

基于网络药理学的黄酮类化合物抗流感病毒作用机制研究

葛加欣, 周学*, 张五千, 夏文静

南京师范大学泰州学院, 江苏 泰州

收稿日期: 2022年11月1日; 录用日期: 2023年1月3日; 发布日期: 2023年1月10日

摘要

通过利用网络药理学的方法寻找黄酮类化合物与人类流感病毒结合能力较好的活性成分, 研究其预防治疗流感病毒的可能性。利用TCMSP和GeneCards、TTD等数据库获取黄酮类化合物抗流感病毒的靶点, 利用在线分析平台STRING对靶蛋白之间相互作用进行研究, 采用Cytoscape软件绘制靶点-靶点网络图, 然后使用DAVID平台GO和KEGG程序对核心靶点的功能和参与调控通路进行分析, 并绘制靶点-通路网络节点图, 最后使用Autodock软件将可能有效的化合物与流感病毒相关分子进行分子对接, 计算它们的结合能并判断是否有效结合。最终获得橘皮苷靶点6个, 黄芩素靶点37个, 二氢杨梅素靶点7个, 流感靶点10,448个, 新冠肺炎靶点7566个, 在橘皮苷-流感中, 发现CASP3靶点通过“AGE-RAGE”信号通路来作用于人体; 在黄芩素-流感中, 发现AKT1靶点通过信号通路中节点度值最高的“癌症的途径”信号通路作用于人体; 在二氢杨梅素-流感中, 发现VEGFA靶点通过“卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染”信号通路作用于人体。本研究初步发现了黄芩素在三个药物中与流感的RIG-I和新冠肺炎的ACE2分子具有最好的结合效能, 最有预防治疗疾病的可能性。

关键词

网络药理学, 黄酮类化合物, 流感病毒, 分子对接

Study on the Mechanism of Flavonoid Anti-Influenza Virus Action Based on Network Pharmacology

Jiaxin Ge, Xue Zhou*, Yuqian Zhang, Wenjing Xia

Nanjing Normal University Taizhou College, Taizhou Jiangsu

Received: Nov. 1st, 2022; accepted: Jan. 3rd, 2023; published: Jan. 10th, 2023

*通讯作者。

文章引用: 葛加欣, 周学, 张五千, 夏文静. 基于网络药理学的黄酮类化合物抗流感病毒作用机制研究[J]. 生物医学, 2023, 13(1): 1-10. DOI: 10.12677/hjbm.2023.131001

Abstract

To explore the possibility of preventing and treating influenza viruses by using network pharmacological methods to search for active components of flavonoid that can bind well with human influenza viruses. The databases such as TCMSP, GeneCards and TTD were used to identify flavonoid targets. The on-line analysis platform STRING was used to study the interaction between target proteins, and the Cytoscape software was used to draw the target-target network. Then, the function and participating regulatory pathways of the core targets were analyzed by using DAVID Platform GO and KEGG program, and the node diagram of the target-pathway network was drawn. Finally, the possible effective compounds were docked with influenza virus-related molecules by Autodock software, and the binding energy was calculated to judge whether the effective binding was or not. Finally, 6 Hesperidin targets, 37 Baicalein targets, 7 Dihydromyricetin targets, 10,448 influenza targets and 7566 COVID-19 targets were obtained. In hesperidin-influenza, CASP3 targets are most likely to act through the "AGE-RAGE" signaling pathway. In baicalein-influenza, the "cancer pathway" signaling pathway has the highest degree of node degree in the signaling pathway. In dihydromyricetin-influenza, the VEGFA target was most likely to act through the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection signaling pathway. In this study, Baicalein was found to have the best binding activity with RIG-I of influenza and ACE2 of COVID-19 among the three drugs, and had the best possibility to prevent and treat the disease.

Keywords

Network Pharmacology, Flavonoid, Flu Viruses, Molecular Docking

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

甲型 H1N1 流感是一种由新型猪流感病毒引起的传染性疾病，为人类流感主要的变异体，易发生变异，病死率高[1]。研究发现，流感病毒对乙醇、碘伏、碘酊敏感，对热敏感，56℃ 30 min 可灭活[2]。对流感病毒预防机制研究发现，黄连、黄芩、金银花等中草药含有的黄酮类化合物，能对流感病毒唾液酸酶活性及膜融合具有抑制作用，还能直接消灭流感病毒及抑制病毒生长[3]。黄芩素能降低甲型流感病毒 H5N1 滴度，减少病毒 RNP 复合物的核输出，增强神经氨酸酶抑制剂扎那米韦的作用[1]。类黄酮化合物对于预防和治疗糖尿病的保健素材也有广阔的应用前景[4]。藤茶含有众多的黄酮类物质[5]，包括二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷、二氢槲皮素和槲皮素等，二氢杨梅素通过与 H1N1 病毒粒子结合抑制 H1N1 感染，阻止 H1N1 病毒粒子识别和进入宿主细胞[1]，二氢杨梅素是通过抑制病毒的前期复制而发挥抗病毒活性[6] [7]。网络药理学是运用多向药理学、系统生物学等多学科理论，采用高网络可视化、通量筛选等多种技术，揭示“药物-基因-靶点-疾病”之间复杂的网络关系，从多维度视角去理解疾病的分子基础，预测药物的药理学机制，并通过相应的实验来验证、评估药物的有效性、作用机制及不良反应，从而发现高效、低毒的药物[6]。目前，相关研究人员常从生物网络数据库、生物网络构建方法、网络可视化、网络分析技术等方面进行网络药理学研究。常用的生物网络数据库有通路信息数据库(KEGG, pharmGkb, Reactome)、结构信息数据库(RCSB PDB, Pub-chem)、药物靶点数据库(Drugbank, TTD)、蛋白质相互作用数据库(HPRD, MINT, BioGRID, DIP)、蛋白质序列和功能数据库(Uni-Prot)和基因信息数据库

(GO, OMIM, DAVID)等。构建分子生物网络主要通过对药物组、疾病组、分子相互作用进行分子网络构建,接着通过采用数学领域图论和复杂网络的研究方法,将生物体内的各种物质及其相互作用进行抽象描述。而网络可视化可以让数据变得更加直观,易于我们去理解所获的数据。确实,网络药理学技术已被作为一种科学解释中药有效性和科学性的新策略应用在中药研究中。尚志浩等人借助网络药理学手段,初步探究逍遥散在干预原发性肝癌(HCC)中多成分、多靶点、多途径的治疗机制,为后续从逍遥散中提取有效药物成分治疗 HCC 提供了依据[7]。通过网络药理学对复方银花解毒颗粒中含有的不同活性化合物进行研究,发现 ACE、VEGFA、NOS3、MPO、TNF 等关键作用靶点调控多条信号通路而发挥抗 COVID-19 的潜在作用[8],并在体外感染细胞模型中初步验证了复方银花解毒颗粒具有抗冠状病毒的作用,这为该药临床防治 COVID-19 提供了参考[9]。揭示金柴饮对新型冠状病毒肺炎多成分、多靶点、多通路的治疗特点,为阐释其内在机制提供科学依据[10]。穿心莲可通过多靶点、多通路发挥抗炎、调节免疫、抗细胞凋亡的作用,进而起到治疗新型冠状病毒肺炎的作用[11]。

2. 材料与方法

2.1. 获取靶点数据

2.1.1. 获取药物靶点

以“hesperidin”或“520-26-3”、“baicalein”或“491-67-8”、“dihydromyricetin”或“27200-12-0”为关键词,搜索中药系统药理学数据库与分析平台获取橘皮苷、黄芩素、二氢杨梅素的靶点。

2.1.2. 获取疾病靶点

以“influenza”、“COVID-19”为关键词搜索公共比较毒理基因组学数据库和人类基因数据库,获取两个数据库中流感病毒和新型冠状病毒目标靶点,并将两个数据库的检索结果整理分析,最终获得流感病毒和新型冠状病毒目标靶点,检索时间为2022年1月20号。

2.1.3. 获取药物和疾病的交叉靶点

通过 VENNY 图对上述药物和疾病靶点结果一一对应进行处理,即可获得药物和疾病交叉目标靶点。将一一对应的交叉目标靶点作为药物抗疾病的可能有效靶点。

2.2. 构建数据网络图

2.2.1. 构建“靶点-靶点”网络图

检索 STRING 在线分析平台,在“multiple proteins”功能区搜索获得的三份交叉目标靶点,种属选择为“Homo sapiens”。利用 Cytoscape3.7.1 软件对结果进行分析筛选,获取分子对接验证核心目标靶点,并构建橘皮苷、黄芩素、二氢杨梅素靶蛋白相互作用网络。

2.2.2. GO 和 KEGG 富集分析

使用 DAVID 数据库对交集靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 途径富集分析,并构建关键目标靶点 GO 函数富集分析图和 KEGG 路径富集分析图。

2.2.3. 构建“靶点-通路”网络图

整合获得的交集靶点和 KEGG 路径富集分析结果,利用 Cytoscape 软件对“靶点-通路”网络图进行绘制及拓扑分析。

2.3. 分子对接

2.3.1. 分子前期处理

在蛋白质数据库搜索 RIG-I、ACE2 的三维结构,在 TCMSP 数据库搜索橘皮苷、黄芩素、二氢杨梅

素的三维结构，并下载其三维结构；接着利用 Pymol2.3.2 软件对大分子结构进行去水去配体操作，保存文件，然后将处理好的大分子结构和小分子结构导入到 Autodock4.2.6 软件进行氢化和其他预处理。

2.3.2. 分子对接

将处理好的大分子结构和小分子结构导入 Autodock 软件，设置对接范围，使其包裹住整个蛋白质；接下来对分子对接验证，设置大分子三维结构为受体，并设置小分子三维结构为配体，分析出结合活性。通过对接分数和结合能可以显示药物相对的评级，以验证药物是否可以治疗疾病。

2.3.3. 结果可视化

利用 Pymol 软件对已获取的分子对接结果进行可视化处理，得出结合位点和氢键长度，并将结果输出。

3. 结果与分析

3.1. 原始靶点数据获取

3.1.1. 药物预测靶点和疾病相关靶点

通过搜索 TCMSp 数据库，检索橘皮苷(OB(%) = 13.33, DL = 0.67), 共获得 6 个靶点;检索黄芩素(OB(%) = 33.52, DL = 0.21), 共获得 37 个靶点;检索二氢杨梅素(OB(%) = 23.48, DL = 0.31), 共获得 7 个靶点。通过 GeneCards 数据库检索到流感病毒靶点 2633 个，通过 CTD 数据库检索到流感病毒靶点 9464 个，去除冗余后共获得流感病毒靶点 10,448 个；同样以此方法，获得新冠病毒靶点共计 11,576 个。

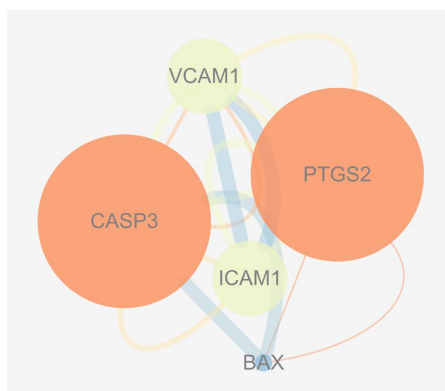
3.1.2. 疾病和药物交叉目标靶点获取

通过 Venny 软件分别对靶点数据进行整合处理，获得六份交叉目标靶点。发现橘皮苷和流感病毒的共同靶点有 5 个、橘皮苷和新冠病毒的共同靶点有 6 个、黄芩素和流感病毒的共同靶点有 34 个、黄芩素和新冠病毒的共同靶点有 34 个、二氢杨梅素和流感病毒的共同靶点有 7 个、二氢杨梅素和新冠病毒的共同靶点有 7 个。这些交叉目标靶点是药物用于抗疾病的潜在靶点。

3.2. 数据网络图

3.2.1. 构建“靶点-靶点”网络图(PPI图)

将六组交叉目标靶点信息导入 STRING 数据库进行分析，得到 PPI 网络图。再将分析结果导入到 Cytoscape 软件构建药物靶蛋白相互作用网络，如图 1~6 所示。筛选其中核心目标靶点，作为分子对接验证核心目标并计算每个节点的度值。



注：节点大小代表度值高低(下同)。

Figure 1. Hesperidin-influenza core target interaction network diagram

图 1. 橘皮苷 - 流感核心目标交互网络图

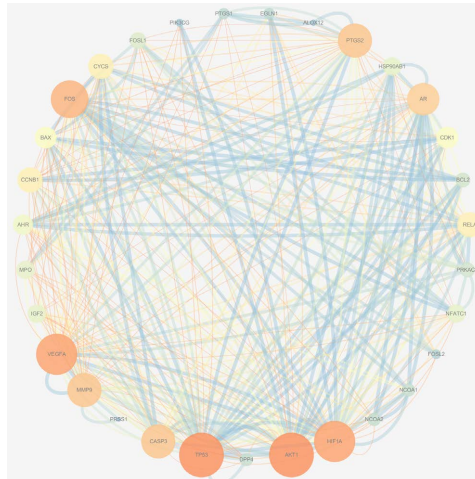


Figure 2. Baicalein-influenza core target interaction network diagram
图 2. 黄芩素 - 流感核心目标交互网络图

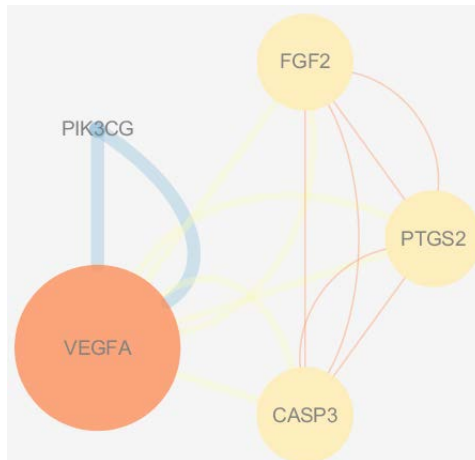


Figure 3. Dihydromyricetin-influenza core target interaction network diagram
图 3. 二氢杨梅素 - 流感核心目标交互网络图

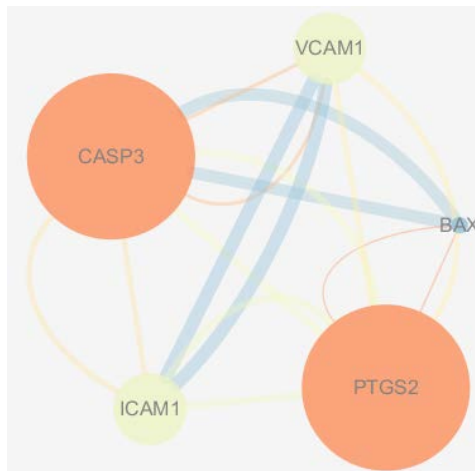


Figure 4. Hesperidin-COVID-19 core target interaction network diagram
图 4. 橘皮苷 - 新冠核心目标交互网络图

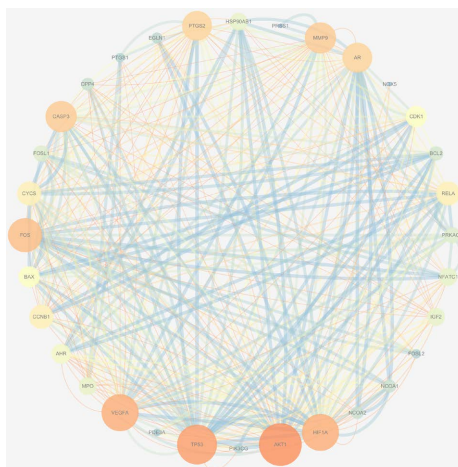


Figure 5. Baicalein-COVID-19 core target interaction network diagram
图 5. 黄芩素 - 新冠核心目标交互网络图

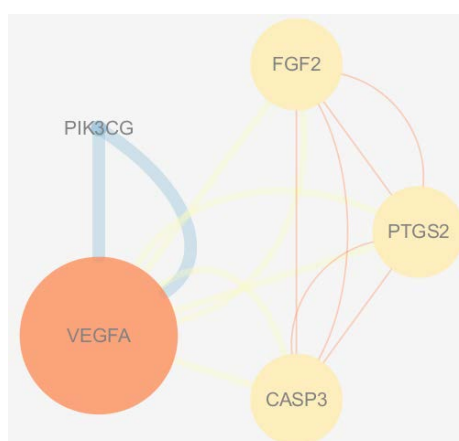


Figure 6. Dihydromyricetin-COVID-19 core target interaction network diagram
图 6. 二氢杨梅素 - 新冠核心目标交互网络图

3.2.2. GO 和 KEGG 富集分析

在 $p < 0.05$ 条件下, 橘皮苷 - 流感 GO 富集分析结果共有 33 个, 在 KEGG 途径富集分析中, 共富集了 20 条途径。黄芩素 - 流感 GO 富集分析结果共有 192 个, 在 KEGG 途径富集分析中, 共富集了 92 条途径。二氢杨梅素 - 流感 GO 富集分析结果共有 34 个, 在 KEGG 途径富集分析中, 共富集了 9 条途径。橘皮苷 - 新冠 GO 富集分析结果共有 34 个, 在 KEGG 途径富集分析中, 共富集了 20 条途径。黄芩素 - 新冠 GO 富集分析结果共有 193 个, 在 KEGG 途径富集分析中, 共富集了 92 条途径。二氢杨梅素 - 新冠 GO 富集分析结果共有 34 个, 在 KEGG 途径富集分析中, 共涉及 17 条途径。

3.2.3. 构建“靶点 - 通路”网络图

整合获得的交集靶点和 KEGG 路径富集分析结果, 将其处理为特定的网络文件和属性文件, 再利用 Cytoscape 软件对“靶点 - 通路”网络图进行绘制及拓扑分析。

3.3. 分子对接

3.3.1. 分子前期处理

在 PDB 数据库搜索 RIG-I、ACE2 的三维结构, 在 TCMSP 数据库搜索橘皮苷、黄芩素、二氢杨梅素

的三维结构,并下载其三维结构。接着在 Pymol 软件对大分子结构进行去水去配体操作,最后到 Autodock 软件进行氢化和其他预处理。

3.3.2. 分子对接

将处理好的大分子结构和小分子结构导入 Autodock 软件,设置对接范围,将大分子三维结构设置为受体,小分子三维结构设置为配体,进行分子对接验证,得出目标的分子对接结果,从而分析出结合活性,其中对接效能越小,抗疾病能力越强。如表 1 所示。黄芩素在三个药物中与流感的 RIG-I 和新冠肺炎的 ACE2 分子具有最好的结合效能,最有预防治疗疾病的可能性。

Table 1. Results of target molecular docking

表 1. 目标的分子对接结果

药物	疾病	对接效能(kcal/mol)
橘皮苷	流感	1.41
橘皮苷	新冠肺炎	0.32
黄芩素	流感	-0.69
黄芩素	新冠肺炎	-2.19
二氢杨梅素	流感	-1.25
二氢杨梅素	新冠肺炎	-3.03

3.3.3. 结果可视化

将已获取的分子对接结果导入 Pymol 软件进行可视化处理,得出橘皮苷与 RIG-I 分子结合位点是 HIS-830 氨基酸残基分子,氢键长度为 2.1,结果显示如图 7 所示;橘皮苷与 AEC2 分子结合位点是 UNK-950,氢键长度为 2.3,结果显示如图 8 所示。黄芩素与 RIG-I 分子无结合位点(如图 9 所示);黄芩素与 AEC2 分子结合位点有两个,分别是 ILE-256 和 SER-254, ILE-256 氨基酸残基分子所连氢键有两条,长度分别为 2.3 和 2.6, SER-254 氨基酸残基分子所连氢键长度为 2.4,并将结果输出(如图 10 所示)。二氢杨梅素与 RIG-I 分子结合位点有两个,分别是 SER-855 和 HIS-830,其氢键长度分别为 2.8 和 1.9,并将结果输出,如图 11 所示;二氢杨梅素与 AEC2 分子结合位点也有两个,分别是 LEU-156 和 TYR-158, LEU-156 氨基酸残基分子所连氢键有两条,长度分别为 2.0 和 2.1, TYR-158 氨基酸残基分子所连氢键长度为 2.3,并将结果输出(如图 12 所示)。

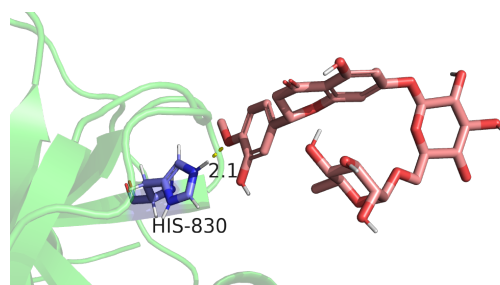


Figure 7. Docking diagram of hesperidin and HIS-830 amino acid residues

图 7. 橘皮苷与 HIS-830 氨基酸残基分子对接图

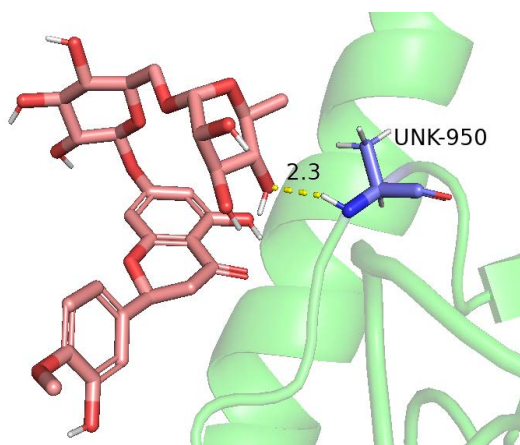


Figure 8. Docking diagram of hesperidin and UNK-950 amino acid residues

图 8. 橘皮苷与 UNK-950 氨基酸残基分子对接图

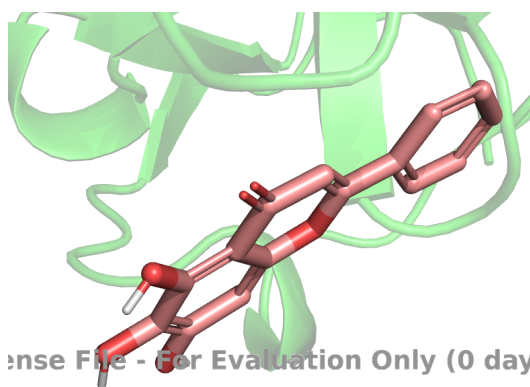


Figure 9. Molecular docking diagram of baicalein

图 9. 黄芩素分子对接图

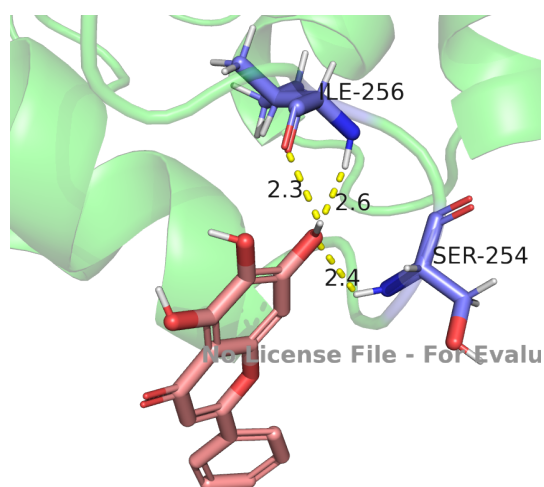


Figure 10. Molecular docking diagram of baicalein with ILE-256 and SER-254 amino acid residues

图 10. 黄芩素与 ILE-256、SER-254 氨基酸残基分子对接图

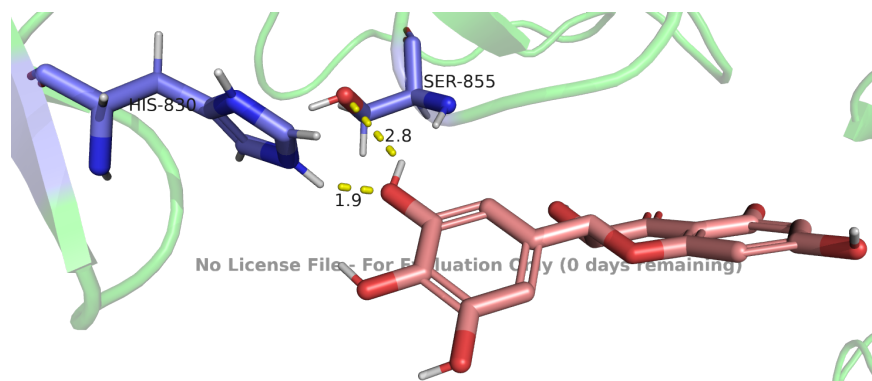


Figure 11. Molecular docking diagram of dihydromyricetin with HIS-830 and SER-855 amino acid residues

图 11. 二氢杨梅素与 HIS-830、SER-855 氨基酸残基分子对接图

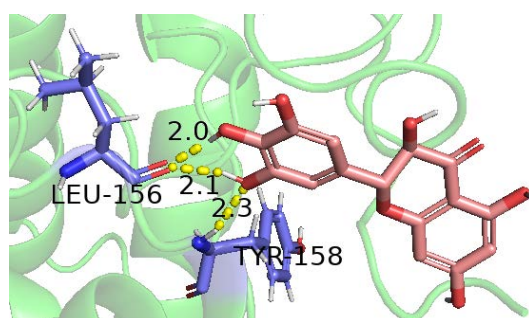


Figure 12. Molecular docking diagram of dihydromyricetin with LEU-156 and TYR-158 amino acid residues

图 12. 二氢杨梅素与 LEU-156、TYR-158 氨基酸残基分子对接图

4. 讨论

橘皮苷对流感共有 5 个靶点，共 56 条通路。其中，CASP3 靶点的节点度值最高，VCAM1 靶点的节点度值最低，这表明橘皮苷在预防和治疗流感时，更容易通过 CASP3 靶点作用于人体。其中，Caspase-3 (CASP3)，又称胱天蛋白酶 3，是一种蛋白酶，能够导致 DNA 裂解促进细胞凋亡，是细胞凋亡途径中最为关键的酶类之一，与癌症的发生、衰老、心血管疾病的发生等有着重要联系。橘皮苷对新冠肺炎共有 6 个靶点，共 56 条通路，其靶点中节点度值最高的也是 CASP3 靶点，信号通路中节点度值最高的是“AGE-RAGE”信号通路。黄芩素对流感共有 30 个靶点，共 527 条，靶点中节点度值最高的是 AKT1 靶点，信号通路中节点度值最高的是“癌症的途径”信号通路。AKT1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，该蛋白参与增殖、胰岛素信号传导、血管生成等多种生物学过程，异常活化的 AKT 会导致肿瘤的发生[12]。黄芩素对新冠肺炎共 30 个靶点，共 528 条通路，靶点中节点度值最高的是 AKT1 靶点，信号通路中节点度值最高的是“癌症的途径”信号通路。二氢杨梅素对流感共有 5 个靶点，共 29 条通路，靶点中节点度值最高的是 VEGFA 靶点，信号通路中节点度值最高的是“卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染”信号通路。VEGFA 是在血管生成、肿瘤生长以及缺血性疾病中扮演着重要角色。二氢杨梅素对新冠肺炎共有 5 个靶点，共 29 条通路，靶点中节点度值最高的是 VEGFA 靶点，信号通路中节点度值最高的是“卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染”信号通路。

基于网络药理学的作用机制，进一步探讨黄酮类化合物抗流感病毒的研究，更加明确黄酮类化合物

对于抗流感病毒是多成分协同作用的，通过作用于不同器官的不同靶标，调节多种生物过程和功能，进而发挥出整体的治疗机制。希望在不久的将来，黄酮类化合物可以在抗流感病毒方面发挥出它最大的作用，加深人们对中药治疗流感病毒作用机制的理解，从而加速中药现代化和国际化的进程。中药在抗新型冠状病毒上发挥着重要的作用，运用网络药理学和分子对接技术，寻找黄酮类化合物与人类流感病毒结合能力较好的活性成分，研究其预防治疗流感的可能性，将为后续实验提供可能的理论依据，同时大大加快了药物筛选的过程。

基金项目

江苏省自然科学基金课题项目“CG18262通过转录调控 Imd 通路与 MAPK 通路交互参与先天免疫稳态维持的分子机制”(项目编号: BK20211128); 江苏省大学生创新创业训练计划“基于网络药理学的黄酮类化合物抗流感病毒作用机制研究”(项目编号: 202213843017Y)。

参考文献

- [1] 丰茂秀, 崔清华, 刘苗苗, 侯林, 田景振. 黄酮类化合物抗甲型流感病毒活性研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021(3): 151-155.
- [2] 韩一芳, 张宏伟, 曹广文. 2009 年新型甲型 H1N1 流感流行特征及防控措施[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(6): 610-612.
- [3] 严敏, 唐筱露. 黄酮类化合物抗病毒作用研究概况[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(9): 149-151.
- [4] 梁海燕, 古德祥, 木苗直秀, 古郡三千代. 类黄酮化合物对糖基化反应终产物 AGE 的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(2): 14-18.
- [5] 黄权锋, 陈泽豪, 彭琳, 刘丹, 丁利君. 藤茶中黄酮类物质抗流感病毒作用机制的分子对接研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(9): 2053-2055.
- [6] 邢心睿, 吕狄亚, 柴逸峰, 朱臻宇. 网络药理学在中药作用机制中的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2018, 36(2): 97-102.
- [7] 商志浩, 潘成镇, 马月辉, 谢卓容, 韦紫怡, 罗伟生, 彭岳, 岑妍慧. 基于网络药理学联合分子对接对逍遥散干预原发性肝癌的作用机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(8): 1302-1315.
- [8] 石依姗, 方建国, 施春阳, 王景. 二氢杨梅素抗菌、抗病毒作用的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(2): 408-413.
- [9] 张冬玲, 何枢衡, 吴建雄, 刘存, 张雨茜, 刘光大, 张评沛. 基于网络药理学研究复方银花解毒颗粒抗新型冠状病毒的潜在机制[J]. 西北药学杂志, 2021(4): 568-575.
- [10] 刘莹, 申力, 王兆博, 曹洪欣. 基于网络药理学探讨金柴饮治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制[J]. 现代中药研究与实践, 2021(4): 66-70.
- [11] 李国芸, 钱旭东, 王硕, 吴美美, 庞桂芬. 基于网络药理学探讨穿心莲治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制[J]. 承德医学院学报, 2021(4): 274-281.
- [12] Yu, X., Xu, J., Cahuzac, K.M., Xie, L., Shen, Y., Chen, X., Liu, J., Parsons, R.E. and Jin, J. (2022) Novel Allosteric Inhibitor-Derived AKT Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) Enable Potent and Selective AKT Degradation in KRAS/BRAF Mutant Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, **65**, 14237-14260. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01454>