

基于网络药理学研究云实感冒合剂治疗感冒的作用机制

谈利红¹, 姜理华^{1*}, 陈欢²

¹重庆医药高等专科学校, 重庆 401332; ²重庆医科大学, 重庆 400016

摘要:本文通过网络药理学研究方法, 探讨云实感冒合剂对感冒的潜在治疗机制。采用 TCMSp 平台及文献检索筛选云实感冒合剂的活性化学成分和相应靶基因, 并使用 UniProt 对靶基因进行注释。采用 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库检索感冒的相关疾病靶标。采用 R(3.6.2) 软件获得感冒与云实感冒合剂化学活性成分靶基因的共同靶点。采用 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建云实感冒合剂活性成分-流行性感冒疾病-靶标基因网络。利用 STRING 数据库, 评估和靶点基因对应蛋白之间的相互作用。利用 R 语言中 BiocManager 包进行 GO 分析, 利用 Reactome 数据库对共同靶基因进行通路分析。共筛选出 21 个有效成分, 对应靶基因共 197 个, 感冒发病相关基因 3 715 个, 交集基因 152 个, 如 AKT1、IL-6、ALB、VEGFA、CASP3 等; GO 功能富集分析得到 159 条目, 398 条 Reactome 通路 ($P < 0.05$), 主要涉及信号转到免疫系统及多种疾病, 如 PI3K/AKT 信号等。云实感冒合剂主要是通过调控多种信号转导途径, 以及炎症免疫反应, 起到调节免疫和减轻炎症的作用。

关键词:云实感冒合剂; 感冒; 作用靶点; 网络药理学

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0119-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.017

Study on the mechanism of Yunshi Ganmao Mixture in the treatment of common cold based on network pharmacology

TAN Li-hong¹, JIANG Li-hua^{1*}, CHEN Huan²

¹Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China;

²Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: To explore the potential therapeutic mechanism of Yunshi Ganmao Mixture on cold by using network pharmacological research method. TCMSp platform and literature search were used to screen the active chemical constituents and target genes of Yunshi Ganmao Mixture, and Uniprot was used to annotate the target genes. GeneCards databases and OMIM databases were used to search for cold-related disease targets. R (3.6.2) software was used to obtain the common target genes of chemical active components of cold and. Cytoscape 3.7.1 software was used to construct the active ingredient-influenza disease-target gene network of Yunshi Ganmao Mixture. The interaction between proteins corresponding to the target gene was evaluated using the STRING database. The Biocmanager package in R language was used for GO analysis, and the pathway analysis of common target genes was carried out using Reactome database. Results A total of 21 active components were screened out, including 197 target genes, 3 715 cold-related genes and 152 intersection genes, such as AKT1, IL-6, ALB, VEGFA, CASP3. GO functional enrichment analysis revealed 159 entries and 398 Reactome pathways ($P < 0.05$), mainly involving signal transfer to the immune system and a variety of diseases, such as PI3K/Akt signal, etc. Yunshi Ganmao Mixture plays a role in the treatment of cold through multi-component and multi-target therapy, mainly by regulating a variety of signal transduction pathways, as well as inflammatory immune response, and plays a role in regulating immunity and reducing inflammation.

Key words: Yunshi Ganmao Mixture; cold; target of action; network pharmacology

云实感冒合剂是在苗族民间验方基础上制备的口服液体剂, 具有解表散寒、祛风止痛和止咳化痰的功效, 常用于风寒感冒所致的头痛、恶寒、发热、鼻塞、流涕、咳嗽痰多等症, 临床疗效确切^[1]。云实感

收稿日期: 2021-02-25

接受日期: 2021-03-17

基金项目: 重庆市卫生健康委员会“十三五”市级中药重点学科建设项目(中药药剂学)(渝中医[2018]43号)

* 通信作者 Tel: 86-23-61969195; E-mail: lhpete@163.com

胃合剂由云实皮、蓝布正、马鞭草和生姜 4 味药材组成,其化学成分复杂,目前缺乏针对其治疗感冒疾病的物质基础和药理作用机制的基础研究。因此,本研究拟采用中药网络药理学的方法,从理论上预测云实感冒合剂治疗感冒的药效成分和作用机制,为进一步的实验验证和临床研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物有效成分筛选及靶标预测

利用中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)(<http://tcmssp.com/tcmssp.php>)检索云实感冒合剂中的马鞭草、生姜的化学活性成分,云实皮和蓝布正的活性成分参考相关文献后,根据所含化学成分在 TCMSP 内进行检索。药物主要活性成分筛选标准为:口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 药物类药性(drug-like, DL) ≥ 0.18 。运行 Perl 软件可得到上述四味中药主要活性成分对应的靶点基因信息。利用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>),可将上述靶点基因转化为获取靶点的标准基因名称。

1.2 感冒疾病相关靶标分析

以“cold”为关键词,于 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)中检索感冒疾病相关的基因靶标,综合两个数据库检索结果,删除重复基因,即得到该疾病靶基因最终结果。

1.3 构建云实感冒合剂化学活性成分与流行性感冒疾病靶标

将云实感冒合剂化学活性成分对应靶标基因文件和感冒疾病靶标基因文件,导入 R(version 3.6.2)软件,并运行 library(Venn Diagra)数据包,获得感冒疾病与云实感冒合剂化学活性成分的共同靶点,及

共同靶点的韦恩图。

1.4 云实感冒合剂活性成分-流行性感冒疾病-靶标网络的构建

采用 Cytoscape 3.7.1 软件分析云实感冒合剂活性成分靶点基因、感冒疾病靶点基因,以及“1.3”中得到的感冒疾病与云实感冒合剂化学活性成分的共同靶点基因文件,可得到药物-成分-疾病-靶标相互作用的网络图。

1.5 蛋白质相互作用网络的构建

利用 STRING 数据库(<https://string-db.org/>),构建感冒疾病与云实感冒合剂化学活性成分的共同靶基因对应蛋白的蛋白互作网络(protein-protein interaction, PPI),蛋白种类选择“Homo Sapiens”,最低相互作用阈值设置为“medium confidence = 0.4”,其他参数保持默认设置,获得 PPI 网络。此外,采用 R(version 3.6.2)软件绘制柱状图,评估各蛋白的相互作用。

1.6 GO 分析及 KEGG 通路富集分析

利用 R(version 3.6.2)软件中 BiocManager 包对感冒疾病与云实感冒合剂化学活性成分的共同靶基因进行 GO 生物学过程富集分析。利用 Reactome 数据库对共同靶基因进行通路分析。

2 结果

2.1 云实感冒合剂化学活性成分的筛选及靶标预测结果

结合 TCMSP 数据库检索云实感冒合剂组成药物化学成分和文献检索云实皮、蓝布正化学成分,经 ADME 参数筛选后,共得到了 21 个有活性的化合物,包括表齐墩果酸(3-epioleanolic acid)、羟基汉黄芩素(4'-hydroxywogonin)、木犀草素(luteolin)、黄芩素(baicalin)、槲皮素(querctin)等(见表 1)。21 个有活性的化合物对应靶基因共 197 个。

表 1 云实感冒合剂化学活性成分表

Table 1 Yunshi Ganmao Mixture chemical composition table

化合物代码 MOL ID	化合物 Compound	口服生物利用度 OB(%)	药物类药性 DL
MOL001663	表齐墩果酸 3-Epioleanolic acid	32.03	0.76
MOL002881	洋茺萸黄素 Diosmetin	31.14	0.27
MOL002933	羟基汉黄芩素 4'-Hydroxywogonin	36.56	0.27
MOL000358	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76

续表 1 (Continued Tab. 1)

化合物代码 MOL ID	化合物 Compound	口服生物利用度 OB(%)	药物类药性 DL
MOL005229	蒿黄素 Artemetin	49.55	0.48
MOL005503	腺齿紫金牛醌 Cornudentanone	39.66	0.33
MOL000006	木犀草素 Luteolin	36.16	0.25
MOL008752	双氢轮叶十齿草碱 Dihydroverticillatine	42.69	0.84
MOL002773	β -胡萝卜素 Beta-carotene	37.18	0.58
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28
MOL006129	6-甲基姜辣二醇双乙酸酯 6-Methylgingediacetate	48.73	0.32
MOL001771	穿贝海绵甾醇 Clionasterol	36.91	0.75
MOL008698	二氢辣椒素 Dihydrocapsaicin	47.07	0.19
MOL005970	桉油精 Eucalyptol	60.62	0.32
MOL001002	柔花酸 Ellagic acid	43.06	0.43
MOL005552	路边青鞣质 D Gemin D	68.83	0.56
MOL005409	山萘碱 Anisodamine	34.87	0.23
MOL002865	毛丝桃碱 Trichostachine	63.63	0.2
MOL002714	黄芩素 Baicalein	33.52	0.21

2.2 云实感冒合剂化学活性成分与感冒疾病靶标的构建结果

通过两个网站检索共得到 3 715 个感冒的疾病

靶点,与 197 个云实感冒合剂的靶标基取交集后获得 152 个云实感冒合剂-感冒疾病共同靶标,结果见韦恩图(见图 1)。

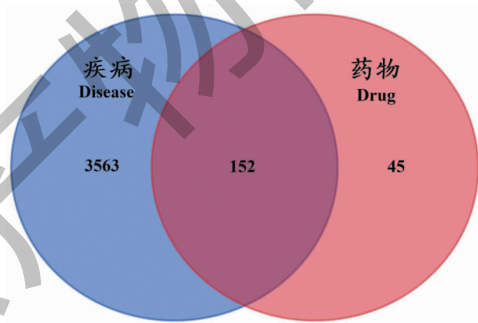


图 1 云实感冒合剂-流行性感冒疾病共同靶标的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of Yunshi Ganmao Mixture using target and cold target

2.3 云实感冒合剂活性成分-感冒疾病-靶标网络的构建结果

基于 Cytoscape 3.7.1 软件,本研究构建云实感冒合剂活性成分-感冒-靶标基因网络图,详见图 2。网络中共获得个 171 个节点,其中活性成分 17 个,作用靶标 152 个,药物和疾病各 1 个。由图可看出 21 中云实感冒合剂活性成分中仅 17 中活性成分对应的靶基因与感冒疾病基因相关联,说明另有 5 种活性成分对应的靶基因不参与感冒疾病中。

2.4 靶基因对应蛋白相互作用网络图构建结果与关键靶点蛋白分析

为了解云实感冒合剂治疗感冒的潜在作用机制,通过 STRING 数据库建立的蛋白质互作网络如图 3 所示。图中共 152 个节点,2 693 条边,平均节点率为 35.4。在 R(version 3.6.2)软件基础上,筛选出前 50 个蛋白绘制了蛋白互作的条形图,结果见图 4。我们可看出,中药-疾病核心基因按邻接节点数目排名前五依次为: AKT1、IL-6、ALB、VEGFA、

CASP3;邻接节点数目越多,成为核心基因的概率越大,可能发挥主要作用。

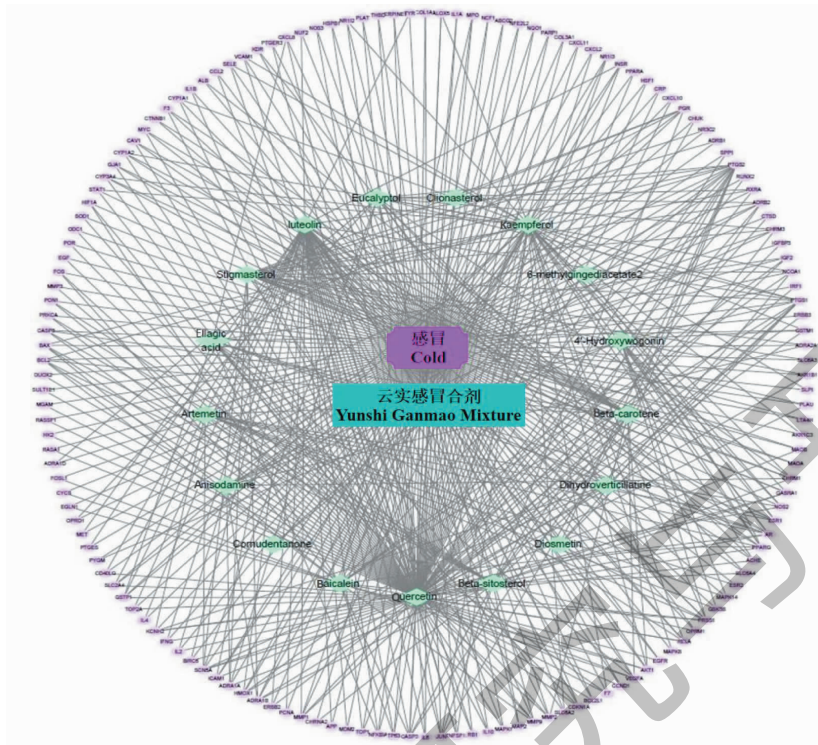


图2 云实感冒合剂活性成分-感冒-靶标基因网络图

Fig. 2 Yunshi Ganmao Mixture active ingredients-cold-target gene network map

注:图中菱形内为云实感冒合剂的活性成分;椭圆内为靶点基因。Note: The rhombus is the active ingredient of Yunshi Ganmao Mixture, and the ellipse is the target gene.

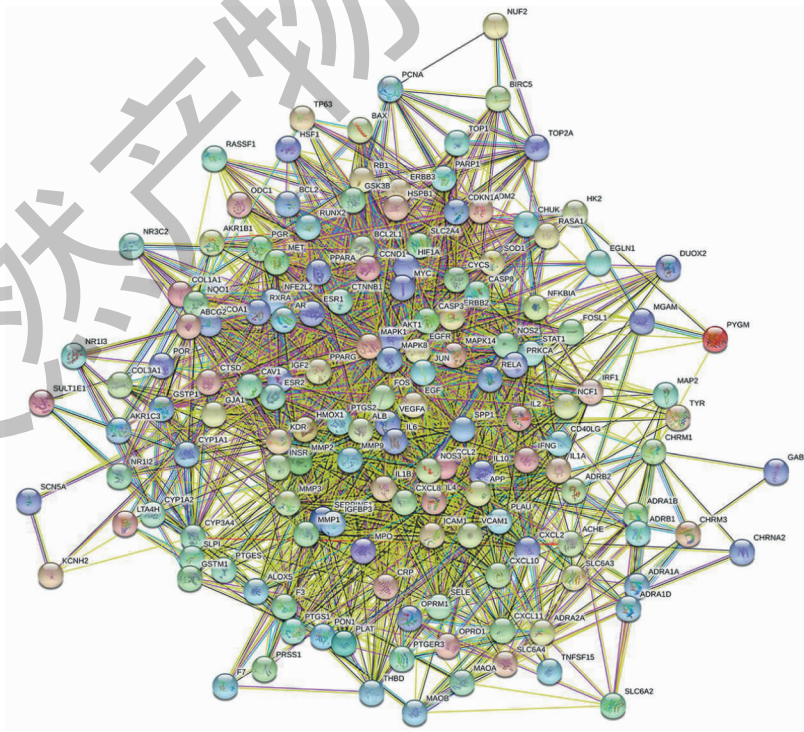


图3 蛋白-蛋白相互作用网络图

Fig. 3 Protein-protein interaction network diagram

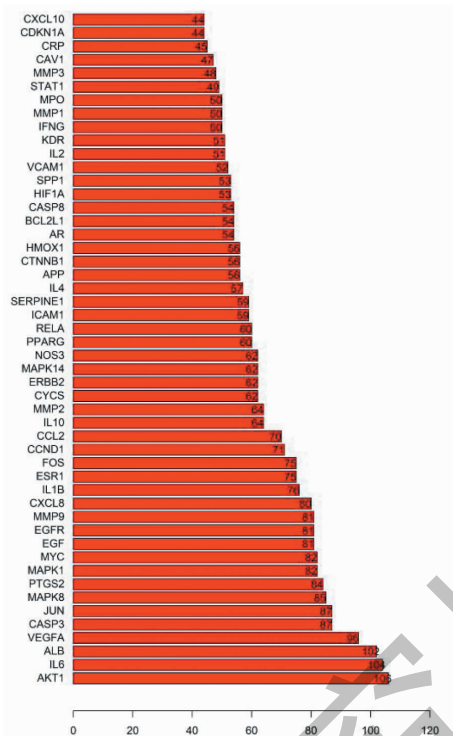


图4 核心靶标蛋白条形图

Fig. 4 Core target bar graph

2.5 GO 功能富集及通路分析结果

经 GO 功能富集分析,确定了 159 个 GO 条目,根据统计显著性,筛选出 *P* 值最小的前 20 个 GO 条目,如图 5 所示,云实感冒合剂治疗感冒的核心基因主要涉及细胞因子受体结合、DNA 结合转录激活物活性-RNA 聚合酶 II -特异性、受体配体活性、细胞因

子活性、泛素样蛋白连接酶结合、磷酸酶绑定等。通路分析发现,云实感冒合剂治疗感冒的核心基因主要富集到 398 条通路 (*P* < 0.05),主要涉及信号转导、免疫系统及多种疾病,如 PI3K/AKT 信号等,结果见图 6 和表 2。

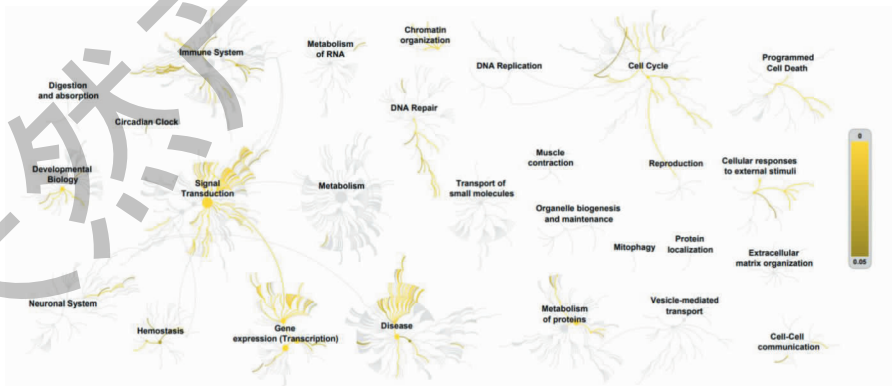


图5 GO 功能富集分析

Fig. 5 Gene Ontology (GO) analysis histogram

3 讨论

感冒作为最常见的疾病,其发生往往与机体感染多种病毒而引起的一系列上呼吸道炎症反应有关^[2]。通过本研究对云实感冒合剂中化学成分筛

选后发现槲皮素、木樨草素和三奈酚是所有化合物中靶向感冒发病靶基因最多的三种化学成分,可分别靶向 110、43 和 39 个基因。三种化学成分均属于黄酮类化合物,均具有较强的药理活性,可发挥明

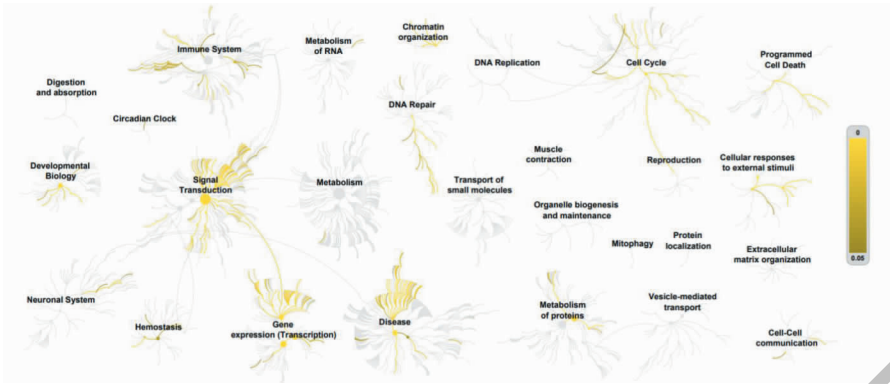


图6 Reactome 通路分析

Fig. 6 Reactome pathway analysis

表2 Reactome 通路信息(前十)

Table 2 Reactome signal pathway information (Top 10)

通路名称 Pathway name	基因组 Entities			
	靶基因/通路总基因 Found/All	比率 Ratio	P 值 P-value	伪发现率 FDR *
信号转导疾病 Diseases of signal transduction	40/475	0.034	1.11E-16	1.15E-13
磷脂酰肌醇3 激酶/蛋白激酶 B 信号 PI3K/AKT signaling	20/130	0.009	1.22E-15	6.13E-13
磷脂酰肌醇三磷酸激活蛋白激酶 B 信号 PIP3 activates AKT signaling	25/312	0.022	6.31E-13	1.22E-10
磷脂酰肌醇五磷酸, 蛋白磷酸酶 2, 即刻早期反应 3 调节磷脂酰肌醇3 激酶/蛋白激酶 B 信号 PIP5, PP2A and IER3 regulate PI3K/AKT signaling	17/122	0.009	8.64E-13	1.27E-10
第二信使介导的细胞内信号 Intracellular signaling by second messengers	25/351	0.025	7.81E-12	8.99E-10
促分裂原活化蛋白激酶 1/促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 3 信号 MAPK1/MAPK3 signaling	22/280	0.020	2.46E-11	2.17E-09
受体酪氨酸激酶介导的信号 Signaling by receptor tyrosine kinases	29/518	0.037	4.47E-11	3.26E-09
通用转录途径 Generic transcription pathway	51/1 454	0.104	2.94E-11	2.33E-09
胰岛素受体底物介导的信号 IRS-mediated signalling	12/64	0.005	7.85E-11	5.02E-09
RAF/丝裂原活化蛋白激酶级联反应 RAF/MAP kinase cascade	21/273	0.020	1.05E-10	6.33E-09

显的抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒等作用^[3-5]。因此,云实感冒合剂治疗感冒是具备一定物质基础的。

通过 PPI 分析后,多个蛋白相互作用的度值越大,则表明云实感冒合剂治疗感冒通过影响该靶点的概率越大。本研究 PPI 结果中排名前 5 的靶蛋白是 RAC- α 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(AKT1)、白介素(IL)-6、白蛋白(ALB)。AKT1 通过激活下游底物的丝氨酸和/或苏氨酸磷酸化来参与调节多种生物过程。先天免疫系统的激活可以控制感冒的发生中

的病毒感染,而先天免疫系统的激活可以通过 AKT1 依赖性激活 NF- κ B 来完成^[6]。通路分析中也直接得到了涉及 AKT 的信号通路。IL-6 蛋白可产生于在机体发生急性和慢性炎症反应的场所,其具有多种生物学功能,是急性炎症发生的有效诱导因素。IL-6 可参与淋巴细胞和单核细胞的分化,另外可通过激活 IL-6 受体诱导转录更多炎症因子,最终加重炎症反应。ALB 蛋白主要在调节血浆胶体渗透压中起作用,并作为多种内源性分子(包括激素、

脂肪酸和代谢产物)以及外源性药物的载体蛋白。感冒患者的喉部出现明显细菌感染可导致局部血管通透性增加,血管扩张和渗出,最终导致喉部充血,疼痛甚至粘膜增厚^[7]。当喉咙发炎时局部 ALB 合成增加,可维持血管内渗透压,减少浆液渗出并减轻症状和咽部炎症过程^[8]。此外,云实感冒合剂治疗感冒的核心靶蛋白还包括 JUN、MAPK8、CXCL8、IL-1 α 、NOS3、ESR1、MYC 等。这些结果表明云实感冒合剂发挥治疗作用可能是通过调节炎症反应、免疫及血管内渗透压等。

通路分析结果可以看出,云实感冒合剂治疗感冒的信号途径主要分布于免疫、细胞信号转导,及某些疾病信号途径中。PI3K/AKT 信号通路在所有通路中排在第二位,它是调控细胞生长,迁移,增殖和代谢的重要途径。研究发现在急性和持续性感染期间,PI3K/Akt 信号通路是病毒用来减缓细胞凋亡和延长病毒复制的途径之一^[9]。病毒进入机体可引起 PI3K/Akt 信号通路的激活,而此通路激活后可抑制下游细胞凋亡相关蛋白 caspase 9 和糖原合成酶激酶(GSK)-3 β 的磷酸化,避免病毒引起的细胞快速凋亡^[10,11]。另外,有报道称,PI3K/Akt 途径通过 ASK1 负调控 JNK 途径,从而抑制了甲型流感病毒感染过程中依赖 JNK 的 Bax 介导的细胞凋亡,有利于病毒在细胞内大量复制^[12]。那么,云实感冒合剂是否能通过抑制该途径,减少病毒复制,达到抗病毒的作用,还有待进一步的研究。

综上所述,本文利用网络药理学方法初步探讨了云实感冒合剂发挥治疗感冒的可能物质基础和作用机制,其可能涉及的方面包括抗炎、抗病毒、维持血管内渗透压等,以上结果也为后续进一步研究其确切的治疗机制提供了研究方向。

参考文献

1 Zhang MX, Zhang Y. Observation on the curative effect of

- Yunshi Ganmao Mixture in the treatment of wind cold and wind heat cold[J]. *Int Clin Med*(世界临床医学),2017,11(7):159.
- 2 Heikkinen T, Järvinen A. The common cold [J]. *Lancet*, 2003,361(9351):51-59.
- 3 Maalik A, Khan FA, Mumtaz A, et al. Pharmacological applications of quercetin and its derivatives; a short review [J]. *Trop J Pharm Res*,2014,13:1561-1566.
- 4 Sun Z, Li Q, Hou R, et al. Kaempferol-3-O-glucorhamnoside inhibits inflammatory responses via MAPK and NF- κ B pathways *in vitro* and *in vivo*[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2019,364:22-28.
- 5 Zhao CQ, Guo ZY. Research progress on pharmacological action of luteolin [J]. *J Chengde Med Coll*(承德医学院学报),2015,32:148-150.
- 6 Luthra P, Sun D, Wolfgang M, et al. AKT1-dependent activation of NF- κ B by the L protein of parainfluenza virus 5 [J]. *J Virol*,2008,82:10887-10895.
- 7 Deng Y, Li Q, Li M, et al. Network pharmacology identifies the mechanisms of Sang-Xing-Zhi-Ke-Fang against pharyngitis [J]. *Evid-based Compl Alt*,2020,2020(9):1-12.
- 8 Happonen L, Hauri S, Svensson Birkedal G, et al. A quantitative *Streptococcus pyogenes*-human protein-protein interaction map reveals localization of opsonizing antibodies [J]. *Nat Commun*,2019,10(1):2727.
- 9 Ji WT, Liu HJ. PI3K-Akt signaling and viral infection [J]. *Recent Pat Biotechnol*,2008,2:218-226.
- 10 Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, et al. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses [J]. *J Virol*,2007,81:3058-3067.
- 11 Shin YK, Li Y, Liu Q, et al. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation [J]. *J Virol*,2007,81:12730-12739.
- 12 Lu X, Masic A, Li Y, et al. The PI3K/Akt pathway inhibits influenza A virus-induced Bax-mediated apoptosis by negatively regulating the JNK pathway via ASK1 [J]. *J Gen Virol*,2010,91:1439-1449.