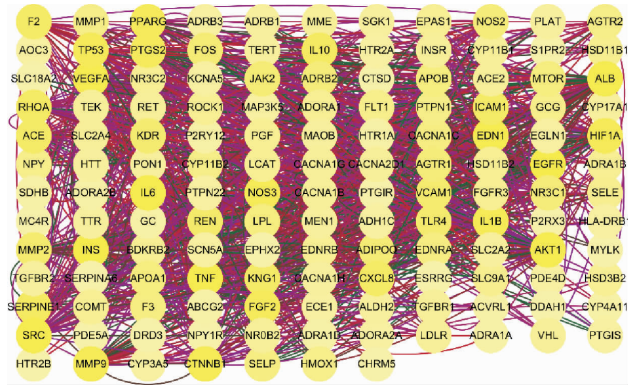
图1 祛瘀平肝化痰汤与高血压病靶点韦恩图

2.3 PPI网络构建

将162个共同靶点导入STRING 11.5数据库,设置combined score ≥ 0.07 ,得到蛋白互作网络,利用Cytoscape 3.9软件将蛋白互作网络可视化。见图2。运用Cytoscape 3.9的CytoHubba功能,分别以MCC、Betweenness、Closeness、Degree为计算指标筛选出排名前20的关键靶点,整理去重后的关键靶点有EDN1、NOS3、INS、ALB、EGFR、TNF、VEGFA、AKT1、IL6、ACE、NOS2等34个。见图3。

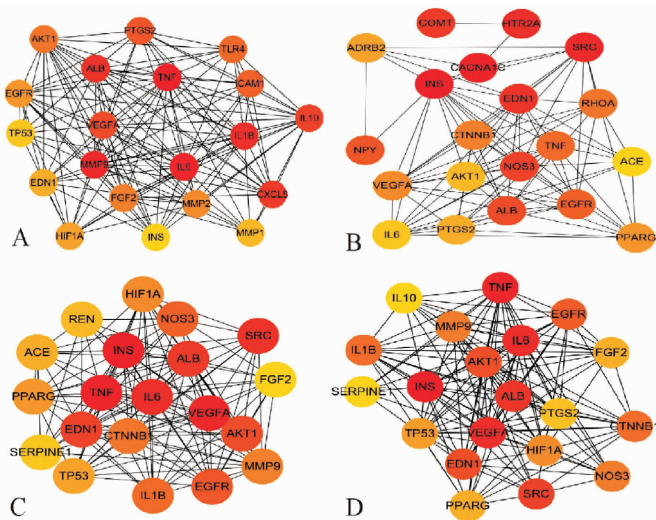
2.4 GO富集分析及KEGG通路注释分析

将162个潜在靶点导入DAVID数据库进行



注:图中节点代表靶点,连线代表靶点之间的相互作用关系,节点颜色深浅代表度值,连线颜色反应靶点蛋白相互作用的协作分数,绿色为 0.80 之下,红色为 0.80~0.90 之间,紫色为 0.90 之上

图 2 祛瘀平肝化痰汤抗高血压病相关蛋白互作网络



注:A.MCC 筛选;B.Betweenness 筛选;C.Closeness 筛选;D.Degree 筛选;颜色越红代表相应算法下等级程度越高

图 3 CytoHubba 筛选祛瘀平肝化痰汤抗高血压病的关键靶点

GO 富集分析 ($P < 0.05$), 共得到 418 个生物过程, 44 个细胞成分, 94 个分子功能。见图 4。生物过程主要涉及腺苷酸环化酶激活肾上腺素能受体信号通路、血管收缩调节、一氧化氮生物合成过程的正调控、平滑肌细胞增殖的正调控、血压调节、细胞对缺氧的反应、平滑肌收缩的正向调节、细胞对药物的反应等; 在细胞成分中, 主要涉及细胞质膜、质膜的组成部分、膜筏、细胞外空间、受体复合物、电压门控钙通道复合体等; 分子功能主要包括肾上腺素结合、支架蛋白结合等。

KEGG 分析 ($P < 0.05$) 共富集到 68 条信号通路。见图 5。主要集中在钙信号通路、心肌细胞中的肾上腺素能信号传导、神经活性配体-受体相互作用、肾素-血管紧张素系统、肾素分泌、血管内皮生长因子信号通路、脂肪细胞脂解的调节、肿瘤坏死因子信号

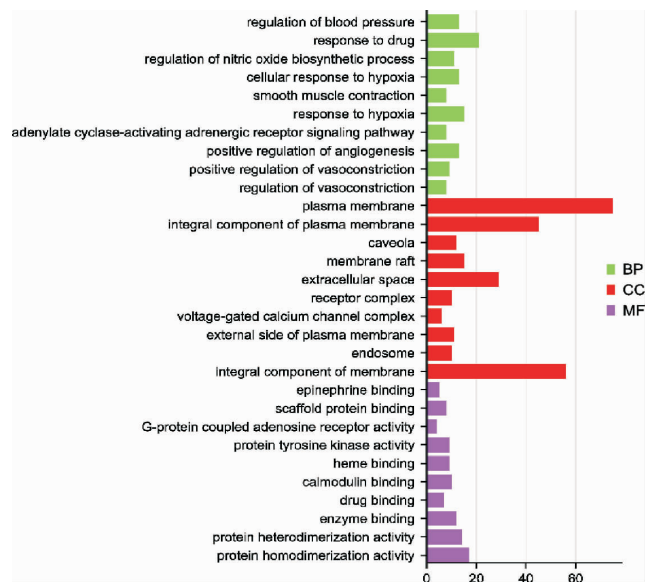


图 4 潜在靶点 GO 富集分析

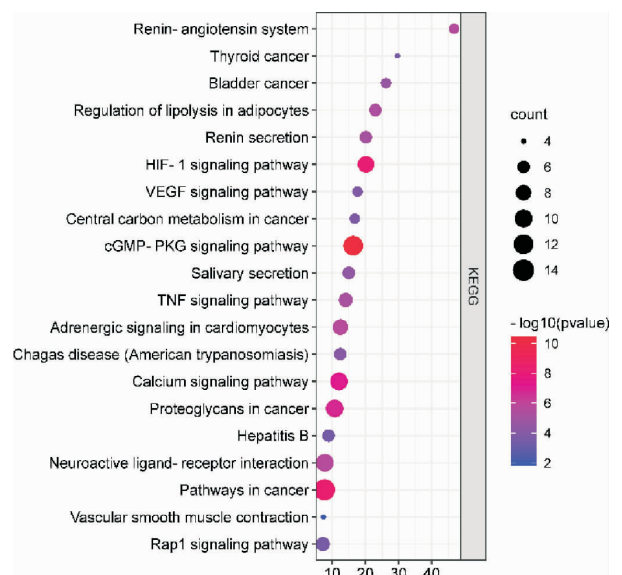


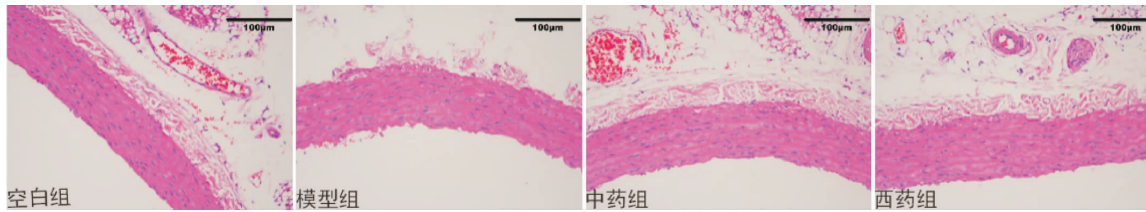
图 5 潜在靶点 KEGG 通路富集分析的前 20 条通路

通路等。上述生物功能及信号通路与祛瘀平肝化痰汤治疗 EH 病密切相关。

2.5 实验验证结果

2.5.1 各组大鼠胸主动脉的病理形态变化 HE 染色中, 空白组大鼠胸主动脉内膜结构完善, 内皮平整, 表面光滑、无凹凸样突起及缺损, 中膜平滑肌细胞排列整齐, 外膜与中膜分界明显。模型组大鼠动脉内膜结构较紊乱, 内皮欠光滑, 表面有凹凸样突起及缺损, 中膜增厚, 外膜与中膜分界不清晰。中药组和西药组大鼠主动脉内膜结构基本完善, 内皮大致完整, 内膜较模型组光滑, 外膜与中膜分界较清楚。见图 6。

2.5.2 各组大鼠 RAAS 相关的生化指标 经灌胃 4 周后, 模型组与空白组相比, Renin、Ang II、Ald 均

图6 4组大鼠胸主动脉 HE 染色图($\times 200$)

显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);中药组、西药组经灌胃4周后,与模型组相比, Renin、Ang II、Ald 均显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$);中药组与西药组相比,经灌胃4周后, Renin、Ang II、Ald 指标的差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 治疗4周后各组大鼠血浆 Renin、Ang II、Ald 比较
($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	Renin/(pg·mL ⁻¹)	Ang II/(pg·mL ⁻¹)	Ald/(pmol·L ⁻¹)
空白组	391.48±16.51	266.82±10.26	608.93±14.54
模型组	461.68±10.20**	478.64±12.28**	805.71±11.44**
中药组	424.53±11.57 ^{△△}	328.52±10.30 ^{△△}	631.84±9.75 ^{△△}
西药组	412.48±10.25 ^{△△}	323.75±11.35 ^{△△}	630.65±10.83 ^{△△}

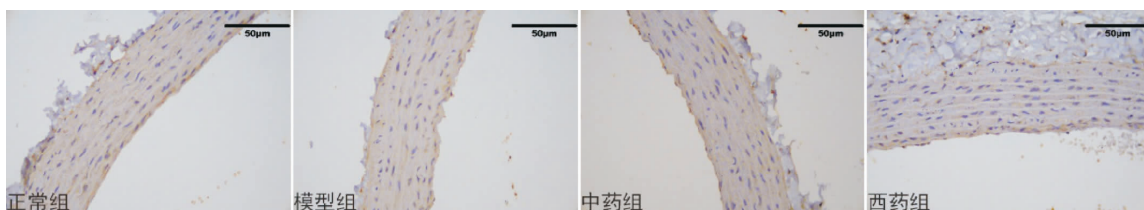
注:与空白组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,^{△△} $P < 0.01$

2.5.3 大鼠胸主动脉 ET-1 表达结果 镜下可见, ET-1 免疫阳性表达于胸主动脉血管内膜、中膜平滑肌细胞胞浆内及外膜纤维中,呈棕黄色染色。见图7。空白组的表达显著低于模型组($P < 0.01$);模型组比各给药组 ET-1 阳性表达较高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而中药组与西药组相近,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠胸主动脉 ET-1 阳性表达比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	AOD
空白组	153.36±3.74
模型组	170.52±4.20**
中药组	164.28±6.33 [△]
西药组	165.83±5.90 [△]

注:与空白组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,[△] $P < 0.05$

图7 4组大鼠胸主动脉 ET-1 阳性表达(免疫组化染色 $\times 400$)

3 讨论

中医学将 EH 归纳为“眩晕”“头痛”等病症,多数医家遵从“诸风掉眩,皆属于肝”的思想,对本病的病因病机认识以肝风、肝阳来立论。而结合当今社会环境来看, EH 具有病机复杂、缠绵难愈、须长期服药等特点。现代医学对高血压的早期诊断、早期用药干预,使升高的血压可以被迅速控制,直接改变了 EH 的自然进程,因此,对高血压的中医学病机探讨值得重新审视。胡国恒教授经过长期临床实践,对 EH 的认识形成了“痰浊瘀毒为病理因素,肝肾失调为发病关键,血络形成为发病根本”的理论体系,自拟验方祛瘀平肝化痰汤来治疗 EH^[6]。

中药组方贯彻了中医治疗疾病时强调整体观念、辨证论治思想。中药复杂的化学成分决定了其药理机制往往是能同时对多个所治疗疾病的信号通路、蛋白靶点进行调节,以达到相应的治疗目的。现代药理学研究表明,祛瘀平肝化痰汤的组方药物,具有许多调控 EH 的活性成分,方中钩藤的有效成分钩藤碱能有效降低 EH 大鼠的血清以及心肌中的 Ang II 表达,同时能对肾组织中 ACE mRNA 起到下调作用^[14];研究表明蒺藜的有效成分能通过 IKK- β /NF- κ B 信号通路干预血压调节中枢^[15];葛根素可降低血浆中 Renin、Ang II 的水平^[16];丹参酮 II A 能调节心肌组织中肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的不同成分表达^[17];当归萃取的挥发油可干预 ACE2-Ang(1-7)-MasR 轴拮抗

ACE系统以调节血压^[18];白芍总苷能够调节RAS,拮抗炎症介质和自由基的生成^[19];茯苓、泽泻功擅利水渗湿,石菖蒲长于豁痰化湿,部分文献报道指出此三者的降压作用与促进利尿相关,其具体机制有待进一步验证^[20]。

通过运用网络药理学分析祛瘀平肝化痰汤的组成药物,经过SWISS与STRING数据库挖掘,发现其作用靶点有1366个,这与经过OMIM、TTD、GeneCards等数据库查找的505个EH靶点有162个交集。最终通过筛选得到34个关键蛋白靶点,包括EDN1、NOS3、INS、ALB、EGFR、TNF、VEGFA、AKT1、IL6、ACE、NOS2等。其中EDN1能够干预全身动静脉的收缩,并调控肾素分泌,在循环系统的稳定中发挥重要作用^[21];NOS3、NOS2属于内皮NO合成酶,通过生成NO来维持血管扩张的稳态,可以干预偏头痛及动脉高血压的发生^[22];ACE是RAAS中最重要的成分之一,在心血管疾病中具有重要的调控作用,目前仍然是用于开发治疗相关疾病的重要药物靶点^[23];TNF及VEGFA主要参与调解血管内皮炎症、增殖等病理生理变化,也会对心血管系统产生部分影响。网络药理学关键靶点结果与现代药理实验研究结合表明,祛瘀平肝化痰汤可以通过EDN1、NOS3、ACE等关键靶点对EH起到治疗作用。

将祛瘀平肝化痰汤抗EH的162个靶点经过GO、KEGG富集分析可以发现,祛瘀平肝化痰汤主要通路为钙通道信号通路、心肌细胞中的肾上腺素能信号传导、神经活性配体-受体相互作用、肾素-血管紧张素系统、肾素分泌、血管内皮生长因子信号通路、脂肪细胞脂解的调节、肿瘤坏死因子信号通路等。这些通路表明祛瘀平肝化痰汤具有较好的靶向干预作用。以钙信号通路为例,动脉的收缩需要Ca²⁺及钙通道的活化参与,动脉平滑肌细胞(artery smooth muscle cells, ASMCs)中有钙敏感受体的表达^[24],同时Ca²⁺通道分布与开放对RAAS也有明显的干预作用^[25]。富集分析的同时表明祛瘀平肝化痰汤作用靶点涉及调控心肌细胞中的肾上腺素能信号传导、肾素-血管紧张素系统、肾素分泌等通路,三者均为RAAS的调控范畴。神经活性配体-受体相互作用、脂肪细胞脂解的调节在细胞和全身组织影响稳态代谢信号,在EH的状态下二者的正常作用受到干扰,可能与相关并发症的发生有关系。血管内皮生长因

子信号通路则往往参与血管生成及影响血管分布的组织细胞的迁移情况,EH状态下往往造成血管内皮的损伤,诱发该通路的活化。

本课题组据网络药理学结果推测,祛瘀平肝化痰汤能够通过上述途径改善血管状态,降低心肌及血管收缩力来起到降压的效果,并对血管内皮具有保护作用。运用祛瘀平肝化痰汤对L-NNA所致的高血压大鼠模型进行实验干预。结果表明,祛瘀平肝化痰汤干预后的中药组大鼠胸主动脉的病理形态较模型组改善;中药组血浆中Renin、Ang II、Ald的含量较模型组低($P<0.05$),表明其对RAAS具有调控作用;免疫组化分析血管活性物质ET-1的表达,发现中药组较模型组低($P<0.05$),说明祛瘀平肝化痰汤具有较好的血管内皮保护作用。

RAAS在循环系统中表现出巨大的生理调控作用,各个器官都会受到RAAS激活以及由此产生的高血压、炎症和细胞增殖、纤维化的损害^[26],Renin和Ang II的分泌过多会导致大量的慢性和急性疾病,长期高血压最终会导致血管内皮损伤,尤以肾小球血管损伤最为严重,这往往又能刺激肾素分泌的增加,形成恶性循环。因此,拮抗RAAS的相关环节,目前是治疗EH中药物开发的重要关注点。血管平滑肌收缩构成血压升高的外周循环阻力,这往往与ET-1的释放密切相关,因此,拮抗血管内皮收缩肽制剂的研发,已经成为一个新的值得关注的领域。

综上所述,祛瘀平肝化痰汤具有多靶点、多途径的抗EH作用。本次实验仅通过其干预RAAS中的相关指标及ET-1的表达,来探讨其治疗EH的可行性,但仍需进一步的临床及基础研究提供支持。

参考文献

- [1] WHITWORTH J A, WORLD HEALTH ORGANIZATION, INTERNATIONAL SOCIETY OF HYPERTENSION WRITING GROUP. 2003 World Health Organization (WHO) / International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension[J]. Journal of Hypertension, 2003, 21(11): 1983-1992.
- [2] 邹剑铭,李蕊均.高血压流行病学研究进展及危险因素分析[J].中国疗养医学,2013,22(9):796-798.
- [3] 国家心血管病中心.中国心血管病报告-2018[M].北京:中国大百科全书出版社,2019.
- [4] 冯静.心血管危险因素智能评估系统降低高血压患者并发症发生率的效果研究[J].解放军预防医学杂志,2019,37(2):111-113.

- [5] 蔺晓源,易健,雍苏南,等.复方钩藤降压片对高血压模型大鼠血压及血管内皮功能的影响[J].中国中医药信息杂志,2021,28(10):75-80.
- [6] 田丰铭,胡国恒.胡国恒教授治疗中青年原发性高血压晕痛[J].吉林中医药,2020,40(11):1445-1448.
- [7] 李腾,胡国恒,秦甜,等.祛瘀平肝化痰汤联合硝苯地平控释片治疗高血压性头痛的疗效临床观察[J].中医药临床杂志,2019,31(6):1093-1096.
- [8] 徐文华,郑景辉,赵阳,等.基于网络药理学和生物信息学的丹参酮Ⅱ_A治疗冠心病的分子生物学机制分析[J].中草药,2019,50(5):1131-1140.
- [9] 韩彦琪,刘耀晨,武琦,等.基于网络药理学的痰热清胶囊治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)机制研究[J].中草药,2020,51(11):2967-2976.
- [10] 何以红,胡展豪,付裕,等.芦荟提取物对左旋硝基精氨酸诱导的高血压大鼠影响的研究[J].中华全科医学,2017,15(3):407-410,474.
- [11] 杨昌振,张雯斐,陈丹阳,等.非手术性高血压大鼠模型建立的研究进展与比较[J].中国循证心血管医学杂志,2019,11(1):118-121.
- [12] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004(9):1069-1072.
- [13] 吴侯,刘良丽,朱晓龙.TGF- β 1/Smad通路在养肺保元汤治疗慢性阻塞性肺病合并肺间质纤维化中的作用[J].海南医学,2021,32(2):137-140.
- [14] 龙吉美,黄德彬,李魁武,等.钩藤碱对阿霉素诱导的大鼠肾损伤的作用及其机制[J].中国病理生理杂志,2012,28(10):1887-1891.
- [15] 郭金昊,姜月华,杨传华,等.蒺藜超微粉对血管紧张素Ⅱ诱导的下丘脑神经元细胞损伤IKK- β /NF- κ B信号通路的影响[J].中医杂志,2017,58(2):151-156.
- [16] 黄帆松,张培,杨帆,等.葛根素对肾性高血压大鼠,apelin-12、AngⅡ及NO含量与血压的影响[J].中国病理生理杂志,2011,27(12):2323-2327.
- [17] 余良主,石春蓉.丹参酮ⅡA对高血压大鼠左心室肌肾素-血管紧张素系统不同成分表达量的影响[J].中国中药杂志,2014,39(8):1468-1472.
- [18] 伊琳,曲强,纪禄凤,等.当归挥发油对自发性高血压大鼠ACE2/Ang1-7/Mas受体轴的影响[J].临床心血管病杂志,2017,33(6):584-587.
- [19] 戴淑萍,颜勤明.白芍总苷在心血管疾病模型动物中的药理研究进展[J].中国药房,2015,26(10):1418-1420.
- [20] 刘伟芳,黄晓瑾,夏淋霞,等.中药利尿降压作用的研究进展[J].上海中医药杂志,2011,45(9):73-78.
- [21] DOUMA L G, SOLOCINSKI K, MASTEN S H, et al. EDN1-AS, A novel long non-coding RNA regulating endothelin-1 in human proximal tubule cells [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 209.
- [22] SHNAYDER N A, PETROVA M M, MOSKALEVA P V, et al. The role of single-nucleotide variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in the comorbidity of arterial hypertension and tension-type headache[J]. *Molecules*, 2021, 26(6): 1556.
- [23] POLAKOVIČOVÁ M, JAMPÍLEK J. Advances in structural biology of ACE and development of domain selective ACE-inhibitors[J]. *Medicinal Chemistry*, 2019, 15(6): 574-587.
- [24] TYKOCKI N R, BOERMAN E M, JACKSON W F. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles[J]. *Comprehensive Physiology*, 2017, 7(2): 485-581.
- [25] THAMCHAROEN N, SUSANTITAPHONG P, WONGRAKPANICH S, et al. Effect of N- and T-type calcium channel blocker on proteinuria, blood pressure and kidney function in hypertensive patients: A meta-analysis[J]. *Hypertension Research*, 2015, 38(12):847-855.
- [26] XIONG X J, YANG X C, LIU W, et al. Trends in the treatment of hypertension from the perspective of traditional Chinese medicine[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2013, 2013: 275279.

(本文编辑 苏维)