·实验研究·

基于网络药理学和分子对接探讨复方双花口服液治疗流感的作用机制

常一川[1],张秀英[2],王雪峰[2]

(1 辽宁中医药大学研究生院,沈阳 110032;2 辽宁中医药大学附属医院,沈阳 110032)

[摘要] **目的**:运用网络药理学方法和分子对接技术探究复方双花口服液治疗流感可能的作用机制。**方法**:通过文献查找复方双花口服液活性成分,根据数据平台对复方双花口服液的活性成分的作用靶点进行预测,构建化合物-靶点网络。将复方双花口服液活性成分靶点与流感疾病靶点取交集,得到关键靶点,构建药物-活性成分-关键靶点-疾病网络。通过对共有核心靶点进行蛋白质相互作用分析,分析蛋白相互作用(PPI)中度中心度(DC)、中间性中心性(BC)、紧密性中心性(CC)、特征向量中心性(EC)、网络中心性(NC)和局部平均连通性(LAC)参数,筛选核心靶基因;选取的复方双花口服液主要活性成分与流感病毒神经氨酸酶靶点进行分子对接。**结果**:获得复方双花口服液对应靶点的活性成分80个,预测作用靶点616个,流感相关基因2 574个,复方双花口服液治疗流感的关键靶点243个,PPI分析筛选出23个关键核心靶点,包括原癌基因酪氨酸蛋白激酶Src(SRC)、酪氨酸蛋白激酶JAK1(JAK1)等;富集分析显示复方双花口服液和流感的共同生物学过程与炎症反应、细胞增殖及凋亡等相关,作用的主要通路为肿瘤坏死因子信号通路、白细胞介素-17信号通路、凋亡信号通路、Toll样受体信号通路、C型凝集素受体信号通路等。分子对接的结果显示主要活性成分与流感病毒神经氨酸酶具有较好结合活性。**结论**:复方双花口服液可能主要通过抑制神经氨酸酶活性、炎症反应及凋亡相关因子和通路抗流感,减轻流感引起的炎症反应,从而达到治疗流感的目的。

[关键词] 复方双花口服液;流行性感冒;网络药理学;分子对接

[中图分类号] R96 [文献标志码] A [文章编号] 1003-3734(2021)23-2210-05

Mechanism of Compound Shuanghua oral liquid in the treatment of influenza based on network pharmacology and molecular docking

CHANG Yi-chuan[1], ZHANG Xiu-ying[2], WANG Xue-feng[2]

(1 *Graduate College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang* 110032, *China*; 2 *Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang* 110032, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: Network pharmacology and molecular docking technology were used to explore the possible mechanism of Compound Shuanghua oral liquid in the treatment of influenza. **Methods**: The active ingredients of the compound Shuanghua oral liquid were searched through the literature, and the target points of the active ingredients were predicted based on the data platform, after which a compound-target network was constructed. The intersection of the active ingredient targets of the compound Shuanghua oral liquid and the influenza disease targets were taken to obtain the key targets to construct a drug-active ingredient-key target-disease network. Protein interaction analysis was conducted through shared core targets. The protein interaction core (PPI) moderate centrality (DC), intermediate centrality (BC), compact centrality (CC), eigenvector centrality (EC), network centrality (NC) and local average connectivity (LAC) parameters were analyzed to screen the core target genes. The selected main active components of the Compound Shuanghua oral liquid are molecularly docked with the influenza virus neuraminidase target. **Results**: Totally 80 active ingredients were obtained corresponding to the targets of Compound Shuanghua oral liquid; 616 action targets, 2 574 influenza-related genes, 243 key targets of Compound Shuanghua

[基金项目] 中医药循证能力建设项目课题(2019XZZX-LG006)

[作者简介] 常一川,男,博士,主要从事呼吸系统疾病治疗科研工作。联系电话:(024)86909114,E-mail:cycm60a1@sina.com。

[通讯作者] 王雪峰,女,教授,主任医师,博士生导师,主要从事中西医结合临床治疗工作。联系电话:(024)86909114,E-mail:lnzywxf@163.com。

oral liquid were predicted in the treatment of influenza, and 23 key core targets were screened from protein interaction core (PPI) analysis, including proto-oncogene tyrosine protein kinase Src (SRC), tyrosine protein kinase JAK1 (JAK1), etc. Enrichment analysis showed the common biological process of compound Shuanghua oral liquid and influenza, which is related to inflammation, cell proliferation and apoptosis. The main pathways of action are tumor necrosis factor signaling pathway, interleukin-17 signaling pathway, apoptosis signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, and C-type lectin receptor signaling Access, etc. The results of molecular docking show that the main active ingredients have good binding activity with influenza virus neuraminidase. **Conclusion**: The mechanism of action for Compound Shuanghua oral liquid may mainly be inhibiting neuraminidase activity, inflammatory response and apoptosis related factors and pathways, acting against influenza, reducing the inflammatory response caused by influenza, so as to achieve the purpose of treating influenza.

[**Key words**] Compound Shuanghua oral liquid; influenza; network pharmacology; molecular docking

复方双花口服液由金银花、连翘、穿心莲、板蓝根组成,具有清热解毒、利咽消肿的功效。其中的君药金银花和连翘是常用的清热类中药,二者配伍相须为用,可以增强清热解毒、疏散风热的功效,是最经典治疗温病的药对之一,其抗病毒作用备受关注,近年来临床上其对流感的有效性越来越受到关注[1]。一般有效的抗病毒药物抗病毒谱狭窄,远不能满足临床需求,特别是选择对病毒有选择性作用却对宿主细胞无害的药物更是迫切任务[2],且与单味药相比中药复方制剂在抗流感病毒中有突出优势[3],但其确切机制尚不清晰,因此本文基于网络药理学及分子对接技术,筛选出复方双花口服液有效活性成分和作用靶点,构建“中药-活性成分-靶点”、靶标蛋白相互作用、靶点功能通路等多层次生物信息网络,为复方双花口服液用于防治流感提供理论依据。

材料与方法

1 活性成分筛选及靶点预测

依据中药系统药理学分析平台(TCMSP,http://lsp.nwu.edu.cn/tcmspsearch.php),输入复方双花口服液的成分,关键词分别为“金银花”、“连翘”、“穿心莲”、“板蓝根”进行检索得到其全部的成分。将所获得的成分输入 TCMSP 平台,以口服生物利用度(OB)≥30% 及类药性(DL)≥0.18 为标准对所获得的成分进行筛选,构建复方双花口服液潜在活性成分数据集。

利用 TCMSP 和 Swiss Target Prediction 数据库筛选活性成分靶点,其中 Swiss Target Prediction 数据库筛选 probability≥0.05 的活性成分靶点蛋白(检索日期:2020 年 7 月 6 日)。然后将靶标信息输入到 UniProt(https://www.uniprot.org)中进行注释标准化。

2 疾病靶点预测

通过 GeneCard database(https://www.genecards.org/),数据库搜索关键词“influenza”,查找与流感相关的基因,去除重复和假阳性的基因,获得流感潜在靶点数据集。

3 药物-疾病靶点筛选

运用 Venny 平台(http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/)将药物中活性成分靶点与流感靶点进行映射并绘制韦恩图,共同交集靶点为药物治疗流感的潜在作用靶点。

4 药物-疾病靶点网络构建

将活性成分及共有靶标导入 Cytoscape 3.6.0 软件,构建活性成分-疾病靶点网络。节点表示活性成分或靶点,而边缘表示它们的交互作用,节点度表示网络中彼此连接的节点数。

5 蛋白相互作用(PPI)网络的构建及核心靶点筛选

将共有靶点导入 STRING 平台(https://string-db.org/),限定研究物种为“homo sapiens”,最低相互作用评分设置为高信度[“high confidence (0.900)”],其余参数保持默认设置,在线绘制 PPI,结果保存成 TSV 格式,导入 Cytoscape 3.6.0 中以获取拓扑属性分析。然后用 App-CytoNCA 计算 6 个参数评估了节点的拓扑性质:度中心度(DC)、中间性中心性(BC)、紧密性中心性(CC)、特征向量中心性(EC)、网络中心性(NC)和局部平均连通性(LAC)。节点的 DC,BC,CC,EC,NC 和 LAC 值意味着其在网络中的重要性。基于上述 PPI 的拓扑性质分析结果,中位数以上的目标被选为核心目标并进行了 2 次筛选,筛选的靶点为网络中的核心靶点。

6 成分靶点与流感病毒神经氨酸酶分子对接验证

选择前 5 位的核心化合物,从 PubChem 数据库

下载化合物的二维结构图，导入 Chem3D 软件，绘制核心化合物的三维结构图，优化能量，并以 mol2 格式保存。然后将这些文件导入到 AutoDockTools-1.5.6 软件中转换成 pdbqt 格式保存。从 PDB 数据库（https://www.rcsb.org/）[7]中下载流感神经氨酸酶蛋白质晶体结构，导入 Pymol 软件中去除水分子和杂分子，导入 AutoDockTools-1.5.6 软件中进行氢原子的添加和充电操作，保存为 pdbqt 格式，并导入 Discovery Studio 3.5 客户端软件以搜索活动口袋。将上述核心化合物为配体，将流感神经氨酸酶作为受体，利用 AutoDock Vina 1.1.2 对受体蛋白与配体小分子分别进行分子对接，对接获取构象并进行结合能打分，取结合能最好的进行作图分析，并采用 PyMOL 作三维图显示受体蛋白与配体小分子之间的相互作用。

结　果

1　活性成分筛选及靶点预测

通过 TCMSP 数据库共筛选出 80 个活性成分。对应的靶点有 616 个。GeneCard database（https://www.genecards.org/）共收集到流感相关基因 2 574 个。运用 Venny 绘图软件，将活性成分潜在靶点和流感相关靶点进行映射取交集，得到 234 个共用靶点（commom targets），结果见图 1。

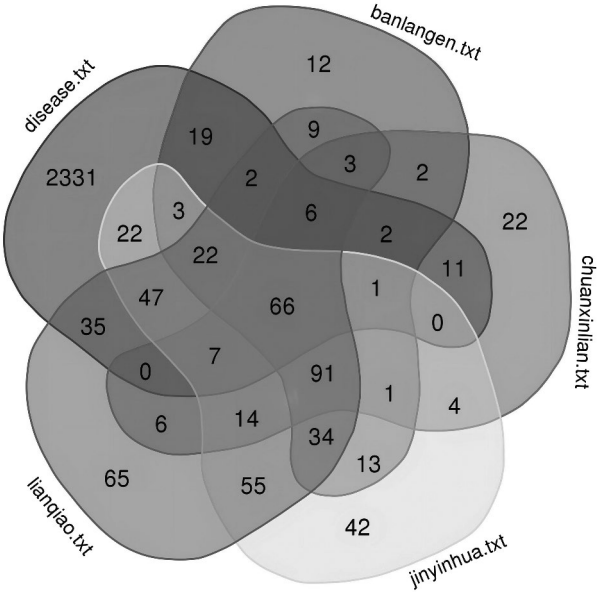


图 1　药物与疾病 Venny 图

2　活性成分-疾病靶点相互作用网络

药物活性成分-疾病靶点网络共有靶点 323 个节点和 1 397 边。活性成分及疾病靶点网络见图 2。

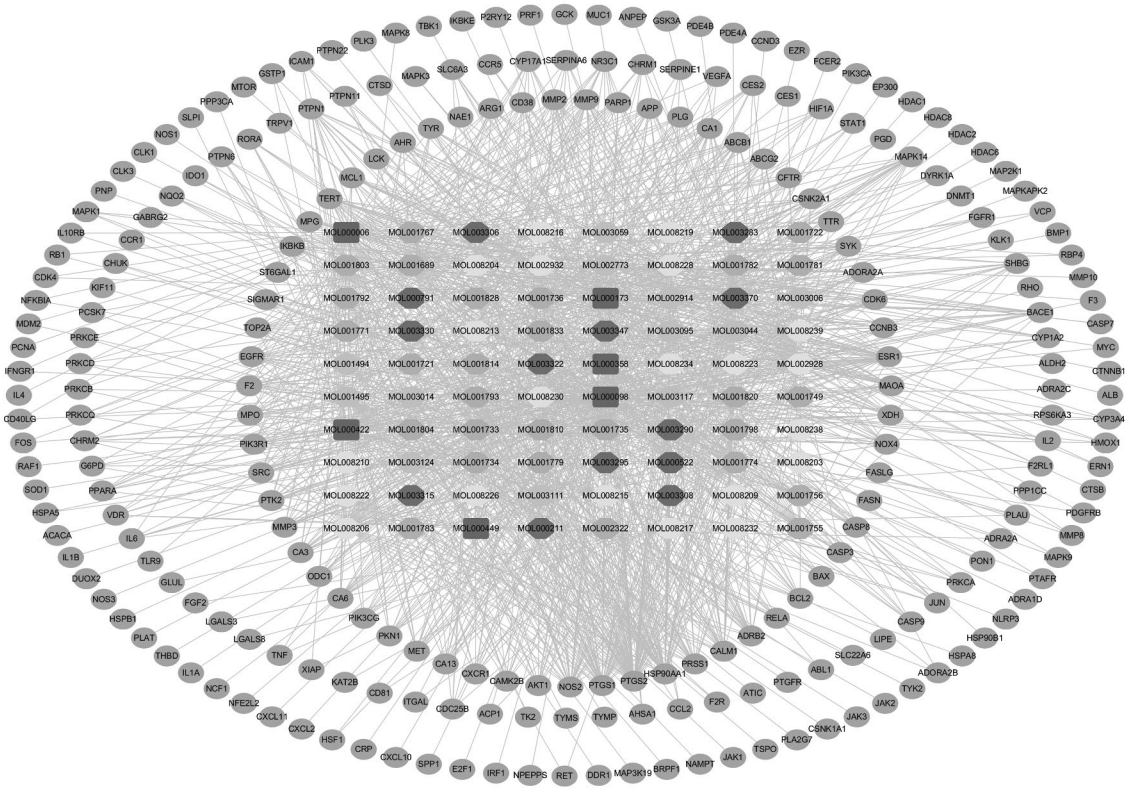


图 2　活性成分-疾病靶点网络图

3 PPI 网络及核心靶点筛选

PPI 网络共含有 202 节点和 2 340 边。将 TSV 数据导入 Cytoscape，利用 CytoNCA 分析 PPI 中 DC，BC，CC，EC，NC 和 LAC 参数。第 1 次筛选的阈值为 DC >18，BC >97.49，LAC >5.93，EC >0.02，CC >0.13，NC >7.08，结果显示共有 65 个节点和 1 114 个边。第 2 次筛选阈值为 DC >32，BC >32.82，LAC >16.24，EC >0.12，CC >0.56，NC >18.29，结果显示共有 23 个节点和 312 个边，核心靶基因为 *PIK3*，*MAPK3*，*MAPK1*，*STAT3* 等。PPI 网络拓扑分析结果见图 3。

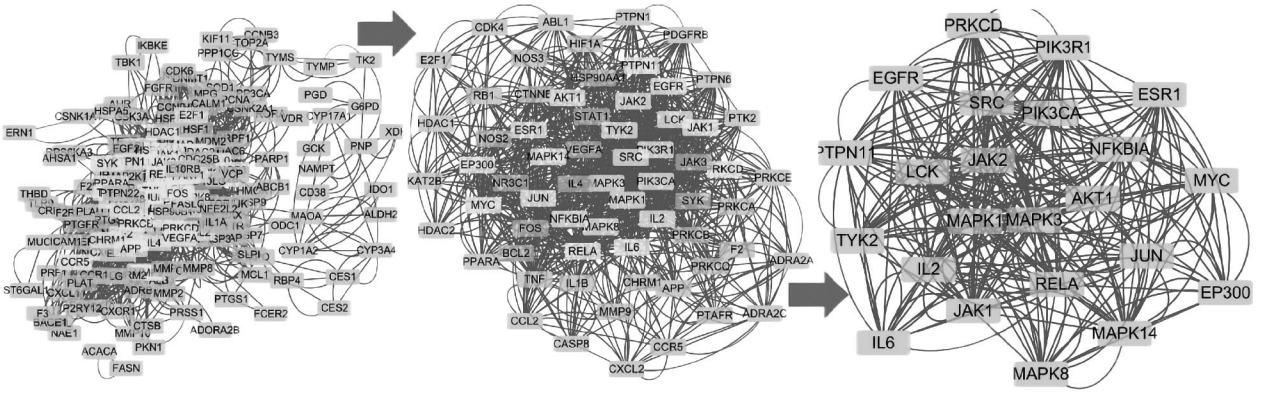
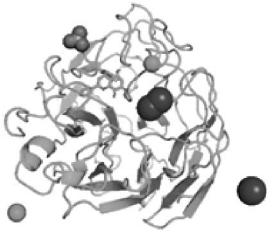
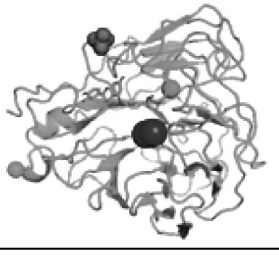
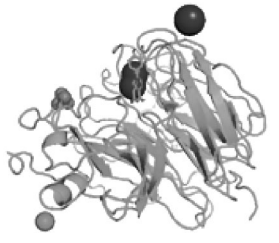
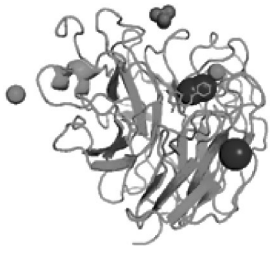


图 3 PPI 网络拓扑分析

4 核心活性化合物与流感病毒 A 神经氨酸酶的分子对接结果

一般认为结合能小于 0 说明化合物与蛋白可以自发结合，化合物与蛋白结合的构象越稳定时能量越低，发生的作用可能性越大。分子对接结果显示，将在药物-化合物-靶点网络中度值前 5 位的核心活性化合物为槲皮素（quercetin）、木犀草素（lutedin）、汉黄芩素（wogonin）、4,5,7-三羟黄酮醇（kaempferol）、刺槐素（acacetin）与神经氨酸酶（PDB ID:6hfc）进行分子对接，结果见表 1。

表 1 活性成分与流感神经氨酸酶分子对接结果

活性成分	对接模式	结合能 /kcal·mol^{-1}
汉黄芩素		-8.9
木犀草素		-8.9
4,5,7-三羟黄酮醇		-8.1
刺槐素		-8.4
槲皮素		-8.6

讨　论

网络药理学是从药物活性成分、靶点与疾病间相互作用的整体性和系统性出发，通过筛选药物活性物质、预测靶点、构建网络、富集信号通路并进行

分析,进而揭示药物活性成分和疾病发生发展相关通路网络之间的潜在机制[4]。分子对接是一种运用计算机技术基于受体特性以及受体与药物分子之间相互作用方式的药物设计方法。本研究基于网络药理学及分子对接技术初步揭示了复方双花口服液治疗流感的分子机制。

1 有效活性成分

研究结果显示,共检索到活性成分 80 个,预测作用靶点 616 个,流感相关基因 2 574 个,复方双花口服液治疗流感的关键靶点 308 个。活性成分-疾病靶点网络分析显示,平均每个活性成分作用 7 个靶点,提示了复方双花口服液的多靶点作用机制;其中核心活性化合物槲皮素、木犀草素、汉黄芩素、4,5,7-三羟黄酮醇、刺槐素分别作用 82,69,73,64,70 个靶点,OB 分别为 46.43,36.16,30.68,41.88,34.45,DL 分别为 0.28,0.25,0.23,0.24,0.84,以上 5 种化合物可能为复方双花口服液治疗流感的主要药效成分。

2 对病毒的影响及细胞保护作用

PPI 网络分析显示,PPI 网络共含有 202 节点和 2 340 边。经过 2 次筛选共有 23 个节点和 312 个边缘,核心靶基因为 *PIK3*,*MAPK3*,*MAPK1*,*STAT3* 等。研究显示流感病毒感染可以激活细胞的 PI3K/AKT 信号通路,加快流感病毒的增殖[5]。*MAPK* 基因则是 TNF-α 作用途径中的重要信号分子,不但可作为细胞凋亡机制中的重要基因,通过诱导线粒体释放细胞色素 C 而启动死亡信号途径和细胞凋亡[6]。肺泡上皮细胞(AECs)是流感病毒进入肺泡后首先遇到的细胞,感染的上皮细胞产生细胞因子,吸引和激活中性粒细胞和巨噬细胞,进而导致上皮细胞内皮屏障受损,流感病毒感染时表皮生长因子受体(EGFR)可增强人 AECs 的固有免疫应答。信号转导与转录激活因子 3(STAT3)是重要的核转录因子,为介导 IFNs 应答的重要效应分子,与病毒感染密切相关。IVA 可以通过 JAK-STAT 通路阻止干扰素介导的下游信号通路,减弱干扰素诱导的下游效应分子的抗病毒作用[7]。因此,推测复方双花口服液主要通过作用于 *PIK3*,*STAT3*,*MAPK3*,*MAPK1* 等靶点发挥抗流感作用。

研究显示,在甲型流感病毒感染呼吸道的过程中,肺组织可发生明显的炎症反应、氧化应激反应及细胞凋亡,进而出现肺损伤[8-10]。其中有效核心成分参与的生物过程提示对巨噬细胞的 IL-8 调节通路,同时竞争性结合流感病毒凝血素从而抑制病毒入侵和复制。在细胞功能方面促进病毒包膜表面糖基荧光肽的裂解,进而对细胞起到保护作用[8]。分子对接的研究结果显示,复方双花口服液中主要药效成分与流感病毒神经氨酸酶具有较好的结合力。基于上述结果推测,复方双花口服液一方面可通过与神经氨酸酶结合发挥抗流感病毒的作用,另一方面通过作用于 T 细胞受体信号通路、趋化因子信号通路、Toll 样受体信号通路、Th17 细胞分化、ErbB 信号通路、PI3K/AKT 信号通路等发挥免疫调控及抗炎作用。

本研究采用网络药理学及分子对接的方法对复方双花口服液防治流感的潜在物质基础和作用机制进行分析,探讨了复方双花口服液通过多成分、多靶点、多通路来发挥抗流感的治疗作用,为深入研究复方双花口服液防治流感的药理机制提供新的思路。但鉴于数据库和软件的参数设置局限性,在结合能力之下关于靶蛋白与有关氨基酸的具体结合状态,还需进一步通过临床试验和体内外实验进行验证。虽然在检索数据库有效成分中已考虑了药物有效成分的口服利用度,但是对于入血浓度并未有进一步阐释,这也是值得研究的课题之一,有待进一步求证。

[参 考 文 献]

[1] 蒋永梅. 复方双花口服液的临床应用及药理研究进展[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(14): 1624-1627.

[2] 张燕萍, 苗青. 浅谈抗病毒中药在呼吸道感染治疗中的应用[C]//第十次全国中西医结合防治呼吸系统疾病学术研讨会论文集. 杭州, 2009: 372-374.

[3] 祖金玥. 复方双花口服液的质量标准提升研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

[4] 王毅,高秀梅,张伯礼,等. 论建立基于网络生物学的现代中药创制方法学[J]. 中国中药杂志,2011,36(2): 228-231.

[5] WAN Y, XU L, LIU Z, *et al*. Utilising network pharmacology to explore the underlying mechanism of Wumei Pill in treating pancreatic neoplasms[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 158.

[6] TOURNIER C, HESS P, YANG DD, *et al*. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway[J]. *Science*, 2000, 288(5467): 870-874.

[7] JIA D, RAHBAR R, CHAN RW, *et al*. Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling[J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13927.

[8] LIU M, CHEN F, LIU T, *et al*. The role of oxidative stress in influenza virus infection[J]. *Microbes Infect*, 2017, 19(12): 580-586.

[9] THAPA RJ, NOGUSA S, BALACHANDRAN S. Analysis of cytokine- and influenza A virus-driven RIPK3 necrosome formation[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1857: 93-99.

[10] LEE S, HIROHAMA M, NOGUCHI M, *et al*. Influenza A virus infection triggers pyroptosis and apoptosis of respiratory epithelial cells through the type I interferon signaling pathway in a mutually exclusive manner[J]. *J Virol*, 2018, 92(14): e00396-18.

编辑:杨青/接受日期:2021-05-14