研究论文

皂苷类似物与肾素的分子对接和结合能分析

张海玲[1]，光翠娥[*1]，江 波[1]，汪俊卿[2]，桑尚源[1]
（1. 食品科学与技术国家重点实验室 江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：肾素是治疗高血压疾病的重要靶标之一，对肾素抑制剂大豆皂苷 I 及其类似物大豆皂苷 II、甘草皂苷、单葡萄糖醛酸甘草皂苷元与肾素进行分子对接，采用分子动力学模拟和 MM-PBSA 相结合的方法计算对接复合物的结合自由能，并且对各部分贡献能以及分子间相互作用进行分析。结果表明范德华力和静电相互作用是复合物形成的主要驱动力，S2 和 S3 是肾素和皂苷相互作用重要的活性口袋，Ala229、Asp38、Asp226、Gly228 和 Tyr83 是肾素中与这类抑制剂形成疏水作用的重要氨基酸残基，Ser230、Tyr231、Ser84 则可与抑制剂形成氢键。对接结果与皂苷抑制能力吻合性较好，可为新的肾素抑制剂的发现奠定基础。

关键词：肾素；大豆皂苷 I；分子对接；动力学模拟；结合自由能
中图分类号：Q 71　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)10—1056—07

Molecular Docking of Saponin Analogues with Renin and The Analysis of Binding Energy

ZHANG Hailing[1]，*GUANG Cuie*[*1]，*JIANG Bo*[1]，*WANG Junqing*[2]，*SANG Shangyuan*[1]
（1. State Key Laboratory of Food Science & Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：Renin is one of important targets for the treatment of hypertension. Soyasaponin I and its analogues soyasaponin II，glycyrrhizin and monoglucuronyl glycyrrhetinic（MGGM）were docked with renin，and binding free energy was calculated using molecular dynamics simulation and MM-PBSA docking method. Contributions of various energy types and intermolecular interactions were analyzed. Results showed that the van der Waals force and electrostatic interaction were the main driving force and pockets S2 and S3 were primarily involvedin the binding. Ala229，Val136，Ala317 and Met303 were the key residues for the hydrophobic effect and Ser230，Tyr231 and Ser84 were critical amino acids responsible for the formation of hydrogen bonds. Docking results are in well accordance with inhibition ability，which can be regarded as the foundation for the discovery of new rennin inhibitors.

Keywords：renin，soyasaponin I，molecular docking，dynamics simulation，binding free energy

收稿日期：2014-03-14
基金项目：国家自然科学基金项目(31201289)；食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题(SKLF-ZZB-201208)。
*通信作者：光翠娥(1976—)，女，湖北仙桃人，工学博士，副教授，主要从事食品营养与功能因子研究。E-mail：guang1226@hotmail.com

随着现代社会人口老龄化进程的不断加快，罹患高血压的人群逐年增加，心血管疾病、糖尿病、充血性心脏衰竭、肾功能异常等并发症同时增加。肾素-血管紧张素系统(RAS)参与体液和血压的内分泌调控进而控制血管收缩，调节心血管功能和肾功能并维持身体电解质平衡，RAS 过度激活导致血管结构和功能损伤引起高血压疾病 [1]。肾素是催化 RAS 的关键限速酶，通过抑制肾素的活性则可阻断 RAS，因此肾素一直是被人们关注的重要靶点。很多研究发现，一些皂苷类的化合物对心脑血管疾病以及肾疾病有良好的治疗效果，已经确定的大豆皂苷 I 及其类似物大豆皂苷 II、甘草皂苷、单葡萄糖醛酸甘草皂苷元与肾素具有生物活性作用。

随着核磁共振和 X 射线衍射方法的发展，越来越多的蛋白质的三维结构被测出来。分子对接是分子模拟的方法之一，研究受体大分子和配体小分子结合作用，预测分子之间最佳的结合模式，并通过研究两者对接结合的能量、作用位点、关键残基等方面评价受体与配体的相互作用[2]，是预测和研究小分子配体与大分子蛋白质受体相互作用模式的重要方法[3]。因此，在基于肾素和皂苷结构的基础上进行分子对接，进而分析对接复合物相互作用的轮廓是否存在相似性，并揭示肾素的活性与皂苷相互作用氢键、疏水作用和重要残基氨基酸，探讨皂苷对于肾素的抑制机理。

1 材料与方法

1.1 肾素的结构与模型的选取

从蛋白质晶体结构数据库(http://www.rcsb.org/pdb/)中下载初始结构为 Renin-indole-piperazinj 复合物结构 (PDB ID:3OOT)，小分子配体为 C8H15NO6 和 C28H28FN3O2，利用 Discovery Studio 2.5(DS)软件去掉小分子配体和水分子得到肾素的三维结构并作为受体用于后续的对接过程。

1.2 大豆皂苷 I 及其类似物结构的获取

在 chemicalbook 网站库 (http://www.chemical-book.com)中下载大豆皂苷 I 三维结构，然后在大豆皂苷 I 的三维结构基础上利用 pymol 软件 [4](http://pymol.org)绘制出大豆皂苷 II(soyasaponin II)、甘草皂苷 (glycyrrhizin)、单葡萄糖醛酸甘草皂苷元(MGGM)的三维结构，图 1 为 4 种皂苷的分子结构。

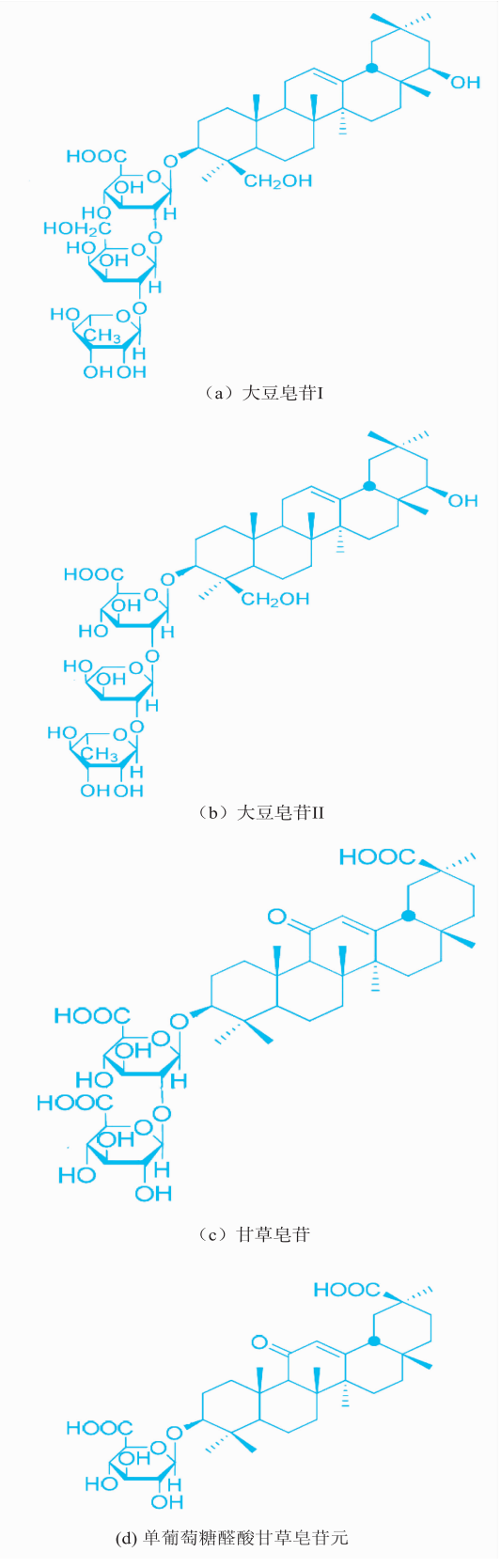


图 1 4 种皂苷分子结构

Fig. 1 Molecular structure of four saponins

1.3 肾素与皂苷的分子对接

分子对接使用的是北京创腾科技有限公司的Discovery Studio(DS)软件,肾素作为为受体并删掉其中的水分子,4 种皂苷作为对接配体,将距肾素活性中心的 Asp226 20×10^{-9} cm 内的范围定义为拟对接区域,并添加 CHARMm 力场,按照王红寅等[5]人所述方法运用 Discovery Studio 2.5 软件对配体和受体空间结构进行分子对接,可能构象模式采用 Libdock 模块进行收集。运用 DS 程序包对对接复合物的空间结构分别进行两次能量优化,即先采用最陡下降法(Steepest Descent)优化 1 000 步,再采用共轭梯度法(Conjugate Gradient)优化 2 000 步。基于优化后的空间结构使用 DS 软件统计肾素活性位点内的氨基酸残基,并用 Ligplot+软件[6]得到分子间相互作用网,统计受体中与配体产生氢键作用以及疏水作用的氨基酸残基,并对复合物的空间作用力进行分析。

1.4 对接复合物结合自由能的计算

分子力学泊松-波尔兹曼表面积(Molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area,MM-PBSA)法是一种常用于受体与配体分子对接后计算结合自由能值(binding free energy,ΔG_{bind})的方法[7-9],ΔG_{bind} 值越低说明受体与配体之间的亲和力越高[10,11]。通过 MM-PBSA 方法可以将分子作用力进行分解,更为直观的分析各种相互作用的贡献。

2 结果与分析讨论

2.1 肾素和抑制剂分子对接和结合自由能计算

4 种皂苷和肾素进行分子对接和优化后,按照公式(1)进行对对接复合物的结合自由能进行计算,结果如表 1 所示。大豆皂苷 I、大豆皂苷 II、甘草皂苷以及单葡萄糖醛酸甘草皂苷元与肾素的结合自由能均小于零,表明这些皂苷均能对肾素起到不同程度的抑制作用,其中大豆皂苷 I、大豆皂苷 II 和甘草皂苷对肾素的抑制效果接近,结合自由能均在-35×4.8=-168 kJ/mol 左右,而甘草皂苷的抑制效果则相对较差,结合自由能仅为-12.24 kJ/mol。结合自由能反映了受体和配体结合的稳定性[12],将计算所得的结合自由能与 4 种皂苷的 IC_{50} 值进行比较,发现使用 MM-PBSA 计算所得的结果能够较好的契合 Saori Takahashi[13]等人的实验结果,如图 2 所示,R^2 为 0.79,表明使用该方法预测皂苷对肾素的抑制能力具有一定的可行性。

表 1 对接复合物的结合自由能

Table 1 Binding free energy of docking compounds

皂苷	ΔE_{vdW}/(kJ/mol)	ΔE_{elec}/(kJ/mol)	ΔG_{PB}/(kJ/mol)	ΔG_{SUR}/(kJ/mol)	ΔG_{bind}/(kJ/mol)
soyasaponin I	-392.835	-384.043	641.087	-39.260	-175.052
soyasaponin II	-340.400	-398.919	628.002	-39.265	-150.581
glycyrrhizin	-304.295	-282.711	571.488	-35.644	-51.162
MGGA	-270.363	-273.038	414.364	-28.279	-157.315

注:ΔE_{vdW} 为气相下皂苷与肾素残基间的范德华作用;ΔE_{elec} 为气相下皂苷与肾素残基间的静电相互作用;ΔG_{PB} 为皂苷与肾素残基间的极性溶剂化能;ΔG_{SUR} 为皂苷与肾素残基间的非极性溶剂化能;ΔG_{bind} 复合物的总的结合自由能。

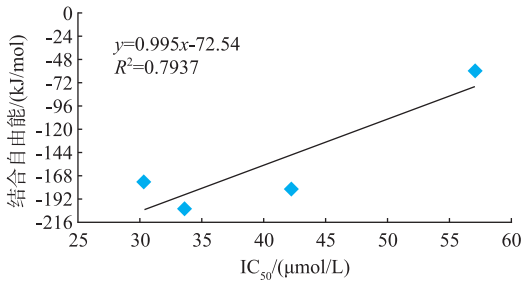


图 2 结合自由能和 IC_{50} 值相关性

Fig. 2 Correlation between binding free energy and IC_{50}

表 1 中列出了对结合自由能贡献的各项能量值,通过图 3 中各种作用力可以看出,ΔE_{vdW},ΔEelec 和 ΔG_{SUR} 均为负值,表明 4 种肾素抑制剂和肾素之间的范德华力,静电相互作用和非极性溶剂化能对于肾素抑制剂和肾素的结合自由能都起到促进作用。在 4 种皂苷和肾素形成的复合物中,ΔE_{vdW} 和 ΔE_{elec} 在 ΔG_{bind} 中占有主导地位,表明范德华力和静电相互作用对于 4 种皂苷和肾素之间的结合能作用贡献比较大(>90%)。

大豆皂苷 I、大豆皂苷 II、甘草皂苷和单葡萄糖醛酸甘草皂苷元与肾素形成复合物的范德华力分

别为–93.97、–81.43、–72.79、–64.68 kJ/mol，大豆皂苷 I 和大豆皂苷 II 的范德华力比甘草皂苷和单葡萄糖醛酸甘草皂苷元大。虽然静电相互作用也对 4 种抑制剂与肾素复合物的形成有促进作用，但是较强的极性溶剂化能抵消这部分作用力，阻碍皂苷和肾素的结合。

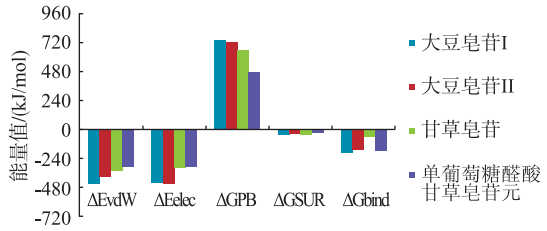


图 3　结合自由能各能量示意图

Fig. 3　Diagram: each energy contribution value in binding free energy of eight groups complexes

2.2　皂苷和肾素形成的疏水作用分析

非极性相互作用能对结合自由能有促进作用，肾素可与 4 种皂苷结合形成较多的疏水相互作用。表 2 为通过 Ligpiot 软件统计肾素和 4 种皂苷相互作用的疏水氨基酸残基。

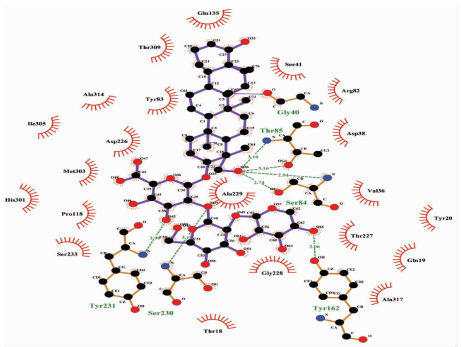
通过图 4 分析可得，氨基酸残基 Ala229、Asp38、Asp226、Gly228 和 Tyr83 与 4 种皂苷在肾素与 4 种皂苷的结合过程中都参与形成疏水相互作用，表明这 4 种氨基酸是参与肾素和皂苷抑制剂结合的重要氨基酸位点。此外，分析还发现 Ala317、Gln19、Met303、Thr18、Tyr20 和 Val36 在肾素与大豆皂苷 I、大豆皂苷 II 和甘草皂苷结合过程中形成疏水相互作用，His301 同时参与肾素与大豆皂苷 I、大豆皂苷 II 和单葡萄糖醛酸甘草皂苷元结合形成疏水相互作用，Ser41 同时大豆皂苷 I、甘草皂苷和单葡萄糖醛酸甘草皂苷元形成疏水作用，Gly40 与大豆皂苷 II、甘草皂苷和单葡萄糖醛酸甘草皂苷元形成疏水作用。

综上所述，范德华力是肾素与 4 种皂苷结合形成复合物主要驱动能之一，大豆皂苷 I 和大豆皂苷 II 的范德华力与甘草皂苷和单葡萄糖醛酸甘草皂苷元相比要高，表明疏水作用可能是大豆皂苷 I 和大豆皂苷 II 对肾素抑制效果较好的重要原因。此外，分析还发现 Ala229、Asp38、Asp226、Gly228 和 Tyr83 是肾素与皂苷类抑制剂结合过程中形成疏水作用的重要氨基酸残基。

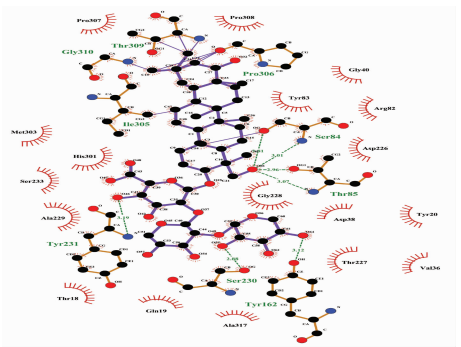
表 2　肾素中与抑制剂疏水作用的氨基酸残基

Table 2　Amino acid residues of renin reacted with inhibitors

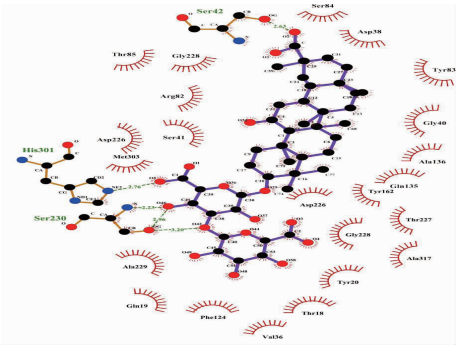
皂苷	关键氨基酸残基
大豆皂苷 I	Ala229, Ala317, Ala314, Arg82, Asp38, Asp226, Gln19, Gln135, Gly228, His301, Ile305, Met303, Ser233, Pro118, Ser41, Thr18, Thr227, Thr309, Tyr20, Tyr83, Val36
大豆皂苷 II	Ala229, Ala317, Arg82, Asp38, Asp226, Gln19, Gly40, Gly228, His301, Met303, Pro307, Pro308, Ser233, Thr18, Thr227, Tyr20, Tyr83, Val36
甘草皂苷	Ala136, Ala229, Ala317, Arg82, Asp38, Asp226, Gln19, Gln135, Gly40, Gly228, Met303, Phe124, Ser41, Ser84, Thr18, Thr85, Thr227, Tyr20, Tyr83, Tyr162, Val36
单葡萄糖醛酸甘草皂苷元	Ala136, Ala229, Ala314, Arg82, Asp38, Asp226, Gly40, Gly228, His301, Ile137, Ile305, Ser41, Thr85, Tyr83



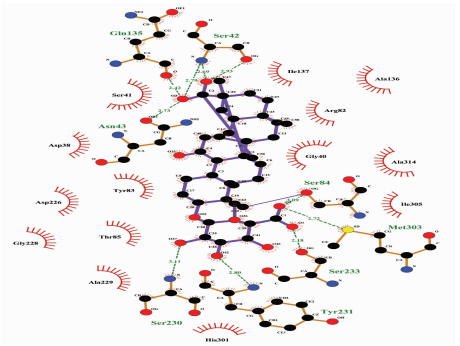
(a) 大豆皂苷I



(b) 大豆皂苷II



(c) 甘草皂苷



(d) 单葡萄糖醛酸甘草皂苷元

图 4　肾素和抑制剂分子间相互作用分析

Fig. 4　Intermolecular interaction analysis between renin and inhibitors

2.3　皂苷与肾素形成的氢键和配位键分析

通过对 4 种复合物结合自由能的分析,可以看出极性相互作用很大程度上表现为阻碍肾素和抑制剂皂苷的结合,但是并不是形成极性作用的氨基酸残基都不利于复合物的形成,例如 Ser230、Tyr231 和 Ser84 等氨基酸残基在结合过程中都表现出了有利于结合自由能的极性作用,因为在结合过程中它们和皂苷能形成稳定的氢键作用。通过图 2 中 Ligplot 软件得到的分子间相互作用网,将体系中较为稳定的氢键作用统计在表 3 中。虽然一些具有极性作用的氨基酸残基形成了氢键作用,但是远小于溶剂化能作用,结果极性相互作用总体上讲还是阻碍肾素和肾素抑制剂的结合。

2.4　肾素活性口袋的氢键和疏水作用

肾素是肾素原经激活酶转化而生成的一种天冬氨酸蛋白酶,呈二叶体结构,每个叶体上的裂隙内都存在肾素的活性位点,肾素主要的活性位点区域可分为 S3sp,S3,S2,S1,S1',S2'[14],将 4 种皂苷和肾素进行分子对接后统计肾素活性口袋内参与形成氢键的氨基酸残基,结果如图 5 和表 4 所示。

通过表 4 中肾素活性口袋的氢键分析可得,皂苷和肾素形成的氢键作用主要是在 S3sp、S3、S1、S2、和 S2'活性口袋,在肾素的 S1'活性口袋内不存在氢键作用。肾素与大豆皂苷 I 和大豆皂苷 II 形成氢键的活性口袋十分相似，这是因为大豆皂苷 I 和大豆皂苷 II 的结构十分相似,都主要是在 S3sp,S3,S2,S1 区域分别和 Tyr162,Ser230,Tyr231 和 Tyr85、Ser84 等氨基酸残基形成氢键；甘草皂苷形成氢键的活性口袋则主要位于 S3 和 S2 口袋;单葡萄糖醛酸甘草皂苷元形成氢键的活性口袋主要位于 S3,S2,S1 和 S2'区域。通过相同活性口袋内的氨基酸类型分析可得,肾素的氨基酸残基 Ser230 与 4 种皂苷都可以形成氢键作用，在 S3 活性口袋内;Tyr231

表 3　4 种复合物中氢键分析

Table 3　Hydrogen bond analysis of four compounds

	氢键	配体原子	受体原子	键长/10^{-10} m
大豆皂苷 I	1	O26	Ser84–N	2.94
	2	O26	Ser84–OH	2.74
	3	O37	Ser230–N	3.18
	4	O26	Thr85–OH	3.16
	5	O26	Thr85–N	3.16
	6	O42	Tyr231–N	2.90
	7	O66	Tyr162–OH	3.06
大豆皂苷 II	1	O26	Ser84–N	3.01
	2	O26	Ser84–OH	2.81
	3	O37	Ser230–N	2.88
	4	O26	Thr85–OH	2.96
	5	O26	Thr85–N	3.07
	6	O42	Tyr231–N	3.19
	7	O66	Tyr162–OH	3.12
甘草皂苷	1	O46	Ser230–N	2.23
	2	O46	Ser230–OH	2.96
	3	O42	Ser230–OH	3.20
	4	O2	Ser42–OH	2.63
	5	O2	His301–N	2.76
单葡萄糖醛酸甘草皂苷元	1	O4	Ser42–N	2.69
	2	O3	Ser42–N	2.79
	3	O4	Ser42–OH	2.93
	4	O2	Ser84–OH	3.09
	5	O37	Ser230–N	3.11
	6	O1	Ser233–OH	2.81
	7	O46	Ser233–OH	2.67
	8	O3	Asn43–OH	2.73
	9	O42	Tyr231–N	2.80
	10	O2	Met303–SH	2.72

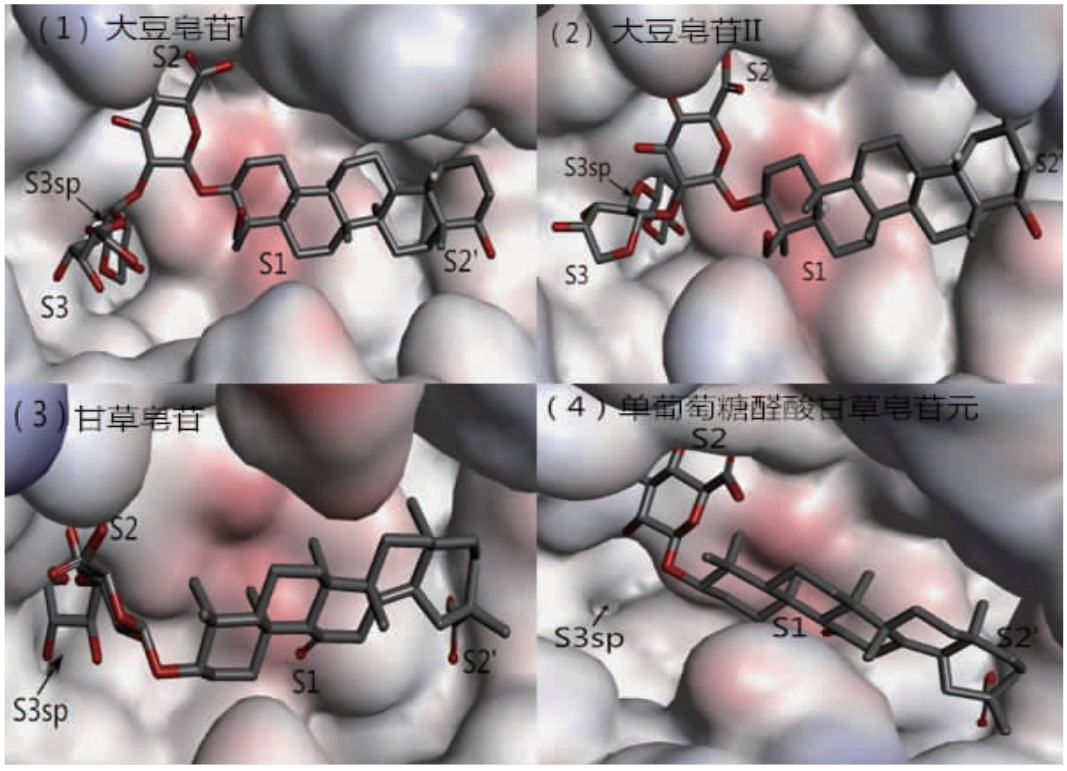


图 5　皂苷与肾素的活性口袋的对接

Fig. 5　Docking between eight saponins and activity pockets of renin

表 4　肾素活性口袋内的与皂苷具有氢键作用的氨基酸残基

Table 4　Amino acid residues inside renin activity pockets interaction with saponins by hydrogen bondings

皂苷	S3sp	S3	S2	S1	S2’
大豆皂苷 I	Tyr162	Ser230	Tyr231	Tyr85,Ser84,	Gly40
大豆皂苷 II	Tyr162	Ser230	Tyr231	Tyr85,Ser84	—
甘草皂苷		—	Ser230,His301	Ser42	—
单葡萄糖醛酸甘草皂苷元	—	Ser233	Tyr231,Ser230	Ser84,Met303	Ser42,Asn43

在 S2 口袋内可以与大豆皂苷 I、大豆皂苷 II、单葡萄糖醛酸甘草皂苷元形成氢键作用；活性口袋 S1 内 Ser84 在可与大豆皂苷 I、大豆皂苷 II、单葡萄糖醛酸甘草皂苷元木鳖子皂苷 Ic 形成氢键作用。因此，皂苷和肾素形成氢键作用的主要氨基酸残基 Ser230、Tyr231 和 Ser84 主要分布在 S3、S1、S2 活性口袋，这些口袋是形成氢键作用是主要活性区域。

将皂苷和肾素之间疏水相互作用的氨基酸残基对应肾素的活性口袋进行分析发现，S3sp，S3，S2，S1，S1’和 S2’ 6 个活性口袋内都有较强的疏水相互作用（见表 5）。8 组皂苷与氨基酸残基 Asp38 和 Arg82 是在 S1 活性口袋形成疏水作用，Asp226 和 Tyr83 是在 S1’活性口袋形成疏水作用，与 Ala229 在 S3 活性口袋形成疏水作用；Met303 和 His301 在 S2 活性口袋和皂苷形成疏水作用；Gly228、Val36 和 Tyr20 在 S3sp 活性口袋形成与皂苷形成疏水作用；Gln19、Thr18 和 Thr18 在 S3 活性口袋和皂苷形成疏水作用；Gly40、Gln135、Ser41 和 Ile137 在 S2’活性口袋和皂苷形成疏水作用。

综上可以得出，肾素和皂苷在 6 个活性口袋内都存在较强的疏水相互作用，并明确得出了每个活性口袋内形成疏水相互作用的关键残基氨基酸。

3 结　语

对大豆皂苷 I 及其类似物大豆皂苷 II、甘草皂苷和单葡萄糖醛酸甘草皂苷元与肾素进行分子对

表 5 肾素活性口袋内与皂苷具有疏水作用的氨基酸残基

Table 5 Amino acid residues inside renin activity pockets interaction with saponins by hydrophobic effect

皂苷	S3sp	S3	S2	S1	S1'	S2'
大豆皂苷 I	Ala317,Tyr20, Val36,Gly228	Ala229, Tyr18, Gln19,	Met303, His301	Asp38,Arg82	Asp226,Tyr83	Gln135,Ser41
大豆皂苷 II	Ala317,Tyr20, Val36, Gly228	Ala229, Tyr18, Gln19,	Met303, His301	Asp38,Arg82	Asp226,Tyr83	Gly40,Ser41
甘草皂苷	Ala317,Tyr20, Val36, Gly228	Ala229, Tyr18, Gln19	Met303	Asp38,Arg82	Asp226,Tyr83	Gly40,Gln135, Ser41
单葡萄糖醛酸甘草皂苷元	Gly228	Ala229	His301	Asp38,Arg82	Asp226,Tyr83	Gly40,Ser41, Ile137

接，并对 4 种复合物分别采用分子动力学模拟和 MM-PBSA 方法计算结合自由能，计算结果和实验值测得的抑制剂抑制能力相接近。通过对结合能能量分解表明范德华力和静电力是形成能够形成复合物的主要驱动力，非极性溶剂化能对于复合物形成的促进作用较小。通过活性口袋氢键分析可以得出，S2、S3 和 S1 是肾素和皂苷形成氢键作用重要的活性口袋，Ser230、Tyr231 和 Ser84 等氨基酸残基是肾素和皂苷类抑制剂形成氢键作用的主要的氨基酸残基。范德华力主要来自于非极性氨基酸形成的疏水作用，通过 Ligpiot 软件以及分析活性口袋内的疏水作用得出，每个活性口袋是肾素和皂苷形成疏水作用的活性区域，Ala229、Asp38、Asp226、Gly228 和 Tyr83 是肾素与皂苷类抑制剂结合过程中形成疏水作用的重要氨基酸残基。

参考文献：

[1] Gwathmey T M,Pendergrass K D,Reid S D,et al. Angiotensin-(1-7)-Angiotensin-Converting Enzyme 2 Attenuates Reactive Oxygen Species Formation to Angiotensin II Within the Cell Nucleus[J]. **Hypertension**,2010,55:166-171.

[2] 陈凯先,蒋华良,嵇汝运. 计算机辅助药物设计:原理,方法及应用[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000.

[3] Reinikainen T L,Ruohonen L,Nevanen T,et a1. Investigation of the function of mutated cellulose-binding domains of Trichoderma reesei cellobiohydrolase I[J]. **Proteins:Structure,Function and genetics**,1992,14(4):475-482

[4] Schrodinger,Llc. The PyMOL Molecular Graphics System,Version 1. 3r1. 2010.

[5] 王红寅,林东强,姚善,等. 4-巯乙基吡啶配基与 IgG 相互作用的分子模拟研究[J]. 化学学报,68(16):1597-1602.

[6] Wallace A C,Thornton J M,Laskowski R A. LIGPLOT:a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions [J]. **Protein Engineering**,1995,8(2):127-134.

[7] Zhang Y,Pan D B,Shen Y L,et al. Understanding the molecular mechanism of the broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01 from the perspective of molecular dynamics simulation and binding free energy calculations [J]. **Journal of Molecular Modeling**,2012,18:4517-4527.

[8] Wang J,Morin P,Wang W. Use of MM-PBSA in reproducing the binding free energies to HIV-1 RT of TIBO derivatives and predicting the binding mode to HIV-1 RT of Efavirenz by docking and MM-PBSA[J]. **American Chemical Society**,2001,123:5221-5230.

[9] De Grandis V,Bizzarri A R,Cannistraro S. Docking study and free energy simulation of the complex between p53 DNA-binding domain and azurin[J]. **Journal of Molecular Recognition**,2007,20:215-226.

[10] Takamatsu Y,Sugiyama A,Purqon A,et al. Binding free energy calculation and structural analysis for antigen-antibody complex [J]. **AIP Conference Proceedings**,2006,832:566-569.

[11] Schrodinger,Llc. The Pymol molecular graphics system,Version 1. 3r1. 2010.

[12] Guang C E,Shang J G,Jiang B. Transport of traditional Chinese pimple milk-derived angiotensin-converting enzyme(ACE) inhibitor peptides across a Caco-2 cell monolayer and their molecular recognition with ACE [J]. **Journal of Food,Agriculture & Environment**,2012,Vol.10(3& 4):40-44.

[13] Takahashi S,Hori K,Hokari M,et al. Inhibition of human renin activity by saponins [J]. **Biomedical Research**,2010,31(2):155-159.