

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.12.006

思路与方法

藿香、苍术对甲型 H1N1 流感免疫调节差异的生物信息学分析

李立, 寇爽, 赵静, 吕诚, 何小鹏, 姜淼, 吕爱平*

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

摘要 目的 对比不同归经芳香药藿香和苍术调节甲型 H1N1 流感免疫相关通路的差异。方法 采用台湾中医药资料库、PubChem、TCMID 查找肺经芳香药藿香和非肺经芳香药苍术的化学成分及其靶蛋白, 采用 Gene 数据库查找甲型 H1N1 流感相关基因, 运用生物信息软件分析三者分子网络和生物通路的相关性, 对比两种药物对甲型 H1N1 流感免疫相关通路中的作用差异。结果 藿香靶蛋白共 42 个, 苍术靶蛋白 24 个, 甲型 H1N1 流感相关基因 32 个。甲型 H1N1 流感的分子网络与藿香形成的分子网络关联较多, 与苍术形成的分子网络关联则相对较少; 藿香较苍术可以作用于更多与甲型 H1N1 流感相关的免疫炎症性疾病; 藿香与甲型 H1N1 流感共同作用于 10 条免疫生物学通路, 苍术与甲型 H1N1 流感共同作用于 4 条免疫生物学通路。结论 归肺经芳香药藿香较非肺经芳香药苍术对甲型 H1N1 流感可能更有免疫调节优势。

关键词 甲型 H1N1 流感; 芳香药; 藿香; 苍术; 生物信息学; 免疫通路

中药归经理论是中药药性理论的重要组成部分。临床上芳香类中药常用于预防流感, 而该类药物中归肺经的中药较其他归经多。免疫反应的激活是抵抗流感的第一道防线, 芳香药可以通过调节免疫信号通路而起到预防流感的作用。本研究以经典的肺经芳香药藿香为研究对象, 并以非肺经芳香药苍术为对照药, 借助生物信息学分析方法, 分析不同归经芳香药调节甲型 H1N1 流感 (简称甲流) 免疫相关通路的差异, 以期为中医归经理论提供科学依据, 同时也为中药预防流感机制研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 藿香、苍术靶蛋白及甲流相关基因的确定

利用台湾中医药资料库 (<http://tcm.cmu.edu.tw>)、PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、TCMID (<http://www.megabionet.org/tcmid>) 在线数据库平台, 查找藿香和苍术的化学成分及其靶蛋白; 在 Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 数据库中查找甲流的相关基因。

1.2 藿香、苍术与甲流分子网络关联性建网

将检索到的藿香、苍术靶蛋白及甲流相关基因在线提交至 Ingenuity Pathway Analysis (IPA, <http://www.ingenuity.com/>) 生物分析软件, 采用 network analysis 分析功能将上传的分子根据不同生物功能进行分类, 形成不同的分子网络, 再将药物与疾病的分子网络进行关联, 观察药物与疾病之间的关系。

1.3 藿香、苍术、甲流与免疫炎症性疾病的相关性

采用 disease and bio functions 分析功能分析藿香、苍术靶蛋白及甲流相关基因与免疫炎症性疾病之间的关系密切程度, 并通过热图表示藿香、苍术、甲流与免疫炎症性疾病的相关性。

1.4 藿香与苍术作用的免疫通路比较

采用 comparison 分析功能对比藿香、苍术在甲流相关免疫生物学通路中作用的差异, 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不同作用位点, 进一步阐释藿香与苍术防治甲流的分子机制。

2 结果

2.1 藿香、苍术靶蛋白及甲流相关基因

截至 2015 年 3 月, 共查找到藿香靶蛋白 42

基金项目: 国家自然科学基金 (81503388)

* 通讯作者: lap64067611@126.com

个, 苍术靶蛋白 24 个, 甲流相关基因 32 个。

2.2 藿香、苍术与甲流分子网络的相关性

藿香共构建分子网络 5 个, 苍术共构建分子网络 2 个, 甲流共构建分子网络 8 个, 将有共同分子的网络用直线连接, 图 1 示, 与苍术比较, 藿香的分子网络与甲流的分子网络关联更多。

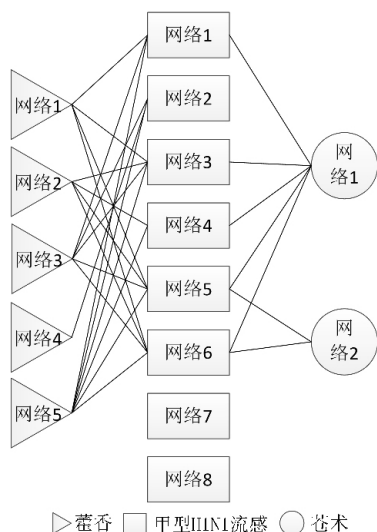


图 1 藿香、苍术靶蛋白与甲流相关基因网络关联图

2.3 藿香、苍术、甲流与免疫炎性疾病的相关性

表 1 示, 甲流与多种免疫炎性疾病相关, 藿香与器官炎症、变态反应及病毒感染有关, 苍术与器官炎症及 IgA 肾病有关, 提示藿香可能作用于更多甲流相关的免疫炎性疾病。

表 1 藿香、苍术与免疫炎性疾病相关性分析

免疫炎性疾病	藿香	苍术	甲流
器官炎症	●	●	●
A 型流感病毒感染			●
变态反应	●		
先天免疫反应			●
气道炎症			●
病毒感染	●		●
肺部炎症			●
肺部感染			●
前炎反应			●
细胞免疫反应			●
IgA 肾病		●	
抗体反应			●
炎症反应			●
细胞炎症反应			●
适应性免疫反应			●

注: ●表示有相关性

2.4 藿香、苍术作用的免疫通路比较

表 2 示, 藿香与甲流共同作用于 10 条生物通路, 苍术与甲流共同作用于 4 条生物通路, 其中,

双链 RNA 调节的蛋白激酶 (PKR) 在干扰素诱导和抗病毒反应中的作用通路及巨噬细胞中白细胞介素 12 生成信号通路为藿香和苍术与甲流共同作用的免疫通路。

表 2 藿香与苍术作用的免疫通路比较

免疫通路	藿香	苍术	甲流
细胞毒 T 淋巴细胞介导的靶细胞凋亡	●		●
巨噬细胞移动抑制因子介导的激素调控	●		●
双链 RNA 调节的蛋白激酶在干扰素诱导和抗病毒反应中的作用通路	●	●	●
T 淋巴细胞中 Nur77 信号通路	●		●
白细胞介素 4 信号通路	●		●
在 T 淋巴细胞中白细胞介素 2 表达的调节	●		●
白细胞介素 6 信号通路	●		●
巨噬细胞中白细胞介素 12 生成信号通路	●	●	●
免疫反应红活化 T 细胞核因子的调节作用	●		●
粒细胞黏附及渗出	●		●
先天免疫的巨噬细胞移动抑制因子的调节		●	●
白细胞介素 17 信号通路		●	●

注: ●表示有相关性

为了进一步阐释藿香与苍术防治甲流的分子机制, 试分析二者在共同作用的生物学通路中的不同作用位点。图 2 示, PKR 在干扰素诱导和抗病毒反应中的作用通路中, 藿香作用于 CASP3 基因, 苍术作用于 P53 基因, 甲流作用于肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 Toll 样受体 3 (TLR3); 图 3 示, 巨噬细胞中白细胞介素 12 生成信号通路中, 藿香作用于 PPAR γ , 苍术作用于一氧化碳合成酶 2 (NOS2), 甲流作用于 TNF- α 和白细胞介素 10。

3 讨论

在中药归经理论中, “归” 即归属, 指药物作用的归属, “经” 即人体的脏腑经络, 归经即指药物作用的定位。在归经理论指导下, 可以把药物的作用与人体的脏腑经络密切联系起来, 用以说明药物对机体某部分的选择性作用, 是临床辨证用药的重要理论依据。

流感是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 流感病毒感染后, 会引起机体的免疫炎症反应, 黏膜表面的免疫反应是第一道防线。芳香中药多以辛凉走窜为特征, 临床上可以通过呼吸道吸入的方式预防流感, 比如中药香囊、中药滴鼻剂、咽部喷雾剂、中药药用口罩^[1-4]等, 都是通过吸入芳香药物来预防流感的, 具有使用安全、毒副作用小、简便易行的特点。临床上常用于制作香囊的中药有藿香、佩兰、薄荷、艾叶、金银花、冰片、沉香、肉桂、白芷、丁香、石菖蒲、细辛、黄芩、黄芪、辛

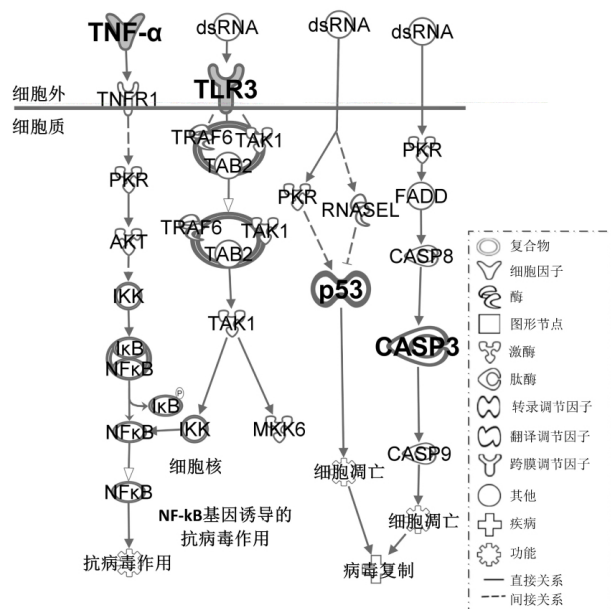


图2 双链 RNA 依赖的蛋白激酶在干扰素诱导和抗病毒反应中的作用通路中藿香、苍术、甲型 H1N1 流感作用位点图

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子- α ; ds-RNA, 双链 RNA; TNFR1, 1 型肿瘤坏死因子受体; TLR3, Toll 样受体 3; TRAF6, 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6; PKR, 双链 RNA 调节的蛋白激酶; TAK1, 转化生长因子激酶 1; p53, P53 基因; FADD, Fas 相关死亡域蛋白; CASP3, 半胱氨酸蛋白酶 3; CASP8, 半胱氨酸蛋白酶 8; CASP9, 半胱氨酸蛋白酶 9; IKK, I κ B 激酶; NF- κ B, 核转录因子 kappaB

夷、紫苏子、花椒等^[5-7], 纵观这些药物, 以芳香药为主, 且大都归肺经。藿香味辛, 性微温, 归肺、脾、胃经; 苍术味辛、苦, 性温, 归脾、胃经, 二者都为典型芳香类药物, 临床上都可用于流感的预防。本研究选用该两味中药对比, 观察不同归经的芳香药调节免疫通路的差异。

本研究结果显示, 与非肺经芳香药苍术比较, 归肺经芳香药藿香形成的分子网络与甲流的分子网络关联更多, 作用于更多甲流相关的免疫炎症疾病和免疫生物通路, 这在一定程度上提示, 肺经较其他归经芳香药对甲流相关的免疫调节更有优势。在临床上, 藿香和苍术都可用于流感的预防或治疗, 基于本研究结果, 我们进一步在免疫学通路中分析了该两味药防治流感的机制, 发现藿香可能通过作用于“PKR 在干扰素诱导和抗病毒反应中的作用通路”和“巨噬细胞中白细胞介素 12 生成信号通路”中的 CASP3 和 PPARG 位点, 而苍术作用于该两条通路中的 P53 和 NOS2 位点, 推测藿香和苍术可能通过调节以上两条免疫相关通路中的分子位点, 而达到防治流感的目的。本研究中的结果是对

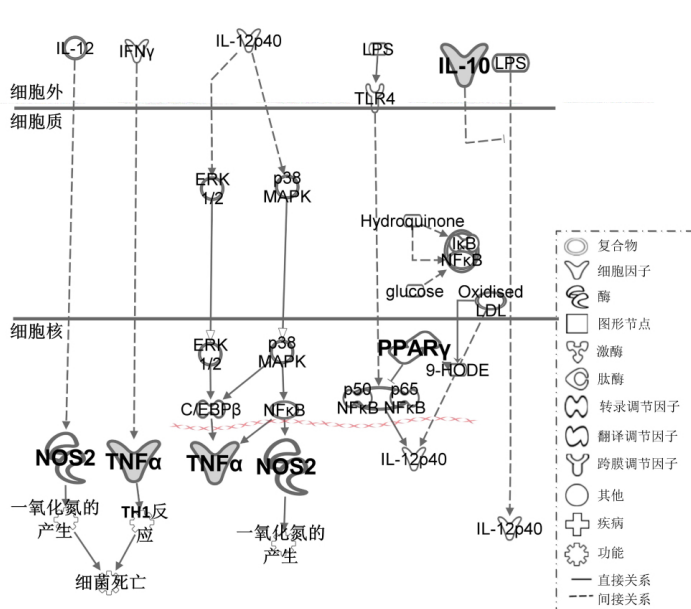


图3 巨噬细胞中白细胞介素 12 生成信号通路中藿香、苍术、甲型 H1N1 流感作用位点图

注: IL-12, 白细胞介素 12; IFN- γ , γ -干扰素; LPS, 脂多糖; TLR4, Toll 样受体 4; IL-10, 白细胞介素 10; glucose, 葡萄糖; hydroquinone, 对苯二酚; PPAR- γ , 过氧化物酶增殖体激活受体- γ ; oxidised LDL, 氧化低密度脂蛋白; NOS2, 一氧化氮合成酶 2; TNF- α , 肿瘤坏死因子- α

不同归经中药预防流感机制的预测, 下一步拟基于该结果开展动物实验, 以流感模型小鼠为研究对象, 给予肺经芳香药藿香和非肺经芳香药苍术进行干预, 进而观察不同归经芳香类药物对呼吸道黏膜免疫的影响, 以期生物信息学结果的科学准确性提供实证数据。

将生物信息学分析应用于中医药研究的技术已日臻成熟, 该方法已经对中药寒热药性、中药“药证对应”、中药药理机制等进行了分析阐释^[8-9], 在中药复方及中成药治疗甲流的分子机制的研究中也得到了成功应用^[10-11]。本研究是将药物活性成分、作用靶标和疾病之间的复杂关系整合起来, 通过分析药物成分靶点在生物通路中的作用, 来解释药物在机体的选择作用, 可以为中药归经理论以及中医药预防流感机制研究提供方法学参考。

参考文献

- [1] WANG H, ZHANG Q, CHENG ML, et al. Effect of the Miaoyao Fanggan sachet-derived isorhamnetin on TLR2/4 and NKp46 expression in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(1): 138-144.

- 向燕, 培平, 符林春, 等. 冰香散挥发油对流感病毒感染鼠的预防作用及 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(2): 214-217.
- 钟燕春. 苍果喷雾剂预防呼吸道感染病毒的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- 李利丹, 蒋美娟, 张琳琳, 等. 中药药物性口罩的制备及其抗 H1N1 流感病毒的实验研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(5): 397-399.
- 刘龙, 岳小强, 王丽娜, 等. 秽防感香囊预防流行性感冒的疗效及其免疫调节机制 [J]. 中西医结合学报, 2010, 8(10): 949-955.
- 王旭东, 谢飞, 高益明. 辟秽香囊抗流感病毒的实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(6): 927-929.
- 郭晟, 郭柳, 徐芝兰, 等. 抗感通鼻香囊治疗变应性鼻炎疗效观察 [J]. 广西中医药, 2013, 36(6): 38-39.
- LIANG F, LI L, WANG ML, et al. Molecular network and chemical fragment based characteristics of medicinal herbs with the cold and hot properties in Chinese medicine [J]. J Ethnopharmacology, 2013, 148(3): 770-779.
- 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): 299-303.
- 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.
- 李立, 王燕平, 赵静, 等. 喜炎平防治甲型 H1N1 流感分子机制的生物信息学分析 [J]. 中医杂志, 2014, 55(4): 337-341.

Bioinformatics Analysis of Immunoregulation Differences Between Huoxiang (*Agastache rugosus*, 藿香) and Cangzhu (*Rhizoma Atractylodis*, 苍术) in Influenza A (H1N1)

LI Li, KOU Shuang, ZHAO Jing, LYU Cheng, HE Xiaojuan, JIANG Miao, LYU Aiping

(Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing, 100700)

ABSTRACT Objective To compare the differences in regulating immune related pathways in influenza A (H1N1) between Huoxiang (*Agastache rugosus*, 藿香) and Cangzhu (*Rhizoma Atractylodis*, 苍术) which are aromatics with different channel tropism. **Methods** The chemical composition and target protein of aromatics Huoxiang with the lung tropism and Cangzhu without the lung tropism were searched in Taiwan Chinese Medicine Database, PubChem, and Traditional Chinese Medicine Integrated Database (TCMID). Related genes of influenza A (H1N1) were searched in Gene database. The correlation of molecular network and biological pathway of Huoxiang target protein, Cangzhu target protein and related genes of influenza A (H1N1) were analyzed with bioinformatics software. Differences in the effect of two herbs on influenza A (H1N1) immune related pathways were compared. **Results** There were 42 Huoxiang target proteins, 24 Cangzhu target proteins, and 32 related genes of influenza A (H1N1). There were a lot of correlations between influenza A (H1N1) molecular network and Huoxiang molecular network, but relatively fewer correlations between influenza A (H1N1) molecular network and Cangzhu molecular network were. Compared with Cangzhu, Huoxiang could work on more immune inflammatory diseases related to influenza A (H1N1). Both Huoxiang and influenza A (H1N1) acted on the same 10 immune biological pathways. Both Cangzhu and influenza A (H1N1) acted on the same 4 immune biological pathways. **Conclusion** Aromatics Huoxiang, which was with the lung tropism, might have more advantages in influenza A (H1N1) immunoregulation than aromatics Cangzhu which was not with the lung tropism.

Keywords influenza A (H1N1); aromatics; Huoxiang (*Agastache rugosus*, 藿香); Cangzhu (*Rhizoma Atractylodis*, 苍术); bioinformatics; immune pathway

(收稿日期: 2015-09-01; 修回日期: 2015-11-27)

编辑: 崔京艳