

金银花、连翘对甲型 H1N1 流感免疫调节通路影响的生物信息学分析

李立¹, 杜紫薇², 寇爽¹, 赵静¹, 吕诚¹, 姜淼¹, 吕爱平^{1*}

(1. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700;

2. 北京中医药大学 东直门医院, 北京 100700)

[摘要] **目的:**基于生物信息学方法分析金银花、连翘对甲型 H1N1 流感免疫调节通路的影响。**方法:**在台湾中医药资料库, PubChem 及 Gene 公众网络平台数据库查找金银花、连翘的靶蛋白及甲型 H1N1 流感相关基因, 运用生物信息软件对检索到的数据集进行分析, 解读金银花、连翘单用和连用对甲型 H1N1 流感相关的免疫调节生物通路的影响。**结果:**金银花相关靶蛋白共 16 个, 连翘相关靶蛋白共 8 个, 甲型 H1N1 流感相关基因 32 个; 生物信息分析发现金银花和连翘有各自作用的特异性的免疫调节通路; 对于巨噬细胞中白介素-12 信号的生成通路和白介素-8 信号通路, 二者作为药对使用后, 代表药物靶蛋白与生物通路相联性的 $-\log P$ 大于单独使用金银花或连翘; 金属蛋白酶家族 (MMPs) 参与了多数金银花特异性作用的通路, 蛋白激酶 C- α (PRKCA) 参与了连翘特异作用的通路。**结论:**对于甲型 H1N1 流感相关的免疫通路, 金银花和连翘有各自的调节特点, 作为药对使用对巨噬细胞中白介素-12 信号的生成通路和白介素-8 信号通路调节更有优势, MMPs 和 PRKCA 可能是金银花和连翘分别作用于免疫通路的关键蛋白。

[关键词] 甲型 H1N1 流感; 金银花; 连翘; 生物信息学; 免疫通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0201-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017100201

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170308.0936.016.html>

[网络出版时间] 2017-03-08 9:36

Bioinformatics Analysis on Effect of Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus on Immune Pathway of H1N1 Influenza A

LI Li¹, DU Ya-wei², KOU Shuang¹, ZHAO Jing¹, LYU Cheng¹, JIANG Miao¹, LYU Ai-ping^{1*}

(1. *Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;*

2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus on immune pathway of H1N1 Influenza A based on bioinformatics approach. **Method:** Target proteins of Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus, and genes of H1N1 Influenza A were searched in TCM Database @ Taiwan, PubChem and Gene online public platform databases. Bioinformatics software was used to analyze the data sets, and explain the effect of Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus on immune pathway of H1N1 Influenza A. **Result:** There were 16 target proteins of Lonicerae Japonicae Flos, eight target proteins of Forsythiae Fructus and 32 genes of H1N1 influenza A. According to the bioinformatics analysis, Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus have their specific immune pathways, respectively. After the production pathway of IL-12 signaling and the pathway

[收稿日期] 20160421(008)

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81503388)

[第一作者] 李立, 博士, 副研究员, 从事中医药防治传染病工作, Tel: 15810212686, E-mail: lilylove1116@126.com

[通讯作者] * 吕爱平, 研究员, 博士生导师, 从事中医证关联工作, Tel: 010-64014411-3301, E-mail: lap64067611@126.com

IL-8 signaling were treated with the drug pairs, the $-\log P$ value representing the correlation between drug target protein and biological pathway was higher than that of single administration of *Lonicerae Japonicae Flos* or *Forsythiae Fructus*. Matrix metalloproteinases (MMPs) involved in the most of specific immune pathways of *Lonicerae Japonicae Flos*, and PRKCA involved in the most of specific immune pathways of *Forsythiae Fructus*. **Conclusion:** *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* have their own characteristics in regulating specific immune pathways related to H1N1 Influenza A. When being used as a drug pair, they have more advantages in regulating the production pathway of IL-12 signaling and the pathway IL-8 signaling. MMPs and PRKCA may be the key proteins of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* in regulating immune pathways.

[**Key words**] H1N1 influenza A; *Lonicerae Japonicae Flos*; *Forsythiae Fructus*; immune pathway; bioinformatics

金银花、连翘是治疗甲型 H1N1 流感(甲流)的常用中药^[1],并且常常作为药对出现在治疗流感的复方中^[2]。免疫反应的激活是抵抗流感的第一道防线,既往研究发现金银花和连翘均有免疫调节的作用^[3],说明金银花和连翘可以通过调节机体免疫功能起到防治流感的作用,但是无论是单药应用还是药对应用,该药对甲流免疫调节机制尚不明确。生物信息学是一门新兴学科,已有研究开始利用生物信息学数据库和分析软件开展中药有效成分或复方的药理机制分析^[4-5]。为了阐明金银花、连翘对甲流免疫反应调节机制,笔者尝试采用生物信息学方法分析金银花、连翘对甲型 H1N1 流感免疫通路的影响,以期对中药治疗流感机制提供科学数据,同时也为中药药对研究提供参考。

1 材料 本研究所采用的生物信息数据均来源于国际社会公认的公共在线数据平台,主要涉及的数据库有台湾中医药资料库(<http://tcm.cmu.edu.tw>),生物技术信息国家中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)信息检索系统下的 PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)和 Gene (<http://www.megabionet.org/tcmid>)数据库。并通过具有完整准确注解生物反应途径的生物信息学分析软件 Ingenuity Pathway Analysis (IPA, <http://www.ingenuity.com/>),对复杂海量的生物信息数据结果进行解析。

2 方法

2.1 检索金银花、连翘靶蛋白及甲流相关基因 首先在台湾中医药资料库中录入药物名称,查找并导出相关的化合物分子;随后在 PubChem 数据平台中,中查找每个化合物分子的相关生物测试及靶蛋白,并导出数据集,以备用于下一步生物信息软件分析;同样在 NCBI 检索系统下的 Gene 数据平台,以 H1N1 influenza A 为关键词,查找甲流的相关基因,

导出数据集备用。

2.2 分析金银花、连翘作用的与甲流相关免疫调节通路 将检索到的金银花、连翘靶蛋白及甲流相关基因的数据集在线提交至 IPA,采用对比(Comparison)分析功能,筛选出金银花、连翘及二者组成的药对作用的甲流相关免疫调节生物通路,解析该两味药物各自的作用特点和连用后的作用优势。

2.3 分析金银花、连翘作用免疫通路的关键蛋白 逐个分析上述步骤中找到的与金银花和连翘有关的免疫调节通路,将二者在这些通路中的作用位点进行列表,进一步阐释金银花和连翘治疗甲流的分子机制。

3 结果

3.1 金银花、连翘靶蛋白及甲流相关基因 截止至 2016 年 4 月,共查找到金银花相关的靶蛋白共 16 个,连翘相关靶蛋白共 8 个,甲型 H1N1 流感相关基因 32 个。见表 1。

表 1 金银花、连翘靶蛋白及甲流相关基因

Table 1 Target proteins and genes of *Lonicerae Japonicae Flos*, *Forsythiae Fructus* and H1N1 influenza A

检索对象	分类	分子名称
金银花	靶蛋白	AR, ID4, MITF, NFE2L2, PRKCA, SQLE, STK33, WHSC1
连翘	靶蛋白	AKR1B1, AKR1B10, ALOX15, ESR1, LIPE, MMP-1, MMP-12, MMP-13, MMP-2, MMP-3, MMP-9, NFE2L2, NFE2L2, RARA, RXRA, SENP8
甲型 H1N1 流感	基因	ACE2, CCL2, CD55, CXCL10, DDX58, F2, FCGR2A, GNB2, HLA-DQB1, HMGB1, IFITM1, IFITM3, IL-10, IL-6, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS4, KIR3DS1, MBL2, MIF, mir-8, mir-939, PDCD1, RSAD2, SOCS1, TLR3, TNF, TRA, TRB, TRI-AAT7-2, VEGFA, ZNF365

3.2 金银花、连翘作用的甲流相关免疫调节通路

IPA 软件可以通过 Fisher 检验, 计算上传的分子与生物通路之间的相关性, 并用 $-\log P$ 表示, $-\log P$ 越高, 说明相关性越大。金银花特异性的单独作用于粒细胞黏附和渗出通路 (granulocyte adhesion and diapedesis), 非粒细胞黏附和血球渗出通路 (agranulocyte adhesion and diapedesis) 和 T 淋巴细胞中 Nur77 信号通路 (Nur77 signaling in T lymphocytes) 通路, 见图 1; 连翘特异性的单独作用于巨噬细胞中 CCR5 信号通路 (CCR5 signaling in macrophages), 细菌和病毒中模式识别受体信号通路 (role of pattern recognition receptors in recognition of bacteria and viruses), 钙诱导的淋巴细胞凋亡通路 (calcium-induced T lymphocyte apoptosis) 和自然杀伤细胞信号通路 (natural killer cell signaling), 见图 2; 二者作为药对, 可以共同作用于巨噬细胞中白细胞介素-12 信号和生成通路 (IL-12 signaling and production in macrophages) 和白细胞介素-8 信号通路 (IL-8 signaling), 见图 3; 并且从图 3 中还可以发现, 二者作为药对使用后, 代表药物靶蛋白与生物通路相联性的 $-\log P$ 大于单独使用金银花或连翘,

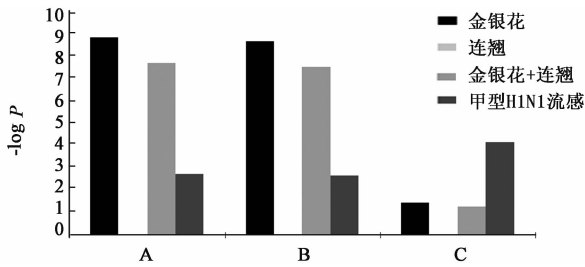


图 1 金银花特异性作用的甲流相关免疫调节通路
Fig.1 Specific immune pathways of Lonicerae Japonicae Flos and H1N1 influenza A

表 2 金银花、连翘、甲型 H1N1 流感在免疫通路中的作用位点

Table 2 Focus molecules of Lonicerae Japonicae Flos, Forsythiae Fructus and H1N1 influenza a on immune pathways

通路 (Pathway)	金银花 (Lonicerae Japonicae Flos)	连翘 (Forsythiae Fructus)	甲型 H1N1 流感 (H1N1 influenza a)
granulocyte adhesion and diapedesis	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13		CCL2, CXCL10, TNF
agranulocyte adhesion and diapedesis	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13		CCL2, CXCL10, TNF
Nur77 signaling in T lymphocytes	RXRA		HLA-DQB1, TRA, TRB
CCR5 signaling in macrophages		PRKCA	GNB2, TRA, TRB
role of pattern recognition receptors in recognition of bacteria and viruses		PRKCA	DDX58, IL-6, IL-10, MBL2, TLR3, TNF
calcium-induced T lymphocyte apoptosis		PRKCA	HLA-DQB1, TRA, TRB
natural killer cell signaling		PRKCA	FCGR2A, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS4
IL-12 signaling and production in macrophages	ALOX15, RXRA	PRKCA	IL-10, TNF
IL-8 signaling	MMP-2, MMP-9	PRKCA	GNB2, VEGFA

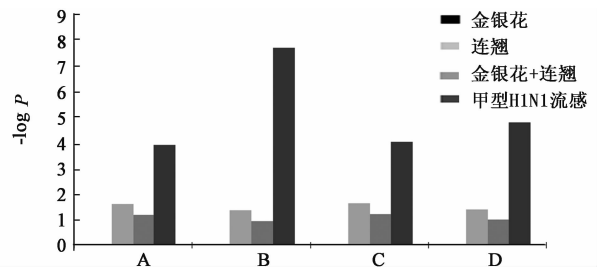


图 2 连翘特异性作用的甲流相关免疫调节通路
Fig.2 Specific immune pathways of Forsythiae Fructus and H1N1 influenza A

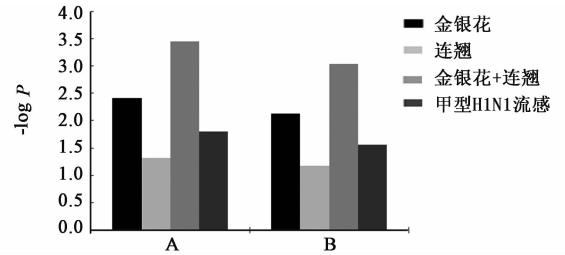


图 3 金银花、连翘药对作用的甲流相关免疫调节通路
Fig.3 Common immune pathways of Lonicerae Japonicae Flos, Forsythiae Fructus and H1N1 influenza A

说明作为药对使用对这两条通路的调节更有优势。
3.3 金银花、连翘、甲型 H1N1 流感在免疫通路中的作用位点 为了进一步阐释金银花、连翘治疗甲型 H1N1 流感的分子机制, 分析二者在共同作用的生物学通路 (IL-12 signaling and production in macrophages, IL-12 signaling) 中的作用位点, 发现在金属蛋白酶家族 (MMPs) 参与了多数金银花特异性作用的通路, 蛋白激酶 C- α (protein kinase C, Alpha, PRKCA) 参与了连翘特异性作用的通路, 提示 MMPs 可能是金银花作用于免疫通路的关键蛋白, PRKCA 可能是连翘作用于免疫通路的关键蛋白。见表 2。

4 讨论

甲型 H1N1 流感是由一种新型猪流感病毒引起的传染性疾病,于 2009 年 4 月在墨西哥首次被发现。由于甲型流感病毒与普通季节性流感病毒在基因和抗原方面都有很大的差异,因此目前的季节性流感疫苗在对抗甲型流感病毒感染几乎起不到任何作用,绝大多数的人对甲型流感病毒没有免疫力。一般当机体受到流感病毒感染时,先天免疫反应和适应性免疫反应都会被激活以抵抗流感病毒,有研究发现甲型 H1N1 流感病毒感染机体后也会出现与季节性流感表现出相似的免疫反应^[6]。

金银花,味甘,性寒。归肺、胃、大肠经。具有清热解毒,轻宣疏散的功效。连翘,味苦,性微寒,归肺、心、胆经。具有清热解毒,消痈散结的功效。二者都可用于外感风热或热病初起。甲型 H1N1 流感属于中医学“瘟疫病”、“疫疔病”、“瘟病”的范畴,风热犯卫证或热毒袭肺证为初期多见证候,故在卫生部颁布的《甲型 H1N1 流感治疗方案(2010 年版)》^[7]中,甲流轻症风热犯肺证中就推荐了以该两味药为主要组成的复方。现代研究中发现,金银花和连翘对机体的免疫调节都有改善作用。金银花可以提高淋巴细胞转化率及巨噬细胞吞噬率^[8,9]。连翘根提取物(FSEER)可以提高免疫抑制状态小鼠脾脏指数增强机体的免疫功能^[10]。

本研究结果显示,金银花和连翘都可以调节甲流相关的免疫通路,并且有各自特异的调节通路,说明二者都可以通过调节免疫通路来干预甲流的病程,同时,虽然都为清热解毒功效的中药,但对机体免疫功能的调节机制存在差异。白细胞介素在机体免疫应答过程中发挥重要调节作用,当二者作为药对合用后,对 IL-12 signaling and production in macrophages 和 IL-8 signaling 信号通路调节更为明显,提示调节免疫信号通路可能是该药对干预治疗甲流的一种作用机制。已知 MMPs 调控炎症细胞浸润与转移的重要因子,机体感染流感病毒后,MMP-3 基因出现上调^[11],肺内 MMP-9 含量上升^[12]血清中 MMP-2 出现下降趋势^[13],说明 MMPs 可能参与的流感的发病。蛋白激酶 C(PRKC)对于组织的分泌、增殖、分裂以及细胞功能具有重要作用,它的激活被认为与呼吸系统疾病有密切关系^[14-15]。本研究中,金银花主要作用于免疫通路中的 MMPs,连翘主要作用于免疫通路中的 PRKCA,提示二者可能是通过调节一些免疫通路中的 MMPs,PRKCA 等分子起到治疗甲流的作用。在大数据时代,应用生物信息学技

术,可以将中药的复杂成分、作用靶标和疾病之间关系整合起来,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作用机制,为中药药理以及中药预防流感机制研究提供方法学参考。

[参考文献]

- [1] 郭洪涛,赵静,姜森,等.基于文本挖掘分析甲型 H1N1 流感的中医药治疗特色[J].世界科学技术—中医药现代化,2011,13(5):772-776.
- [2] 赵静,郭洪涛,韩经丹,等.中医药治疗流行性感胃文本挖掘结果与诊疗方案的比较分析[J].中医杂志,2014,55(7):612-616.
- [3] 孙丽平.银翘散主要药物活性成分调节流感病毒感染小鼠免疫失衡的实验研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2007.
- [4] 李立,王燕平,赵静,等.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[J].中医杂志,2014,55(4):337-341.
- [5] 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.
- [6] 王海.甲型 H1N1 流感病毒引起机体免疫反应的分析[D].杭州:浙江大学,2011.
- [7] 卫生部.卫生部办公厅关于印发《甲型 H1N1 流感诊疗方案(2010 年版)》的通知[EB/OL].http://www.moh.gov.cn/mohyzs/s3586/201005/47250.shtml,2010-05-07
- [8] 王妍,石学魁,宋宝辉.金银花增强小鼠免疫功能的研究[J].牡丹江医学院学报,2010,31(2):49-50.
- [9] 周秀萍,李争鸣,刘志杰,等.金银花对大鼠免疫功能影响的研究[J].实用预防医学,2011,18(2):214-216.
- [10] 孙佳玮,戴素丽,李磊,等.连翘根提取物(FSEER)对化疗后小鼠骨髓和免疫抑制的影响[J].中国免疫学杂志,2015,31(5):625-628.
- [11] 卢娜娜,刘琪,顾立刚,等.不同治法方药对流感病毒性肺炎小鼠 MMPs 和 TIMPs 表达影响的研究[J].中华中医药杂志,2014,29(2):411-414.
- [12] WANG S, QUANG L T, Chida J. Mechanisms of matrix metalloproteinase-9 p-regulation and tissue destruction in various organs in influenza A virus infection[J]. J Med Invest, 2010,57(1/2):26-34.
- [13] 孙桂莲,姜红堃,李萍,等.流感病毒相关脑病患者血清中 MMPs 和 TIMP-1 水平[J].中国医科大学学报,2005,34(1):60-61,68.
- [14] Struhar D, Harbeck R J. Inhibition of induced acute lung edema by a novel protein kinase C inhibitor[J]. FASEB J,1987,1(2):116.
- [15] Souhrada M, Souhrada J F. The role of protein kinase C in sensitization and antigen response of airway smooth muscle[J]. Am Rev Respir Dis, 1989, 140(6):1567-1572.

[责任编辑 周冰冰]