

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071154214

UDC_____

厦门大学

硕士学位论文

中药单方不良反应机理研究方法探索
The Approach For Mechanism Research Of TCM
Single Prescription's ADR

张驰

指导教师姓名: 纪志梁

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2011年5月

论文答辩时间: 2011年 月

学位授予日期: 2011年 月

2011年05月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
第一章 绪论	1
1.1 药物不良反应	1
1.1.1 药物不良反应的定义与分类.....	1
1.1.2 药物不良反应的机理研究与预测.....	3
1.2 中药的药物不良反应	8
1.2.1 中药不良反应的定义.....	8
1.2.2 导致中药不良反应的主要原因.....	8
1.2.3 进行中药不良反应研究的需求及研究现状.....	9
1.3 本论文的研究思路，目的及意义	11
第二章 材料与方法	13
2.1 预测机制及实验流程	13
2.2 研究对象的获取	14
2.2.1 鸦胆子植物学属性.....	15
2.2.2 鸦胆子的药理作用及临床应用.....	15
2.2.3 鸦胆子活性成分及化学结构.....	16
2.2.4 其它中药单方简要介绍.....	19
2.3 主要实验方法和工具	24
2.3.1 小分子潜在靶点搜寻方法.....	24
2.3.2 DITOP 数据库介绍.....	25
2.2.3 基于 ADReCS 系统 ADR 症状信息的标准化.....	26
2.3.4 利用 KEGG Pathway 网络协同分析调控位点.....	30
第三章 结果与分析	32
3.1 鸦胆子各组分与预测靶点的关系	32
3.2 鸦胆子 Pathway 节点基因分析及抗癌机理浅析	33
3.3 通过 ADRAPs 预测鸦胆子的不良反应	38

3.4 预测结果评估	46
3.5 鸦胆子不良反应分子机理分析	51
结论与展望	55
参考文献	57
致谢	62

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstrate in Chinese	I
Abstrate in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Adverse Drug Reaction	1
1.1.1 Definition and classication of ADR.....	1
1.1.2 ADR mechanism research and prediction	3
1.2 Chinese Traditional Medicine ADR	8
1.2.1 Definition of TCM ADR	8
1.2.2 Major causes of TCM ADR.....	8
1.2.3 Research status and significance of TCM ADR.....	9
1.3 Idea,objective and methods of this article	11
Chapter 2 Materials and methods	13
2.1 Prediction mechanism and experimental procedure	13
2.2 Seletion of research subject	14
2.2.1 Botany features of Yadanzi	15
2.2.2 Pharmacological activity and Clinical application of Yadanzi	15
2.2.3 Strutrures of Yadanzi's chemical components	16
2.2.4 Brief introduction of other single prescriptions.....	19
2.3 Major experimental methods and tools	24
2.3.1 Taget-searching of small molecules	24
2.3.2 Introduction of DITOP database.....	25
2.2.3 Strutrures of Yadanzi's chemical components	26
2.3.4 Brief introduction of other single prescriptions.....	30
Chapter 3 Results and Analysis	32
3.1 Putative protein targets of Yadanzi's components	32

3.2 Mechanism analysis of Yadanzi's Anti-cancer activity	33
3.3 ADR prediction connected with ADRAPs	38
3.4 Evaluation of the predictional results	46
3.5 Molecular mechanism of Yadanzi's ADR	51
Conclusion and prospect	55
Reference	57
Acknowledgement	62

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

中药不良反应的预测与机理研究已经成为当前药物研究中的一个热点,然而目前却没有一种有效的方法能在分子机制上对中药不良反应进行预测并阐明其机理,本文进行的是相关方法论方面的研究。本文选取了 8 种常见中药单方作为研究对象,以鸦胆子为例子进行深入研究分析。本文采用的不良反应预测方法是通过计算机辅助小分子潜在靶点搜寻的方法,寻找鸦胆子各化学组分对应的不良反应相关蛋白,利用不良反应相关蛋白来预测其对应的不良反应。通过将预测结果与实际文献中报道的不良反应进行对比来评估预测结果的准确性。文献报道的 28 个实际不良反应中的 26 个都能通过该方法得到有效预测,预测结果的准确率达 92.9%。通过寻找鸦胆子所重点作用代谢路径的网络节点的方法,尝试解释鸦胆子的药效机理。通过对鸦胆子重点作用的 64 条代谢路径进行分析,发现 PIK3CA 基因是这些代谢路径的网络节点。PIK3CA 基因在癌症发生和迁徙过程中发挥重要作用,鸦胆子抗癌活性,可能与对 PIK3CA 基因的调控有关。同时发现了鸦胆子的作用靶点中,有 24 个是和癌症直接关联的蛋白靶点,有利于指导鸦胆子抗癌机理的后续研究及抗癌新药的开发。在对鸦胆子不良反应机理研究是采用代谢路径分析的方法,使用不良反应低血压作为研究对象,通过分析鸦胆子潜在靶点在低血压相关代谢路径中的作用情况,来阐明低血压发生机理。研究发现,肾素血管紧张素系统路径对低血压产生有着重要作用,该路径中的血管紧张素 II 具有提升血压的生物学效应。鸦胆子诱导低血压的产生,主要是通过调控该路径与血管紧张素 II 产生直接相关的蛋白,抑制了血管紧张素 II 的生成导致的。鸦胆子同时也能够对血管加压素受体蛋白产生抑制作用,也与低血压的产生有关。通过本文以鸦胆子为例子的研究,引入了一个在分子机制上预测中药不良反应及进行机理研究的方法,为中药不良反应的研究探索了一条新路。

关键词 中药 不良反应 机理研究 生物信息学

Abstrate

Adverse Drug Reaction(ADR) of Traditional Chinese Medicine (TCM) draws more and more attention in the world. However, current knowledge and methodology for TCM ADR research still remain inefficient and limited. In this work, a new computer-aided approach was introduced to explore molecular mechanisms underlying TCM induced ADR using a traditional herb Yadanzi (*Brucea javanica* (L.) Merr) as example. The putative protein targets of the Yadanzi were predicted by searching its all active chemical components against PDB structure database using a reverse docking software INVDOCK. The Yadanzi induced ADR were then predicted by searching the putative targets against the Drug-Induced Toxicity Related Protein database (DITOP). Additional literature surveillance were also demonstrated to support and evaluate the target-ADR relationship. It is found that 92.9% of the literature-reported ADR are agreed with the predicted ADR. Furthermore, pathway analysis was used to explain the possible molecular mechanisms underlying Yadanzi induced ADR. It was found that renin-angiotensin system(RAS) pathway may respond to Yadanzi induced hypotension. Angiotensin II played an important role in the RAS pathway, which can increase blood pressure. Via inhibiting the activities of proteins REN,ACE,CMA1,and CTSG.Yadanzi reduces the synthesis of Angiotensin II and induce hypotension. All these results suggested that it is a feasible approach to predicted ADR of TCM and explore their molecular mechanisms.

Key Word Traditional Chinese Medicine Adverse Drug Reaction Mechanism Research Bioinformatics

第一章 绪论

1.1 药物不良反应

1.1.1 药物不良反应的定义与分类

按照 WHO 国际药物监测合作中心的规定，药物不良反应（Adverse Drug Reactions, ADR）是指正常剂量的药物用于预防、诊断、治疗疾病或者调节生理机能时出现的有害的和与用药目的无关的反应。该定义排除有意的或意外的过量用药及用药不当引起的反应。换言之，药物不良反应是药物作用机制非期待性的直接延伸。

ADR 严重影响了药物的治疗效果，不但增加了病人的痛苦，还有可能导致病人病情的恶化，甚至死亡。同时，还给患者带来了沉重的负担。据调查，住院患者中 6.7%存在严重的 ADR，死亡率达到了 0.32%^[1]。在药源性伤亡事件中的花费每年高达 1360 亿美元^[1]。1994 年美国的住院患者中由于 ADR 所导致的重度病例有 220 万，其中 10 万人死亡。据评估，中国每年约有 5000 万人住院，其中至少 250 万人（20%）是因 ADR 住院，50 万人是严重的 ADR，每年约死亡 19 万人，从而增加医药费 40 亿元^[2]。

药物不良反应还是目前制约新药开发和上市后临床应用的一大难题。开发新药是一项长期而复杂的工作，上市前失败率是非常高的^[3]。在药物研发过程中，高达 1/3 比例的药物最终因为药物不良反应宣告失败^[4]。2004 年 11 月，美国 FDA 批准 Biogen Idec 公司生产的一种治疗多发性硬化症的新药那它珠单抗（Natalizumab，商品名:Tysabri），由于出现了一种罕见的中枢神经系统严重不良反应（进行性多病灶脑白质病）和患者死亡，上市仅 3 个月就宣布从市场撤出并停止使用；另外治疗类风湿关节炎药物英夫利昔单抗（Infliximab），上市后发现有严重的肝脏毒性，还可能出现白细胞、粒细胞和全血细胞减少，引起严重感染危及生命或死亡，FDA 要求企业对其说明书作出修改和加黑框警告；丙氧酚（Propoxyphene），是常用的阿片类止痛药之一，用于治疗轻度至中度疼痛。2010 年，FDA 最新研究表明，即使使用治疗剂量，这类药物也可能对心脏产生毒性

作用，若过量服用则有可能致死，建议停止使用丙氧芬类止痛药，要求生产商自觉将该类药物撤出市场^[5]。

ADR 发生的机理比较复杂，目前通常采用的是将其分为 A，B 两类。

A 型药物不良反应又称之为剂量相关的不良反应 (Dose-Related Adverse Reactions)，主要是由于药物药理作用的增强所导致的，一般与药物剂量相关，减药或停药后症状很快缓解或消失，通常可以预测。发生率高，大概占药物不良反应的 70%-80%，但是死亡率低。例如药物在循环中分布的量和范围取决于局部血液量和药物穿透细胞膜的难易程度，心排出量也对药物分布及组织灌注速率起着决定性作用。经由肝代谢的利多卡因 (Lidocaine)，主要受肝血流的影响，当心衰，出血或者静脉滴注去甲肾上腺素时，肝血流量减少导致利多卡因消除率降低，便会引发与之相关的 A 型药物不良反应。A 型药物不良反应同时也和机体差异及靶器官的敏感性有关。神经递质、激素和某些维生素等，主要通过与其特异受体结合来发挥其药理作用。个体间的受体的数量上存在不同，受体的敏感性也往往可受到其它药物影响。例如乙诺酮 (Norethandrolone) 本身并不具有抗凝作用，但当与抗凝药华法令 (Warfarin) 合用时，则可加强后者的抗凝作用而出现 A 型不良反应，主要原因是乙诺酮能够增加华法令对肝脏受体部位的亲和力。

B 型药物不良反应又称为剂量不相关的不良反应 (Non-dose-related adverse reaction)，通常与正常药理作用和剂量无关，预测困难，进行常规的毒理筛选实验通常无法发现和预测。它的发生率较低，一般占药物不良反应的 20%-30%。然而 B 型药物不良反应往往具有较高的死亡率，经常是一些较为严重的不良反应。B 型药物不良反应的发生主要有药物因素和机体因素两方面的原因。药物因素包括药物有效成份的分解产物、添加剂、增溶剂、稳定剂、着色剂、赋型剂、化学合成中产生的杂质等。如四环素 (Tetracycline) 贮存过程中的降解产物，即可引起范可尼氏综合征。机体因素主要指的是患者遗传水平上的特异性因素，如遗传上的异常的缺陷，暴露在药物下发生的不良反应。如氯霉素 (Chloromycetin) 诱发的再生障碍性贫血；口服避孕药引起的胆汁郁积性黄疸等。大多数药物过敏性反应可归类为 B 型不良反应。包括 I 型 (过敏性休克型)、II 型 (溶细胞型或细胞毒型)、III 型 (局部炎症或坏死反应) 以及 IV 型 (迟缓型细胞反应)。

1.1.2 药物不良反应的机理研究与预测

由于 ADR 具有普遍性，而且可能产生的严重后果，人们迫切的希望能透彻的明白它的发生机制，并且能找到快速而准确的方法，来预测它的产生。这样不但可以减少医学上因为 ADR 所导致的重要生命和财产的损失，减轻病人的痛苦，而且可以指导新药的设计工作，缩短新药的研发周期，尽早规避可能造成严重 ADR 的潜在药物，并为新药的临床试验提供指导和帮助。

1.1.2.1 传统的 ADR 研究方法

传统 ADR 研究方法，主要以动物实验，体外试验和临床研究为主。

动物实验是通过动物为模型进行研究，观察动物在给药后的不良反应，根据动物不良反应的情况分析，为药物对人体不良反应研究提供预测和参照。例如俄罗斯研究者在使用铂类抗癌药对实验鼠进行的研究中发现，铂类抗癌药物对实验鼠生殖健康会造成损害，而且对雌性鼠的损害要较雄性鼠来的大，抗癌效果越好的铂类抗癌药，对实验鼠健康的损害就越大。从而推断铂类抗癌药对人体的生殖器官，可能也有类似的损害。使用动物学模型进行 ADR 机理的研究，虽然能提供一定的参考，可是动物模型与人类之间毕竟存在着显著的区别，动物模型上的研究成果，套用到人类身上必然有偏差，甚至有截然不同的结果。抗 CD28 人源化单克隆抗体 TGN1412，在动物实验中是安全的，在 I 期临床试验中却出现了灾难性的意外。6 名接受药物注射的志愿者在接受小于动物安全剂量 500 倍的初次注射后，出现了危机生命的严重不良反应。经过抢救，6 名志愿者虽然无 1 例死亡，但反应最严重的志愿者，在重症监护病房住院治疗 3 个多月后，因药物不良反应导致脚趾和手指缺血坏死而接受全部足趾切除术和 3 个手指部分切除术^[6]。因此，利用动物模型有着显著的局限性，效率低成本高。

体外实验一定程度上克服了动物实验的不足，采用的是人体的细胞，并可模拟体内的环境进行研究。在采用蛋白质组学技术使用地高辛对体外培养的人脐静脉内皮细胞（HUVEC）进行毒理学研究时，Qiu 等发现 HSP60 表达量增加了，进而根据 HSP60 表达量的异常推断出地高辛对内皮细胞具有毒害作用^[7]。但是体内细胞毕竟无法代替人体环境，体外实验仍不能克服效率低，自动化操作程度低，

结果影响因素多等不足，在 ADR 研究和预测的应用中受到一定限制。

临床研究在药物不良反应中是必不可少的，每个新药从研发到上市，都必须经过临床药理和毒性试验。可是由于临床试验花费较大，而且可能对人体产生危害，甚至危及生命，在临床研究是必须的可是又是受限的。而且临床研究对于从分子角度阐明 ADR 发生的机制，并没有很好的办法。

1.1.2.2 计算机辅助 ADR 机理研究及预测

传统的 ADR 机理研究都有其缺点和局限性，计算机辅助药物设计和生物信息学的发展，为 ADR 研究指明了一条低成本，高效率的新路。计算机辅助 ADR 机理研究，能够摆脱传统 ADR 研究耗费大，耗时长，效率低的劣势，能够对 ADR 进行快速，全面，系统性的研究，具有其独特的优势。生物信息学为 ADR 的机理研究，提供了新方法，新手段。生物信息学数据库，为 ADR 研究提供了坚实的基础，而各种生物学软件的开发和使用，则为 ADR 研究插上了新的翅膀。

1.1.2.2.1 生物信息学数据库辅助 ADR 机理研究

生物信息学是以计算机为工具对生物学数据进行储存、检索、分析和处理的一门学科，数据库是生物信息学应用的基础。ADR，在较多情况下是药物小分子或其代谢产物与特定蛋白质作用的结果。药物，蛋白质，ADR，这三者理应是密切联系的。可是这 3 者的数据，却存在于不同的数据库之中，内容繁杂，甚至看不到关联性。想要研究药物所引起的 ADR，了解其产生的机理，我们就必须找到一个合适的方法，将这一切分散的数据联系起来，形成一个完整而严密的链条。药物小分子及化合物结构相关的数据库，ADR 相关蛋白数据库，以及具体 ADR 表征数据库。是我们在进行 ADR 研究中必须了解的数据库。

药物小分子数据库的代表是加拿大的 DrugBank 数据库^[8]。该数据库收录了 4800 个药物细节描述信息和相关的药物的靶标数据，包括药物化学数据（分子式，CAS 编号，化学结构等），药理学数据（作用机制，疗效，代谢途径等），制药学数据（制剂类型，体内半衰期等），全面而广泛的介绍了药物本身的化学特性及体内作用信息。

ADR 相关蛋白数据库方面，许多线粒体蛋白都已经被证实是 ADR 的靶点蛋

白，从线粒体工程数据库（Mitochondria Project Database）中可以得到这些蛋白相关信息得到。G 蛋白偶联受体家族和谷氨酸盐受体家族中一些特定成员也已被证明是 ADR 靶点蛋白，一些药物转运子也是 ADR 靶点蛋白。相关的数据库，有酶数据库（The ENZYME Database），G 蛋白偶联受体数据库（Information System for G Protein coupled Receptors, GPCRDB），核受体数据库（NRDB），孟德尔遗传法则和线粒体数据库^[9]（The Mendelian Inheritance and The Mitochondria Database），人类跨膜转运子数据库^[10]（The Human Membrane Transporter Database），离子通道数据库等。随着 ADR 研究的日益深入，已有与 ADR 直接相关的蛋白数据库被陆续开发出来，如药物不良反应相关蛋白数据库（Drug Induced toxicity related Protein Database, DITOP）^[11]。

关于 ADR 事件的描述，也有许多专门的数据库。具有代表性的如世界卫生组织（WHO）的个例安全性病例报告数据库 Vigibase。此项与 WHO 国际药物检测合作的计划项目至今有 90 多个国家参与。该数据库中收录了 470 万例 ADR 事件，是目前最完整的个例安全性病例数据库。比较成熟的药物不良反应数据库还有美国国立医学图书馆（NLM）和美国国立卫生研究院（NIH）联合开发的 DailyMed 网站以及 FDA 下属的不良反应呈报系统（Adverse Event Reporting System, AERS）数据库等。药物毒理学数据库中也包含了 ADR 的相关信息。如美国国立图书馆 NLM 主办的数据库 TOXNET（Toxicology Data Network），该数据库涵盖了化合物结构数据库 ChemIDplus，美国环境保护署（U S Environmental Protection Agency）主办的数据库 Distributed Structure-Searchable Toxicity（DSSTox） Database Network 等。这些数据库的信息，详见表 1.1。

表 1.1 ADR 机理研究相关数据库
Table 1.1 Databases for mechanism research of ADR

生物信息学数据库	网址
Drug Bank	http://www.drugbank.ca/
MITOP- Mitochondrial Proteome	http://ihg.gsf.de/mitop2/start.jsp
Cytochrome P450 Homepage of Nelson's	http://drnelson.utmem.edu/cytochromep450.html
Information System for G Protein coupled Receptors (GPCRDB)	http://www.gpcr.org/7tm/
The ENZYME Database	http://www.expasy.ch/enzyme/enzyme_details.html
the Human Membrane Transporter Database	http://lab.digibench.net/transporter/
Drug Induced Toxicity related Protein Database (DITOP)	http://bioinf.xmu.edu.cn/databases/ADR/index.html
Vigibase	http://www.druglogic.com/
Daily Med	http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/about.cfm
Toxicology Data Network (TOXNET)	http://toxnet.nlm.nih.gov/index.html
Distributed Structure-Searchable Toxicity Public Database Network (DSSTox)	http://www.epa.gov/NCCT/dsstox/
Adverse Event Reporting System (AERS)	http://www.fda.gov/cder/aers/default.htm

1.1.2.2.1 生物信息学软件辅助 ADR 机理研究

随着生物信息学技术的不断发展,对药物不良反应及毒理学研究方面的迫切需求,催生了一系列相关软件的开发,这些软件主要进行化合物毒性方面的预测,判断相关化合物或药品的毒性,这些系统被称作专家系统^[12]。有关这些软件的有效性,各国研究者进行了多方面的研究进行评估^[12-17],证明了在一定的范围内,其具有相对可靠的预测结果,为化学家,毒理学家和制药公司在进行研究和药品开发时提供技术支持,避免了不必要的投入和损耗,少走弯路。目前,大多数的计算机毒性预测的专家系统都是基于定量构效关系(Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR)模型。QSAR 模型的理论基础源于 Crum Brown 在 1868-1869 年提出被人们广泛接受的理论:“一种物质的生理学反应活性与它的化学组成及结构密切联系^[18]。” QSAR 模型根据化合物及其所在环境设定的描述子来定义化合物的特性,根据描述子的差异定义 QSAR 的维度。计算机毒性预测的专家系统必须包含药物分子化学结构和生物活性数据(毒理及不良反应数据)两方面的信息。目前,专家系统主要分为基于数据统计的专家系统和基于知识的专家系统两类^[19]。

基于数据统计的专家系统,原理是通过对一组化合物的分子结构数据和它对应的生物活性以及毒理学数据二者进行统计分析,建立两者之间的量化关系模型,以此预测化合物潜在的毒性及不良反应,如 TOPKAT^[20], CASE/MultiCASE^[21] 等软件。而基于知识库的专家系统,则是通过将专家的知识及毒理学研究成果建立知识库,使用系统内置的知识库来预测化合物的毒理学信息及可能诱导的不良反应。代表如 DEREK^[22], HazardExpert, OncoLogic^[23], 等。

TOPKAT 是数据统计为基础专家系统的典型代表,基于 QSAR 原理,用多线性回归方程和线性判别式回归的统计学方式建模。它包含了多个模块,每个模块都有一个数据库和一个 QSAR 模型。数据库为严格筛选的异质数据库;QSAR 模型主要使用分子形状指数,分子连接性和分子电荷等基于拓扑学的描述符。TOPKAT 利用不同模块来预测不同的不良反应。如致癌、致畸、致过敏、致突变等。它会为预测可信度提供一个评估值,帮助研究者判断预测结果的可信度。经过研究者对其可靠性的考察, TOPKAT 的准确率是令人满意的。

DEREK 是以基于知识专家系统的代表。知识库中的储存了通过已知毒物学

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库