

[Article]

doi: 10.3866/PKU.WHXB201304171

www.whxb.pku.edu.cn

利用网络药理学方法研究热毒宁注射液抗流感病毒的分子作用机制

张新庄¹ 萧伟^{2,*} 徐筱杰^{3,*} 王振中² 曹亮² 孙兰²⁽¹⁾南京中医药大学药学院, 南京 210046; ⁽²⁾康缘药业中药制药新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222002;⁽³⁾北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要: 采用分子对接、网络分析预测热毒宁注射液抗流感病毒的分子作用机制, 并通过已建立的体外流感病毒神经氨酸酶筛选模型对网络预测结果验证。结果表明, 热毒宁注射液所含化合物在化学空间上具有类药性质; 网络分析揭示出热毒宁注射液是通过与流感病毒吸附、脱壳、复制以及释放等环节的多个蛋白相互作用发挥抗流感病毒作用的; 对于预测的 15 个活性分子而言, 实验结果初步证实, 对 A 型流感病毒, 木犀草素呈现较强的抑制作用, 槲皮素则呈现较弱的抑制作用, 这也初步证实了预测结果。

关键词: 网络药理学; 热毒宁; 流感病毒; 中药; 神经氨酸酶

中图分类号: O641

Study on Mechanism of the Reduning Injection on the Influenza Virus Using Network Pharmacology Method

ZHANG Xin-Zhuang¹ XIAO Wei^{2,*} XU Xiao-Jie^{3,*} WANG Zhen-Zhong²
CAO Liang² SUN Lan²

⁽¹⁾College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, P. R. China; ⁽²⁾National Key Laboratory of Pharmaceutical New Technology for Chinese Medicine, Kanion Pharmaceutical Corporation, Lianyungang 222002, Jiangsu Province, P. R. China; ⁽³⁾College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, P. R. China)

Abstract: The mechanisms of the Reduning injection on the influenza virus were studied by computer methods at the molecular level, including docking and network analysis. A neuraminidase (NA) activity assay was used to verify the predicted results *in vitro*. Results show that most of the compounds in the Reduning injection exhibit good drug-like properties. The mechanism of the Reduning injection may be that it affects viral entry, RNA synthesis, or viral release, which limits influenza virus replication. Potential active molecules of the Reduning injection were found by analyzing the network parameters of compound-target interaction networks. The experimental results suggest that of the potential active molecules, luteolin displayed significant inhibitory activity toward the influenza A virus, while quercetin proved less effective, which supports the predicted results.

Key Words: Network pharmacology; Reduning; Influenza virus; Traditional Chinese medicine; Neuraminidase

1 引言

流感是常见的急性呼吸道感染疾病, 其主要病原体为流感病毒, 属于正粘病毒科的含包膜的 RNA

病毒。由于其基因的高突变性以及人体对新病毒株缺乏免疫性, 每年爆发的流感病毒会造成平均 2–4 万人死亡, 并给社会带来严重的经济负担。^{1,2} 虽然现

Received: February 22, 2013; Revised: April 17, 2013; Published on Web: April 17, 2013.

*Corresponding authors. XIAO Wei, Email: xw_kanion@163.com; Tel: +86-518-85521956. XU Xiao-Jie, Email: xiaojxu@pku.edu.cn; Tel: +86-10-62757456.

The project was supported by the “Innovative Drug Development” Key Project of the Ministry of Science and Technology of China (2011ZX09304). 国家科技部“重大新药创制”项目(2011ZX09304)资助

© Editorial office of *Acta Physico-Chimica Sinica*

有的药物有生物疫苗、神经氨酸酶抑制剂(oseltamivir 和 zanamivir)、M2 离子通道抑制剂(金刚烷胺类)等可以预防和治疗流感病毒感染,^{3,4} 但由于流感病毒高抗原漂移性, 这些针对单靶点的抗流感药物都面临着耐药性和滞后性的问题。

中药, 作为治疗流感症状(咳嗽、咽喉痛、头痛、流鼻涕、发烧等)的另一种治疗手段已受到研究者的广泛关注,⁵ 其中江苏康缘药业于 2005 年研发的用于治疗上呼吸道感染的热毒宁注射液呈现出良好的市场前景。前期的化学成分和药理作用研究表明, 主要含有环烯醚萜类、黄酮类和有机酚酸类, 对流感病毒呈现一定抑制作用,⁶ 但其多成分、多靶点以及多途径的作用机制使得其抗流感病毒作用机制研究面临一定的挑战。

最近几年, 作为基于生物信息学和系统生物学的方法, 网络药理学被应用到生命科学的多个领域, 如新药靶的识别、先导化合物的发现、作用机制的研究、药物临床前疗效和安全性评估等,⁷⁻¹¹ 其中以分子对接、药-靶网构建以及网络特征分析为基础的多靶点整体调控的思维方法正逐渐被用于预测中药主要活性成分群和潜在靶标群, 阐述中药作用机制。^{8,12-16} 这种基于系统思维的研究方法更符合中医药的思维模式: 调控失衡的生物系统(疾病)恢复到固有平衡。因此, 本文尝试用网络药理学方法对热毒宁注射液抗流感病毒的分子作用机制进行研究, 进而为后续的临床使用提供理论支撑。

2 实验方法

2.1 分子数据集的收集和处理

从 SciFinder 数据库收集热毒宁注射液中 78 个小分子化合物(见 Supporting Information)的分子结构,

导入 Cerius 2(4.10 版)软件加氢后, 选用 CHARMm 力场进行构象优化, 优化时能量阈值设定为 $1 \times 10^{-3} \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$, 然后再将优化后的分子结构导入 Discovery Studio(2.5 版)中的 general purpose 模块来计算相关描述符。此外, 根据流感病毒在宿主体内的复制过程以及药物治疗方法, 选择了 11 个比较重要的靶蛋白(表 1), 并按照分辨率不高于 0.25 nm 原则从 RCSB 的 PDB 库¹⁷中下载含有原配体的靶蛋白非模建的晶体结构, 导入 Discovery studio 2.5 中的 Clean protein 和 Forcefield 中的 CHARMm 力场进一步对这些靶蛋白进行修饰、加氢以及自动分配原子类型和部分电荷, 并根据靶蛋白复合物中配体的中心点坐标确定结合的活性位点。

2.2 分子对接与打分

将处理过的靶蛋白和化合物分别导入 Auto Dock4.0 进行半柔性对接计算。对接时, 对于每个化合物采用拉马克遗传算法(LGA)进行构象采样, 具体参数设置如下: 以蛋白-配体复合物中配体分子的坐标为盒子中心, 格点数为 $4 \text{ nm} \times 4 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$, 格点间隔为 0.0375 nm, 初始种群数为 150, 随机选取起始构象和取向, 平移步长为 0.2 nm, 旋转步长为 50° , 突变率为 0.02, 交叉率为 0.8, 局部搜索频率为 0.06, 其余均为默认设置。

2.3 分子靶蛋白作用网络的构建

根据分子对接计算结果, 以靶蛋白复合物中的原配体对接分数为阈值, 打分高于此阈值的小分子即认为具有活性, 再从中抽取较高得分(score ≥ 5)的分子与靶蛋白导入 Cytoscape 2.8.1 网络分析软件,¹⁸ 构建热毒宁注射液分子与靶蛋白作用网络(见图 1), 其中分子、靶蛋白用节点(node)表示, 边(edge)表示分子与靶蛋白间的相互关系, 某个分子与某个靶蛋

表 1 与流感病毒复制相关的蛋白

Table 1 Proteins related to the replication of influenza

Protein	Full name	PDB code
HA	hemagglutinin	3EYM
NA (flu A)	influenza A virus neuraminidase	1XOE
NA (flu B)	influenza B virus neuraminidase	1NSD
PB ₂	polymerase basic protein 2	2VQZ
M ₂	influenza A virus M ₂ protein	2RLF
NP	nucleoprotein	3RO5
RdRp	RNA polymerase	3HW4
OMP decarboxylase	orotidine 5'-monophosphate decarboxylase	1EIX
IMP dehydrogenase 2	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	1NF7
IMP dehydrogenase 1	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1	1JCN
SAH	human S-adenosylhomocysteine hydrolase	1LI4

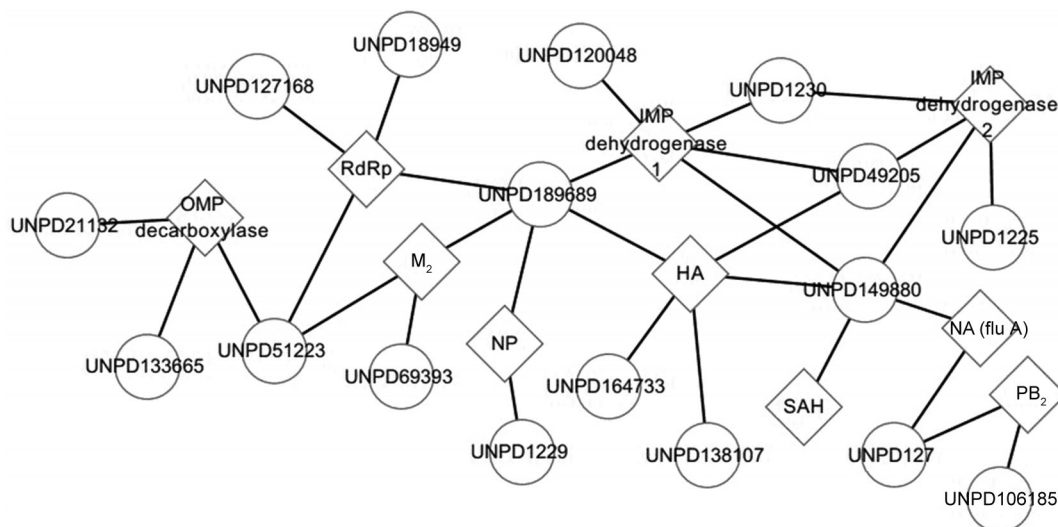


图1 热毒宁注射液所含化合物-靶蛋白(D-T)的作用网络

Fig.1 Compounds in Reduning injection-target protein (D-T) network

The circles represent the molecules of Reduning injection, and the diamonds represent target proteins related on the replication of influenza virus.

白存在相互作用, 则它们就会通过 edge 连接起来. 之后进一步通过 Cytoscape 软件中的 network analyzer 插件分析网络特征: 网络度(degree)、介数(betweenness)、网络密度(network density)、最短路径等, 预测热毒宁注射液可能的活性分子群、潜在靶蛋白等.

2.4 抗流感病毒活性的测定

化合物的细胞毒性测定: 取培养至 80%–90% 密度的 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 细胞, 0.25% 胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清(FBS)的 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 每孔接种 100 μL 细胞悬液于 96 孔板上, CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 弃上清, 加 150 μL 不同浓度的含药细胞维持液(药物从 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 起连续 5 倍梯度稀释 6 个梯度), CO_2 培养箱中培养 72 h, 倒置显微镜下观察药细胞病变效应(CPE), 再每孔加入 25 μL alamarBlue[®] 液(Invitrogen), 继续孵育 2 h, 用 M2e 酶标仪于激发光 570 nm, 发射光 595 nm 处荧光检测 alamarBlue[®] 的还原情况, 并以 $F(\text{样品组})/F(\text{正常对照组})$ 的比值作为细胞存活率(F 为荧光强度), 计算药物对细胞的半数毒性浓度(CC_{50}).

抗流感病毒活性测定:¹⁹ 取培养至 80%–90% 密度的 MDCK 细胞, 0.25% 胰酶消化, 再用含 10% FBS 的 DMEM 调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 接种于 96 孔板中, 每孔接种 100 μL 细胞悬液, CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 弃上清, 加入流感病毒(A/PR/8/34 H1N1) 液, CO_2 细胞培养箱中孵育 1 h 后, 弃上清, PBS 洗涤

后, 加入 150 μL 不同浓度的含药细胞维持液(药物从 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 起连续 5 倍稀释 6 个梯度), 继续培养 48 h 后, 倒置显微镜下观察细胞病变效应(CPE). 然后取上清 40 μL 加入到含 20 μL 底物(60 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ MUNANA)MES 溶液的 96 孔黑色微量板中, CO_2 细胞培养箱孵育 60 min, 再加入 100 μL 终止液(0.014 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ KOH 的 83% 乙醇溶液), 在激发波长为 355 nm, 发射波长 485 nm 处测定各孔的荧光强度. 设正常对照孔, 病毒感染对照孔(酶活对照孔). 计算不同浓度的化合物对流感病毒的抑制率. 阳性对照药为利巴韦林.

$$\text{Inhibition rate} = \left(1 - \frac{F_{\text{sample}} - F_{\text{blank}}}{F_{\text{enzyme}} - F_{\text{blank}}} \right) \times 100\%$$

采用 Origin 8.0 软件分别预测药物的 CC_{50} 和对病毒的半数抑制量(EC_{50}), 并进一步计算出化合物的选择指数(SI). (此部分的验证实验是委托中国科学院武汉病毒所完成测试, 进一步的重复验证实验仍在开展过程中.)

3 结果与讨论

3.1 化学成分分子描述符的分析

从表 2 中各分子描述符的平均值及其中位数可以看出, 热毒宁注射液中大部分分子都没有违反 Lipinski 的“rule of 5”规则,²⁰ 表明其具有较好的类药性; 而从分子极性表面积(PSA)(平均值为 1.3202 ($\leq 1.4 \text{ nm}^2$))和可旋转键数(rotatable bonds)(平均值为 4.68 (≤ 7), 中位数为 5)来看, 热毒宁注射液中的分子

表2 热毒宁注射液中78个分子的主要分子描述符
Table 2 Key molecular descriptors of 78 compounds in Reduning injection

Descriptor	Mean	Min	Max	Median
MW	343.08	138.12	696.65	354.31
Num. of H-bond acceptors	8.03	1	17	9
Num. of H-bond donors	4.30	0	10	5
V _m	216.44	81.29	436.63	223.63
Num. of rotatable bonds	4.68	0	16	5
PSA	132.02	9.23	265.52	149.64
AlogP	0.21	-3.81	3.05	-0.10
Num_Rings	2.42	0	5	2
Rule of 5 violations	1.15	0	3	1

大多都具有较好的生物利用度($\geq 20\%$).²¹

3.2 分子-靶蛋白网络特征分析

网络分析既可以提供生物网络的一般特征, 同时也能计算具体节点的拓扑学特征, 进而有助于从复杂关系中获得潜在的生物信息.²² 对分子-靶标网络的总体特征分析表明(见表3), 热毒宁注射液中既存在一个分子与多个靶蛋白存在较强相互作用, 同时也存在不同分子作用同一个靶蛋白的现象, 显示

了热毒宁注射液的多活性化合物多靶点作用特点, 也正符合了中药作用的特点.

节点的网络度(degree)和介数(betweenness)常用于网络特征分析以评估生物网络中的药靶,^{23,24} 故又对D-T网络中各分子与靶蛋白的作用情况做了进一步分析, 部分重要节点的网络特征值见表4. 从D-T网络各节点的介数、网络度来看, 热毒宁注射液抗流感病毒机制之一可能是其15个活性分子分别与流感病毒的吸附、脱壳、复制和释放等多个环节相互作用, 从而降低流感病毒载量. 而从化合物的网络特征分析来看, luteolin对HA、NA (flu A)、IMP dehydrogenase 1、IMP dehydrogenase 2、SAH蛋白有很强的相互作用, 而 artemisinin 与 HA、M₂、NP、RdRp、IMP dehydrogenase 1 蛋白存在较强的相互作用; 且它们也具有较高的介数, 所以推测其可能是热毒宁注射液抗流感病毒的活性成分. 此外, quercetin 虽有高的网络度, 但其介数比较低, 故其对流感病毒的抑制作用可能会较弱.

3.3 抗流感病毒测定结果

表3 D-T网络总体特征
Table 3 Topological features of the D-T network

Network	Average degree	Average shortest path	Network density	Network centralization	Network heterogeneity
D-T	3.714	3.234	0.045	0.275	1.017

表4 热毒宁注射液中D-T网络中部分节点的网络特征分析
Table 4 Network features of part nodes in the D-T network in Reduning injection

Node	Betweenness	Degree	Node	Betweenness	Degree
HA	0.316	5	luteolin	0.388	5
IMP dehydrogenase 1	0.310	5	artemisinin	0.580	5
IMP dehydrogenase 2	0.098	4	quercetin	0.053	3
RdRp	0.262	4	cynaroside	0.222	3
OMP decarboxylase	0.151	3			
M ₂	0.188	3			
NA (flu A)	0.212	2			
PB ₂	0.077	2			
NP	0.077	2			

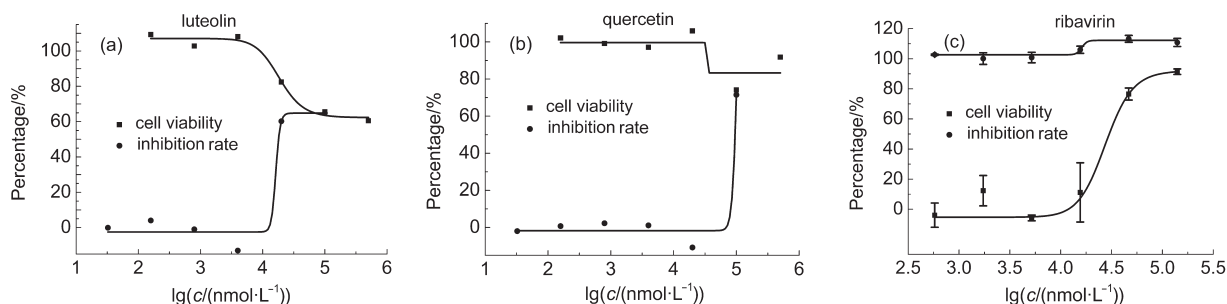


图2 热毒宁注射液中部分化合物体外抗流感病毒活性

Fig.2 *In vitro* anti-influenza viral activity of part of compounds in Reduning injection

生物网络分析表明, 多数情况下, 疾病的产生是由于多个蛋白的“扰动”而不是单个靶蛋白的“修饰”, 故对网络药理学预测结果的实验验证需要通过整体行为来进行评估。^{25,26} 在对预测出的15个活性分子的体外细胞实验结果表明高网络度和高介数木犀草素(luteolin)呈现较强的抑制A型流感病毒活性($CC_{50}=701.219 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, $EC_{50}=28.44 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, $SI=24.66$)、槲皮素(quercelein)(高网络度和低介数)呈现一定的抑制病毒活性($EC_{50}=91.284 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, $SI>5.48$)(见图2)。

4 结论

通过对分子-靶标的网络特征分析发现热毒宁注射液中的多数分子具有多靶点特性, 并根据靶蛋白的网络特征预测其抗流感病毒的分子作用机制为通过HA、NA、M₂、RdRp等蛋白, 从而影响病毒的吸附、脱壳、复制以及释放等。根据预测出的15个活性分子, 通过体外细胞实验对网络预测进行了验证, 结果表明, 对于A型流感病毒, 木犀草素呈现较强的抑制作用, 而预测结果表明木犀草素与HA、NA以及病毒复制时的酶都有较强的作用, 且在整个网络的信息流中处于重要的地位, 这也比较符合实验结果。

网络药理学研究方法作为中药研究的一种新思路, 虽存在不少有待解决的问题, 但其借助网络分析预测出中药基于信号通路模式的作用机制, 并通过对信号通路终端因子和关键靶蛋白实验验证来阐明中药作用机制,^{26,27} 从而来大大减少实验工作量, 同时也从新的层面为中药赋予新的科学内涵。

Supporting Information: The chemical information of chemical molecules in Reduning injection and the biological test results of some compounds have been included. This information is available free of charge via the internet at <http://www.whxb.pku.edu.cn>.

References

- (1) Fraser, C.; Donnelly, C. A.; Cauchemez, S.; Hanage, W. P.; Van Kerkhove, M. D.; Hollingsworth, T. D.; Griffin, J.; Baggaley, R. F.; Jenkins, H. E.; Lyons, E. J.; Jombart, T.; Hinsley, W. R.; Grassly, N. C.; Balloux, F.; Ghani, A. C.; Ferguson, N. M.; Rambaut, A.; Pybus, O. G.; Lopez-Gatell, H.; Alpuche-Aranda, C. M.; Chapela, I. B.; Zavala, E. P.; Guevara, D. M.; Checchi, F.; Garcia, E.; Hugonnet, S.; Roth, C. *Science* **2009**, *324* (5934), 1557. doi: 10.1126/science.1176062
- (2) Palese, P. *Nat. Med.* **2004**, *10* (Suppl. 12), S82.
- (3) Subbarao, K.; Joseph, T. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7* (4), 267. doi: 10.1038/nri2054
- (4) Kim, A.; Lee, J. Y.; Byun, S. J.; Kwon, M. H.; Kim, Y. S. *Antiviral Res.* **2012**, *94* (2), 157. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.03.007
- (5) Tian, L.; Wang, Z.; Wu, H.; Wang, S.; Wang, Y.; Wang, Y.; Xu, J.; Wang, L.; Qi, F.; Fang, M.; Yu, D.; Fang, X. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137* (1), 534. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.002
- (6) Zu, M.; Zhou, D.; Gao, L.; Liu, A. L.; Du, G. H. *Acta Pharmaceutica Sinica* **2010**, *45* (3), 408.
- (7) Fang, Y. J. *Pharmacol. Toxicol. Methods* **2013**, *67* (2), 69. doi: 10.1016/j.vascn.2013.01.004
- (8) Wang, X.; Xu, X.; Tao, W.; Li, Y.; Wang, Y.; Yang, L. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, *2012*, 15.
- (9) Campillos, M.; Kuhn, M.; Gavin, A. C.; Jensen, L. J.; Bork, P. *Science* **2008**, *321* (5886), 263. doi: 10.1126/science.1158140
- (10) Daminelli, S.; Haupt, V. J.; Reimann, M.; Schroeder, M. *Integrative Biology* **2012**, *4* (7), 778. doi: 10.1039/c2ib00154c
- (11) Mestres, J.; Gregori-Puigjane, E.; Valverde, S.; Sole, R. V. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5* (9), 1051. doi: 10.1039/b905821b
- (12) Barlow, D. J.; Buriani, A.; Ehrman, T.; Bosisio, E.; Eberini, I.; Hylands, P. J. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *140* (3), 526. doi: 10.1016/j.jep.2012.01.041
- (13) Wu, D. H.; Xu, X. J. *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2010**, *25* (3), 446. [吴钉红, 徐筱杰. 物理化学学报, **2010**, *25* (3), 446.] doi: 10.3866/PKU.WHXB20100218
- (14) Gu, J. Y.; Yuan, G.; Zhu, Y. H.; Xu, X. J. *Sci. China Ser. B-Chem.* **2009**, *39* (11), 1415. [古江勇, 袁谷, 朱永宏, 徐筱杰. 中国科学B辑: 化学, **2009**, *39* (11), 1415.]
- (15) Gertsch, J. *Planta Med.* **2011**, *77* (11), 1086. doi: 10.1055/s-0030-1270904
- (16) Tao, W.; Xu, X.; Wang, X.; Li, B.; Wang, Y.; Li, Y.; Yang, L. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *145* (1), 1.
- (17) Deshpande, N.; Address, K. J.; Bluhm, W. F.; Merino-Ott, J. C.; Townsend-Merino, W.; Zhang, Q.; Knezevich, C.; Xie, L.; Chen, L.; Feng, Z.; Green, R. K.; Flippen-Anderson, J. L.; Westbrook, J.; Berman, H. M.; Bourne, P. E. *Nucleic. Acids Res.* **2005**, *33* (Database issue), D233.
- (18) Smoot, M. E.; Ono, K.; Ruscheinski, J.; Wang, P. L.; Ideker, T. *Bioinformatics* **2011**, *27* (3), 431. doi: 10.1093/bioinformatics/btq675
- (19) Liu, A. L.; Wang, H. D.; Lee, S. M.; Wang, Y. T.; Du, G. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (15), 7141. doi: 10.1016/j.bmc.2008.06.049
- (20) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46* (1-3), 3. doi: 10.1016/S0169-409X(00)00129-0
- (21) Meanwell, N. A. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24* (9), 1420.

- doi: 10.1021/tx200211v
- (22) Berger, S. I.; Iyengar, R. *Bioinformatics* **2009**, *25* (19), 2466. doi: 10.1093/bioinformatics/btp465
- (23) Hwang, W. C.; Zhang, A.; Ramanathan, M. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *84* (5), 563. doi: 10.1038/clpt.2008.129
- (24) Zhu, M.; Gao, L.; Li, X.; Liu, Z.; Xu, C.; Yan, Y.; Walker, E.; Jiang, W.; Su, B.; Chen, X.; Lin, H. *J. Drug Target.* **2009**, *17* (7), 524. doi: 10.1080/10611860903046610
- (25) Hopkins, A. L. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4* (11), 682. doi: 10.1038/nchembio.118
- (26) Pujol, A.; Mosca, R.; Farrés, J.; Aloy, P. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31* (3), 115. doi: 10.1016/j.tips.2009.11.006
- (27) Dai, W.; Chen, J. X.; Lu, P.; Gao, B. Y.; Chen, L.; Liu, X.; Song, L. J.; Xu, Y. H.; Chen, D.; Yang, P. Y.; Yang, J. H.; Huang, Q. L. *Molecular BioSystems* **2013**, *9* (3), 375. doi: 10.1039/c2mb25372k