

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.04.019

中医药防治传染病专栏

喜炎平注射液防治甲型 H1N1 流感分子机制的生物信息学分析

李 立, 王燕平, 赵 静, 姜 淼, 吕 诚, 吕爱平*

(中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京市东直门内南小街 16 号, 100700)

基金项目: 2009 年中医药行业科研专项资助项目 (200907001); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目 (Z0252, Z0218)

摘要 目的 通过生物信息学方法, 探讨喜炎平注射液防治甲型 H1N1 流感 (简称甲流) 的分子机制。方法 以 “Andrographolide” (穿心莲内酯) 为检索词, 在 PubChem 数据库中查找其相关生物学结果, 根据结果确定穿心莲内酯的活性靶蛋白。以 “H1N1 influenza A” (甲流) 为检索词, 在 Gene 数据库中查找甲流的相关基因。利用 IPA 生物信息学软件分别构建穿心莲内酯的活性靶蛋白及甲流相关基因的分子网络, 并进行生物学作用通路及分子作用机制的解析。结果 查找到穿心莲内酯的活性靶蛋白 9 个, 甲流相关基因 22 个。二者构成的网络中共同分子为: Akt、Hsp90、Hsp27、PI3K、ERK1/2、NFκB、Proteasome、caspase、Jnk、P38MAPK、Pka、Pkc (s)、Ras、RNA polymerase II、Vegf, 其中穿心莲内酯靶蛋白网络的分子大多与细胞周期、胚胎发育及细胞间信号传导有关; 甲流相关基因网络中的分子大多与传染性疾病、炎症反应及免疫性疾病有关。二者共同作用的通路以细胞免疫通路为主, 穿心莲内酯主要作用于该类通路中的 AKT 和 NF-κB 分子。结论 喜炎平注射液可能通过调解细胞免疫通路中的 AKT 和 NF-κB 分子干预甲流。

关键词 喜炎平注射液; 穿心莲内酯; 甲型 H1N1 流感; IPA; PubChem

2009 年全球爆发的甲型 H1N1 流感 (H1N1 influenza A, 简称甲流) 是由新型猪源性甲流病毒引起的一种急性呼吸道传染病, 轻症患者症状与其他流感类似, 重者有严重心、肺、脑并发症, 甚至可能导致死亡。中医药在防治甲流的过程中起到了积极作用, 也获得了比较满意的效果^[1-2]。喜炎平注射液的主要成分是水溶性穿心莲内酯, 在卫生部颁布的甲流治疗方案 (2010 年版)^[3] 中, 喜炎平注射液是中医辨证治疗重症及危重症甲流患者的主要中成药。为探讨喜炎平注射液防治甲流的作用机制, 我们尝试运用生物信息学方法分析二者的分子网络、生物学经典通路和作用位点, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 靶蛋白及相关基因的检索

以 “Andrographolide” (穿心莲内酯) 为检索词, 在 PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

数据库中查找其相关的分子信息及相应的生物学检测结果, 根据数据库中提供的生物学信息, 确定该成分的活性靶蛋白。以 “H1N1 influenza A” 为检索词, 在 Gene 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 中查找甲流的相关基因。

1.2 构建穿心莲内酯及甲流的分子网络

将检索到的穿心莲内酯对应的靶蛋白及甲流相关基因, 在线提交至 IPA (Ingenuity Pathway Analysis <http://www.ingenuity.com/>) 生物分析软件。利用 IPA 软件中的网络分析 (Network analysis) 功能, 分别构建穿心莲内酯及甲流的分子网络。

1.3 对比穿心莲内酯及甲流共同作用的生物学通路及作用位点

利用 IPA 软件中比较模块 (Comparison), 对比穿心莲内酯及甲流的生物学通路, 并选取二者共同作用的通路进行深入研究, 分析二者在共同作用的生物学通路中的位点, 明确喜炎平注射液防治甲流的分子机制。

* 通讯作者: lap64067611@126.com, (010) 64014411 转 2343

2 结果

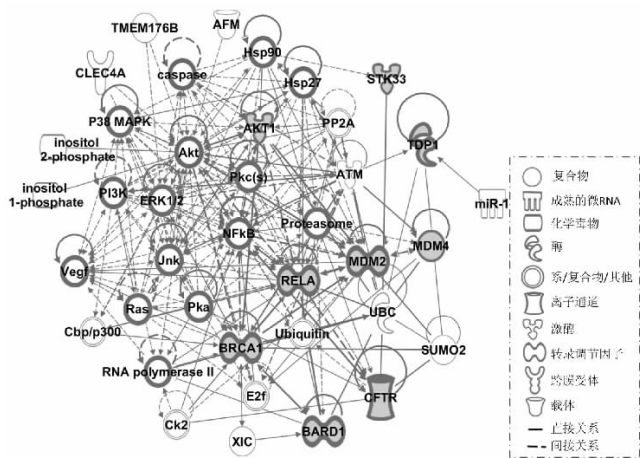
2.1 穿心莲内酯的靶蛋白及甲流相关基因

表 1 示,截至 2013 年 8 月 5 日,在 PubChem 数据库中查到穿心莲内酯的靶蛋白共 9 个,在 Gene 数据库中查到甲流相关基因 22 个。

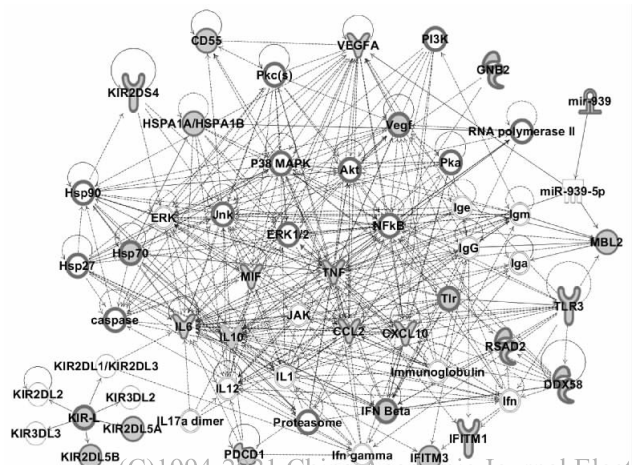
表 1 穿心莲内酯的靶蛋白及甲流相关基因

序号	穿心莲内酯靶蛋白	甲流相关基因
1	AKT1	TNF MIF IFITM1
2	BRCA1	IL6 CXCL10 GNB2
3	BARD1	IL10 PDCD1 KIR2DL5B
4	RELA	VEGFA HSPA1A MIR939
5	CRTR	IFITM3 CD55
6	MDM2	CCL2 KIR3DS1
7	MDM4	MBL2 KIR2DS5
8	TDP1	DDX58 KIR2DL5A
9	STK33	TLR3 RSAD2

2.2 穿心莲内酯的靶蛋白及甲流相关基因的分子网络



A. 穿心莲内酯靶蛋白 (灰色分子) 构成的分子网络图



B. 甲流相关基因 (灰色分子) 构成的分子网络图

图 1 穿心莲内酯靶蛋白及甲流相关基因构成的分子网络图

将检索到的穿心莲内酯靶蛋白及甲流相关基因上传至 IPA 软件,利用网络分析功能,构建二者的分子网络,见图 1A、B。图 1 中灰色的分子为穿心莲内酯靶蛋白或甲流相关基因,边框粗显的分子为两个网络共同的分子,未涂色且边框未粗显的分子为构建网络所需的相关分子。图注中说明了不同形状分子分类属性,实线代表两个分子间直接的作用关系,虚线代表两个分子间接的作用关系。

构成穿心莲内酯靶蛋白网络的分子大多与细胞周期、胚胎发育及细胞间信号传导有关;甲流相关基因网络中的分子大多与传染性、炎症反应及免疫性疾病有关。从二者构成的分子网络图中可见,二者网络中共同的分子为: Akt、Hsp90、Hsp27、PI3K、ERK1/2、NFkB、Proteasome、caspase、Jnk、P38MAPK、Pka、Pkc (s)、Ras、RNA polymerase II、Vegf,提示穿心莲内酯的分子与甲流相关基因构成的分子网络有重叠之处。说明二者构成的网络既有共同的分子,又有差异的分子,各自的生物功能复杂多样。

2.3 生物学通路比较

通过 IPA 软件的 Comparison Analysis 模块,按照穿心莲内酯的靶蛋白与作用通路相关性 ($-\log P$) 从大到小进行排列,对比穿心莲内酯靶蛋白和甲流相关基因作用的生物学通路。我们发现,二者共同作用的通路有 30 条,其中 17 条与细胞免疫相关。图 2 示全部共有通路的前 5 条: PKR 转导通路、TREM1 信号通路、PXR/RXR 信号通路、IL-17 信号通路、HMGB1 信号通路,这 5 条通路中有 4 条 (除外 PXR/RXR 信号通路) 为细胞免疫相关通路。以上结果提示,穿心莲内酯主要作用于细胞免疫调节通路,且通过调节这些通路进而对甲流发生作用。

2.4 生物通路作用位点

基于以上结果,通过 IPA 软件经典通路分析功能,打开 PKR 转导通路、TREM1 信号通路、IL-17 信号通路、HMGB1 信号通路这 4 条细胞免疫相关信号通路,分析穿心莲内酯和甲流作用于该 4 条通路的作用位点 (见图 3A、B、C、D)。图中浅灰色分子为甲流相关基因在通路的作用位点,深灰色分子为穿心莲内酯靶蛋白在通路的作用位点。图 3 示,穿心莲内酯主要参与调节细胞免疫相关通路中的 AKT 和 NF- κ B 分子。

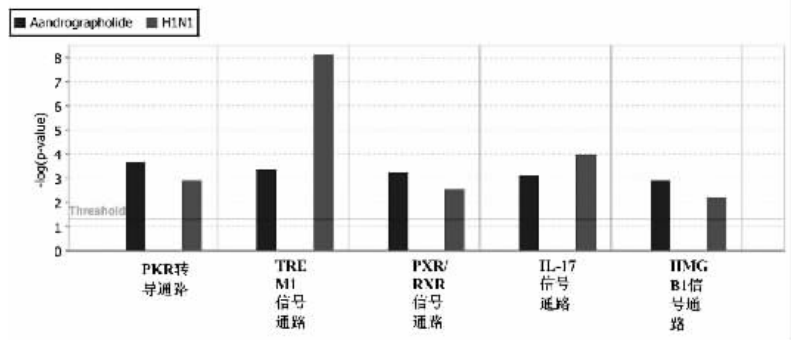
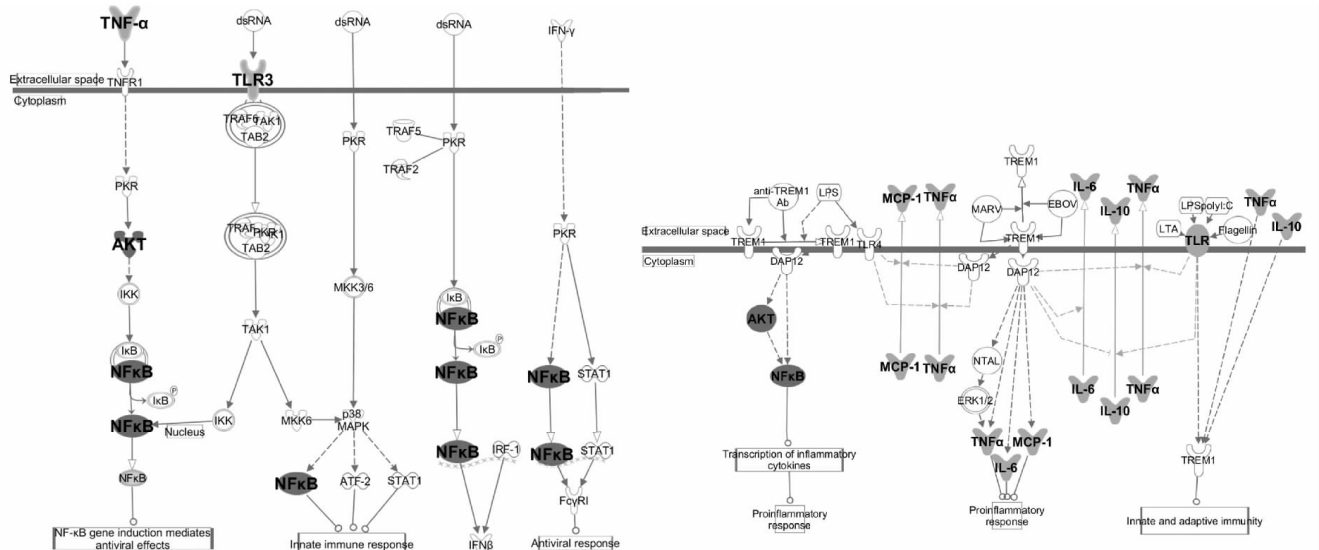
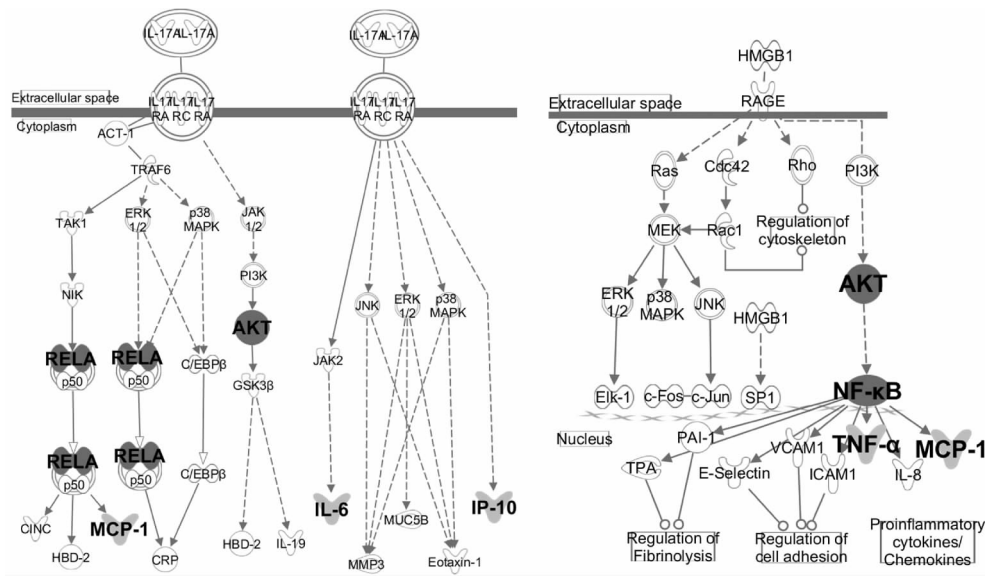


图 2 穿心莲内酯靶蛋白及甲流相关基因共同作用的生物通路



A PKR 转导通路

B TREM1 信号通路



C IL-17 信号通路

D HMGB1 信号通路

图 3 穿心莲内酯靶蛋白及甲流相关基因共同参与的 4 条细胞免疫相关通路

3 讨论 (C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

甲流属于中医学“瘟疫病”、“疫疔病”、“瘟病”的范畴，是一种具有强烈传染性的疾病。甲流初期多见风热犯卫证或热毒袭肺证，治宜疏风清热解毒。中药穿心莲味苦，性寒，归心、肺、大肠、膀胱经，主要功效为清热解毒，凉血，消肿，

燥湿。喜炎平注射液为中药穿心莲的提取物,主要有效成分为穿心莲内酯磺化物,该类化合物有抗菌消炎的作用,体外抑菌试验及临床研究表明,对金黄色葡萄球菌、肺炎球菌、链球菌、大肠杆菌等 10 多种细菌有明显抑制作用^[4],此外,对白细胞、中性粒细胞及巨噬细胞对细菌、病毒的吞噬能力有增强作用^[5];能够增强细胞免疫功能,抑制迟发性变态反应^[6]。喜炎平注射液联合西药可以治疗甲流导致的高热,有效缓解临床症状、缩短病程,提高治愈率及总有效率,疗效明显优于单用西药者^[7]。在卫生部印发的《甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年第 3 版)》^[8]中就提出喜炎平注射液可以用于治疗热毒壅肺的危重症患者,在 2010 年印发的诊疗方案^[9]中,对其应用范围进行了扩充,毒热闭肺、气营两燔、毒热内陷、内闭外脱的患者亦可联合使用。

本研究结果显示,穿心莲内酯靶蛋白和甲流相关基因二者构成的网络既有共同的分子又有差异的分子,各自的生物功能复杂多样。研究证实,甲流发病过程中细胞免疫反应起着至关重要的作用^[10],且穿心莲内酯靶蛋白及甲流相关基因主要作用于细胞免疫相关的通路。在与穿心莲内酯最相关的 4 条免疫相关通路中,其主要作用于 AKT、NF- κ B 和 RELA 分子。RELA 分子是 NF- κ B 家族的重要成员,它通过对靶基因的调节,参与细胞的增殖与转化、凋亡、炎症以及免疫应答等重要的生命活动^[11]。有研究发现,穿心莲内酯可以通过抑制磷酸化的 I κ B α 的降解及 P65 单体的磷酸化来调节 NF- κ B 通路,减轻小鼠肺损伤的炎症变化^[12]。PI3K/Akt 信号通路在流感病毒的增殖方面起重要作用^[13]。在被甲型流感病毒感染的细胞中,流感病毒蛋白 NS1 可以直接与 PI3K 的 p85 β 调节亚基结合继而造成 PI3K 依赖的 Akt 磷酸化^[13-14],PI3K/Akt 信号通路被激活。在急性和持续性感染中病毒可通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制病毒感染诱导的细胞凋亡以延长病毒复制时间^[15]。基于以上研究,推测喜炎平注射液可能对细胞免疫通路中的 AKT 和 NF- κ B 分子有调节作用,进而干预甲流。

PubChem 数据库结合 IPA 生物分析软件探讨中药复方对甲流的防治作用机制研究已经开展^[16],并且该方在类风湿关节炎“药—证对应”的生物机制研究也得到了成功应用^[17]。结合本研究的

结果,我们认为, PubChem 和 IPA 分析技术可以用于中成药制剂防治甲流分子生物学机制研究,且作用机制清晰,作用靶点明确,是生物信息分析技术应用用于复方机制研究的一次新的良好的尝试。

参考文献

- [1] Wang C, Cao B, Liu QQ, et al. Oseltamivir Compared With the Chinese Traditional Therapy Maxingshigan - Yin-qiaosan in the Treatment of H1N1 Influenza: a randomized trial [J]. Ann Intern Med, 2011, 155(4): 217-225.
- [2] 王玉光, 王晓静, 杜宏波, 等. 6 例甲型 H1N1 流感确诊病例中西医证治报告 [J]. 北京中医药, 2009, 28(6): 403.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案(2010 年版) [J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(2): 81-84.
- [4] 马利维. 喜炎平治疗 118 例上呼吸道感染疗效观察 [J]. 儿科药理学杂志, 2005, 11(3): 61.
- [5] 黄添友, 张玉良, 李继来. 穿心莲内酯对小鼠免疫系统影响的实验研究 [J]. 第一军医大学学报, 1986, 6(2): 143-145.
- [6] Shen YC, Chen CF, Chiou WF. Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect [J]. Br J Pharmacol, 2002, 135(2): 399-402.
- [7] 唐承波, 卜延宁. 喜炎平联合西药治疗甲型 H1N1 流感致高热 30 例 [J]. 中国社区医师, 2010, 12(20): 141.
- [8] 钟南山, 李兰娟, 王辰, 晁恩祥等代表国家卫生部专家组. 甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年第 3 版) [J]. 中华医学杂志, 2009, 89(45): 3173-3175.
- [9] Iorio AM, Bistoni O, Galdiero M, et al. Influenza viruses and cross-reactivity in healthy adults: humoral and cellular immunity induced by seasonal 2007/2008 influenza vaccination against vaccine antigens and 2009 A (H1N1) pandemic influenza virus [J]. Vaccine, 2012, 30(9): 1617-1623.
- [10] 王玲, 单保恩, 刘丽宏. 核转录因子 NF- κ B/RelA 的磷酸化、乙酰化和甲基化修饰与活性调控 [J]. 生命的化学, 2012, 32(4): 316-321.
- [11] 管弦, 朱涛, 王导新. 穿心莲内酯对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤中 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(4): 524-527.
- [12] 王婷, 房师松, 俞慕华. 流感病毒致病机理的研究进展 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(12): 1537-1540.
- [13] Shin YK, Li Y, Liu Q, et al. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation [J]. J Virol, 2007, 81(23): 12730-12739.
- [14] Shin YK, Liu Q, Tikoo SK, et al. Influenza A virus NS1

protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K [4]. J Gen Virol, 2007, 88(Pt 1): 13-18.

[5] Ji WT, Liu HJ. PI3K-Akt signaling and viral infection [J]. Recent Pat Biotechnol, 2008, 2(3): 218-226.

[6] 李立,赵静,王雪飞,等. 麻杏石甘汤防治甲型 H1N1 流感分子机制的生物信息学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 159-163.

[7] 牛旭艳,李健,吕诚,等. 类风湿性关节炎热证“药—证对应”机制的网络药理学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 299-301.

Bioinformatics Analysis on Molecular Mechanism of *Xiyanping Injection* for H1N1 Influenza A

LI Li, WANG Yanping, ZHAO Jing, JIANG Miao, LÜ Cheng, LÜ Aiping

(China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

ABSTRACT Objective To study the molecular mechanism of *Xiyanping Injection* (Andrographolide) for H1N1 influenza A with bioinformatics methods. **Methods** Target proteins of Andrographolide were searched in PubChem and the related genes of H1N1 influenza A were search in NCBI Gene Database online. The data sets were uploaded to IPA bioinformatics software. Molecular networks and canonical pathways were compared and analyzed with Ingenuity Pathway Analysis (IPA) . **Results** There were 9 target proteins of Andrographolide and 22 related genes of H1N1 influenza A. Their common molecules were Akt, Hsp90, Hsp27, PI3K, ERK1/2, NFκB, Proteasome, caspase, Jnk, P38 MAPK, Pka, Pkc (s), Ras, RNA polymerase II, and Vegf. The network functions of Andrographolide were mostly associated with the cell cycle, embryonic development, and cell-to-cell signaling and interaction. The network functions of H1N1 influenza A were mostly associated with infectious diseases, inflammatory response and immunological diseases. Their common pathways were cell immune pathways. Andrographolide could regulate AKT and NF-κB. **Conclusion** *Xiyanping Injection* is effective for H1N1 influenza A possibly by regulating AKT and NF-κB of cell immune pathways.

Keywords *Xiyanping Injection*; Andrographolide; H1N1 influenza A; Ingenuity Pathway Analysis; PubChem

(收稿日期: 2013 - 12 - 15; 修回日期: 2013 - 01 - 10)

编辑: 焦 爽

中华中医药学会生殖医学分会成立 暨第四次全国中医生殖医学学术研讨会征文通知

由中华中医药学会主办,河南省中医院、河南省中医药学会生殖医学分会共同承办的中华中医药学会生殖医学分会成立暨第四次全国中医生殖医学学术研讨会定于 2014 年 8 月 15 日~17 日在郑州召开,有关事项通知如下。

一、征文内容: 1. 中医、中西医结合治疗各种原因所致不孕不育的新技术和新方法; 2. 全国名老中医治疗不孕不育症经验; 3. 中医生殖医学理论探讨; 4. 中医、中西医结合治疗不孕不育机制的研究成果; 5. 中医药在现代辅助生殖技术中应用的研究思路和方法; 6. 中医药在生殖保健和优生方面的研究成果; 7. 中医、中西医结合治疗与生殖健康相关疾病(如慢性盆腔炎、前列腺炎、性功能障碍等) 的临床经验与研究成果; 8. 关于不孕不育、生殖保健和优生优育等方面的中医文献研究; 9. 中医、中西医结合治疗不孕不育的最新研究进展。

二、征文要求: 1. 来稿限 3000 字以内,附 500 字以内中文摘要。文责自负。2. 本次会议全部采用网上投稿,请用 Word 格式排版,注明作者姓名、单位、邮编、联系电话,发送至 zy60908736@163.com 邮箱。3. 截稿日期 2014 年 7 月 20 日。

三、参加人员: 全国各级各类医院不孕不育科、生殖中心、中医妇科、妇产科、男科和相关科室临床医师; 高等院校、科研院所及企业从事该领域研究开发的科研人员。特别提示: 会议期间同时举办国家继续教育项目“第四届全国不孕不育中西医结合诊疗新技术研修班”授予国家 I 类继续教育学分。

四、联系方式: 地 址: 郑州市东风路 6 号河南省中医院(邮编: 450002)。联系人: 孙自学(0371 - 60908730, 13937105329)、陈建设(0371 - 60905757, 15838262155)、宋艳丽(13733806323)