

基于网络药理学的双黄连口服液抗流感病毒的作用机制研究

摘要：目的 本研究采用网络药理学方法筛选双黄连口服液抗流感病毒作用的潜在活性成分，探讨双黄连口服液抗流感病毒活性的作用机制。**方法** 从中药系统药理学分析平台(TCMSP)中寻找与双黄连中 3 味中药相关的所有成分和作用靶点，并构建药物分子-靶点网络；通过 DisGeNET、GenCards 数据库筛选与抗流感病毒相关的靶标，利用 STRING 构建药物-疾病靶点网络；对核心靶点进行网络拓扑分析；并进行 GO 及 KEGG 通路富集分析，构建双黄连活性成分-药物靶点-KEGG 通路网络。**结果** 药物分子-靶点网络得到 270 个节点，1067 条边，其中包括山柰酚、木犀草素、 β -谷甾醇等 82 个成分，关键靶点有 RELA、MAPK1、IL6、MAPK14、CXCL8 等。通过 GO 富集获得 $P < 0.05$ 的生物学过程 122 条；通过 KEGG 富集获得 $P < 0.05$ 的信号通路 155 条。**结论** 双黄连口服液抗流感病毒是通过多成分、多靶点、多通路的协同作用来发挥疗效的。但由于本研究主要基于网络药理学以基础理论水平探讨，后期还需要进一步对其药效学、代谢组学、临床疗效等开展实验研究，为双黄连口服液抗流感病毒以及后期的药物开发提供坚实的依据。

关键词：抗流感病毒；双黄连；网络药理学

Exploration on Mechanism of Anti-influenza Virus Activity of Shuanghuanglian Based on Network Pharmacology

Abstract: **Objective:** This paper aimed to investigate the anti-influenza virus activity of Shuanghuanglian, screen potential anti-influenza virus compounds to explore the mechanism of anti-influenza virus activity. **Methods:** By identifying all the composition and effect targets of three herbal ingredients in Shuanghuanglian from TCMSP, and the pharmaceutical molecular-target network was constructed. The interaction network of drug-disease target by STRING was constructed by screening related targets through DisGeNET and GenCards databases. The centre targets were analyzed by network topology. The R Project was used to perform GO and KEGG pathway enrichment analysis of centre target proteins, and further construct a multi-dimensional network relationship diagram of the active component of Shuanghuanglian-drug targets-signaling pathway. **Results:** The component-target network included 270 nodes and 1067 edges, including 82 components such as kaempferol, luteolin, quercetin, etc, and key targets included RELA, MAPK1, IL6, MAPK14, CXCL8, etc. 122 biological processes with $P < 0.05$ obtained through GO enrichment, by KEGG enrichment, 155 signal pathways with $P < 0.05$ were obtained. **Conclusion:** A variety of active ingredients contained in Shuanghuanglian play a role in controlling through various biological pathways.

Key words: anti-influenza virus activity; Shuanghuanglian ; network pharmacology

流行性感冒是由流感病毒引起的呼吸道疾病。流感病毒属于正黏病毒科，球形或丝状，是一种负螺旋单链片段 RNA 病毒^[1]。具有种类繁多、传染性强等特点^[2]。可根据其病毒核蛋白和基质蛋白抗原决定簇的不同分为 A, B, C 三个亚型^[3]。针对病毒靶点药物的大量使用加速了流感耐药株的出现，因此，低毒高效的新型抗流感药物的研究与开发尤为紧迫。

“双黄连”由金银花、黄芩、连翘组成，中医研究发现，这三味中药具有良好的清热解毒作用；现代医学研究认为，双黄连口服液具有广谱抗病毒、提高机体免疫的作用，是目前有效的广谱抗病毒药物之一^[4]。多年临床实践证明双黄连对流行性感冒有显著的治疗作用，并且已由呼吸系统疾病扩展到其他系统疾病，如动脉粥样硬化等^[5]，对多种疾病的临床疗效确切^[6]。

网络药理学是一种基于大数据融合系统生物学、药理学以及多种网络计算平台的新兴学科^[7]。本研究采用网络药理学的方法预测和筛选双黄连口服液抗流感病毒的潜在活性成分和作用靶点，讨论双黄连口服液多成分、多靶点抗流感病毒的作用机制，为进一步研究双黄连口服液抗流感病毒活性奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 数据库及软件

数据库:中药系统药理学分析平台 TCMSP, DisGeNET, Uniprot, GeneCards, STRING-11.0, Venny2.1。软件及插件: R 语言、Cytoscape Version 3.7.1 及其 BisoGenet、Network Analysis 插件。

1.2 药物相关活性成分及药物靶点的筛选

利用中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP^[8]，在“信息设定”模块，分别以“金银花”“黄芩”“连翘”为关键词获得双黄连中所含的已知化学成分，设置口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) ≥ 0.18 筛选金银花、黄芩、连翘的活性成分，收集已知化学成分的靶点。将所筛选的靶点导入 Uniprot 数据库^[9]，将检索得到的所有蛋白靶标校正为 UniprotID，得到靶标蛋白所对应的基因。

1.3 双黄连抗流感病毒潜在作用靶点预测

以“*Influenza*”为关键词，检索 DisGeNET、GenCards 数据库，选择物种为“*Homo sapiens*”，寻找与流感病毒相关的基因。将流感病毒相关基因和靶标蛋白所对应的基因取交集，利用 Venny2.1 绘图软件绘制韦恩图，将双黄连预测的靶点与疾病的靶点进行映射，获得双黄连口服液抗流感病毒的潜在作用靶点。

1.4 药物分子-靶点的构建

将筛选得到的共有靶标蛋白上传至 STRING^[10]平台，蛋白种属设为“*Homo sapiens*”，建立药物靶蛋白-疾病靶蛋白(PPI)相互作用网络，筛选条件为最高置信度“highest confidence(≥ 0.9)”，删除孤立节点，得到 PPI 相互作用关系网络，获得蛋白互作关系，保存为 TSV 格式文件。将其导入 Cytoscape-3.7.1 中，运用插件“Network Analyze”分析网络拓扑

参数。之后将 STRING 平台筛选出来的相互作用的蛋白基因输入 Cytoscape 3.7.1 软件 BisoGenet^[11]插件中, 通过设置筛选条件“Human”, “Gene identifiers only”等, 对蛋白质相互作用的关系进行更深入分析。

1.5 PPI 网络的拓扑分析和核心靶点的筛选

将上述 BisoGenet 插件得到的蛋白互作网络进行功能分析, 使用 Cytoscape 软件中 CytoNCA^[12]插件, Centralities 下选取“degree(DC)”, 点击 analyze 进行拓扑分析, 然后调节中心度值(BC), 多次筛选之后, 得到新的核心蛋白互作网络。

1.6 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析

采用 R 语言软件, 应用 org.Hs.eg.db 将 symbol 转变为基因 ID, 利用 clusterProfiler 程序包, 对调控网络的靶基因进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析, 设定 $P < 0.05$, 筛选出具有显著性差异的 GO 功能和 KEGG 通路信息。将符合 $P < 0.05$, 从小到大排序前 20 个 GO 及 KEGG 信号通路用 R 软件画出 GO 富集分析和 KEGG 通路分析的柱状图。

1.7 双黄连活性成分-药物靶点-KEGG 通路网络构建

将符合 $P < 0.05$, 从小到大排序前 30 个参与抗流感病毒的 KEGG 通路, 与双黄连活性成分、药物靶点共同上传至 Cytoscape 3.7.1 软件, 得到双黄连活性成分-药物靶点-KEGG 通路网络图, 对网路进行分析。

2 结果

2.1 双黄连活性成分

通过 TCMSP 数据库, 输入双黄连中 3 味中药, 即金银花、黄芩、连翘, 通过 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 条件筛选出双黄连口服液活性化合物共 82 个, 其中黄芩 36 个, 连翘 23 个, 金银花 23 个化合物。这 82 个化合物包括: quercetin(槲皮素)、beta-Sitosterol(β -谷甾醇)、luteolin(木犀草素)、neobaicalein(黄芩新素)、stigmasterol (豆甾醇)、Kaempferol(山柰酚)等。然后将 82 个化学成分输入 TCMSP 数据库, 经过筛选后共得到 218 个药物潜在靶点。双黄连主要活性成分见表 1(由于筛选结果过多, 因此根据 OB 值仅列出前 20 项), 双黄连成分靶标见表 2(由于筛选结果过多, 只展示部分结果)。

表 1 双黄连部分活性成分基本信息

Table 1 Basic information of some compounds in Shuanghuanglian

药材	MolID	分子名	OB (%)	DL
黄芩	MOL002934	NEOBAICALEIN	104.34	0.44
连翘	MOL003330	(-)-Phillygenin	95.04	0.57
连翘	MOL003306	ACon1_001697	85.12	0.57
连翘	MOL003322	FORSYTHINOL	81.25	0.57
连翘	MOL003370	Onjixanthone I	79.16	0.30
黄芩	MOL002932	Panicolin	76.26	0.29
连翘	MOL000791	bicuculline	69.67	0.88

黄芩	MOL002927	Skullcapflavone II	69.51	0.44
黄芩	MOL002911	2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone	69.04	0.22
黄芩	MOL002937	DIHYDROOROXYLIN	66.06	0.23
连翘	MOL003308	(+)-pinoresinol monomethyl ether-4-D-beta-glucoside_qt	61.20	0.57
金银花	MOL003117	Ioniceracetalides B_qt	61.19	0.19
金银花	MOL003111	Centauroside_qt	55.79	0.50
金银花	MOL003108	Caeruloside C	55.64	0.73
连翘	MOL000211	Mairin	55.38	0.78
黄芩	MOL000228	(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	55.23	0.20
金银花	MOL003014	secologanic dibutylacetal_qt	53.65	0.29
连翘	MOL003295	(+)-pinoresinol monomethyl ether	53.08	0.57
连翘	MOL003290	(3R,4R)-3,4-bis[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one	52.30	0.48
金银花	MOL003095	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	51.96	0.41

表 2 双黄连部分靶点基本信息

Table 2 Basic information on some targets of Shuanghuanglian

Mol Id	靶标名	基因
MOL000098	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	PSMD3
MOL000006	72 kDa type IV collagenase	MMP2
MOL000098	Acetylcholinesterase	ACHE
MOL000098	Acetyl-CoA carboxylase 1	ACACA
MOL000098	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog	AHSA1
MOL000006	Adenylate cyclase type 2	ADCY2
MOL000449	Alcohol dehydrogenase 1C	ADH1C
MOL000791	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	ALDH3A1
MOL000422	Aldo-keto reductase family 1 member C3	AKR1C3
MOL000098	Aldose reductase	AKR1B1
MOL000358	Alpha-1A adrenergic receptor	ADRA1A
MOL000358	Alpha-1B adrenergic receptor	ADRA1B
MOL000449	Alpha-2A adrenergic receptor	ADRA2A
MOL000449	Amine oxidase [flavin-containing] A	MAOA
MOL000098	Amine oxidase [flavin-containing] B	MAOB
MOL000006	Amyloid beta A4 protein	APP

MOL000006	Androgen receptor	AR
MOL000422	Antileukoproteinase	SLPI
MOL002714	Apolipoprotein D	PYGM

2.2 药材-化合物-靶点相互作用网络

药材-化合物-靶点网络总共包括 270 个节点和 1067 条边，如图 1 所示，其中正上方,左下角, 右下角三个红色正方形分别代表黄芩、金银花、连翘三种药材，7 个青色正六边形代表三种药材共有化合物，黄色圆形代表黄芩所属化合物，绿色圆形代表金银花所属化合物，蓝色圆形代表连翘所属化合物，浅粉红色代表靶标基因。该网络中，每个化合物平均与 18.5 个靶点相互作用，每个靶点平均与 4.7 个化合物相互作用。在网络中，一个节点的度值表示网络中和节点相连的节点的数量。目前网络分析的主要策略之一是利用节点度值排序确定网络关键节点，对整个网络具有重要的贡献意义的节点连接度需要大于等于所有节点连接度的 2 倍。本研究网络中度值 > 中位数(成分度值中位数=8，靶点度值中位数=2，药材度值中位数=17)的药材有 3 个，成分有 32 个，靶点有 177 个。排名前 5 位的化合物分别是 MOL000098-槲皮素、MOL000422-山柰酚、MOL000006-木犀草素、MOL000358-β-谷甾醇、MOL000449-豆甾醇，分别能与 264、98、96、77、50 个靶点蛋白发生相互作用；从靶点的角度，排名前 5 位的是 PTGS2、PTGS1、SCN5A、AR、ADRB2，分别能与 54、43、32、28、24 个化合物发生相互作用。

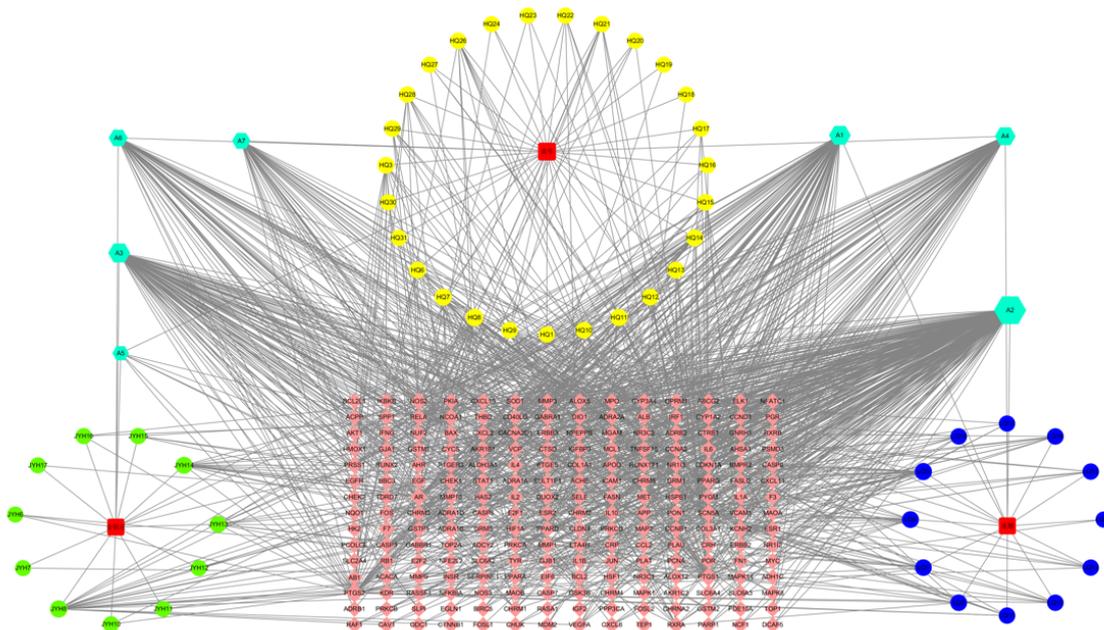


图 1 双黄连药材-化合物-靶点网络

Fig. 1 Shuanghuanglian-compound-target network

2.3 双黄连抗流感病毒作用靶点预测及 PPI 构建

通过 DisGeNET、GenCards 等数据库分别收集到流感病毒潜在靶点 858 个、2506 个，剔除重复 46 个，共收集到 2905 个流感相关靶点。将双黄连和流感病毒潜在靶点进行映射取交集共得到 111 个双黄连抗流感病毒潜在作用靶点，见图 2。将其导入 STRING 中，以高置信度为条件筛选，得到联系紧密的蛋白互作网络图，见图 3。经过筛选后得到 97 个靶点，利用 Network Analyze 插件对导出的 97 个靶点进行分析，得到图 4，其共涉及 97 个节点、405 条边，其中节点越大度值越大，边的粗细反应连接评分，边越粗评分越高，即关系越密切。排名前五的关键靶点分别为 RELA、MAPK1、IL6、MAPK14、CXCL8。

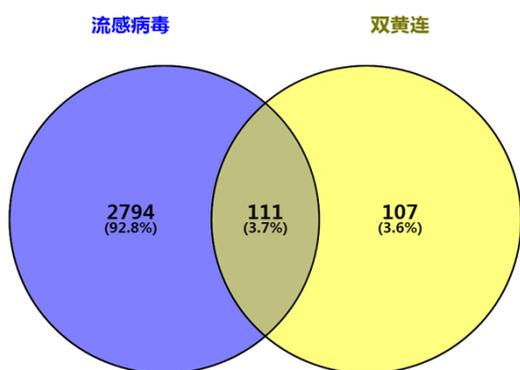


图 2 药物靶点-疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of targets of herbs and disease

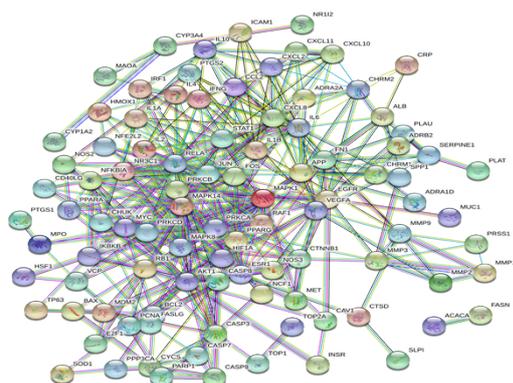


图 3 共有靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of common targets

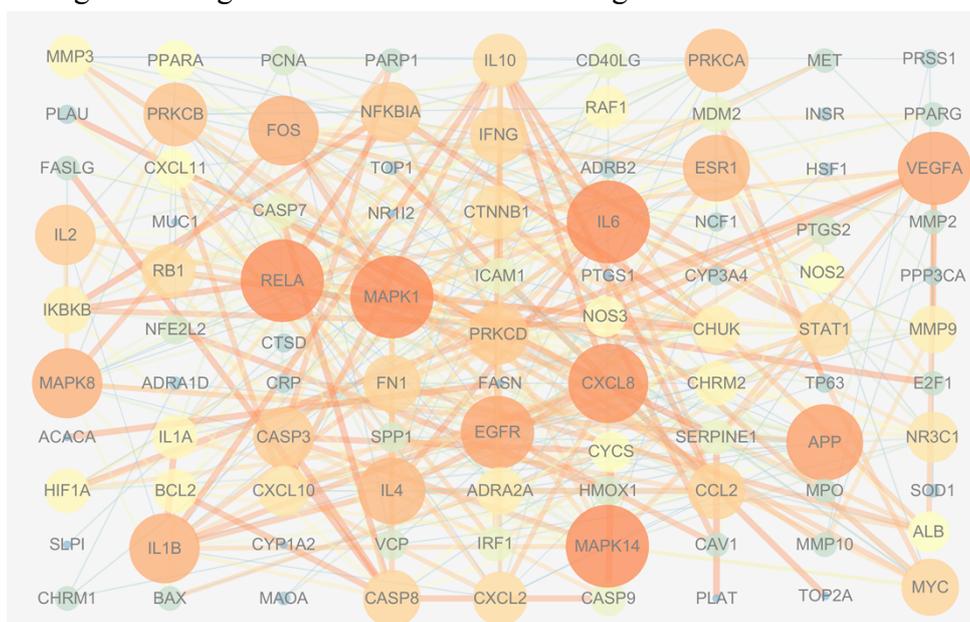


图 4 双黄连 PPI 关键子网络

Fig. 4 Key subnetwork for PPI network diagram of Shuanghuanglian

2.4 网络拓扑分析

为进一步探究双黄连抗流感病毒的机制，将共有蛋白基因输入 Cytoscape3.7.1 软件的 BisoGenet 插件中进行网络分析，根据前文筛选条件，初步得到一个 3654 个节点、85200 条边的 PPI 网络图，以 $DC \geq 60$ 进行 2 次筛选，得到一个 837 个节点、84642 条边的 PPI 网

络图，3次筛选得到一个63个节点以及835条边的PPI网络图，其过程见图5。

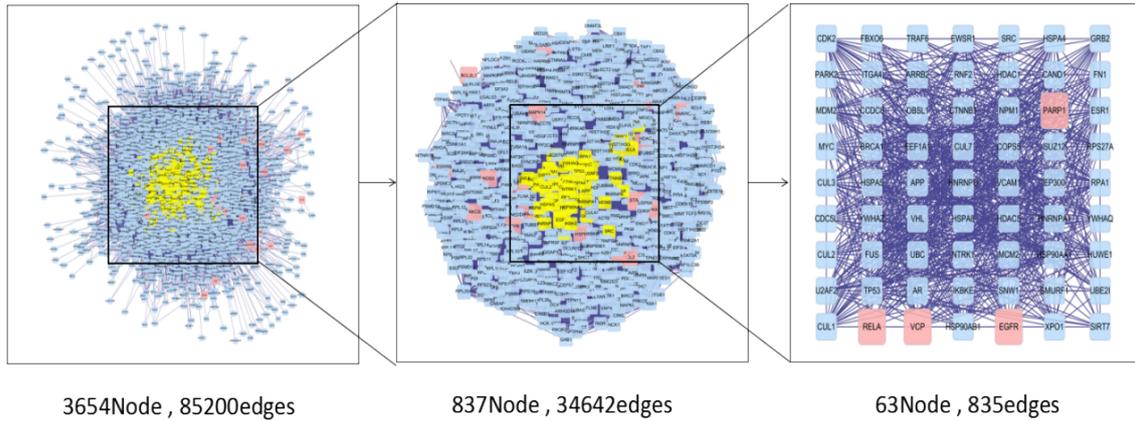


图5 PPI网络拓扑分析

Fig. 5 Network topology analysis of PPI

2.5 GO 和 KEGG 富集分析

利用 R 语言核心靶点进行 Gene Ontology(GO)功能分析和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)信号通路分析，分子层面涉及的 GO 富集分析有细胞因子受体结合、细胞因子活性、激活转录因子结合、受体配体活性等，柱状图见图 6。KEGG 通路分析结果可知，排名靠前的涉及乙型肝炎、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、IL-17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、人巨细胞病毒感染等疾病相关信号通路，其中乙型肝炎涉及 JUN、E2F1、AKT1、IKBKB、CASP8 等基因；波西肉瘤相关疱疹病毒感染涉及 IL6、VEGFA、CASP3、CXCL8、MYC 等基因；IL-17 信号通路涉及 MMP3、CXCL2、MAPK14、PTGS2、MMP9 等基因，柱状图见图 7。

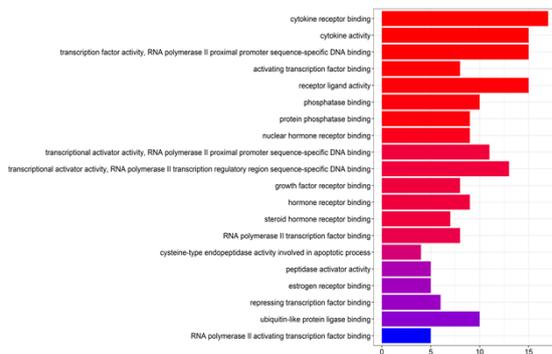


图6 GO 富集分析柱状图

Fig.6 Histogram of GO analysis

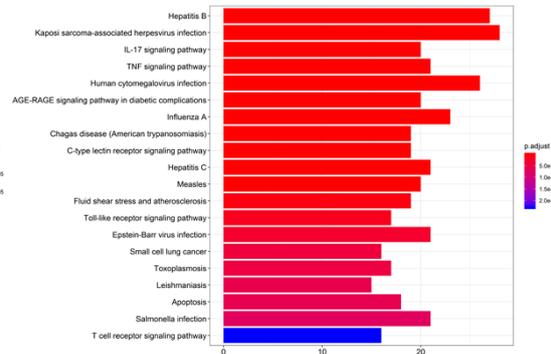


图7 KEGG 富集分析柱状图

Fig. 7 Histogram of KEGG analysis

2.6 活性成分-共同靶点-通路网络图

将 $P < 0.01$ 筛选出的排名前 30 条信号通路、信号通路上的靶点和双黄连活性成分输入 Cytoscape3.7.1 软件中，构建“活性成分-共同靶点-通路”图，总共包括 305 个节点和 1441 条边。如图 8 所示：绿色代表药物活性成分；黄色代表靶点；蓝色代表信号通路。

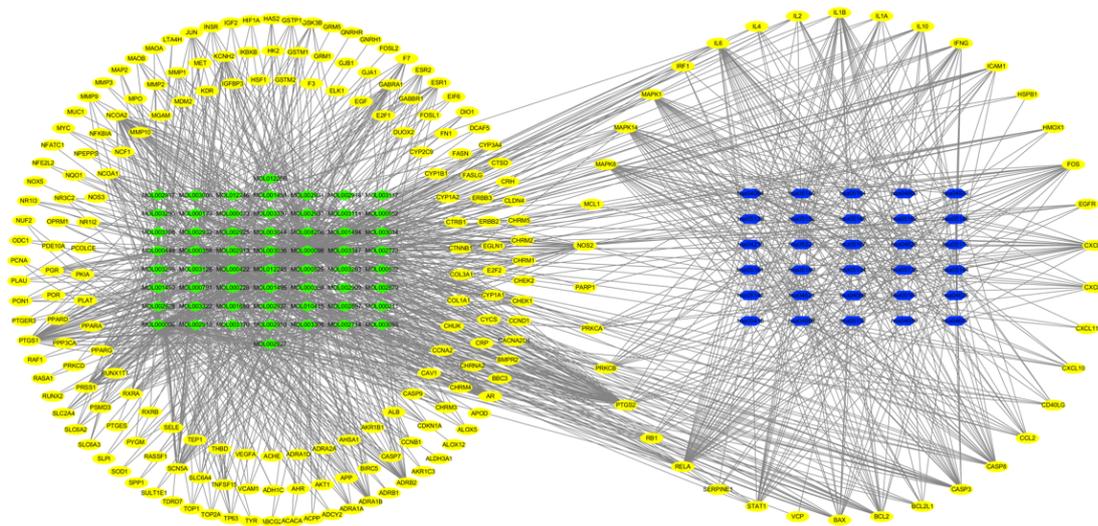


图 8 双黄连成分-药物靶点-信号通路网络

Fig. 8 Network of compounds of Shuanghuanglian-drug targets-signaling pathway

通过对双黄连口服液有效成分进行相关靶点的筛选，筛选出抗流感病毒的直接靶点有 218 个，通过 PPI 网络分析发现 RELA、MAPK1、IL6、MAPK14、CXCL8 等靶点是双黄连口服液抗流感病毒的主要作用靶点。RELA 是转录因子 NF- κ B 的一个亚基，可激活 NF- κ B^[13]。NF- κ B 蛋白家族可以选择性的结合在 B 细胞 κ -轻链增强子上调控多种基因的表达，在细胞的免疫应答、炎症反应等过程中起到关键性作用。MAPK1 和 MAPK14 是丝裂原活化蛋白激酶，主要在 DNA 损伤、氧化应激和病毒感染等情况下被激活，并可检测到 MAPK 成员的磷酸化^[14]。关键靶标 IL6 作为细胞因子，具有传递信息、激活与调节免疫细胞功能，在炎症修复病理过程中起重要作用^[15]。CXCL8 属 ELR⁺CXC 趋化因子，其趋化吸引多种炎症细胞至肺部组织浸润积聚，释放血管活性物质，引起组织免疫损伤^[16]。有研究发现趋化因子可影响 T 淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞吞噬作用，促进组织修复，发挥机体免疫应答和对肺部炎症进行抑制^[17, 18]。由此可知，双黄连口服液抗流感病毒靶点涉及抗炎、抗病毒、抗氧化、免疫应答等药理作用。

通过 KEGG 富集分析显示，双黄连口服液主要活性成分相关靶点涉及参与乙型肝炎、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、IL-17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、人巨细胞病毒感染等疾病相关信号通路，其主要与病毒感染的疾病有关。IL-17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路在抗病毒、介导能量代谢、炎症反应、血管生成以及维持干细胞特性等方面发挥重要作用，例如 SARS 病毒诱导了模式识别受体和 IL-17 通路的激活^[20]。由此可推理出，双黄连口服液抗流感病毒的有效成分可能是山奈酚、木犀草素、槲皮素等，但其具体作用机制及效果有待通过实验进一步论证。

综上所述，本研究应用网络药理学方法对双黄连中化学成分、作用靶点进行了分析，从理论上验证了双黄连口服液抗流感病毒是通过多成分、多靶点、多通路的协同作用来发挥疗效的。但由于本研究主要基于网络药理学以基础理论水平探讨，后期还需要进一步对

其药效学、代谢组学、临床疗效等开展实验研究，为双黄连口服液抗流感病毒以及后期的药物开发提供坚实的依据。

参考文献：

- [1] LI J, YANG X, HUANG L. Anti-Influenza Virus Activity and Constituents Characterization of *Paeonia delavayi* Extracts [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1133-1135.
- [2] 姜昕汝, 王于莉, 郑月娟. 中西医抗流感病毒研究进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 039(001): 121-124.
- [3] 马琳琳, 蒋建东, 李玉环. 抗流感病毒药物宿主靶点的研究进展 [J]. *药学学报*, 2014, (12): 11-18.
- [4] 杨丽梅. 双黄连蜂胶口服液的制备及药理学研究 [D]; 吉林大学, 2013.
- [5] 梁浩, 于莹, 邹天雨, 等. 双黄连对动脉粥样硬化大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路表达的影响实验研究 [J]. *现代中药研究与实践*, 2020, 01): 20-23.
- [6] 于洋, 于欣欣, 吴艳丽. 双黄连口服液治疗细菌性呼吸道感染的疗效与安全性观察 [J]. *中医临床研究*, 2018, 10(08): 34-35.
- [7] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [8] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6(13) : 123-125.
- [9] APWEILER R, BAIROCH A, WU C H, et al. UniProt: the Universal Protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Database issue): D115-119.
- [10] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-d13.
- [11] MARTIN A, OCHAGAVIA M E, RABASA L C, et al. Bisogenet: a new tool for gene network building, visualization and analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(91).
- [12] TANG Y, LI M, WANG J, et al. CytoNCA: a cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks [J]. *Biosystems*, 2015, (127): 67-72.
- [13] 李玉. Keap1 与 RelA 相互作用及生理功能的研究 [D]; 湖北大学, 2009.
- [14] LIM Y X, NG Y L, TAM J P, et al. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions [J]. *Diseases*, 2016, 4(3): 12-19.
- [15] 张珣, 唐莎, 袁琳, 等. 气道上皮趋化因子与肺部炎症反应的研究进展 [J]. *广东医学*, 2018, 39(21): 3277-3282.
- [16] KOBAYASHI Y, WADA H, ROSSIOS C, et al. A novel macrolide solithromycin exerts superior anti-inflammatory effect via NF-kappaB inhibition [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 345(1): 76-84.
- [17] MURDOCH C, MONK P N, FINN A. Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells [J]. *Cytokine*, 1999, 11(9): 704-712.
- [18] 姜懿纳, 陈乃宏. CCL2/MCP-1 在其相关疾病的机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2016,

32(12): 1634-1638.

[29]JOSSET L, MENACHERY V D, GRALINSKI L E, et al. Cell Host Response to Infection with Novel Human Coronavirus EMC Predicts Potential Antivirals and Important Differences with SARS Coronavirus [J]. Mbio, 2013, 4(3): e00165-13-e-13.