

复方一枝蒿抗流感有效成分的网络药理学研究

许律捷^{1†}, 姜雯^{2†}, 庞晓丛¹, 康德¹, 熊婉迪¹, 刘睿¹, 邢建国³,
刘艾林^{1*}, 杜冠华¹

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 新疆医科大学第六附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830002; 3. 新疆药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002)

摘要: 复方一枝蒿由板蓝根、大青叶、一枝蒿 3 味中药组成, 主要用于治疗感冒发烧, 临床疗效明显, 但其作用机制尚不明确。本文通过对流感病毒相关靶点和复方一枝蒿化学成分的收集, 采用朴素贝叶斯算法, 基于分子指纹和分子描述符, 建立抗流感多靶点预测平台; 利用靶点预测平台, 对复方一枝蒿的有效成分及其作用靶点进行预测, 并利用网络开发专业软件, 构建了化学成分-靶点网络及靶点-通路网络, 以揭示复方一枝蒿的多种有效成分抗流感病毒的网络药理机制, 为进一步研究复方一枝蒿抗流感的作用机制提供理论依据。

关键词: 复方一枝蒿; 流感; 药物靶点; 朴素贝叶斯分类模型; 分子指纹; 分子描述符; 网络药理学
中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2017) 05-0745-08

Network pharmacology study of the effective constituents in the Compound Yizhihao against influenza disease

XU Lü-jie^{1†}, JIANG Wen^{2†}, PANG Xiao-cong¹, KANG De¹, XIONG Wan-di¹, LIU Rui¹,
XING Jian-guo³, LIU Ai-lin^{1*}, DU Guan-hua¹

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. The Sixth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumchi 830002, China; 3. The Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumchi 830002, China)

Abstract: Compound Yizhihao, consists of Radix isatidis, Folium isatidis, Artemisia rupestris, has a significant therapeutic effect on the treatment of influenza and fever. However, the mechanism of its action is still unclear. In this investigation, we collected the key target molecule of influenza disease and the chemical constituents of Compound Yizhihao, and developed Naïve Bayesian classification models based on the input molecular fingerprints and molecule descriptors. The built models were further applied to construct classifiers for predicting the effective constituents. We used the professional network-building software to build the constituent-target network and target-pathway network, which revealed the network pharmacology of the effective constituents in Compound Yizhihao. It will contribute to the further research of mechanism of Compound Yizhihao.

Key words: Compound Yizhihao; influenza; drug target; Naïve Bayesian classification model; molecular fingerprint; molecule descriptor; network pharmacology

收稿日期: 2016-12-05; 修回日期: 2017-01-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673480); 北京市自然科学基金资助项目 (7152103); 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市科学技术局项目 (Y151310010).

†共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-83150885, E-mail: liuailin@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1172

流行性感 冒 (流感) 是由流感病毒引起的急性呼吸系统传染病, 每年在全球范围内爆发的季节性流感可使全球 5%~15% 的人口发病, 死亡人数约为 300 000~500 000 例, 对人类的健康造成严重威胁。流感具有发病率高、起病迅速、传播快和变异性强的特点, 目前经美国 FDA 批准上市的抗流感药物金刚烷胺类和神经氨酸酶 (NA) 抑制剂奥司他韦已有耐药性报道。因此, 研制新型预防或治疗流感的药物仍是目前的研究热点^[1]。

与西药相比, 中药具有综合调节多靶点的特点, 不仅能减轻症状, 而且具有提高人体免疫功能的作用。据报道, 抗流感病毒的中药, 主要有直接和间接抗流感病毒的方式。直接抗病毒是通过阻断病毒繁殖过程中的某一环节而达到抗流感作用; 间接抗病毒是通过促进网状内皮系统的吞噬功能, 诱导干扰素, 促进巨噬细胞活化, 促进白介素产生, 增强机体细胞和体液免疫功能, 从而达到抵御流感病毒入侵的作用^[2]。

复方一枝蒿颗粒是维吾尔医学中治疗感冒的纯中药临床经验方, 收载于《国家中成药标准汇编》, 处方由板蓝根、大青叶、一枝蒿 3 味中药组成, 主要用于治疗咽喉肿痛和感冒发烧等^[3]。根据文献报道, 板蓝根是通过多种化学成分、多个靶点作用来发挥抗流感病毒作用。板蓝根凝集素可阻断新生流感病毒的核蛋白表达而对流感病毒具有直接杀灭作用; 同时尿苷、鸟苷、腺苷等核苷类成分能干扰病毒核酸的合成, 发挥直接的抗流感病毒作用; 另外, 多糖类成分具有免疫调节作用, 发挥间接的抗流感病毒作用^[4-8]。大青叶水提物可从细胞免疫和体液免疫两方面调节免疫功能, 发挥间接的抗流感病毒作用^[8,9]。一枝蒿中的酮酸和黄酮类化合物可以抑制神经氨酸酶活性和膜融合作用, 发挥直接抗流感病毒作用; 一枝蒿的提取物能增强免疫功能, 发挥间接的抗病毒作用^[10-12]。综上所述, 复方一枝蒿具有抑制流感病毒复制和调节机体免疫的双重作用, 推测可能是通过多个网络药理学靶点发挥作用的。但是, 关于复方一枝蒿中具有抑制流感病毒复制及调节机体免疫作用的具体成分及其网络作用机制尚未见系统的研究报道。

本文基于现有的药物靶点数据库和活性化合物数据库, 对流感病毒相关靶点、靶点相关活性化合物及非活性化合物进行收集。在此基础上, 利用朴素贝叶斯算法, 基于分子指纹和分子描述符, 建立了一系列抗流感药物靶点预测模型, 形成了抗流感多靶点预测平台。同时, 对复方一枝蒿的化学成分进行收

集。利用靶点预测平台, 对复方一枝蒿的有效成分及其作用靶点进行预测, 并利用网络开发专业软件, 构建了化学成分-药物靶点网络及药物靶点-生物通路网络, 以揭示复方一枝蒿的多种有效成分抗流感的网络药理机制, 为复方一枝蒿抗流感的开发与临床应用提供理论依据。

材料与方法

中药化学成分的收集 复方一枝蒿共包含 3 味中药, 即板蓝根、大青叶、一枝蒿。这些中草药的化学成分从 TCM-Database@Taiwan 数据库 (<http://tcm.cmu.edu.tw>)^[13]、TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>)^[14]和 PubChem Compound 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>) 获得。

靶点、靶点活性化合物及相应非活性化合物的收集 从 Thomson Reuters Integrity 数据库输入关键词 “influenza”, 收集流感相关靶点。再从 Binding DB 数据库下载各个靶点的活性化合物, 并剔除活性化合物小于 50 个的靶点。利用 Discovery studio 2016 从各个靶点的活性化合物中随机挑选出 10%, 用于在 DUD-E: A Database of Useful (Docking) Decoys — Enhanced (<http://dude.docking.org/>) 数据库收集相应非活性化合物, 并使用 MOE 软件进行相关格式转换。

构建并评价模型 将收集到的靶点活性化合物及相应非活性化合物建立成训练集和测试集, 使训练集和测试集中包含的活性化合物及非活性化合物数目比例为 3 : 1。再利用 Discovery studio 2016 采用朴素贝叶斯 (Naive Bayesian, NB) 的建模方法, 利用分子指纹描述符 ECFP-6 和分子描述符构建了 18 个抗流感重要靶点的理论预测模型, 并通过训练集的五倍交叉验证与测试集验证, 证明这些模型的预测精度。评价预测标准都是以真阳性 (true positive, TP)、真阴性 (true negative, TN)、假阳性 (false positive, FP)、假阴性 (false negative, FN) 的相关组合来评价的。如敏感度 (sensitivity, SE)、精确度 (specificity, SP)、总体预测精度 (overall prediction accuracy, Q)、马修斯相关系数 (Matthews correlation coefficient, MCC) 和受试集工作特征曲线的曲线下面积 (area under the receiver operating characteristic curve, AUC)^[15]。各参数计算公式如下:

$$SE = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$SP = \frac{TN}{TN + FP}$$

$$Q = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

$$MCC = \frac{TP \times TN - FN \times FP}{\sqrt{(TP + FN)(TP + FP)(TN + FN)(TN + FP)}}$$

另外, AUC 数值越大, 说明预测结果越好, 最佳值为 1。

靶点预测 基于上述建模方法构建的针对流感疾病的药物靶点预测平台, 对复方一枝蒿的化学成分进行靶点预测, 进而分析中药有效成分与靶点之间的关联性^[16]。

作用网络分析 基于靶点预测结果利用 Cytoscape-3.2.1 构建化学成分-靶点的作用网络后, 再对中药化学成分作用靶点的代谢通路利用 DAVID 数据库进行 Gene-Ontology (GO) 富集分析, 利用 Cytoscape-3.2.1 构建靶点-通路网络。

结果

1 中药化学成分的收集

通过对 TCM-Database @Taiwan 数据库、TCMSP 数据库及 PubChem Compound 数据库搜索, 合并重复的成分并去除成分中的长链烷烃后, 共收集到板蓝根化学成分 127 个、大青叶化学成分 36 个及一枝蒿化学成分 52 个。

2 流感相关靶点及其活性化合物、非活性化合物的收集

从 Thomson Reuters Integrity 数据库收集到符合

要求的流感疾病相关靶点 18 个, 其中流感病毒蛋白来源的靶点 4 个, 宿主蛋白来源的靶点 2 个, 流感相关抗炎免疫靶点 12 个, 靶点名称、缩写及分类如表 1 所示。并从 Binding DB 数据库收集了各靶点相应的活性化合物, 对化合物数目进行整理, 如图 1 所示。

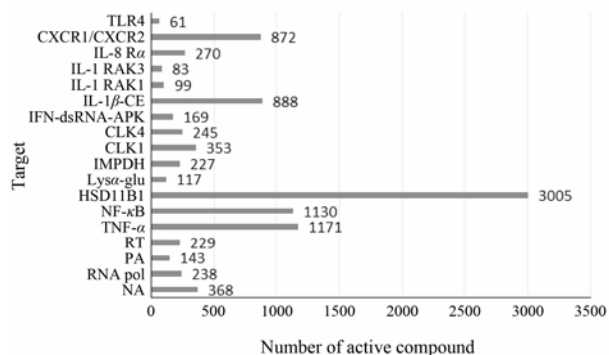


Figure 1 The drug targets and the number of their active compounds

3 构建模型

利用 Discovery studio 2016 构建了 18 个流感疾病相关重要靶点的理论预测模型, 通过训练集 5 倍交叉验证与测试集验证, 检定了这些模型的精确度, 结果如表 2 和表 3。在表 2 中, 所有模型的训练集 5 倍交叉验证结果中 MCC 大于 0.93, AUC 大于 0.98; 在表 3 中, 所有模型的测试集验证结果中的 MCC 大于 0.82, AUC 大于 0.98。说明各模型都具有较高的预测精度, 可用于复方一枝蒿有效化学成分和潜在靶点的预测。

Table 1 Influenza related drug targets and their classification

ID	Influenza related drug target	Abbreviation	Classification of targets
1	Neuraminidase	NA	Protein of influenza virus
2	Viral RNA-directed RNA polymerase	RNA pol	Protein of influenza virus
3	Polymerase acidic protein	PA	Protein of influenza virus
4	Reverse transcriptase	RT	Protein of influenza virus
5	Tumor necrosis factor alpha	TNF- α	Immune-related target
6	NF- κ B	NF- κ B	Immune-related target
7	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase, isozyme 1	HSD11B1	Immune-related target
8	Lysosomal alpha-glucosidase	Lys α -glu	Immune-related target
9	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	IMPDH	Immune-related target
10	Cdc-like kinase 1	CLK1	Host protein
11	Cdc-like kinase 4	CLK4	Host protein
12	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	IFN-dsRNA-APK	Immune-related target
13	Interleukin-1 beta-converting enzyme	IL-1 β -CE	Immune-related target
14	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	IL-1 RAK1	Immune-related target
15	Interleukin-1 receptor-associated kinase 3	IL-1 RAK3	Immune-related target
16	Interleukin-8 receptor alpha	IL-8 R α	Immune-related target
17	Interleukin-8 receptors, cxcr1/cxcr2	CXCR1/CXCR2	Immune-related target
18	Toll-like receptor 4	TLR4	Immune-related target

Table 2 The performance of the training set by 5-fold cross-validation. TP: True positive; FN: False negative; FP: False positive; TN: True negative; SE: Sensitivity; SP: Specificity; Q: The overall prediction accuracy; MCC: Matthews correlation coefficient; AUC: The area under the receiver operating characteristic curve

Target	TP	FN	FP	TN	SE	SP	Q	MCC	AUC
NA	276	0	1	827	1.000	0.999	0.999	0.998	1.000
RNA pol	179	0	1	536	1.000	0.998	0.999	0.996	0.996
PA	106	1	0	321	0.991	1.000	0.998	0.994	1.000
RT	172	0	2	514	1.000	0.996	0.997	0.992	0.996
TNF- α	861	17	52	2 582	0.981	0.980	0.980	0.949	0.981
NF- κ B	833	15	65	2 479	0.982	0.974	0.976	0.939	0.989
HSD11B1	2 210	44	18	6 743	0.980	0.997	0.993	0.982	0.995
Lys α -glu	88	0	2	262	1.000	0.992	0.994	0.985	0.998
IMPDH	166	4	0	510	0.976	1.000	0.994	0.984	0.999
CLK1	261	4	5	790	0.985	0.994	0.992	0.977	0.995
CLK4	182	2	8	544	0.989	0.986	0.986	0.964	0.992
IFN-RNA- PK	125	2	1	380	0.984	0.997	0.994	0.984	0.993
IL-1 β -CE	654	12	11	1 987	0.982	0.994	0.991	0.977	0.996
IL-1 RAK1	74	0	2	220	1.000	0.991	0.993	0.982	0.994
IL-1 RAK3	62	0	1	185	1.000	0.995	0.996	0.989	0.998
IL-8 R α	201	2	1	608	0.990	0.998	0.996	0.990	0.994
CXCR1/CXCR2	653	1	3	1 959	0.998	0.998	0.998	0.996	1.000
TLR4	46	0	0	138	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Table 3 The performance of the test set by 5-fold cross-validation

Target	TP	FN	FP	TN	SE	SP	Q	MCC	AUC
NA	91	1	1	275	0.989	0.996	0.995	0.986	0.999
RNA pol	59	0	1	176	1.000	0.994	0.996	0.989	1.000
PA	34	2	0	108	0.944	1.000	0.986	0.963	0.991
RT	54	3	7	164	0.947	0.959	0.956	0.887	0.993
TNF- α	276	17	59	820	0.942	0.933	0.935	0.838	0.988
NF- κ B	272	10	71	775	0.965	0.916	0.928	0.829	0.990
HSD11B1	729	22	13	2 240	0.971	0.994	0.988	0.969	0.995
Lys α -glu	29	0	0	87	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
IMPDH	54	3	0	171	0.947	1.000	0.987	0.965	0.996
CLK1	86	2	14	250	0.977	0.947	0.955	0.887	0.993
CLK4	58	3	10	173	0.951	0.945	0.947	0.866	0.987
IFN-RNA- PK	42	0	0	126	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
IL-1 β -CE	214	8	16	650	0.964	0.976	0.973	0.929	0.995
IL-1 RAK1	24	1	5	70	0.960	0.933	0.940	0.852	0.991
IL-1 RAK3	21	0	3	60	1.000	0.952	0.964	0.913	0.989
IL-8 R α	67	0	1	200	1.000	0.995	0.996	0.990	1.000
CXCR1/CXCR2	213	5	2	652	0.977	0.997	0.992	0.979	0.998
TLR4	15	0	0	45	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

4 网络机制分析

基于上述模型对复方一枝蒿的板蓝根、大青叶和一枝蒿 3 个单味中药的化学成分分别进行活性预测, 作用于各个靶点的活性化学成分见表 4。并对 3 个单味药中不同作用靶点数目的化学成分的个数进行了统计, 结果见图 2, 这些化学成分平均有 4.67 个作用靶点。在此基础上, 分别对 3 味药中各靶点的活性化合物按化学结构进行分类, 将作用于相同靶点且结

构骨架相似的化合物归为一类, 并选择具有代表性的化合物, 应用 Cytoscape-3.2.1 软件构建了 3 个单味药的化学成分-靶点网络, 见图 3~5。其中涉及到的用 MOL ID 或 Pubchem ID 表示的化合物名称见表 5。从综合结果来看, 作用于靶点 IL-1 β -CE、IL-1 RAK3、IL-8 R α 、RNA pol 及 Lys α -glu 的有效化学成分较多。最后经 DAVID 数据库对 GO biological pathway 进行富集分析, 得到了 5 个靶点-生物通路网络, 结果见图 6。

Table 4 The number of potential inhibitors on each targets from Radix isatidis, Folium isatidis, Artemisia rupestris

Target	The number of potential inhibitors from Radix isatidis	The number of potential inhibitors from Folium isatidis	The number of potential inhibitors from Artemisia rupestris
NA	9	3	10
CLK1	45	9	14
CLK4	20	4	10
IFN-dsRNA-APK	31	7	0
IL-1 β -CE	51	12	13
IL-1 RAK3	89	26	37
IL-8 R α	66	23	41
CXCR1/CXCR2	6	1	0
TLR4	35	12	3
RNA pol	41	12	29
PA	20	5	0
RT	45	14	4
TNF- α	32	8	16
NF- κ B	40	7	15
HSD11B1	13	7	29
Lysa-glu	48	16	14
IL-1 RAK1	35	11	6

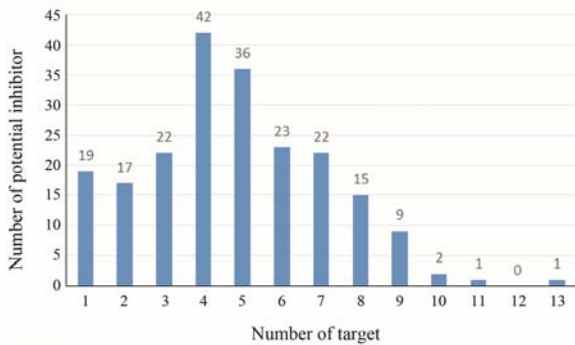


Figure 2 The number of potential inhibitors in Compound Yizhihao in different frequency of targets

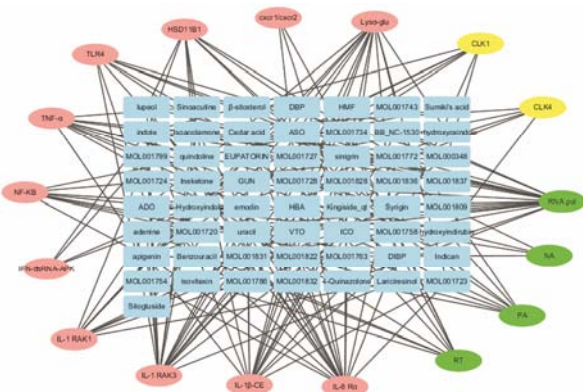


Figure 3 The constituent-target network for potential inhibitors from Radix isatidis. The blue rectangle means active compound, and the oval means drug target. Among them, the red oval means immune-related target, the yellow oval means host protein and the green oval means protein of influenza virus

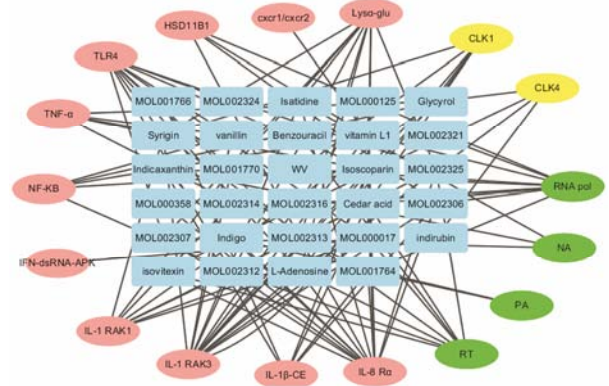


Figure 4 The constituent-target network for potential inhibitors from Folium isatidis. The blue rectangle means active compound, and the oval means drug target. Among them, the red oval means immune-related target, the yellow oval means host protein and the green oval means protein of influenza virus

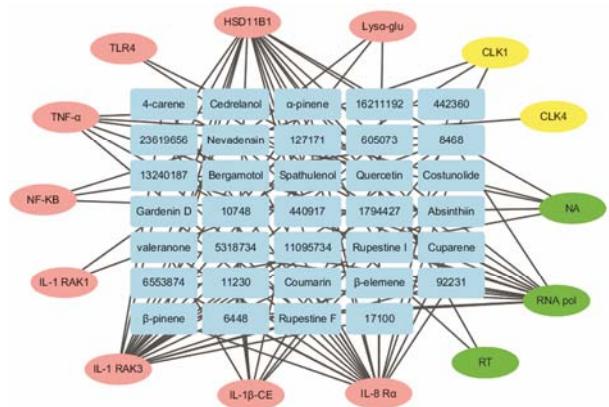


Figure 5 The constituent-target network for potential inhibitors from Artemisia rupestris. The blue rectangle means active compound, and the oval means drug target. Among them, the red oval means immune-related target, the yellow oval means host protein and the green oval means protein of influenza virus

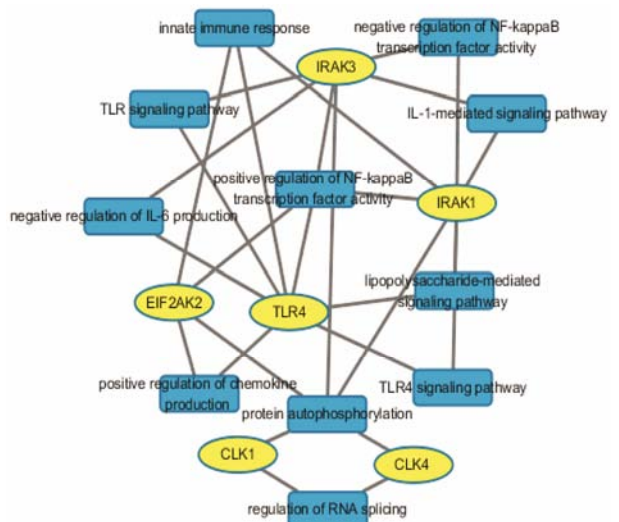


Figure 6 The target-pathway network by the enrichment analysis of Gene-Ontology (GO) biological pathway

Table 5 The name of compounds represented by MOL ID/Pubchem ID in Figure 3–5

Compound ID	Compound name	Source
MOL000348	4-[(Z)-3-Hydroxyprop-1-enyl]-2,6-dimethoxyphenol	Radix isatidis
MOL001720	4-Hydroxy-1 <i>H</i> -indole-3-carbaldehyde	Radix isatidis
MOL001723	2- <i>O</i> - β - <i>D</i> -Glucopyranosyl-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-one_qt	Radix isatidis
MOL001724	2- <i>O</i> - β - <i>D</i> -Glucopyranosyl-4-hydroxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-one	Radix isatidis
MOL001727	3-[2'-(5'-Hydroxymethyl)furyl]-1(2 <i>H</i>)-isoquinolinone-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside	Radix isatidis
MOL001728	3-[2'-(5'-Hydroxymethyl)furyl]-1(2 <i>H</i>)-isoquinolinone-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside_qt	Radix isatidis
MOL001734	3-[[2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,5-Dihydroxy-6-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)oxy]-4-oxooxan-2-yl]methoxy]-3-oxopropanoic acid	Radix isatidis
MOL001743	1-[(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]pyrimidine-2,4-dione	Radix isatidis
MOL001754	2-Methoxy-4-vinylphenol_qt	Radix isatidis
MOL001758	Hydroxyterephthalic acid	Radix isatidis
MOL001763	3-(2-Hydroxyphenyl)quinazolin-4-one	Radix isatidis
MOL001772	Dihydro- β -ionone	Radix isatidis
MOL001786	(+)-Isolariciresinol	Radix isatidis
MOL001799	Pyrophephorbide α -methyl ester	Radix isatidis
MOL001809	(24 <i>R</i>)-Ethyl-3 β ,5 α ,6 β -trihydroxycholan	Radix isatidis
MOL001822	5-(Methoxymethyl)-2-furoic acid	Radix isatidis
MOL001828	3-[(3,5-Dimethoxy-4-oxo-1-cyclohexa-2,5-dienylidene)methyl]-2,4-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[2,1- <i>b</i>]quinazolin-9-one	Radix isatidis
MOL001831	HX (3,7-dihydropurin-6-one)	Radix isatidis
MOL001832	1-Sulpho-3-indolylmethyl-glucosinolate	Radix isatidis
MOL001836	<i>n</i> -Butyl- β - <i>D</i> -fructopyranoside	Radix isatidis
MOL001837	Methyl- β -coumarate	Radix isatidis
MOL000017	β - <i>D</i> -Glucopyranose, 1-thio-, 1-(1-methoxy- <i>N</i> -(sulfoxy)-1 <i>H</i> -indole-3-ethanimidate)	Folium isatidis
MOL000125	(-)- α -Pinene	Folium isatidis
MOL000358	β -Sitosterol	Folium isatidis
MOL001764	4-Quinazoline	Folium isatidis
MOL001766	5-Hydroxyoxindole	Folium isatidis
MOL001770	β -Sitosterol- α -glucoside	Folium isatidis
MOL002306	(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-Bicyclo[2.2.1]hept-2-ene	Folium isatidis
MOL002307	20-Hexadecanoylingenol	Folium isatidis
MOL002312	[(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-5-[[2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-6-(2-Acetyl-5-methoxyphenoxy)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methoxy]-3,4-dihydroxyoxolan-3-yl]methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate	Folium isatidis
MOL002313	TR-Saponin A	Folium isatidis
MOL002314	TR-Saponin A_qt	Folium isatidis
MOL002316	Thladioside H1_qt	Folium isatidis
MOL002321	Pca(5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid)	Folium isatidis
MOL002324	3-[2-Sulfoxyimino-2-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]sulfanylethyl]indole-1-sulfonic acid	Folium isatidis
MOL002325	[[4-Mesyl-1-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methylol-tetrahydropyran-2-yl]thio]butylidene]amino]hydrogen sulfate	Folium isatidis
6448	Bornyl acetate	Artemisia rupestris
8468	Vanillic acid	Artemisia rupestris
10748	7-Methoxycoumarin	Artemisia rupestris
11230	4-Carvomenthenol	Artemisia rupestris
17100	α -Terpineol	Artemisia rupestris
92231	(+)-Spathulenol	Artemisia rupestris
127171	Rupestric acid	Artemisia rupestris
440917	(4 <i>R</i>)-(+)-Limonene	Artemisia rupestris
442360	1- α -Curcumene	Artemisia rupestris
605073	(-)- α -Neoclovene	Artemisia rupestris
1794427	Chlorogenic acid	Artemisia rupestris
5318734	Juniper camphor	Artemisia rupestris
6553874	(-)-Dihydrocarvyl acetate	Artemisia rupestris
11095734	(+)-Aromadendrene	Artemisia rupestris
13240187	α -Caryophyllene oxide	Artemisia rupestris
16211192	Aromadendrene oxide 2	Artemisia rupestris
23619656	(-)-Dihydrocarvyl acetate	Artemisia rupestris

这些靶点涉及最多相关通路的是蛋白自身磷酸化, 其次是 NF- κ B 转录因子活性的正向调节及天然免疫应答。验证了复方一枝蒿的化学成分不仅仅直接作用于流感病毒, 对于机体免疫也有调节作用。

讨论

复方一枝蒿作为维吾尔民族药应用于流感疾病的治疗, 具有确切的治疗效果, 但其物质基础及作用机制尚不明确。随着对流感病毒发病机制的不断认识, 流感的发生并非简单地由病毒自身组件侵害宿主而引起, 而是通过病毒组件-宿主因子复杂的相互作用网络而发生的^[17]。2008年, Hopkins^[18]明确提出“网络药理学”的概念, 指出疾病是多个通路、多途径分子功能网络相互作用的过程, 研发作用于网络靶点的新药是未来的研究模式。本文利用网络药理学研究思路, 探讨了复方一枝蒿抗流感的网络作用机制。

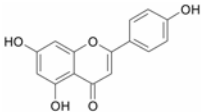
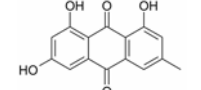
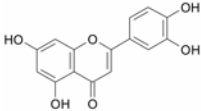
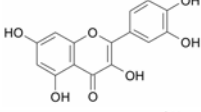
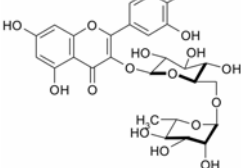
本文采用朴素贝叶斯的建模方法, 利用分子指纹描述符 ECFP-6 和分子描述符, 构建了 18 个抗流感病毒重要靶点的理论预测模型, 并通过训练集 5 倍交叉验证与测试集验证的方法, 确证了这些模型均具有较强的预测能力, 形成了抗流感药物靶点和活性化学成分的预测系统, 该系统可用于化合物抗流感靶点的预测和中药抗流感活性化学成分的预测。

应用该预测系统, 对复方一枝蒿抗流感的化学成分和作用靶点进行了预测, 发现板蓝根的 127 个化

学成分中, 有 84 个化学成分与流感病毒蛋白有关, 45 个化学成分与病毒复制相关的宿主蛋白有关, 124 个化学成分与抗炎免疫有关; 大青叶的 36 个化学成分中, 有 24 个化学成分与流感病毒蛋白有关, 9 个化学成分与病毒复制相关的宿主蛋白有关, 35 个化学成分与抗炎免疫有关; 一枝蒿的 52 个化学成分中, 有 37 个化学成分与流感病毒蛋白有关, 14 个化学成分与病毒复制相关的宿主蛋白有关, 52 个化学成分与抗炎免疫有关。在复方一枝蒿的 215 个化学成分中具有 3 个以上靶点作用的化合物 151 个。其中许多成分已有文献报道, 如一枝蒿酮酸体外研究显示该化合物具有较强的抗 B 型流感病毒活性^[10]; 靛玉红、靛蓝, 4-3 (H) 喹唑酮、异牡荆苷、紫丁香苷、琥珀酸、黑芥子苷、新橙皮苷、异甘草素、表告依春和蒙花苷具有体外抗流感病毒作用^[19]; 落叶松脂素-4,4'-二-O- β -D-二葡萄糖苷通过干扰流感病毒早期核蛋白的表达和核输出途径, 阻断病毒早期的复制繁殖^[20]; 靛玉红通过抑制流感病毒感染的人支气管上皮细胞活化趋化因子的表达发挥作用^[21]等。经整合分析, 作用靶点 3 个以上的典型化学成分、在 DrugBank 中记载的作用靶点及预测靶点, 如表 6 所示。这些对于多靶点抗流感药物设计将提供重要信息。

从 3 个单味中药的化学成分-药物靶点作用网络可以看出, 它们的化学成分对各靶点均有不同程度的作用。其中, 板蓝根的已知化学成分最多, 其作用

Table 6 The typical examples of multi-target constituents

Compound ID	Compound name	Structure	DrugBank	Predicted target
MOL000008	Apigenin		TNF- α , NF- κ B inhibitor α , NF- κ B essential modulator	TNF- α , NF- κ B, NA, CLK1, CLK4, IL-1 β -CE, IL-1 RAK3, IL-8 R α , Lys α -glu
MOL000472	Emodin		TNF- α , IL-1 β	IL-1 β -CE, IL-1 RAK3, IL-8 R α , TNF- α , NF- κ B
MOL000006	Luteolin		TNF- α , NF- κ B inhibitor α	TNF- α , NF- κ B NA, CLK1, CLK4, IL-1 RAK3, IL-8 R α , Lys α -glu
MOL000098	Quercetin		TNF- α , NF- κ B inhibitor α , IL-1 β , IL-8, IL-1 α	TNF- α , NF- κ B, IL-1 RAK1, IL-1 RAK3, IL-1 β -CE, IL-8 R α , NA, CLK1, CLK4, Lys α -glu
MOL000415	Rutin		TNF- α , IL-8, IL-1 β	IL-8 R α , IL-1 RAK1, IL-1 RAK3, RT, NF- κ B, Lys α -glu

网络也最为复杂, 核心靶点 (有 45 个以上的化合物与之作用) 有免疫相关靶点, 包括 IL-1 RAK3、IL-8 R α 和 IL-1 β -CE, 还有与流感病毒蛋白相关的 RT 以及与病毒复制相关的宿主蛋白 CLK1 等; 大青叶的核心靶点与板蓝根类似; 一枝蒿的化学成分对于 RNA pol 以及炎症相关靶点 HSD11B1 的作用相对较多。这些研究结果充分说明, 复方一枝蒿中各组分之间在抗流感作用方面相辅相成, 协同发挥作用。最后的代谢通路富集结果说明复方一枝蒿的化学成分作用于多条免疫相关通路, 从而参与机体免疫调节, 发挥抗流感作用。

综上所述, 复方一枝蒿具有抑制流感病毒复制和抗炎免疫的药效作用, 通过多成分、多靶点和多通路发挥网络药理抗流感作用。本研究将为复方一枝蒿抗流感的临床应用、多靶点抗流感新药设计提供重要信息, 也为研究其他中药复方的抗流感作用靶点和活性化学成分提供预测工具。

References

- [1] Ehrhardt C, Seyer R, Hrinicus ER, et al. Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling [J]. *Microbes Infect*, 2010, 12: 81–87.
- [2] Wang LQ, Yang R, Yuan BC, et al. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 310–315.
- [3] Jiang W, Yao H, Chen Q, et al. Antivirus effect of compound Yizhihao pellets on influenza virus H1N1 infection in mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2015, 31: 135–137.
- [4] Li L, Yang ZF. Review of anti-influenza virus effect of Radix isatidis on multi-target [J]. *J New Chin Med (新中医)*, 2014, 46: 202–204.
- [5] Shin EK, Kim DH, Lim H, et al. The anti-inflammatory effects of a methanolic extract from Radix isatidis in murine macrophages and mice [J]. *Inflammation*, 2010, 33: 110–118.
- [6] Xiao P, Ye W, Chen J, et al. Antiviral activities against influenza virus (FM1) of bioactive fractions and representative compounds extracted from Banlangen (Radix isatidis) [J]. *J Tradit Chin Med*, 2016, 36: 369–376.
- [7] Zhou W, Zhang XY. Research progress of Chinese herbal medicine Radix isatidis (banlangen) [J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41: 743–764.
- [8] Muluye RA, Bian YH, Alemu PN. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of heat-clearing Chinese herbs: a current review [J]. *J Tradit Complement Med*, 2014, 4: 93–98.
- [9] Liu Z, Yang ZQ, Xiao H, et al. Antiviral activity of the effective monomers from Folium isatidis against influenza virus *in vitro* [J]. *J South-Central Univ Natl (Nat Sci) (中南民族大学学报 (自然科学版))*, 2009, 28: 42–46.
- [10] Yong JP, Lu CZ, Aisa HA. Advances in studies on the rupestonic acid derivatives as anti-influenza agents [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2013, 13: 310–315.
- [11] Dong HJ, Jiang YT, Yu KY, et al. Advances in research on artemisia rupestris L. [J]. *Chin Med J Res Prac (现代中药研究与实践)*, 2013, 27: 73–77.
- [12] Ji TF, Yang JB, Song WX, et al. Studies on chemical constituents of Artemisia rupestris (II) [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2007, 32: 1187–1189.
- [13] Chen CYC. TCM Database@Taiwan: the world's largest traditional Chinese medicine database for drug screening *in silico* [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e15939.
- [14] Ru JP, Li J, Wang W, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [15] Fang JS, Yang RY, Gao L, et al. Predictions of BuChE inhibitors using support vector machine and naive bayesian classification techniques in drug discovery [J]. *J Chem Inf Model*, 2013, 53: 3009–3020.
- [16] Fang JS, Wu P, Yang RY, et al. Inhibition of acetylcholinesterase by two genistein derivatives: kinetic analysis, molecular docking and molecular dynamics simulation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2014, 4: 430–437.
- [17] Vijaykrishna D, Smith GJ, Pybus OG, et al. Long-term evolution and transmission dynamics of swine influenza A virus [J]. *Nature*, 2011, 473: 519–522.
- [18] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 682–690.
- [19] Ye WY, Li X, Chen JW. Screening of 11 antiviral effect constituents from Radix isatidis [J]. *J Emerg Tradit Chin Med (中国中医急诊)*, 2011, 20: 1772–1774.
- [20] Yang ZF, Wang YT, Zheng ZG, et al. Antiviral activity of Isatisindigotica root-derived clemastanin B against human and avian influenza A and B viruses *in vitro* [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31: 867–873.
- [21] Mak NK, Leung CY, Wei XY, et al. Inhibition of RANTES expression by indirubin in influenza virus-infected human bronchial epithelial cells [J]. *Biochem Pharm*, 2004, 67: 167–174.