

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.08.021

中医药防治传染病专栏

连花清瘟颗粒/胶囊治疗甲型 H1N1 流感作用机理的网络生物学分析

陈 杲¹, 广慧敏¹, 李 立², 叶秋阳¹, 吕 诚², 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. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所)
基金项目: 国家中医药管理局中医药行业科研专项资助项目 (200907001)

摘要 目的 采用网络生物学方法探讨连花清瘟颗粒/胶囊治疗甲型 H1N1 流感的药理机制。方法 用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 数据库获得连花清瘟颗粒/胶囊的靶蛋白, 依据多个相互作用数据库中数据, 分别构建甲型 H1N1 流感体内反应的蛋白质相互作用网络和连花清瘟颗粒/胶囊的靶蛋白相互作用网络, 建立连花清瘟颗粒/胶囊对抗甲型 H1N1 流感体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 (GO) 分析。结果 连花清瘟颗粒/胶囊药理作用主要涉及细胞对外部刺激反应的抑制性调节、细胞凋亡的调节和信号转导等方面, 主要涉及蛋白激酶 B (AKT1)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、肿瘤基因 P53 (TP53)、核因子-κBp65 (RELA)、核因子-κBp50 (NFKB1)、热休克蛋白 90-α (HSP90AA1) 等。结论 连花清瘟颗粒/胶囊可能主要是通过影响 AKT1、CASP3 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 连花清瘟颗粒/胶囊; 甲型 H1N1 流感; 网络生物学

连花清瘟颗粒/胶囊由连翘、金银花、炙麻黄、炒苦杏仁、石膏、板蓝根、绵马贯众、鱼腥草、广藿香、大黄、红景天、薄荷脑、甘草组成, 具有清瘟解毒、宣肺泄热的功效。研究表明, 该药体外可直接抗病毒, 但作用机制仍不十分清楚^[1-2]。体内高病毒载量引起自身过度反应造成病理损伤是甲型 H1N1 流感 (简称甲流) 主要的致病机制^[3]。病毒与宿主相互作用的研究是近年来分子病毒学领域的前沿和热点, 也是一个复杂的过程。对于复杂体系, 传统的方法很难系统研究。为此, 我们应用网络生物学方法对连花清瘟颗粒/胶囊治疗甲流的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 (<http://wishart.biology.ualberta.ca/polysearch/index.htm>) 获得。该系统是一种基于网络的文本挖掘工具, 用于解决处理综合和联系等医学文献中

挖掘信息的关键问题, 即查询基因组、蛋白质组或代谢组范围综合信息^[4]。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 (<http://geneticasociationdb.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/蛋白, 人工阅读抽提语句以校正。

连花清瘟颗粒/胶囊的靶蛋白通过查询 PubChem 数据库获得。PubChem 是有机小分子生物活性数据库, 存储数以百万计的有机小分子以及生物活性、生物实验数据^[5]。在《中药大辞典》中检索连花清瘟颗粒/胶囊所含的连翘^[6 1552]、金银花^[6 1969]、炙麻黄^[6 3092]等 11 味中药的主要化学成分 (包括连翘苷、连翘脂苷、左旋麻黄碱、右旋伪麻黄碱、苦杏仁苷、大黄酸、绵马酸、茴香脑等 60 个化合物), 在 PubChem 数据库中查询这些化学成分的靶蛋白, 所有中药的靶蛋白总和认定为连花清瘟颗粒/胶囊的靶蛋白。

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

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、连花清瘟颗粒/胶囊的靶蛋白名为检索词,从分子相互作用数据库 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(<http://mint.bio.uniroma2.it/mint/>) 中进行检索,并用 Agilent Literature Search(<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,用这些信息构建甲型流感蛋白质的蛋白质相互作用网络和连花清瘟颗粒/胶囊的靶蛋白质相互作用网络,以 Cytoscape 软件进行可视化^[9]。

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

采用 Merge 工具^[9],将连花清瘟颗粒/胶囊的

靶蛋白相互作用网络映射到甲流体内反应的网络上,并建立映射亚网络。

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^[9]。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^[10]。

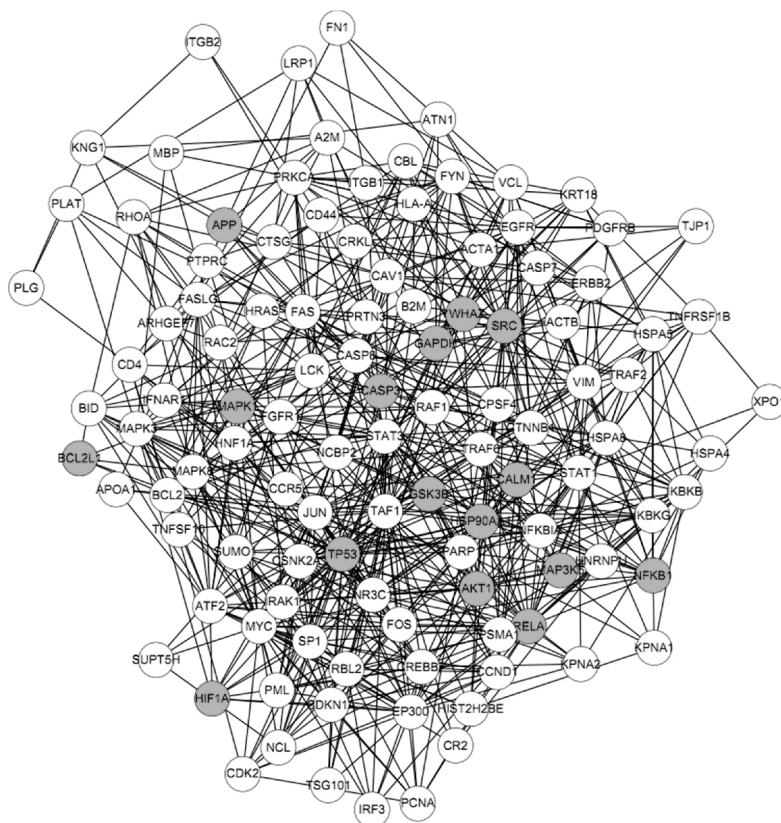
2 结果

2.1 甲流体内反应的蛋白质相互作用网络

从多个数据库中文本挖掘,去除非人类,与甲流的相关基因或蛋白质有 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,见图 1。

2.2 连花清瘟颗粒/胶囊的靶蛋白相互作用网络

查询 PubChem 数据库获得连花清瘟颗粒/胶囊



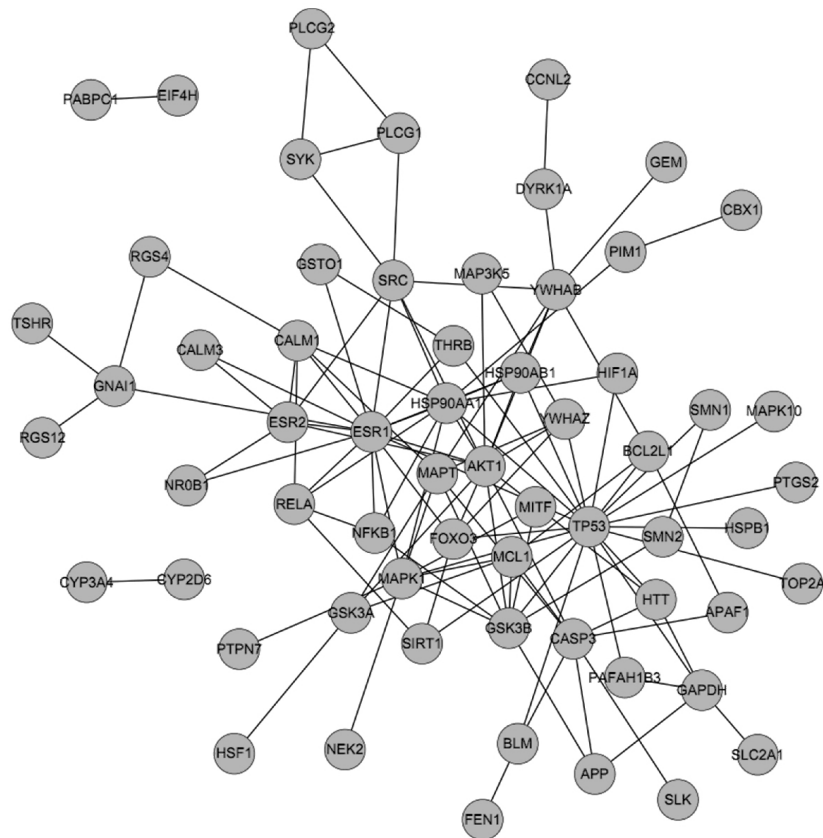


图 2 连花清瘟颗粒/胶囊的靶蛋白相互作用网络

的靶蛋白有 140 个。连花清瘟颗粒/胶囊组成是一个有机体系，成分的作用间应该相互联系。为此，构建其作用靶蛋白的直接相互作用网络，由 62 个蛋白质和 117 个相互作用（图 2），反映其主要药理作用。GO 分析网络主要涉及对外部刺激反应的抑制性调节、细胞凋亡的调节和信号转导等（表 1）。

表 1 连花清瘟颗粒/胶囊靶蛋白相互作用网络的 GO 分类

GOID	描述	P 值
50896	对外部刺激的抑制性调节	1.98×10^{-11}
43066	细胞凋亡的调节	2.71×10^{-11}
7165	信号转导	1.84×10^{-7}

2.3 连花清瘟颗粒/胶囊对抗甲流的靶蛋白相互作用网络

将连花清瘟颗粒/胶囊的靶网络映射到甲流体内反应的网路，建立连花清瘟颗粒/胶囊对抗甲流体内反应的网路，包括 20 个蛋白质和 34 个相互作用（图 3）。GO 分析显示，其网络主要涉及细胞凋亡的调节、对外部刺激反应的抑制性调节、线粒体膜组织化等（图 4），提示连花清瘟颗粒/胶囊对抗甲流时发挥主要的药理作用，适合治疗。分析甲流网络拓扑结构，图 3 中包含肿瘤基因 P53（TP53）、核因子-κB p65（RELA）、核因子-κB p50（NFKB1）、

热休克蛋白 90-α（HSP90AA1）、丝裂原活化蛋白激酶 1（MAPK1）、癌基因蛋白质 c-src（SRC）、蛋白激酶 B（AKT1）、胱天蛋白酶 3（CASP3）等，在甲流体内反应中起着重要作用的蛋白质，上述三个过程都参与。

3 讨论

连花清瘟颗粒/胶囊是针对多种流行性感冒等疾病而研发的复方中药。临床研究表明，其治疗

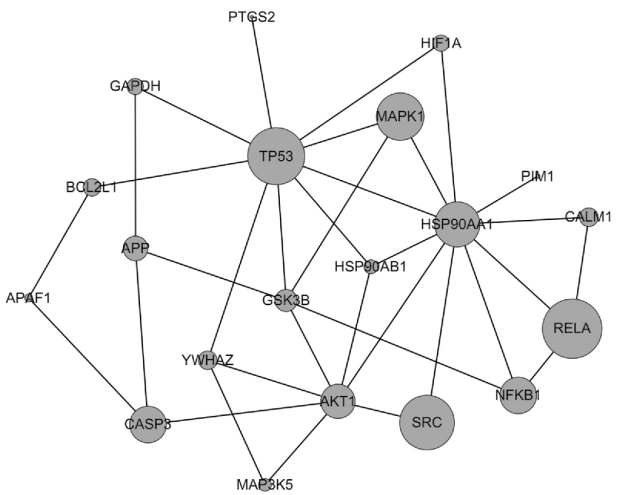


图 3 连花清瘟颗粒/胶囊对抗甲流体内反应的网路

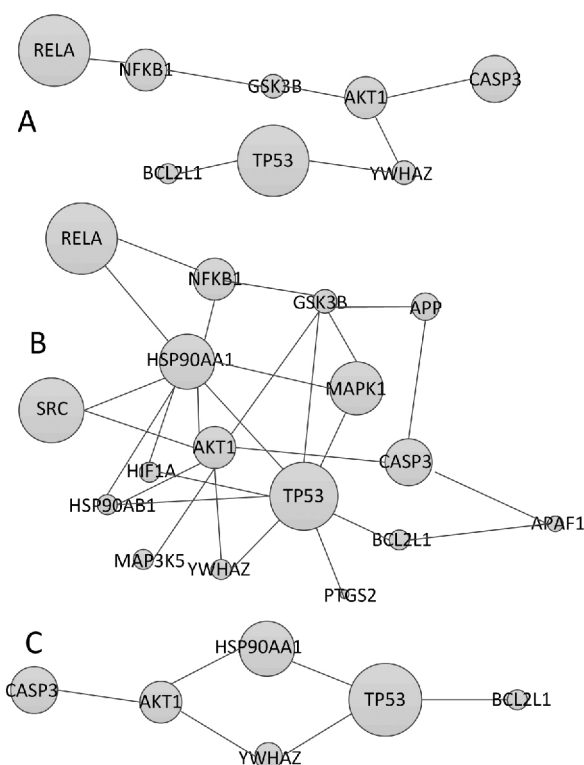


图 4 连花清瘟颗粒/胶囊对抗甲流体内反应的 GO 分类网络
A: 对外部刺激反应的抑制性调节; B: 细胞凋亡的抑制性调节; C: 线粒体膜组织化过程

甲流疗效确切^[1]。H1N1 型等病毒进入人体后, 需要宿主细胞提供病毒生命周期中所需的绝大部分物质、能量和环境条件, 完成复制和增殖, 必须刺激宿主细胞做出有利于高效复制反应, 宿主细胞也会做出各项防御应答, 是一个相互博弈过程。当机体对外刺激过度反应, 就会引发病理损伤, 从而导致疾病发生^[2]。

研究表明, H1N1 型病毒在感染宿主细胞后可以激活细胞内的信号转导来支持自身的高效复制^[12-17]。H1N1 型病毒的非结构蛋白 1 (NS1) 蛋白可以与 PI3K 的调节亚基 p85p 亚基结合, 激活 PI3K/AKT 信号通路, 以及 NFKB1、TP53、GSK3B 等下游信号, 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^[12-14]。通过 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^[13], 降低细胞的过早凋亡, 促进细胞内病毒的增殖。H1N1 型病毒血凝素 (HA) 在细胞膜上的堆积以及它与细胞膜脂筏结构的紧密结合触发了由 PKCa 激活而引起的 MAPK 信号级联的激活和流感病毒核蛋白的输出。这种 HA 在细胞膜上的堆积作用可以被流感病毒的高聚合酶活性放大继而导致

MAPK 信号的增强和更加高效的病毒 RNP 输出, 这样就实现了流感病毒的高效增殖^[16-17]。抑制 HSP90AA1、CASP3、TP53 和阻断 MAPK、PI3K/AKT 信号通路, 能有效减少病毒复制^[12,18-20]。

本研究的网络分析结果显示, 连花清瘟颗粒/胶囊对抗甲流的药理作用包括细胞凋亡的调节和信号转导等, 靶标涉及 TP53、RELA、NFKB1、HSP90AA1、MAPK1、AKT1、CASP3 等, 提示连花清瘟颗粒/胶囊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。在连花清瘟颗粒/胶囊对抗甲流中, 究竟何种成分作用于哪些分子及其间协同作用等机制, 仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] 丁新佩. 连花清瘟药物抗流感病毒的药理分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(10A): 32.
- [2] 莫红缨, 柯昌文, 郑劲平, 等. 连花清瘟胶囊体外抗甲型流感病毒的实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(1): 5-9.
- [3] 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 *Epicoccum* sp. JJY40 [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(9): 3188-3190.
- [4] 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): 399-405.
- [5] 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.
- [6] 南京中医药大学. 中药大辞典 [S]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [7] 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.
- [8] Kotlyar M, Fortney K, Jurisica I. Network-based characterization of drug-regulated genes, drug targets, and toxicity [J]. Methods, 2012, 57(4): 499-507.
- [9] 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.

- [10] 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.
- [11] 欧阳茴香, 唐清艳, 陈永忠, 等. 连花清瘟胶囊治疗甲型 H1N1 流感的临床研究 [J]. 中国医药导报, 2010, 7(30) : 6-8.
- [12] 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.
- [13] Lu X, Masic A, Liu Q, et al. Regulation of influenza A virus induced CXCL-10 gene expression requires PI3K/ Akt pathway and IRF3 transcription factor [J]. Mol Immunol, 2011, 48(12-13) : 1417-1423.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Heynisch B, Frensing T, Heinze K, et al. Differential activation of host cell signalling pathways through infection with two variants of influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) in MDCK cells [J]. Vaccine, 2010, 28(51) : 8210-8218.
- [17] Wu W, Booth JL, Duggan ES, et al. Innate immune response to H3N2 and H1N1 influenza virus infection in a human lung organ culture model [J]. Virology, 2010, 396(2) : 178-188.
- [18] Chase G, Deng T, Fodor E, et al. Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture [J]. Virology, 2008, 377(2) : 431-439.
- [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.

Biological Network Analysis on Mechanism of *Lianhua Qingwen Granules/Capsules* for H1N1 Influenza A

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

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

ABSTRACT Objective To study the pharmacological mechanism of *Lianhua Qingwen Granules/Capsules* for H1N1 influenza A by biological network method. **Methods** The H1N1 influenza-related genes or proteins were confirmed by text mining. The target proteins of *Lianhua Qingwen Granules/Capsules* were obtained by searching the PubChem Database. The protein interaction networks of H1N1 influenza A and target protein interaction networks of *Lianhua Qingwen Granules/Capsules* were constructed and the latter was mapped to the former to establish the target protein interaction networks of *Lianhua Qingwen Granules/Capsules* against H1N1 influenza. The network topology and gene ontology (GO) analysis were conducted. **Results** The pharmacological effect of *Lianhua Qingwen Granules/Capsules* was mainly related to inhibitory regulation of cells to external stimulation, regulation of apoptosis and signal transduction. The protein kinase B (AKT1), caspase 3 (CASP3), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), tumor gene p53 (TP53), nuclear factor- κ B p65 (RELA), nuclear factor- κ B p50 (NFKB1), and heat shock protein 90- α (HSP90AA1) was involved. **Conclusion** *Lianhua Qingwen Granules/Capsules* can inhibit the disease progression of H1N1 influenza A possibly by affecting AKT1 and CASP3 signaling pathways, regulating apoptosis, and reducing viral replication.

Keywords *Lianhua Qingwen Granules/Capsules*; H1N1 influenza A; pharmacological mechanism; biological network

(收稿日期: 2013-12-05; 修回日期: 2014-01-15)

编辑: 焦爽