

· 数据挖掘 ·

麻杏石甘汤防治甲型 H1N1 流感分子机制的生物信息学分析

李立¹, 赵静¹, 王雪飞², 谭勇¹, 姜淼¹, 吕诚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. 首都医科大学附属北京中医医院针灸科, 北京 100010)

[摘要] 目的: 通过构建分子网络及解析生物学通路, 探讨麻杏石甘汤防治甲型 H1N1 流感的分子机制。方法: 查找麻杏石甘汤中药成分的有效化合物, 在 PubChem 数据库中检索有效成分的靶蛋白, 在 Gene 数据库中查找甲型 H1N1 流感的相关基因, 运用 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 软件对二者进行构图和解析。结果: 查找到麻杏石甘汤的靶蛋白 186 个, 甲型 H1N1 流感相关基因 7 个。二者的分子网络复杂, 生物功能多样, 在共同作用的 8 条生物通路中, 有 4 条通路为细胞免疫相关通路: 病毒模式识别受体信号通路、巨噬细胞白介素 12 (IL-12) 信号和生产通路、蛋白激酶 (PKR) 在干扰素诱导的抗病毒反应中作用通路、肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) 信号通路。麻杏石甘汤可以调节细胞免疫相关通路中的 Toll 样受体 9 (TLR9)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、核苷酸结合的寡聚结构域 2 受体 (NOD2) 等多个位点。结论: 麻杏石甘汤可以通过干预细胞免疫相关通路中的多个位点起到防治甲型 H1N1 流感的作用。

[关键词] 麻杏石甘汤; 甲型 H1N1 流感; IPA; PubChem

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2013) 13-0346-05

[doi] 10.11653/syfy2013130346

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130425.1504.006.html>

[网络出版时间] 2013-04-25 15:04

Bioinformatics Analysis on Molecular Mechanism of Maxing Shigan Decoction in Treating H1N1 Influenza A

LI Li¹, ZHAO Jing¹, WANG Xue-fei², TAN Yong¹, JIANG Miao¹, LV Cheng¹, LV Ai-ping^{1*}

(1. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Acupuncture and Moxibustion Department, Beijing Tiantan Hospital Affiliated with Capital Medical University, Beijing 100010, China)

[Abstract] **Objective:** To study the molecular mechanism of Maxing Shigan decoction in the treatment of H1N1 influenza A; by establishing molecular networks and comparing canonical pathways. **Method:** Target proteins of Maxing Shigan decoction and related genes of H1N1 influenza A were searched based on Pubchem and Gene databases on line. Molecular networks and canonical pathways comparison analyses were performed by Ingenuity pathway Analysis (IPA). **Result:** There were 186 targets proteins of Maxing Shigan decoction and 7 related genes of H1N1 influenza A. The molecular networks of Maxing Shigan decoction and H1N1 influenza A were multifunction. There were four cellular immune related pathways in all eight common pathways including: role of pattern recognition receptors in recognition of viruses, interleukin 12 (IL-12) signaling and production in

[收稿日期] 20130116(001)

[基金项目] 国家中医药管理局 2009 年中医药行业科研专项 (200907001); 国家自然科学基金面上项目 (30973975); 国家自然科学基金杰青项目 (30825047)

[第一作者] 李立, 博士, 从事中药复方组方机制研究, Tel: 010-64014411-3402, E-mail: lilylove1116@sina.com

[通讯作者] * 吕爱平, 研究员, 博士生导师, 从事中医病证关联研究, Tel: 010-64014411-2343, E-mail: lap64067611@126.com

macrophages, role of protein kinase (PKR) in interferon induction and antiviral response and Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) signaling. Maxing Shigan decoction could regulate Toll-like receptor (TLR9), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) and other molecules of cellular immune related pathways. **Conclusion:** Regulating many effective nodes of cellular immune related pathways maybe the way of Maxing Shigan decoction against H1N1 influenza A.

[**Key words**] Maxing Shigan decoction, H1N1 influenza A, Ingenuity Pathway Analysis (IPA), PubChem

甲型 H1N1 流感是由变异后的新型甲型 H1N1 流感病毒所引起的急性呼吸道性传染病。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。中医药在防治甲型 H1N1 流感的过程中起到了积极作用,也获得了比较满意的效果^[1-2]。麻黄杏仁甘草石膏汤(下简称“麻杏石甘汤”)在国内用于治疗各种呼吸道疾病,其防治甲型 H1N1 流感的临床研究也已开展^[3];体外实验发现,该方具有抗 A 型流感病毒的作用^[4]。为探讨麻杏石甘汤对甲型 H1N1 流感防治作用机制,我们尝试从生物信息学角度分析中药和疾病的分子网络、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 根据《中药大辞典(第二版)》^[5]查找麻黄、杏仁、石膏、甘草的化学成分。将这些化学成份在 PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中查找相关的分子信息及相应的生物学测试,进而确定该成分的靶蛋白。4 味中药的化学成份对应的靶蛋白总和,即代表麻杏石甘汤的生物学靶点。以“H1N1 influenza A”为关键词,在 Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 数据库中查找甲型 H1N1 流感的相关基因。为了便于日后更深入的研究和讨论,笔者将中药靶蛋白及疾病的基因均限定为人类相关。

1.2 构建麻杏石甘汤及甲型 H1N1 流感分子网络

将检索到的麻杏石甘汤对应的靶蛋白及甲型 H1N1 流感相关基因,在线提交至 Ingenuity Pathway Analysis (IPA <http://www.ingenuity.com/>) 生物分析软件。利用 IPA 软件中的 Network analysis 功能,分别构建麻杏石甘汤及甲型 H1N1 流感分子网络,并展示分子网络的核心分子、相关性评分及生物功能。

1.3 对比麻杏石甘汤及甲型 H1N1 流感共同作用的生物学通路及作用位点 利用 IPA 软件中 Comparison 模块,对比麻杏石甘汤及甲型 H1N1 流

感的生物学通路,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,明确麻杏石甘汤防治甲型 H1N1 流感分子机制。

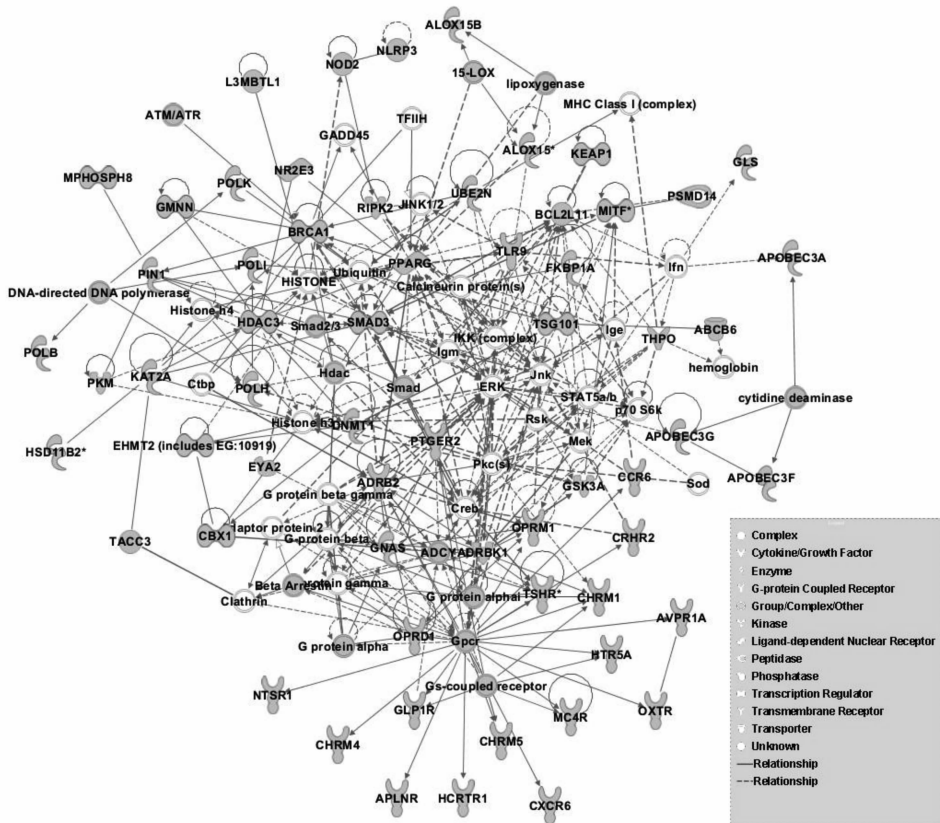
2 结果

2.1 麻杏石甘汤的靶蛋白及甲型 H1N1 流感相关基因 截止 2012 年 7 月 18 日,在 PubChem 数据库中查到麻杏石甘汤的靶蛋白共 186 个(麻黄 24 个,杏仁 141 个,石膏 1 个,甘草 20 个),在 Gene 数据库中查到甲型 H1N1 流感相关基因 7 个。随后将这些分子上传至 IPA 软件。

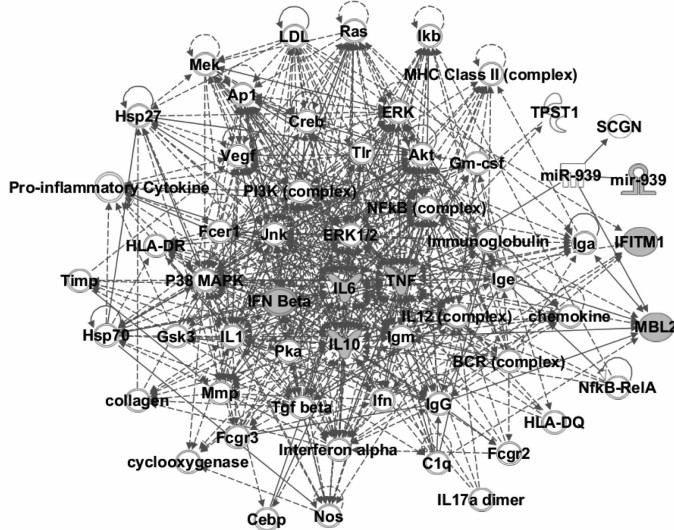
2.2 分子网络的构建 应用 IPA 软件 Network analysis 模块,构建麻杏石甘汤靶蛋白及甲型 H1N1 流感相关基因的分子网络,见(图 1 A, B);网络图中,每一个节点代表一个分子,灰色的分子为麻杏石甘汤的靶蛋白或甲型 H1N1 流感相关基因,未涂色的分子为构建网络所需的相关分子。图注中说明了不同形状分子的分类属性,实线代表两个分子间直接的作用关系,虚线代表两个分子间接的作用关系。通过 IPA 构建的中药及疾病分子网络,能够显示分子之间相互关联,体现生物功能复杂多样性。

2.3 生物学通路比较 通过 IPA 软件的 Comparison Analysis 模块,对比麻杏石甘汤的靶蛋白和甲型 H1N1 流感相关基因作用的生物学通路(见图 2)。二者共同作用的通路有 8 条,其中,有 4 条通路与细胞免疫调节相关:病毒模式识别受体信号通路、巨噬细胞白介素-12(IL-12)信号和生产通路、蛋白激酶(PKR)在干扰素诱导的抗病毒反应中作用通路、肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)信号通路。提示麻杏石甘汤可能通过干预以上细胞免疫调节通路,进而对甲型 H1N1 流感发生作用。

2.4 生物通路作用位点 基于以上结果,进一步观察麻杏石甘汤和甲型 H1N1 流感共同参与的 4 条细胞免疫相关通路,明确作用位点(见图 3)。图中浅灰色为甲型 H1N1 流感相关基因在通路的作用位点,深灰色为麻杏石甘汤的靶蛋白在通路的作用位



A



B

A. 麻杏石甘汤的靶蛋白(灰色分子)构成的分子网络图;B. 甲型 H1N1 流感相关基因(灰色分子)构成的分子网络

图 1 麻杏石甘汤的靶蛋白及甲型 H1N1 流感相关基因构成的分子网络图

点。图中显示,麻杏石甘汤参与调节细胞免疫相关通路中的 TLR9,PI3K,MALP3, NOD2 等多个位点。

3 讨论

甲型 H1N1 流感属于中医学“瘟疫病”、“疫疔病”、“疫病”、“瘟病”的范畴。是一种具有强烈传染性的疾病。甲型 H1N1 流感初期多见风热犯卫证或

热毒袭肺证,治宜疏风清热解毒。麻杏石甘汤见于《伤寒论》,由麻黄、杏仁、石膏、炙甘草 4 味药组成,具有清热宣肺,降气平喘之功效,主治肺热咳喘,是辛凉解表剂的代表方,也是治疗感冒、支气管炎、大叶性肺炎等呼吸道感染的良方。麻杏石甘汤对甲型 H1N1 流感的防治作用已被广泛研究,有随机对照

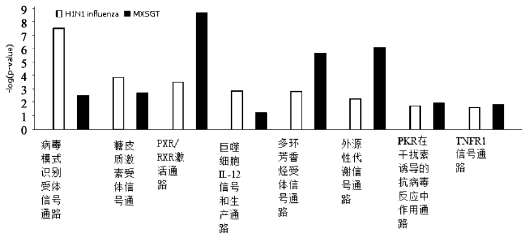
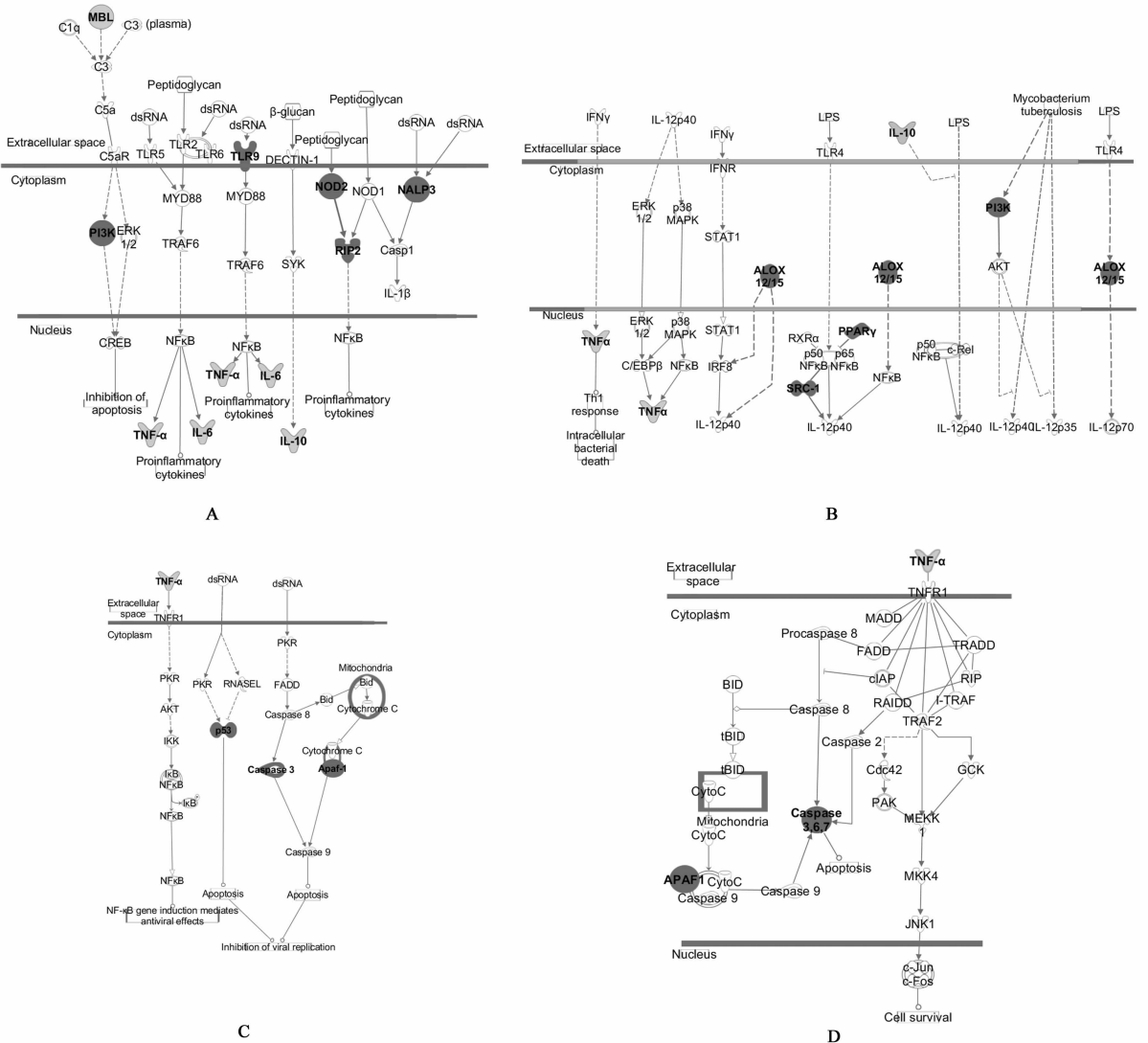


图2 麻杏石甘汤的靶蛋白及甲型 H1N1 流感共同作用的生物通路
 试验发现,该方联合奥司他韦治疗轻症甲型 H1N1 流感有缩短发热病程的作用,且效果优于单独使用中药或西药^[3]。在卫生部颁布的《甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年第三版)》中,中医辨证治疗的热毒袭肺证的方案即为麻杏石甘汤加味而成^[6]。可见在防治甲型 H1N1 流感的诸多中药方剂中,麻杏

石甘汤是重要的经典方剂之一,可以作为中药汤剂的基本方进行加减使用,其防治甲型 H1N1 流感的分子机制亦值得进一步探讨和研究。

PubChem 数据库是由美国国立卫生研究院(NIH)建立的关于小分子生物活性的公共数据库。国内已有学者^[7-8]开始利用 PubChem 网络平台为其研究提供可靠准确的数据信息。IPA 生物分析软件能够分析、整合、理解来自于基因表达等系统生物学、组学等的实验数据;能够搜索到有关基因、蛋白质、化学品和药物的信息,并能建立起实验系统的交互模型。基于 PubChem 和 IPA 分析技术的生物学网络构建,是网络药理学研究方剂作用原理的主要方法之一,一方面能推测方剂中发挥调节作用的有效组分群,发现具有协同或拮抗作用的化合物组合;



A. 病毒模式识别受体信号通路;B. 巨噬细胞 IL-12 信号和生产通路;

C. PKR 在干扰素诱导的抗病毒反应中作用通路;D. TNFR1 信号通路中的作用位点

图3 细胞免疫相关生物学通路作用位点

另一方面,通过靶点网络的动态变化可探查方剂的药效、药理或毒理作用的分子机制,发现方剂对应的网络靶标^[9]。目前,已有学者^[10]采用该方法构建 RA 热证和对证中药靶蛋白的分子相互作用网络,探讨了类风湿关节炎热证“药-证对应”的生物学机制。

本研究结果显示麻杏石甘汤的靶蛋白和甲型 H1N1 流感相关基因构成的网络,分子之间相互联系,生物功能复杂多样;甲型 H1N1 流感发病过程中细胞免疫反应起着至关重要的作用^[11],研究结果提示麻杏石甘汤可能是通过调节 4 条细胞免疫相关通路中的多个位点,来干预甲型 H1N1 流感。为了进一步阐述结论,以 TNFR1 信号通路为例,对本研究的结果进行深入分析:甲型 H1N1 流感轻症患者的血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 浓度水平明显高于健康人^[12],且麻杏石甘汤能下调 A 型流感病毒感染小鼠血清和肺组织中 TNF- α 水平^[13], TNFR1 是 TNF- α 的受体之一,能够诱导其他多种炎症介质,如 γ -干扰素 (IFN- γ)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6) 等释放,本研究结果显示,麻杏石甘汤的靶蛋白和甲型 H1N1 相关基因共同作用于 TNFR1 信号通路,也就是说,麻杏石甘汤可能是通过对 TNFR1 信号通路中个别靶点的影响,本研究提示为:半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase 3)、半胱氨酸蛋白酶 7 (Caspase 7)、凋亡酶激活因子 1 (APAF1),进而干预该通路的生物学功能,是起到对甲型 H1N1 流感的治疗作用的可能途径。除外 TNFR1 信号通路,本研究还得到了很多麻杏石甘汤干预甲型 H1N1 流感分子机制的生物信息结果,这不仅是对该研究方法可靠性的支持,同时也为进一步开展更多更深入的麻杏石甘汤药理研究提供科研依据。

基于 PubChem 和 IPA 分析技术,可以用于中药防治甲型 H1N1 流感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于复方机制研究的一次新的良好的尝试,若能进一步开展定量研究和实验验证,则将为本方法提供更有力的数据支持。本研究可以为中药药理、组方机制及新药研发等提供有益的参考。

[参考文献]

- [1] Wang Chen, Cao Bin, Liu Qing-Quan, et al. Oseltamivir compared with the Chinese traditional therapy Maxingshigan-Yinqiaosan in the treatment of H1N1 influenza [J]. *Ann Intern Med*, 2011, 155 (4):217.
- [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] 曾义岚,刘大风,刘亚玲,等. 麻杏石甘汤治疗轻症甲型 H1N1 流感的随机对照研究[J]. *现代预防医学*, 2011, 38(12):2227.
- [4] 卢芳国,何迎春,肖子曾,等. 麻杏石甘汤体外抗 A 型流感病毒作用靶点的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2008, 28(2):5.
- [5] 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.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案 (2009 年第三版) [J]. *中华临床感染病杂志*, 2009, 2 (5):257.
- [7] 董乃维,赵翠静,刘凤芝. 10 种天然黄酮化合物对大鼠心肌细胞抗凋亡作用的定量构效关系研究[J]. *中国药物化学杂志*, 2008, 18(1):23.
- [8] 刘立明,陈坚. 基因组规模代谢网络模型构建及其应用[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(9):1176.
- [9] 李健,郭洪涛,牛旭艳,等. 治疗类风湿关节炎中药方剂作用原理的网络药理学研究策略[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(6):267.
- [10] 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.
- [11] Iorio A M, 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.
- [12] Yu X, Zhang X, Zhao B, et al. Intensive cytokine induction in pandemic H1N1 influenza virus infection accompanied by robust production of IL-10 and IL-6 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12):e28680.
- [13] 李玲. 麻杏石甘汤对 A 型流感病毒感染小鼠免疫调节作用的研究 [D]. 湖南中医药大学:湖南中医药大学硕士学位论文, 2010:46.

[责任编辑 聂淑琴]