

基于网络药理学及分子对接技术探讨荆防颗粒治疗流感的作用机制[△]

黄佳奇^{1*}, 谭影影¹, 陈美琳¹, 李佳霖¹, 张景媛¹, 段小霞², 翟弋焱¹, 时锐¹, 吴嘉瑞^{1#} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京泽桥传媒科技股份有限公司, 北京 100176)

中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)11-1291-07

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.11.003

摘要 目的:基于网络药理学及分子对接技术探讨荆防颗粒治疗流感的机制。方法:通过中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)查询荆防颗粒的成分以及靶点,通过GeneCards数据库查询流感的靶点,进而取交集得到荆防颗粒治疗流感的潜在靶点。通过STRING数据库对潜在靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络分析,利用R软件RStudio对潜在靶点进行基因本体(gene ontology,GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析。利用Cytoscape 3.7.2构建“药物-成分-潜在靶点”网络。应用Autodock开展重要有效成分和关键靶点的分子对接。结果:共检索到荆防颗粒符合筛选标准(OB \geq 30%、DL \geq 0.18)的成分159个,检索到流感的靶点2574个,取交集得到54个靶点作为荆防颗粒治疗流感的潜在靶点。GO功能和KEGG通路富集分析结果显示,荆防颗粒主要通过作用于Influenza A、MAPK和TNF信号通路等发挥治疗流感的作用。槲皮素、木犀草素、 β -谷甾醇、山柰酚、柚皮素和汉黄芩素是荆防颗粒治疗流感的重要有效成分,PTGS2、PRSS1、ADRB2、MAPK14和RELA是治疗中的关键靶点。经过分子对接验证发现,槲皮素、木犀草素、 β -谷甾醇、山柰酚、汉黄芩素与相关靶点的结合能较低,亲和力较好。结论:荆防颗粒可能通过作用于PTGS2、PRSS1、ADRB2、MAPK14和RELA等靶点,调控甲型流感信号通路、TNF信号通路、MAPK信号通路和IL-17信号通路等,实现对流感病毒的抑制和对机体免疫反应的调节。

关键词 荆防颗粒;流感;网络药理学;分子对接

Mechanism of Jingfang Granules in the Treatment of Influenza Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology[△]

HUANG Jiaqi¹, TAN Yingying¹, CHEN Meilin¹, LI Jialin¹, ZHANG Jingyuan¹, DUAN Xiaoxia², ZHAI Yiyan¹, SHI Rui¹, WU Jiarui¹ (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Beijing Zest Bridge Media Technology Co., Ltd., Beijing 100176, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the mechanism of Jingfang granules in the treatment of influenza based on network pharmacology and molecular docking technology. **METHODS:** The components and targets of Jingfang granules were investigated by traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP). GeneCards database was used to retrieve the targets of influenza, and the potential targets of Jingfang granules in the treatment of influenza were obtained. Protein-protein interaction (PPI) network analysis was performed on the potential targets through the STRING database. Gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis of potential targets were performed by R software RStudio. “Drug-component-potential targets” network was constructed by using Cytoscape 3.7.2. Autodock was used to carry out the molecular docking of important active components and key targets. **RESULTS:** A total of 159 components that met the screening criteria (OB \geq 30%, DL \geq 0.18) of Jingfang granules were retrieved, and 2574 targets for influenza were collected, and 54 targets were obtained as potential targets for the treatment of influenza with Jingfang granules by taking the intersection. GO and KEGG enrichment analysis showed that Jingfang Granule played an essential role in the treatment

[△] 基金项目:国家自然科学基金项目(No. 82074284)

* 硕士研究生。研究方向:临床中医学。E-mail:18801314409@163.com

通信作者:博士,教授,博士生导师。研究方向:临床中医学。E-mail:exogamy@163.com

of influenza mainly through acting on influenza A signaling pathway, MAPK signaling pathway, TNF signaling pathway. Quercetin, luteolin, beta-sitosterol, kaempferol, naringin and wogonin were important effective components of Jingfang granules in the treatment of influenza. PTGS2, PRSS1, ADRB2, MAPK14 and RELA were key targets in the treatment of influenza. Through molecular docking, it was found that quercetin, luteolin, beta-sitosterol, kaempferol and wogonin had low binding energy and good affinity with related targets. CONCLUSIONS: Jingfang granules may inhibit influenza virus and regulate immune response of the body by acting on targets such as PTGS2, PRSS1, ADRB2, MAPK14 and RELA and regulating influenza A signaling pathway, TNF signaling pathway, MAPK signaling pathway and IL-17 signaling pathway.

KEYWORDS Jingfang granule; Influenza; Network pharmacology; Molecular docking

流行性感冒(简称“流感”)是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病,临床表现包括咳嗽、鼻塞、头痛和咽喉痛等^[1]。流感病毒由于核蛋白和内膜抗原蛋白的不同可分为甲、乙和丙3型^[2]。荆防颗粒由荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、前胡、川芎、枳壳、茯苓、桔梗和甘草等11味药组成,具有发汗解表、散风祛湿的功效^[3]。本研究利用网络药理学的方法预测荆防颗粒治疗流感的成分、靶点,并通过分子对接技术进行验证,为进一步的研究提供基础。

1 资料与方法

1.1 荆防颗粒相关化学成分及靶点信息查找

通过中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)(<https://tcmspw.com/tcmspsearch.php>)查找荆防颗粒的成分,并以药物口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%、类药性(drug-likeness, DL)≥0.18为筛选条件,筛选各药材的成分,并通过TCMSP查找成分对应的靶点。通过GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>),以“influenza”为关键词查找流感的疾病靶点;根据Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>),将流感靶点的蛋白名转化为基因名。利用在线工具Venny 2.1.0(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>),将荆防颗粒的靶点与流感的靶点进行交集,得到荆防颗粒治疗流感的潜在靶点。

1.2 “药物-成分-潜在靶点”网络构建

利用Cytoscape 3.7.2软件,将荆防颗粒的成分及潜在靶点进行可视化处理,构建“药物-成分-潜在靶点”网络。

1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein Interaction, PPI)网络分析

将潜在靶点输入STRING数据库(<https://string-db.org/>),设置物种为“Homo sapiens”,进行PPI网络分析,利用Cytoscape 3.7.2构建PPI网络。

1.4 基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析

将潜在靶点通过Rstudio进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析。通过PATHVIEW网站(<https://pathview.uncc.edu/analysis>)显示出富集通路的基因,利用Portable Pathway Builder Tool 2.0软件将通路可视化。

1.5 分子对接

通过TCMSP获得荆防颗粒成分的结构信息,通过PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)得到靶蛋白的3D结构。利用AutodockTool软件对小分子和靶蛋白进行加氢、计算电荷和合并非极性氢等前处理,利用Autodock Vina软件对二者进行对接,通过PyMOL 2.3.0软件将对接结果可视化。

2 结果

2.1 荆防颗粒成分和靶点信息

收集到11味药共220个成分,去除未查得靶点的成分后再去重得到159个成分。查得荆防颗粒的靶点3531个,去除未能成功转化为基因名的靶点并去重得到248个靶点。

2.2 共有靶点库的建立

查得流感的靶点2574个,取“Relevance”大于中位数的靶点,筛选2次得到665个靶点。与荆防颗粒的靶点取交集得到荆防颗粒治疗流感的54个潜在靶点,见图1。

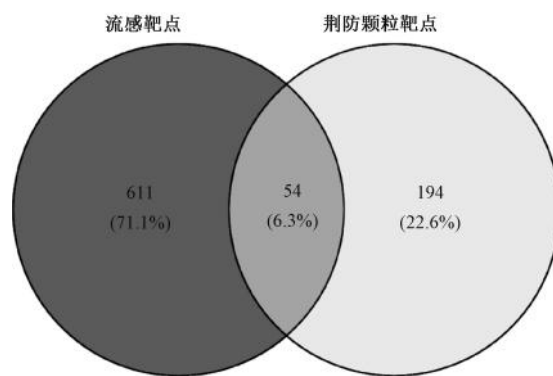


图1 VENN图

Fig 1 Venn diagram

2.3 “药物-成分-潜在靶点”网络

“药物-成分-潜在靶点”网络见图2,图中菱形节点代表荆防颗粒治疗流感的潜在靶点,圆形节点代表荆防颗粒的成分,正方形节点代表荆防颗粒的11味药材,节点大小与其度值(Degree)成正比。槲皮素(quercetin)、木犀草素(luteolin)、山柰酚(kaempferol)、汉黄芩素(wogonin)、β-谷甾醇(beta-sitosterol)、柚皮素(naringenin)、金合欢素(acacetin)和丹参酮IIA(tanshinone II A)等成分Degree较高,可能是荆防颗粒治疗流感的关键成分。靶蛋白PTGS2、PRSS1、MAPK14、ADRB2和

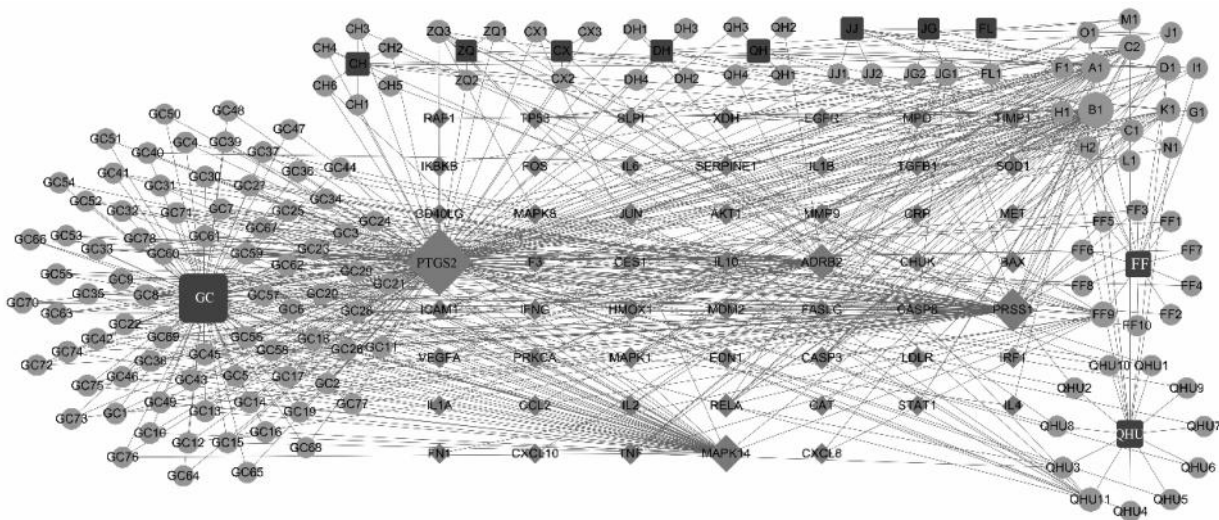


图 2 “药物-成分-潜在靶点”网络图

Fig 2 “Drug-components-potential targets” network

RELA 的 Degree 较高, Degree ≥ 10 。

2.4 PPI 网络分析

荆防颗粒治疗流感的潜在靶点相互作用网络见图 3, 图中节点大小以及颜色深浅与其 Degree 成正比。白细胞介素(IL)6、肿瘤坏死因子(TNF)、血管内皮生长因子-A(VEGFA)、转录因子 AP-1(JUN)、细胞肿瘤抗原 p53(TP53)、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1)和 IL-1 β 等节点的 Degree 较高, 与其他蛋白关系密切。

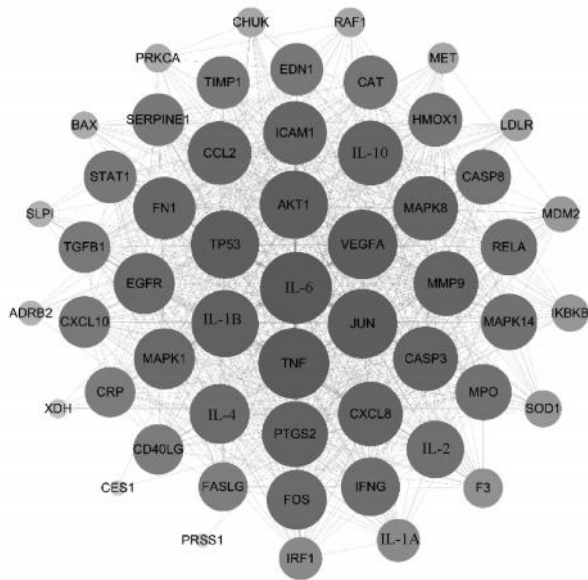


图 3 PPI 网络图

Fig 3 PPI network

2.5 GO 和 KEGG 富集分析

GO 和 KEGG 分析结果见图 4—5。荆防颗粒可调节信号受体结合、酶结合、含蛋白质的复合物结合、细胞因子受体结合和细胞因子活性等分子功能, 作用于细胞外区域、细胞外空间、

细胞质囊泡和细胞内囊泡等细胞组分, 参与细胞对化学刺激的反应、细胞对有机物的反应、细胞死亡和程序性细胞死亡等生物过程。甲型流感信号通路、人巨细胞病毒感染信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路和 IL-17 信号通路等可能是荆防颗粒治疗流感的关键通路。

2.6 分子对接

选取 PTGS2、PRSS1、ADRB2、MAPK14、CASP3、JUN 和 RELA 作为分子对接的靶蛋白, 槲皮素、木犀草素、 β -谷甾醇、山柰酚、柚皮素和汉黄芩素作为分子对接的小分子, 结合能最低的 9 组对接结果见表 1。结合能越低, 小分子与靶蛋白之间的亲和力越高, 结合效果越好。选取结合效果最好的 5 组进行展示, 见图 6。

表 1 分子对接结果

Tab 1 Results of molecular docking

编号	蛋白	蛋白 PDB 数据库编号	化合物	结合能/(kJ/mol)
1	ADRB2	2RH1	luteolin	-40.18
2	PTGS2	5F19	luteolin	-39.77
3	PTGS2	5F19	quercetin	-39.35
4	ADRB2	2RH1	quercetin	-39.35
5	ADRB2	2RH1	beta-sitosterol	-39.35
6	PTGS2	5F19	wogonin	-38.93
7	PTGS2	5F19	beta-sitosterol	-38.51
8	ADRB2	2RH1	kaempferol	-38.51
9	ADRB2	2RH1	wogonin	-38.09

2.7 荆防颗粒治疗流感的通路分析

选取 Influenza A 通路进行展示, 见图 7—8。图 7 中, 深色方块代表荆防颗粒作用的靶点; 图 8 中, P 代表磷酸化, 箭头代表促进作用, 星形标注的靶点是荆防颗粒作用的靶点。荆防颗粒可作用于核因子 κ B(NF- κ B)、IL-1、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 调控 Influenza A 通路, 通过调节病毒引起的先天免疫反应、促进细胞因子释放, 影响流感病毒 RNP 的释放以及病毒蛋白的表达控制病毒感染。

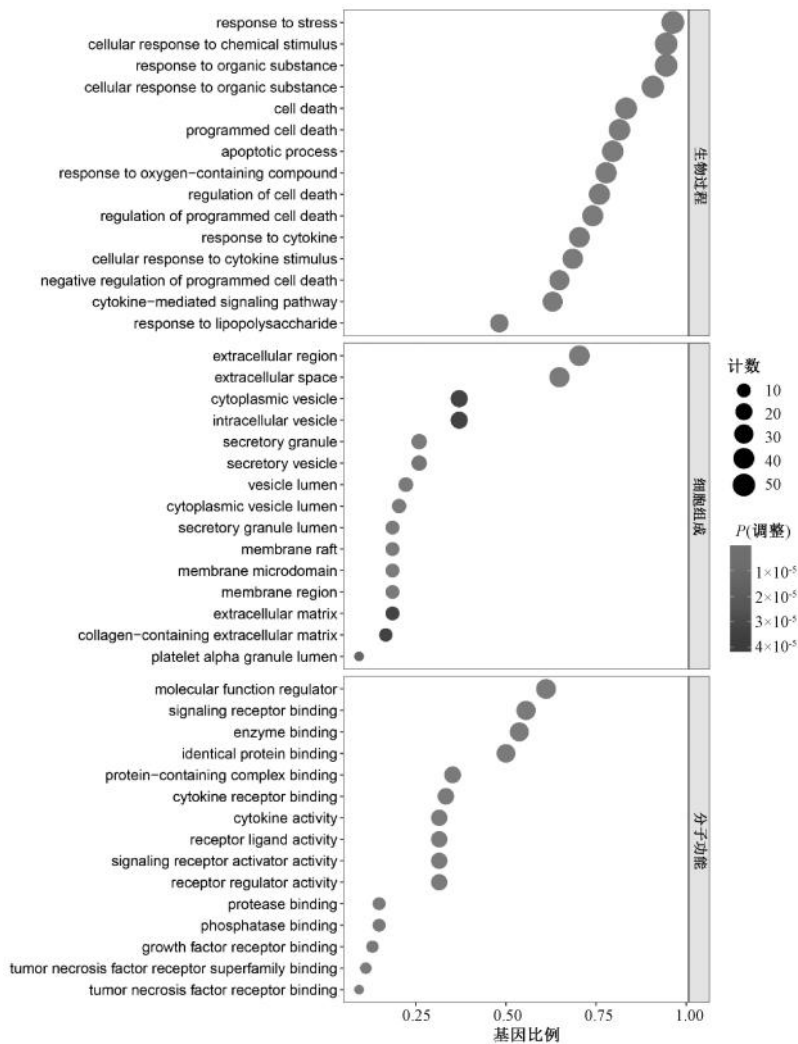


图 4 GO 功能富集分析

Fig 4 GO functional enrichment analysis

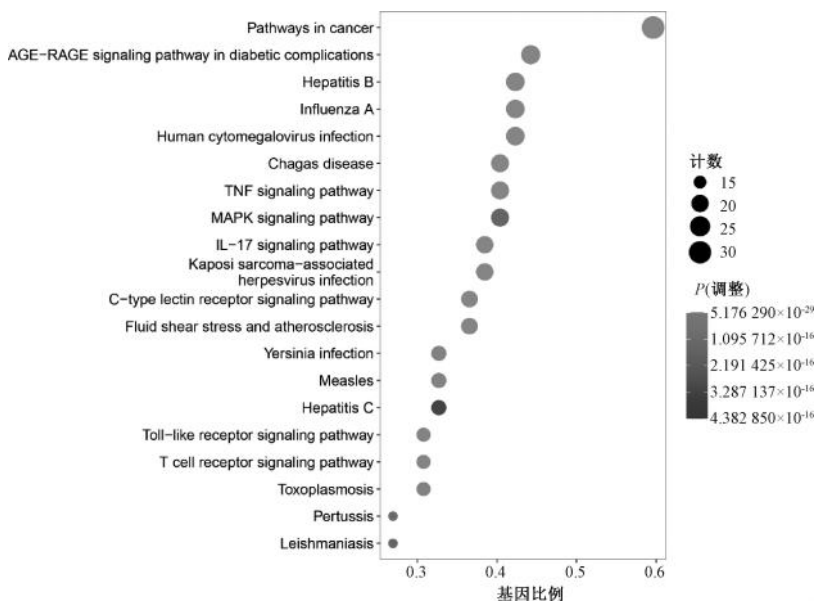
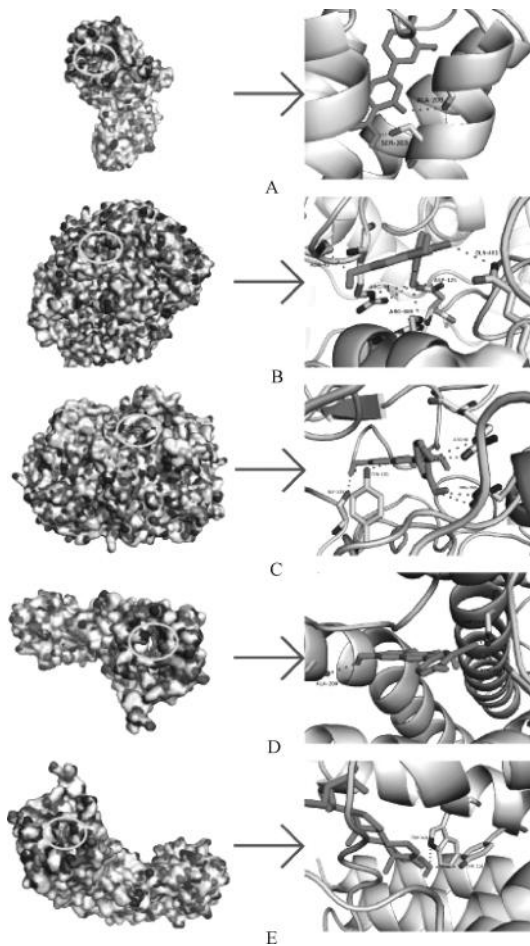


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig 5 KEGG pathway enrichment analysis



A. ADRB2-luteolin; B. PTGS2-luteolin; C. PTGS2-quercetin;
D. ADRB2-quercetin; E. ADRB2-beta-sitosterol
A. ADRB2-luteolin; B. PTGS2-luteolin; C. PTGS2-quercetin;
D. ADRB2-quercetin; E. ADRB2-beta-sitosterol

图6 分子对接结果

Fig 6 Results of molecular docking

2.8 “药物-成分-靶点-通路”网络

荆防颗粒治疗流感的“药物-成分-靶点-通路”网络见图9,图中正方形节点代表荆防颗粒,三角形节点代表药物,菱形节点代表成分,圆形节点代表靶点,正六边形节点代表通路。

3 讨论

荆防颗粒由11味中药组成,其中荆芥、防风为君药,有发汗解表散风之效;羌活、独活为臣药,祛一身风寒湿邪;柴胡、川芎、桔梗、枳壳、前胡和茯苓共为佐药;甘草调和诸药,为使药;诸药合用,共奏发汗解表、散风祛湿之效^[4]。

通过“药物-成分-潜在靶点”网络发现,荆防颗粒可能通过槲皮素、木犀草素、山柰酚等成分作用于PTGS2、PRSS1和ADRB2等靶点发挥治疗流感的作用。槲皮素具有抗氧化、抗菌、抗病毒、抗肿瘤和抗炎的作用,影响流感病毒mRNA的合成、病毒的组装及释放^[5-6]。木犀草素能够干扰IAV外壳蛋白I复合物的表达,抑制H1N1导致的细胞病变,下调流感病毒H1N1激活的凋亡通路^[7-9]。山柰酚与M2蛋白有较高

的结合亲和力,能够阻断神经氨酸酶的活性位点,抑制TLR4/MyD88介导的NF- κ B和MAPK通路的激活,从而抑制炎症介质过量产生^[10-12]。汉黄芩素能够抑制TLR7介导的MyD88依赖性信号通路及NF- κ B p65的核转位和表达,抑制流感病毒感染后肺泡巨噬细胞内炎症因子的产生,发挥抗炎作用^[13-14]。PTGS2具有抗炎、抗氧化的作用,与炎症病理过程密切相关^[15]。MAPK14参与调节炎症反应,被激活后可以调节炎症介质的产生以及细胞的增殖、分化^[16-17]。ADRB2即 β 2-AR,可介导NE诱导细胞分泌IL-10,控制炎症^[18]。RELA与炎症调节、免疫应答等生命活动密切相关^[19]。CASP3、CASP8与细胞焦亡密切相关^[20]。木犀草素能下调CASP3、CASP8的表达,干预流感病毒诱导的细胞凋亡^[8]。因此,荆防颗粒治疗流感的作用机制可能与抑制流感病毒复制,干预炎症反应和免疫应答有关。

GO功能富集分析结果发现,荆防颗粒可能通过调节信号受体结合、细胞因子受体结合和分子功能等过程,参与调控细胞死亡、细胞对相关刺激的反应,发挥抗流感病毒的作用。甲型流感信号通路图显示,荆防颗粒参与了流感病毒的先天免疫逃避、细胞因子抗感染、细胞死亡、流感病毒RNP的输出和流感病毒蛋白的表达等过程,并涉及到MAPK信号通路。MAPK通路是生物体内的信号传导通路,可以将细胞外刺激信号,如细胞因子、炎症反应等信号,从细胞膜传导至细胞核内,参与多种生理病理过程,影响细胞生长的各阶段,如细胞的生长、增殖和迁移等活动都会受到MAPK通路的调控^[21-22]。说明荆防颗粒治疗流感可能与干预细胞死亡、抑制流感病毒的表达和调节免疫反应有关。

综上所述,本研究采用网络药理学和分子对接的方法,初步揭示了荆防颗粒治疗流感的分子机制,为进一步的研究提供了基础。

参考文献

- [1] 马洲, 姜明, 邢志芳, 等. 流感病毒研究现状与进展[J]. 检验医学, 2020, 35(12): 1315-1319.
- [2] 王贺新, 张婷婷, 李春进, 等. 常见病毒性肺炎病原学研究现状及进展[J]. 解放军预防医学杂志, 2020, 38(7): 80-84.
- [3] 刘雯, 李峰, 孙春亮, 等. HPLC同时测定荆防颗粒中6种成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(17): 55-58.
- [4] 陈文璐, 张怡萍, 牟艳芳, 等. 基于生物信息技术的荆防颗粒治疗冠状病毒感染疾病机制探析[J]. 中草药, 2020, 51(15): 3937-3951.
- [5] Mehrbod P, Hudy D, Shyntum D, et al. Quercetin as a Natural Therapeutic Candidate for the Treatment of Influenza Virus[J]. Biomolecules, 2021, 11(1): 10.
- [6] 杨颖, 王芸芸, 蒋琦辰. 槲皮素药理作用的研究进展[J]. 特种经济动植物, 2020, 23(5): 24-28.
- [7] Yan H, Ma L, Wang H, et al. Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex expression[J]. J Nat Med, 2019, 73(3): 487-496.

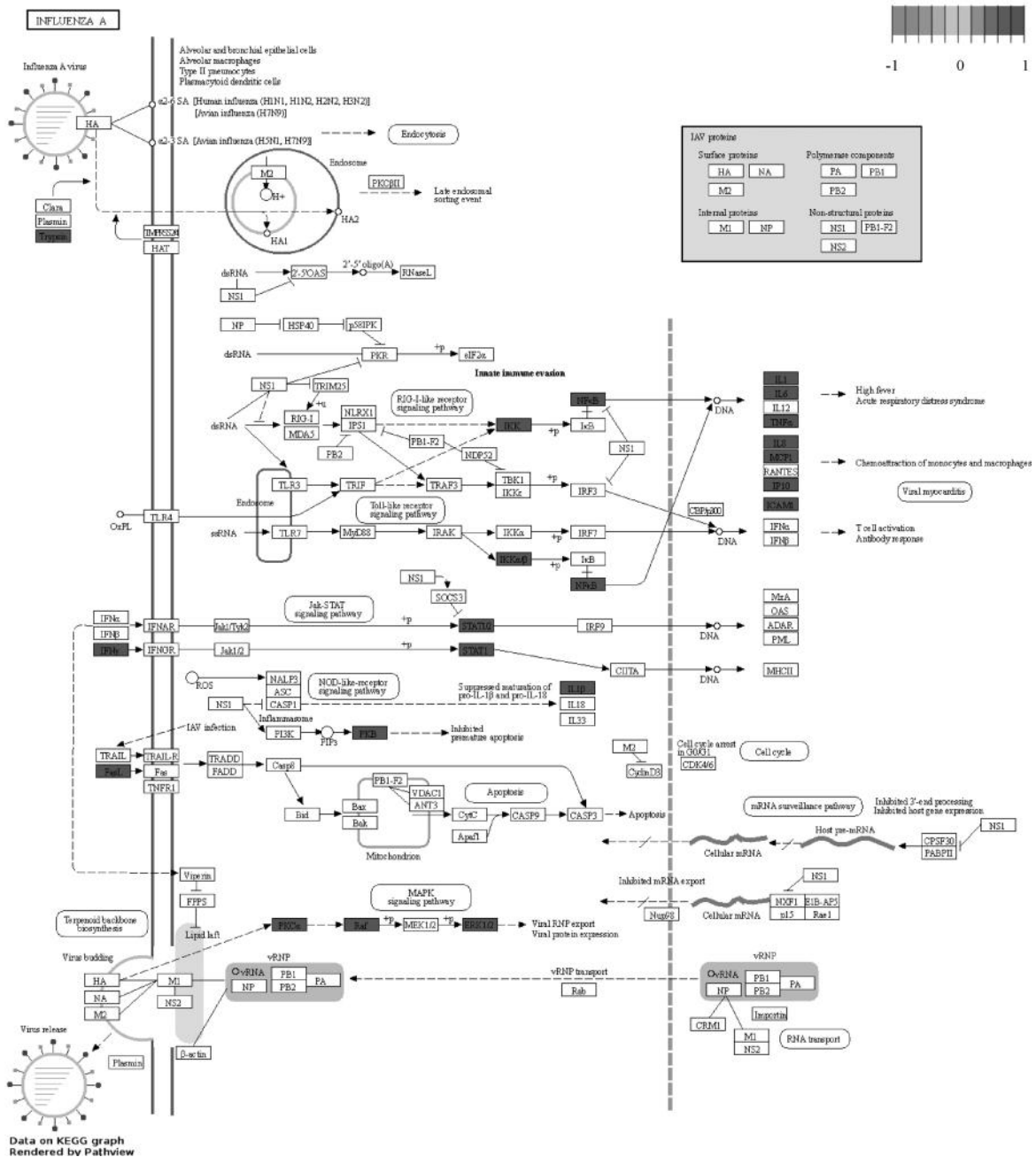


图7 荆防颗粒干预 Influenza A 通路图

Fig 7 Pathway of Influenza A intervened by Jingfang granules

[8] 邓东沅,顾立刚,刘晓婷,等. 木犀草素体外对 H1N1 感染 A549 诱导凋亡的干预作用及机制[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1524-1527.

[9] 邓东沅,顾立刚,刘晓婷,等. 木犀草素体外对 H1N1 感染 A549 作用的研究[J]. 中医药导报, 2017, 23(3): 11-14.

[10] Choi JG, Lee H, Kim YS, et al. Aloe vera and its Components Inhibit Influenza A Virus-Induced Autophagy and Replication[J]. Am J Chin Med, 2019, 47(6): 1307-1324.

[11] Sadati SM, Gheibi N, Ranjbar S, et al. Docking study of flavonoid derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 virus neuraminidase[J]. Biomed Rep, 2019, 10(1): 33-38.

[12] Zhang R, Ai X, Duan Y, et al. Kaempferol ameliorates H9N2 swine influenza virus-induced acute lung injury by inactivation of TLR4/MyD88-mediated NF-κB and MAPK signaling pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 660-672.

[13] 谢银子, 钟彩婷, 纪树亮, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨化湿败毒方治疗新型冠状病毒肺炎的分子机制[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(3): 28-35.

[14] 范卫锋, 李皓翔, 梅全喜, 等. 防瘟九味饮防治新型冠状病毒肺炎的网络药理学研究[J]. 中药材, 2020, 43(4): 1044-1050.

[15] 周帅琪, 梁龙, 于杰, 等. 基于网络药理学探讨独活-桑寄生治疗骨质疏松症的活性成分及生物学基础[J]. 中国骨质疏松杂志,

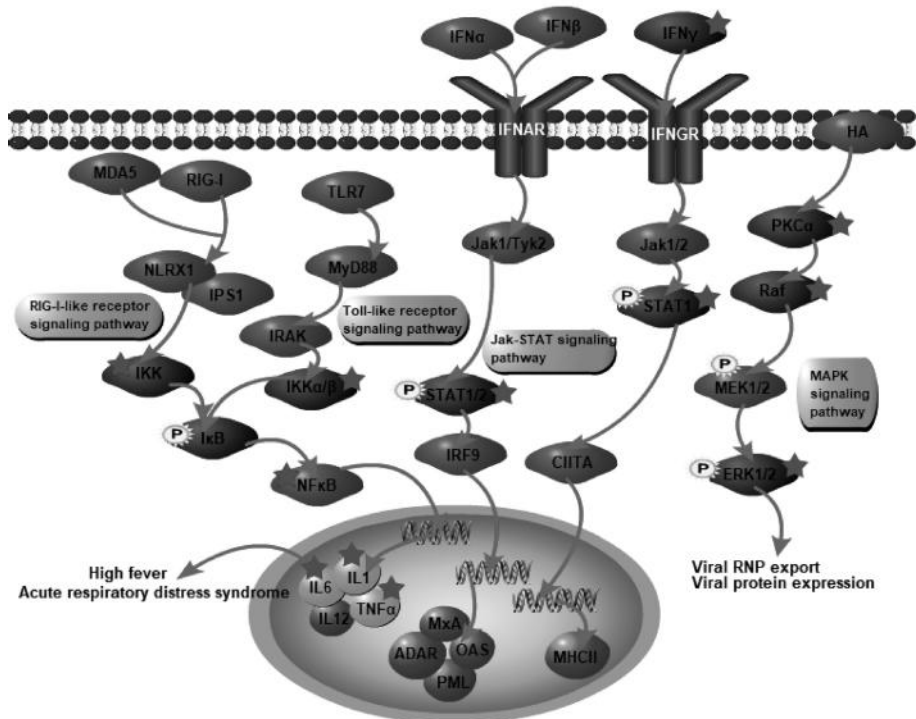


图 8 荆防颗粒干预 Influenza A 核心通路示意图

Fig 8 Core pathway of influenza A intervened by Jingfang granules

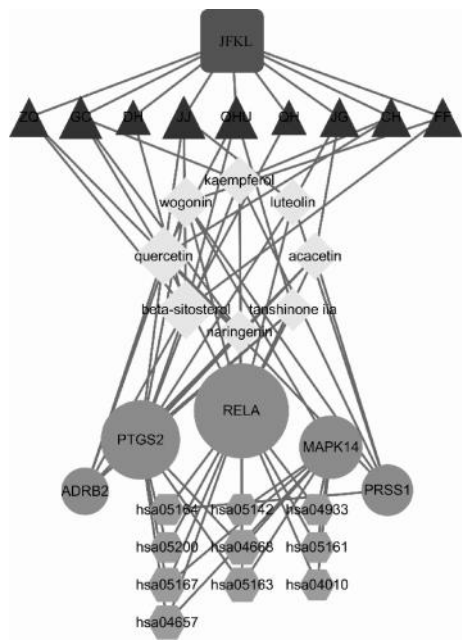


图 9 “药物-成分-靶点-通路”网络

Fig 9 “Drug-components-targets-pathway” network

2020,26(11):1584-1591.

[16] 廖美华,张涛,赖冬萍,等.基于网络药理学及分子对接探讨
 苓白术散治疗腹泻型肠易激综合征的作用机制[J].海南医学
 院学报:1-17[2021-11-17].https://doi.org/10.13210/j.cnki.
 jhmu.20210219.001.

[17] 杨甜,吴八路,江宏强,等.MAPK14与胃癌放疗抵抗机制实验研
 究[J].中华肿瘤防治杂志,2019,26(21):1599-1605.

[18] Ağaç D, Estrada LD, Maples R, et al. The β 2-adrenergic receptor
 controls inflammation by driving rapid IL-10 secretion [J]. Brain
 Behav Immun, 2018, 74: 176-185.

[19] 耿云峰,杜鸿斌,刘琳琳,等.NF- κ B家族成员RelA的翻译后修饰
 及其生理病理作用的研究进展[J].生命科学,2020,32(5):
 431-438.

[20] 姜明霞,祁玲,李燕京.Caspase家族在肿瘤细胞焦亡中的研究进
 展[J].肿瘤,2020,40(12):872-880.

[21] 段昆朋.LncRNA LINC00978通过MAPK信号通路影响肝细胞
 癌发生发展的研究[D].保定:河北大学,2020.

[22] 彭波辉.JNK/MAPK信号通路介导的组蛋白乙酰化修饰在漆树酸改
 善PE诱导心肌肥大中的作用[D].遵义:遵义医科大学,2020.

(收稿日期:2021-08-04)

(上接第1290页)

[17] 黄晓巍,张丹丹,王晋冀,等.葛根化学成分及药理作用[J].吉
 林中医药,2018,38(1):87-89.

[18] Chen T, Li J, Chen J, Song H, Yang C. Anti-hyperplasia effects of
 Rosa rugosa polyphenols in rats with hyperplasia of mammary gland
 [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015, 39(2): 990-996.

[19] 折娅欢,张小花,武权生.中药周期疗法治疗肝郁痰凝型乳腺增
 生症60例临床观察[J].世界最新医学信息文摘:连续型电子
 期刊,2018,18(92):118-119.

[20] Li JQ, Xiao CJ, Li YM, et al. Astronestin, a novel auronoph-
 enylpropanoid adduct from the roots of Astragalus ernestii [J]. Nat
 Prod Res, 2020, 34(20): 2894-2899.

(收稿日期:2021-06-30)