

化学药物有关物质含量检测^[14-16]。本课题采用高效液相色谱法测定马西替坦中 N,N-二甲基苯胺的含量,通过方法学研究,包括线性试验、精密度试验、重复性试验、溶液稳定性试验、回收率试验以及耐用性试验等,结果均符合要求,适合马西替坦中 N,N-二甲基苯胺的检测。

参考文献

- [1] 段永建. 肺动脉高压病因及治疗研究进展[J]. 西部医学, 2016, 28(8): 1178-1180.
- [2] 谭晓明, 李燕明. 肺动脉高压药物治疗进展[J]. 临床药物治疗杂志, 2015, 13(2): 1-4.
- [3] 何建国, 杨涛. 肺动脉高压治疗新视野[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(10): 761-763.
- [4] 顾智淳, 沈节艳, 刘晓琰. 新型内皮素受体拮抗剂马西替坦: 治疗肺动脉高压的一线药物[J]. 中国新药与临床杂志, 2015, 34(2): 102-106.
- [5] 潘晓菲, 谭初兵, 时丽丽, 等. 新型肺动脉高压治疗药物马西替坦[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(1): 3-5.
- [6] 沈爱平. 色谱法在药物分析中的应用[J]. 黄冈职业技术学院学报, 2014, 16(3): 97-100.
- [7] 耿新华, 李晓, 刘汝锋, 等. 顶空单滴液相微萃取-气相色谱法测定水中苯胺类化合物[J]. 理化检验-化学分册, 2014, 50(2): 202-205.
- [8] 罗舒君, 杜仁军. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法测

定水中的 N,N-二甲基苯胺[J]. 理化检验-化学分册, 2016, 52(10): 1187-1188.

- [9] 纪峰, 崔崇威, 李圭白, 等. 液相色谱法测定水中痕量 N,N-二甲基苯胺[J]. 中国给水排水, 2007, 23(12): 76-79.
- [10] 梁键谋, 傅聪, 陈悦. 高效液相色谱-质谱联用测定富马酸噻硫平中 N,N-二甲基苯胺[J]. 医药导报, 2017, 36(3): 317-320.
- [11] 张云峰, 钱建钦, 王建. HPLC-MS/MS 法分析氟胞嘧啶中痕量基因毒性杂质 N,N-二甲基苯胺[J]. 药物分析杂质, 2017(2): 265-271.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 105-109.
- [13] 吴标, 李晓梅, 崔红晓. 反相高效液相色谱法测定马西替坦有关物质[J]. 安徽医药, 2017, 21(2): 248-251.
- [14] 马博凯, 勾新磊, 赵新颖, 等. 高效液相色谱法在食品和药品安全分析中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(11): 4295-4298.
- [15] 徐巧玲, 吴学军, 姜文清, 等. 应用高效液相色谱-二极管阵列检测器筛查中药及保健品中糖皮质激素类非法添加剂[J]. 中国临床保健杂志, 2016, 19(6): 569-573.
- [16] 曹玉明. 高效液相色谱法测定小儿氨酚黄那敏颗粒中马来酸氯苯那敏含量及均匀度[J]. 安徽医药, 2016, 29(8): 1486-1489.

(收稿日期: 2018-07-10)

• 基础研究 •

基于生物信息学途径挖掘防治急性高原病的潜在药物

施冰¹, 崔庆华², 冯振龙³, 李俊峡¹

(1. 中国人民解放军总医院第七医学中心干一科, 北京 100700; 2. 北京大学医学部生物信息学系; 3. 安徽医科大学研究生院)

[摘要] **目的** 应用生物信息学途径挖掘潜在的防治急性高原病的药物。**方法** 选取急性高原低氧暴露 7 d 大鼠心肌组织标本, 进行全转录组高通量测序, 筛选差异表达 mRNA。应用生物信息学工具 Connectivity Map, 整合差异表达 mRNA 信息, 推测急性高原低氧心肌损伤差异基因与药物小分子功能的关系, 筛选潜在的具有防治急性高原低氧心肌损伤效应的药物。**结果** 高通量测序结果显示, 与常压常氧对照组比较, 急性高原低氧暴露大鼠心肌组织中 1 084 个 mRNA 表达水平发生显著变化。其中 457 个 mRNA 表达上调, 627 个 mRNA 表达下调。通过 connectivity map 药物数据库比对分析, 发现小分子化合物 SB203580 负性富集分数较高, 是潜在的防治急性高原病的药物。动物实验提示 SB203580 可减轻高原低氧大鼠心肌水肿和心肌组织病理损伤, 下调心肌 AQP1 mRNA 表达。**结论** 通过生物信息学方法可挖掘出潜在的防治急性高原病的药物, 研究方法合理、简便、省时, 减少了药物开发研究的盲目性。

[关键词] 高原病; 低氧; 计算生物学; 药物评价, 临床前; 数据挖掘

DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2019.04.019

基金项目: 全军后勤重点项目 (BBJ14L001)

作者简介: 施冰, 副主任医师, 副教授, Email: Dr_shibing@bjmu.edu.cn

Mining potential drugs for prevention and treatment of acute mountain sickness based on bioinformatics approach Shi Bing*, Cui Qinghua, Feng Zhenlong, Li Junxia (* Department of Geriatrics, No. 7 Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100700, China)

Corresponding author: Shi Bing, Email: Dr_shibing@bjmu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To explore potential drugs for prevention and treatment Acute Mountain Sickness by bioinformatics. **Methods** Myocardial tissue of rats exposed to high altitude hypobaric hypoxia for 7 days was selected for high throughput sequencing to screen differentially expressed genes. Connectivity Map was used to speculate the relationship between differentially expressed genes and function of small molecule drugs, and to screen potential drugs for preventing and treating Acute Mountain Sickness. **Results** High-throughput sequencing results showed that the expression of 1084 mRNAs in myocardium of rats exposed to high altitude hypobaric hypoxia changed significantly compared with that of normobaric control group. 457 mRNAs were upregulated and 627 mRNAs were downregulated. Through the comparative analysis of connectivity map drug database, it was found that SB203580 had higher negative enrichment fraction, and was potential drug to prevent and treat Acute Mountain Sickness. Animal experiments showed that SB203580 could alleviate myocardial edema and pathological damage in rats exposed to high altitude hypobaric hypoxia, and down-regulate the expression of AQP1 mRNA in myocardium. **Conclusion** Potential drugs for prevention and treatment of acute mountain sickness can be excavated by bioinformatics. The research method is reasonable, simple and time saving, which reduces the blindness of drug development and research.

[Keywords] Altitude sickness; Hypoxia; Computational Biology; Drug evaluation, preclinical; Data mining

急进高原后急性高山病(AMS)的发病率居高不下,其中高原心脏疾病是很重要的一部分^[1]。文献报道,高原环境运动者30%的死亡与高原心脏病猝死相关^[2]。高原心脏病的发生发展比较复杂^[3],尤其对急进高原后心脏的影响还不甚清楚^[4]。前期实验中,我们应用低氧实验舱模拟海拔7000 m高原环境,应用超声心动图评估了SD大鼠在急进高原后不同时间点(3 d、7 d、14 d、28 d)心脏结构和功能变化,HE染色病理切片评估了心肌组织病理变化。发现急性高原低氧可造成大鼠心肌组织水肿,心脏收缩和舒张功能严重受损。急进高原第7天时大鼠心脏收缩功能受损最严重^[5]。目前国内外对于AMS发生机制尚不十分明确,还没有非常有效的干预策略。虽然很多研究已证实炎症因子、氧化应激等在急性高原病发生发展过程中起着重要作用,但均不足以从基因水平全面阐述急性高原病发生机制,也不足以筛选新的防治急性高原病的药物。本研究拟通过低压氧舱模拟高原低氧环境,建立急性高原病大鼠动物模型。通过对高原低氧暴露7 d大鼠心肌组织进行全转录组测序,筛选与急性高原病相关的差异表达基因。应用Connectivity Map数据库对差异表达基因进行分析比对,通过生物信息学方法筛选潜在的防治急性高原病的药物。

1 材料与方法

1.1 实验动物及其分组 选取6周龄SPF级SD大鼠,体质量(200±20)g,雄性,购自北京维通利华

实验动物技术有限公司。许可证号:SCXK(京)2016-0006。所有动物实验均通过伦理委员会审核。采用随机数字表法将SD大鼠分为高原低压低氧实验组(HH组)、常压常氧对照组(con组)、药物干预组(Sb203580组)。每组20只动物。

1.2 实验仪器及实验条件 应用实验舱(贵州风雷航空军械有限责任公司)模拟高原低氧条件。实验舱参数设定:模拟海拔高度7000 m,升降速度10 m/s,舱内压力39.1 kPa,舱内氧气压力9.022 kPa。实验组和药物干预组大鼠均置于实验舱内。实验舱运行时间23 h/d,昼夜比12 h:12 h。每日上午开仓1 h更换垫料、饲料、饮用水。药物干预组大鼠于每天开仓时腹腔注射SB203580溶液(10 mg/kg),每日注射1次,每只大鼠连续注射7 d。对照组大鼠置于实验舱外,处理等同于实验组大鼠。

1.3 方法

1.3.1 大鼠心肌组织总RNA提取 各组大鼠饲养7 d后处死,开胸取出心脏。应用Trizol试剂提取心肌组织总RNA。取100 mg心肌组织样品,加入1 mL RNastore样本保存液。按照Trizol试剂说明书,一步法提取心肌组织总RNA。采用RNeasy Mini Kit纯化总RNA,应用NanoDrop2000分光光度计分别测量RNA在波长为260 nm、280 nm的吸收值,间接计算出提取的RNA浓度。使用2%琼脂糖凝胶电泳检测RNA纯度和完整性。

1.3.2 大鼠心肌组织mRNA高通量测序 质检合

格的 RNA 进行文库构建。使用 HiSeq2500 进行全转录组高通量测序(实验组和对照组各 6 只动物),获得 mRNA 表达谱。使用 FastQC 对原始序列进行检测,保留高质量的整洁序列(clean reads)。使用 Cufflinks 2.0 对所有转录组结果进行汇总整合,并使用 Ensemble 转录本数据库对获得的结果进行注释。使用 Cufflinks 软件筛选差异基因。差异基因的筛选标准为同时满足以下条件:①在两个样本中测序读数之和 ≥ 10 的基因;②满足 $|\log_2(FC)| > 1$ (上调 2 倍或下调 2 倍);③同时满足 $P < 0.05$ 和 FDR(false discovery rate) < 0.05 。高通量测序检测由北京博奥公司完成。

1.3.3 差异基因 GO 分类和 Pathway 分析 应用 SAM 软件筛选出实验组和对照组比较,相对表达超过 2 倍的差异基因。应用可视化和整合发现的数据库(DAVID)软件对差异基因功能进行基因本体(GO)分类、生物学通路(Pathway)分析、功能注释聚类分析,获得差异基因相关功能的功能富集类。

1.3.4 connectivitymap 药物数据库筛选与高原低氧作用机制拮抗的药物 应用生物信息学工具 ConnectivityMap 数据库,整合差异表达 mRNA 信息,推测高原低氧相关心肌损伤中差异表达基因与药物小分子功能的关系。将比对系数 OR < 1 且 $P < 0.05$ 的药物定义为具有防治急性高原病的效应。

1.3.5 心肌组织含水量检测 各组动物完成实验处死后,剖开胸腔,无菌条件下取出心脏。4 ℃ PBS 溶液漂洗,滤纸吸干。用电子天平称量心脏湿质量后,置于 80 ℃ 恒温干燥箱烘干 48 h 至恒质量,称重心脏干质量。计算组织含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重 $\times 100\%$ 。

1.3.6 心肌组织病理学检测 各组动物完成实验处死后,剖开胸腔,无菌条件下取出心脏。4 ℃ PBS 溶液漂洗,滤纸吸干。组织用 40 mL/L 多聚甲醛溶液固定 24 h,常规脱水,石蜡包埋,连续切 5 片,片厚约 4 μm ,HE 染色,中性树胶封片,光镜下观察心肌组织病理学变化。

1.3.7 心肌组织 AQP1 mRNA 检测 应用 real time PCR 技术检测心肌组织 AQP1 mRNA 表达。通过 Reverse Transcription Kit 试剂盒将心肌组织 RNA 逆转录为 cDNA,使用荧光定量 PCR 试剂盒进行 AQP1 mRNA 相对表达水平测定。检测总体积为 25 μL (其中上下游引物各 0.5 μL ,Premix 12.5 μL ,cDNA 模板 2 μL ,ddH₂O 9.5 μL)。PCR 程序参照试剂盒

中提供的两步法检测,95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,共 40 个循环。各组实验独立重复 3 次。以 β -actin 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量,引物由上海生工合成。AQP1 上游引物为 5'-GCCAGCGAGTTCAAGAAG-3',下游引物 5'-TC-CACCACCCTGTTGCTGTA-3'。 β -actin 上游引物为 5'-TTCGCGGGCGACGATGC-3';下游引物为 5'-CGAAGTCCAGGGCGAC-3'。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态分布和方差齐性检验。多组间比较采用单因素方差分析,两组间差异采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌组织差异表达基因筛选 将相对表达量比值在 2 倍以上,且差异有统计学意义($P < 0.05$)的 mRNA 作为差异表达 mRNA。与对照组比较,高原低氧实验组大鼠心肌组织中 1 084 个 mRNA 表达发生显著变化。其中 457 个 mRNA 表达上调,627 个 mRNA 表达下调(图 1)。图 1 中,横轴和纵轴分别表示对照组和实验组的表达量值。红色的点代表上调基因,绿色的点代表下调基因,黑色的点代表无显著差异的基因。

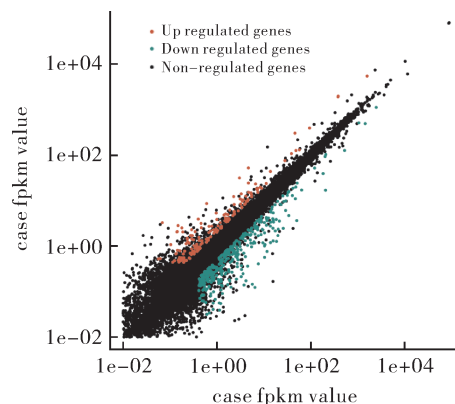


图 1 大鼠心肌组织差异表达 mRNA 的散点图

2.2 潜在防治急性高原病的药物筛选 应用高通量测序获得的上调基因和下调基因,建立 QuerySignature 格式文件。然后进入 cMap 网站(<http://www.broadinstitute.org/cnmap/>),分别导入上调基因和下调基因的文件,按使用说明操作进行药物表达谱分析。通过与 cMap 数据库中已有参考基因表达谱数据进行比对,获得每一次比对分值在 1 和 -1 之间的富集分值(enrichment)。富集分值代表输入

的表达谱数据与比对的相应表达谱数据的相似程度。正分值表示与 cMap 相应表达谱数据有着较高的相似性,负分值表示输入的表达谱与数据库中相应表达谱表达模式相反。根据比对结果,认为小分子化合物 SB203580 ($OR = 0.047, P = 0.04$) 具有潜在的预防急性高原病效应。

2.3 小分子化合物 SB203580 防治急性高原心肌损伤的效果

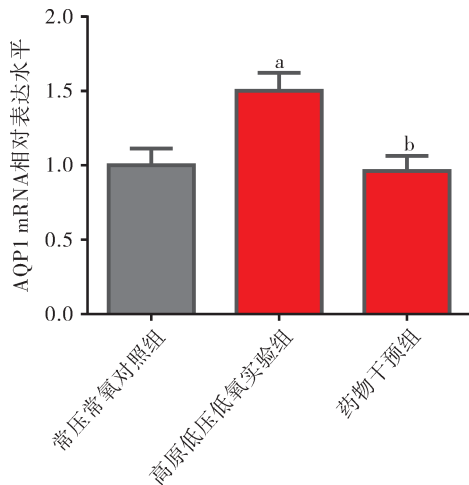
2.3.1 大鼠心肌组织含水量 与对照组比较,低氧组和 SB203580 组大鼠心肌组织含水量均升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与低氧组比较,SB203580 组大鼠心肌组织含水量降低 ($P < 0.05$)。提示 SB203580 可减轻高原低氧导致的心肌水肿。

2.3.2 大鼠心肌组织病理 心肌组织病理切片(光学显微镜, $\times 200$ 倍)提示对照组心肌细胞界限清楚,可见肌原纤维和横纹,核清晰。低氧组可见心肌灶状变性,心肌水肿、肌束稀疏。SB203580 组偶可见心肌灶状变性。根据心肌组织病理变化,提示 SB203580 可减轻高原低氧导致的心肌损伤。见图 2。

2.3.3 大鼠心肌组织 AQP1mRNA 表达 与对照组比较,低氧组大鼠心肌组织 AQP1mRNA 表达量显著升高 ($P < 0.01$), SB203580 组大鼠心肌组织 AQP1mRNA 表达量未见显著变化 ($P > 0.05$)。与低氧组比较,SB203580 组大鼠心肌组织 AQP1mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$)。提示 SB203580 可下调高原低氧大鼠心肌组织 AQP1mRNA 表达。见图 3。

3 讨论

生物信息学综合运用数学、计算机科学和生物学等多学科知识和工具,阐明和揭示大量数据所包含的生物学意义。随着高通量测序和生物信息学的出现,药物发现模式发生了重大变革。由既往偶然发现、工业合成有效成分的传统时代进入一个以基因为基础的药物研发新阶段。近年来,基因表达谱在药物研究方面的应用越来越广泛,研究人员构建



注:与常压常氧对照组比较,^a $P < 0.01$;与高原低压低氧实验组比较,^b $P < 0.01$

图3 大鼠心肌组织 AQP1mRNA 检测

了与活性化合物或药物相关的基因表达谱数据库,绘制了“基因-疾病-药物”之间的关系图。这些“关系图”为药物发现及研究提供了新思路,形成一种独特的药物发现新模式,即基于化合物或药物基因表达谱的药物发现模式。通过该方法可筛选到一些疾病治疗候选化合物,加快了药物发现过程,特别是对于那些临床罕见疾病的治疗药物发掘有着更为重要的意义。

Connectivity map (cMap) 数据库是美国麻省理工学院、哈佛大学及其附属医院联合开发的数据库。该数据库应用基因表达谱信号揭示药物-基因-疾病之间的相互联系。通过对比不同药物之间在基因组表达谱上的相关程度,即可判断药物在调控下游基因的方式上的相似程度,也就间接反映了不同药物是否影响了相近的或部分重叠的下游基因。为了定量衡量一对药物表达谱之间正向或负向的相关程度,CMaP 根据特定的计算方法能够给出一个介于 -1 和 +1 之间的“联系分值”,用以定量衡量各药

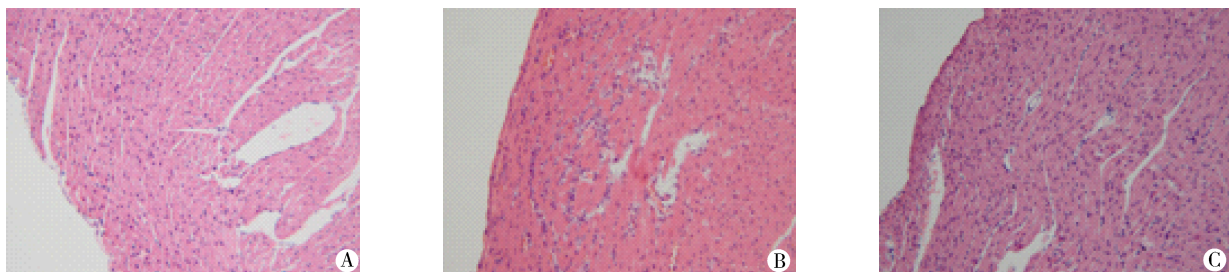


图2 大鼠心肌组织病理切片(HE 染色, $200 \times$): A 为常压常氧对照组, B 为高原低压低氧实验组, C 为药物干预组

物表达谱之间的相似程度。当前 cMap 数据库包含超过 7 000 个表达谱数据,涉及多达 1 300 种化合物,可应用于发现具有相似作用的药物,提示药物的作用机制,以及从 FDA 目前已有药物中发现老药的新用途。

水通道蛋白(AQP)是一类广泛分布于机体不同组织器官中的特异性跨膜转运水的膜蛋白,共有 13 个亚型。可以促进水分子的快速跨膜转运,维持细胞内外渗透压力的平衡^[6]。在心脏表达的水通道蛋白主要是 AQP1 亚型。文献报道,在人类和老鼠心肌组织中,AQP1 主要分布于无孔型血管内皮细胞和心肌细胞,协调水分子的跨膜转运。生理状态下,AQP1 蛋白对于水分子的跨膜转运影响并不明显。病理状态下,AQP1 在缺氧条件下被诱导表达^[7]。山羊体外循环手术后心肌组织中 AQP1 高表达,且与心肌水肿程度密切相关^[8]。应用 AQP1 慢病毒载体转染羊心肌组织后,心肌组织 AQP1 mRNA 和蛋白的表达水平均呈升高趋势,心肌组织 AQP1 表达水平与心肌水肿程度呈正相关。敲除 AQP1 基因后,心肌水肿程度明显降低^[9]。心肌细胞水肿坏死是导致心肌缺血和各种继发性损伤的重要环节之一。调节 AQP1 的表达是防止心肌水肿的一个重要途径。临床研究表明 AQP1 主要受上游 ERK/MAPK、PI3K/AKT/m TOR 等通路的调节,进而促进基质金属蛋白酶、VEGF 等基因表达,参与肿瘤细胞的增殖凋亡、侵袭转移及血管生成^[10]。通过 cMap 数据库分析比对,我们推测小分子化合物 SB203580 是潜在的具有防治急性高原低氧心肌损伤的候选药物。本研究发现,与对照组比较,低氧组大鼠心肌组织出现水肿、坏死,心肌组织中 AQP1 mRNA 表达显著增高。SB203580 组大鼠尽管心肌含水量轻度增高,但心肌组织病理未见显著变化,心肌组织 AQP1 mRNA 表达无显著变化。SB203580 是一种常用 p38MAPK 抑制剂,可以通透细胞,抑制 p38MAPK 激活,进而有效抑制一些炎性因子(如 IL-1 β 、TNF- α)介导的部分信号传导。本研究结果提示,SB203580 可通过调控心肌组织 AQP1 表达,防治高原低氧导致的心肌水肿和心肌损伤。

本研究基于高通量测序和生物信息学技术,从

全转录组水平初步揭示了高原低氧大鼠心肌损伤的作用机制。结合已知的基因功能和信号通路,以及 cMap 数据库分析比对结果,初步预测了潜在的具有干预急性高原心肌损伤的药物并进行了实验验证。通过本研究,将深化有关急性高原病发病机制的认识,为探索新的防治策略提供理论依据和实验基础。

参考文献

- [1] GE R L, SIMONSON T S, COOKSEY R C, et al. Metabolic insight into mechanisms of high-altitude adaptation in Tibetans[J]. *Mol Genet Metab*, 2012, 106(2): 244-247.
- [2] RIMOLDI S F, SARTORI C, SEILER C, et al. High-Altitude exposure in patients with cardiovascular disease: risk assessment and practical recommendations[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52(6): 512-524.
- [3] MARIPOV A, MAMAZHAKYPOV A, KARAGULOVA G, et al. High altitude pulmonary hypertension with severe right ventricular dysfunction[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(3): e89-e90.
- [4] LEON-VELARDE F, VILLAFUERTE F C, RICHALET J P. Chronic mountain sickness and the Heart[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52(6): 540-549.
- [5] 冯振龙, 施冰, 赵永歧, 等. 急性高原低氧对于大鼠心功能及其心肌组织 miR-144 表达影响的研究[J]. *中华心脏与心律电子杂志*, 2018, 6(3): 129-133. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-6568.2018.03.001.
- [6] MOSA-AZIZ R, CHEN L M, PELLETIER M F, et al. Relative CO₂/NH₃ selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(13): 5406-5411.
- [7] AU C G, COOPER S T, LO H P, et al. Expression of aquaporin 1 in human cardiac and skeletal muscle[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36(5): 655-662.
- [8] YAN Y, HUANG J, DING F, et al. Aquaporin 1 plays an important role in myocardial edema caused by cardiopulmonary bypass surgery in goat[J]. *Int J Mot Med*, 2013, 31(3): 637-643.
- [9] 闫玉梅, 丁芳宝, 梅举, 等. AQP1 慢病毒载体成功转染心肌细胞后加重体外循环后心肌细胞水肿[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2012, 28(9): 540-543.
- [10] 李继强. 缺氧诱导因子 1 α 相关信号通路与肿瘤关系的研究进展[J]. *医学综述*, 2015, 21(24): 4460-4464.

(收稿日期:2019-03-04)