

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.06.018

中医药防治传染病专栏

运用网络生物学方法分析双黄连口服液治疗甲型 H1N1 流感的药理机制

陈 杲¹, 李 立², 吕 诚², 广慧敏¹, 叶秋阳¹, 杨艳燕¹, 吕爱平^{2*}

(1. 湖北大学生命科学学院, 湖北省武汉市友谊大道 368 号, 430062; 2. 中国中医科学院临床基础医学研究所)

基金项目: 国家中医药管理局 2009 年中医药行业科研专项资助项目 (200907001)

摘要 目的 探讨双黄连口服液治疗甲型 H1N1 流感的药理机制。方法 文本挖掘文献证实甲型 H1N1 流感相关的基因或蛋白质, 查询 PubChem 数据库获得双黄连口服液的靶蛋白, 依据多个相互作用数据库中数据, 运用网络生物学方法分别构建甲型 H1N1 流感体内反应的蛋白质相互作用网络和双黄连口服液的靶蛋白相互作用网络, 将后者映射到前者, 建立双黄连口服液对抗甲型 H1N1 流感的靶蛋白相互作用网络, 并进行网络拓扑结构和基因本位论分析。结果 双黄连口服液药理作用主要与细胞对外部刺激反应的调节、细胞凋亡的调节和信号转导等有关, 主要涉及糖原合成激酶-3B (GSK3B)、肿瘤基因 P53 (TP53)、核因子- κ Bp50 (NFKB1)、热休克蛋白 90- α (HSP90AA1) 等。结论 双黄连口服液可能主要是通过影响 GSK3B 等信号通路, 调节细胞凋亡而减少病毒复制, 抑制甲型 H1N1 流感的疾病进程。

关键词 双黄连口服液; 甲型 H1N1 流感; 药理机制; 网络生物学

双黄连口服液由金银花、黄芩、连翘组成, 具有辛凉解表、清热解毒的功能。临床研究显示, 其治疗甲型 H1N1 流感 (简称甲流) 效果良好, 已被中华人民共和国卫生部列入诊疗方案中^[1]。双黄连口服液含有多种抗病毒成分, 能抑制病毒在人体细胞内的复制^[2]。但甲流是病毒进入体内后复制, 并与人体抗病毒反应之间相互作用的结果, 是一个复杂的过程, 双黄连口服液如何在体内抑制 H1N1 病毒复制, 机制仍不十分清楚^[3-4]。本研究应用网络生物学方法对双黄连口服液治疗甲流的分子药理机制进行了探讨。

1 方法

1.1 文本挖掘

甲流相关基因或蛋白质通过应用 Polysearch 系统^[5] (<http://wishart.biology.ualberta.ca/polysearch/index.htm>) 获得。以疾病“H1N1”为检索词, 选择 PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)、OMIM (<http://www.omim.org/>)、DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>)、GAD ([\[db.nih.gov/\]\(http://db.nih.gov/\)\)、HPRD \(<http://www.hprd.org/>\)、EntrezSNP \(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/SNPutils.htm>\) 数据库, 检索相关基因或蛋白质, 挖掘文献证实甲流相关的基因或蛋白质数据, 人工阅读抽提语句以校正。](http://geneticassociation-</p>
</div>
<div data-bbox=)

双黄连口服液的靶蛋白通过查询 PubChem^[6] (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库获得。我们在《中药大辞典》(第二版) 中检索双黄连口服液中金银花^{[7]1969}、黄芩^{[8]2805}、连翘^{[9]1552}的主要化学成分 (包括绿原酸、 β -谷甾醇、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、连翘苷、连翘脂苷等 22 个化合物), 通过查询 PubChem 数据库获得这些化学成分的靶蛋白, 3 种药物的靶蛋白总和认定为双黄连口服液的靶蛋白。

1.2 蛋白质相互作用网络的构建

以甲流相关的基因或蛋白质名、双黄连口服液的靶蛋白名为检索词, 检索 BIND (<https://www.isc.org/downloads/bind/>)、BioGRID (<http://thebiogrid.org/>)、DIP (<http://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/Main.cgi>)、HPRD (<http://hprd.org/>)、IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>)、MINT ([* 通讯作者: lap64067611@126.com, \(010\) 64014411 转 2343](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

mint. bio. uniroma2. it/mint/) 等分子相互作用数据库, 并用 AgilentLiteratureSearch (<http://apps.cytoscape.org/apps/agilentliteraturesearch>) 文本挖掘工具从文献中获得它们之间相互作用蛋白质的信息。然后, 用这些信息构建甲流蛋白质相互作用网络和双黄连口服液的靶蛋白质相互作用网络, 以 Cytoscape 软件进行可视化^[8]。

1.3 网络拓扑结构分析

采用节点度作为拓扑指数分析网络拓扑结构。蛋白质相互作用网络是一种无尺度的幂分布, 幂的分布表示极少的点拥有很高的度, 这些点被称为中枢。中枢点(高连接点)在调控中起着重要作用, 点连接得越多越重要^[9]。

1.4 蛋白质相互作用网络间的映射

应用 Merge 程序^[8]将双黄连口服液的靶蛋白相互作用网络映射到甲流体内反应的网络上, 并建立映射网络。

1.5 基因本位论的分析

基因本位论(GO)是一个广泛用于基因功能分类的系统^[10]。为了注释各显著性高连接区的功能, 采用 BiNGO 计算机工具进行了 GO 的聚类分

析, 统计学超几何分布定量(P 值)评估存在于各 GO 注释中的蛋白质群^[11]。

2 结果

2.1 甲流体内反应的蛋白质相互作用网络

从多个数据库中进行文本挖掘, 与人类甲流相关的基因或蛋白质有 1087 个。搜索彼此之间相互作用蛋白质的信息, 构建甲流体内反应的复杂网络, 由 691 个节点(蛋白质)和 2516 个边(相互作用)组成。根据“中心致死性”原则, 目前认为中心性高于网络平均值(23.892)的节点通常在网络中起着重要作用。计算网络节点度, 取高于平均值的节点构建中心网络, 包含 111 个蛋白质和 668 个相互作用(图 1)。

2.2 双黄连口服液的靶蛋白相互作用网络

查询 PubChem 数据库获得双黄连口服液的靶蛋白有 80 个。构建其作用靶蛋白的直接相互作用网络, 25 个蛋白质和 27 个相互作用反映其主要药理作用构成(图 2)。GO 分析显示, 其网络主要涉及信号转导、细胞对外部刺激反应和淋巴细胞分化等(表 1)。

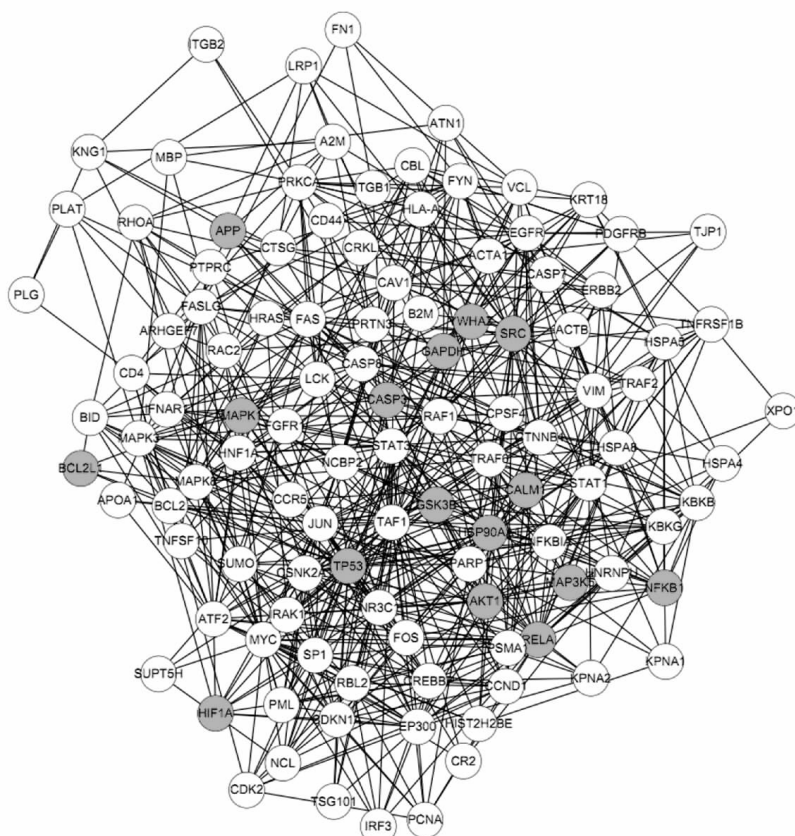


图 1 甲流体内反应的蛋白质相互作用中心网络

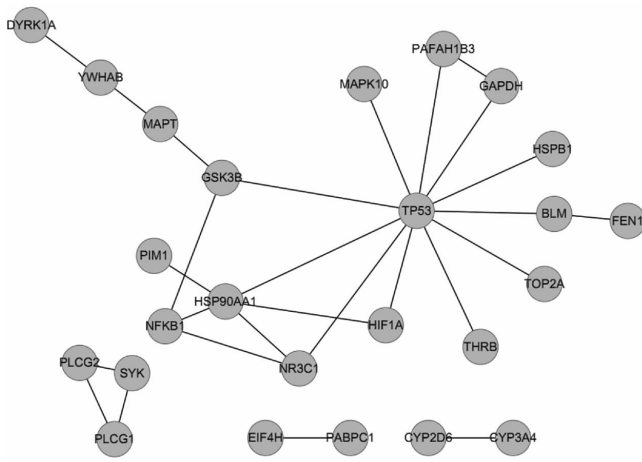


图 2 双黄连口服液的靶蛋白相互作用网络

表 1 双黄连口服液靶蛋白相互作用网络的 GO 分类

GOID	描述	P 值
7165	信号转导	3.68×10^{-6}
51716	细胞对刺激的反应	2.54×10^{-5}
9822	淋巴细胞分化进程	8.79×10^{-6}

2.3 双黄连口服液对抗甲流的靶蛋白相互作用网络

将双黄连口服液的靶网络映射到甲流体内反应的网络，建立双黄连口服液对抗甲流体内反应的网络，包括 8 个蛋白质和 11 个相互作用（图 3）。GO 分析结果显示网络主要涉及细胞凋亡、线粒体膜组织化、核信号通路等（表 2），提示双黄连口服液对抗甲流时主要涉及线粒体细胞凋亡和影响信号通路的作用。甲流网络拓扑结构可见肿瘤基因 p53（TP53）、核因子-κB p50（NFKB1）、热休克蛋白 90-α（HSP90AA1）、糖原合成激酶-3β（GSK3B）等在甲流体内反应中起着重要作用的蛋白质（图 3）。

表 2 双黄连口服液对抗甲流靶蛋白相互作用网络的 GO 分类

GOID	描述	P 值
43066	细胞凋亡的调节	3.02×10^{-5}
7006	线粒体膜组织化	1.10×10^{-4}
6984	核信号通路	1.71×10^{-4}

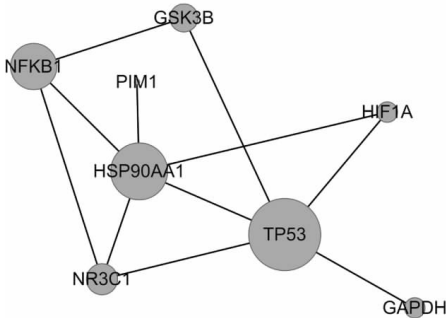


图 3 双黄连口服液对抗甲流体内反应的网络

3 讨论

目前认为双黄连口服液通过多成分、多靶点治疗疾病，能抑制多种病毒复制，广泛用于流行性感冒等多种病毒性疾病的治疗，临床效果良好^[2]。研究表明，H1N1 病毒在感染宿主细胞后可以激活细胞内的信号转导来调节宿主细胞凋亡，支持自身的高效复制^[3-17]。通过 H1N1 病毒的非结构蛋白 1（NS1）减弱凋亡肽酶激活因子（Apaf1）与 HSP90AA1 相互作用，促进 Apaf1 与细胞色素 C 作用，激活 CASP3 分解^[3]；NS1 还可以与 PI3K 的调节亚基 p85p 亚基结合，激活 PI3K 下游信号 NF-κB、p53、GSK3B 等，增加感染细胞存活并降低流感病毒感染造成的过早细胞凋亡，促进细胞内病毒的增殖^[4]。抑制 HSP90AA1、TP53、GSK3B，能有效减少病毒复制^[4-17]。通过 HA、神经氨酸酶（NA）、基质蛋白（M）、核蛋白（NP）和非结构蛋白（NS）等都可激活 NF-κB^[4,14]。本研究结果中 NFKB1 是 NF-κB 家族中的成员之一，为标码 P50 的二聚体^[3]。它的适度激活是流感病毒感染的先决条件^[4,14]。NF-κB 信号通路可以不同地调节流感病毒 RNA 的合成，并抑制 NF-κB 降低了流感病毒的复制水平和病毒 RNA 的合成^[4,19]。NF-κB 依赖的 TRAIL 和 Fas/FasL 的表达对于流感病毒的高效复制是必需的^[4,20]。

本研究的网络分析结果显示，双黄连口服液对抗甲流的药理作用主要表现为细胞凋亡的调节和信号转导等，对抗甲流的药理作用所涉及信号转导分子包括 TP53、NFKB1、HSP90AA1、GSK3B 等，提示双黄连口服液可能主要是通过影响这些信号通路，调节细胞凋亡，减少病毒复制，抑制甲流的疾病进程。在双黄连口服液对抗甲流中，究竟何种成分作用于哪些分子及其协同作用等机制，仍有待进一步研究。

参考文献

[1] 申玲玲, 杜光. 中成药治疗甲型 H1N1 流感的研究进展 [J]. 医药导报, 2010, 29(10): 1326-1328.
[2] 易世红, 王放, 王丽萍, 等. 双黄连粉针剂体外抗病毒药效学研究 [J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(5): 490-492.
[3] 孙坚, 王农荣, 杨斌, 等. 双黄连抑制甲 1 型流感病毒诱导细胞凋亡的机制研究 [J]. 中国药房, 2007, 18(27): 2086-2088.
[4] Peng J, Jiao J, Li J, et al. Pyronepolyene C-glucosides with NF-kappaB inhibitory and anti-influenza A viral (H1N1) activities from the sponge-associated fungus Epic-

- ocum sp. JJY40 [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22 (9): 3188–3190.
- [5] Cheng D, Knox C, Young N, et al. PolySearch: a web-based text mining system for extracting relationships between human diseases, genes, mutations, drugs and metabolites [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36 (Web Server issue): W399–405.
- [6] Canny SA, Cruz Y, Southern MR, et al. PubChem promiscuity: a web resource for gathering compound promiscuity data from PubChem [J]. Bioinformatics, 2012, 28 (1): 140–141.
- [7] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [8] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Res, 2003, 13 (11): 2498–2504.
- [9] Kotlyar M, Fortney K, Jurisica I. Network-based characterization of drug-regulated genes, drug targets, and toxicity [J]. Methods, 2012, 57 (4): 499–507.
- [10] Martucci D, Masseroli M, Pinciroli F. Gene ontology application to genomic functional annotation, statistical analysis and knowledge mining [J]. Stud Health Technol Inform, 2004, 102 (5): 108–131.
- [11] Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks [J]. Bioinformatics, 2005, 21 (16): 3448–3449.
- [12] 孔蕾, 刘春云, 杨红洁. 甲型 H1N1 流感 95 例临床分析 [J]. 传染病信息, 2010, 1 (1): 25–27.
- [13] Zhang C, Yang Y, Zhou X, et al. The NS1 protein of influenza A virus interacts with heat shock protein Hsp90 in human alveolar basal epithelial cells: implication for virus-induced apoptosis [J]. Virol J, 2011 (8): 181.
- [14] Wang X, Shen Y, Qiu Y, et al. The non-structural (NS1) protein of influenza A virus associates with p53 and inhibits p53-mediated transcriptional activity and apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 395 (1): 141–145.
- [15] Lu X, Masic A, Liu Q, et al. Regulation of influenza A virus induced CXCL10 gene expression requires PI3K/Akt pathway and IRF3 transcription factor [J]. Mol Immunol, 2011, 48 (12–13): 1417–1423.
- [16] Murray JL, McDonald NJ, Sheng J, et al. Inhibition of influenza A virus replication by antagonism of a PI3K-AKT-mTOR pathway member identified by gene-trap insertional mutagenesis [J]. Antivir Chem Chemother, 2012, 22 (5): 205–215.
- [17] Chase G, Deng T, Fodor E, et al. Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture [J]. Virology, 2008, 377 (2): 431–439.
- [18] Lu R, Gao X, Chen Y, et al. Association of an NFKB1 intron SNP (rs 4648068) with gastric cancer patients in the Han Chinese population [J]. BMC Gastroenterol, 2012 (12): 87.
- [19] Pleschka S. RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade [J]. Biol Chem, 2008, 389 (10): 1273–1282.
- [20] Tisoncik JR, Billharz R, Burmakin S, et al. The NS1 protein of influenza A virus suppresses interferon-regulated activation of antigen-presentation and immune-proteasome pathways [J]. J Gen Virol, 2011, 92 (Pt 9): 2093–2104.

Analysis on Pharmacological Mechanism of Shuanghuanglian Oral Liquid for Influenza A (H1N1) by Network Biology Approaches

CHEN Gao¹, LI Li², LÜ Cheng², GUANG Huimin¹, YE Qiuyang¹, YANG Yanyan¹, LÜ Aiping²

(1. School of Life Sciences, Hubei University, Hubei Province 430062; 2. China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To study the pharmacological mechanism of Shuanghuanglian Oral Liquid (双黄连口服液) for influenza A (H1N1). **Methods** Genes or proteins related to influenza A (H1N1) were obtained by text mining, and target proteins of Shuanghuanglian Oral Liquid were searched in PubChem. Influenza A (H1N1) network and Shuanghuanglian Oral Liquid network were constructed by interaction between the genes or proteins related to influenza A (H1N1) and target proteins of Shuanghuanglian Oral Liquid from multiple protein-protein interaction databases respectively. The sub-network of Shuanghuanglian Oral Liquid for influenza A (H1N1) was produced by mapping Shuanghuanglian Oral Liquid network to influenza A (H1N1) network. The networks were analyzed with network topology and gene ontology. **Results** The pharmacological mechanism of Shuanghuanglian Oral Liquid was related to stimulus, regulation of apoptosis and signal transduction. Glycogen synthase kinase-3B (GSK3B), tumor gene P53 (TP53), nuclear factor- κ Bp50 (NFKB1), and heat shock protein 90- α (HSP90AA1) were involved. **Conclusion** Shuanghuanglian Oral Liquid can inhibit the disease progression of influenza A (H1N1) by affecting GSK3B signaling pathways, regulating apoptosis, and reducing viral replication.

Keywords Shuanghuanglian Oral Liquid (双黄连口服液); influenza A (H1N1); pharmacological mechanism; network biology

(收稿日期: 2013-12-30; 修回日期: 2014-01-14)

编辑: 焦爽