

基于网络药理学和分子对接方法研究羚珠散抗小儿易感病毒的作用机制

陈怡¹, 熊建新¹, 夏扬², 张亚云², 翟云良², 包明月¹, 朱琳¹, 上官秋苓^{1*}

1. 南通大学附属常州儿童医院 呼吸科, 江苏 常州 213002

2. 雷允上药业集团有限公司, 江苏 苏州 215009

摘要: **目的** 运用网络药理学和分子对接技术研究羚珠散抗小儿易感病毒的有效成分和作用机制。**方法** 利用 TCMID 数据库查找羚珠散的化学成分, 利用 TCMSP、Pubchem、Swiss Target Prediction、SEA 和 STITCH 数据获得羚珠散活性化合物的作用靶点; 通过 GeneCards 数据库获得相关病毒性疾病靶点, 取交集后得到共有靶点, 即为羚珠散抗小儿易感病毒的潜在作用靶点。通过 STRING 数据库构建交集靶点的蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 基于 degree 值筛选重要靶点。利用 DAVID 平台对重要靶点进行基因本体论 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。使用 Cytoscape 软件进行化合物-靶点网络拓扑分析, 获得羚珠散抗小儿易感病毒的关键化合物和核心靶点。采用 AutoDock Vina 软件对筛选出的关键靶点和核心化合物进行分子对接验证。**结果** 共获得 91 个活性化合物以及 184 个药物-疾病交集靶点, 经筛选获得羚珠散抗小儿易感病毒 15 个核心化合物 (桉油烯醇、桉脂素、丁香烯、乙酸龙脑酯等) 以及 3 个核心靶点 [C 反应蛋白 (CRP)、趋化因子 2 (CCL2)、血红素加氧酶 1 (HMOX1)]。KEGG 通路富集分析结果显示, 羚珠散抗小儿易感病毒可能主要通过调控肿瘤坏死因子 (TNF)、Toll 样受体、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、叉头框蛋白 O (FoxO) 及 T 细胞受体等多种信号通路发挥治疗作用。分子对接结果表明, 羚珠散抗易感病毒中 10 个核心化合物和核心靶点均有良好的结合能力, 证明了网络药理学筛选结果的可靠性。**结论** 羚珠散可通过桉油烯醇、桉脂素、丁香烯、乙酸龙脑酯等主要活性成分, 结合 CRP、CCL2、HMOX1 等核心靶点来调控机体多种炎症反应、免疫反应相关信号通路, 从而发挥抗小儿易感病毒作用。

关键词: 羚珠散; 小儿易感病毒; 网络药理学; 分子对接; 桉油烯醇; 桉脂素; 丁香烯; 乙酸龙脑酯

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2023)05-1077-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.05.007

Mechanism of Lingzhu Powder in treatment of children susceptible viruses based on network pharmacology and molecular docking

CHEN Yi¹, XIONG Jian-xin¹, XIA Yang², ZHANG Ya-yun², ZHAI Yun-liang², BAO Ming-yue¹, ZHU Lin¹, SHANG GUAN Qiu-ling¹

1. Department of Respiratory, Changzhou Children's Hospital Affiliated to Nantong University, Changzhou 213002, China

2. Lei Yun Shang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Suzhou 215009, China

Abstract: Objective To explore the active components and action mechanism of Lingzhu Powder against infantile susceptible virus through network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** To screen the active compounds of Lingzhu Powder from TCMID databases. Target of the active compound was obtained by TCMSP, Pubchem, Swiss Target Prediction, SEA, and STITCH data. The target of related viral diseases was obtained from GeneCards database, and the common target was obtained after intersection, which was the potential target of Lingzhu Powder against children susceptible virus. The protein interaction (PPI) network of intersecting targets was constructed by STRING database, and important targets were screened based on degree value. DAVID platform was used for gene ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis for important targets. Cytoscape software was used to conduct compound-target network topology analysis to obtain the key compounds and core targets of Lingzhu Powder against infantile susceptible virus. AutoDock Vina software was used to verify the molecular docking of key targets and core compounds. **Results** A total of 92 active compounds and 184 drug-disease intersection targets were obtained. 15 Key compounds (cineolenol, cineolene, eugenene, bornyl acetate, etc.) and three core targets (CRP, CCL2, HMOX1) were obtained

收稿日期: 2023-01-19

作者简介: 陈怡, 女, 主治医师, 主要研究方向为儿科呼吸系统疾病。E-mail: 723884543@qq.com

*通信作者: 上官秋苓, 女, 副主任医师, 主要研究方向为儿科呼吸系统疾病。E-mail: 541185693@qq.com

from Lingzhu Powder for anti-infantile virus. The results of KEGG pathway enrichment analysis showed that Linzu Powder may exert therapeutic effects on infantile susceptible virus mainly through regulating tumor necrosis factor (TNF), Toll-like receptor, mitogen activated protein kinase (MAPK), FoxO, and T cell receptor. The molecular docking results showed that 10 core compounds and core targets of Linzu Powder had good binding ability against susceptible viruses, which verified the reliability of the network pharmacological screening results. **Conclusion** Linzu Powder can regulate a variety of signaling pathways related to inflammation and immune response through the main active ingredients such as cinetol, eudalin, eugenene, bornyl acetate, and combined with core targets such as CRP, CCL2, HMOX1, so as to play the role of anti-infantile virus.

Key words: Lingzhu Powder; children susceptible virus; network pharmacology; molecular docking; cineolenol; cineolene; eugenene; bornyl acetate

病毒是临床上侵犯小儿消化系统和呼吸系统的主要病原微生物之一，也是导致儿童就诊和住院的重要原因，感染后通常发病迅速并能够快速传播。常见消化系统病毒感染可引起疱疹性口腔炎、病毒性肠炎等，主要由疱疹病毒、轮状病毒、诺如病毒、肠道腺病毒引起，常采用营养治疗结合纠正水和电解质紊乱措施，必要时配合抗生素；呼吸系统病毒感染可引发包括高热、头痛、咳嗽、呕吐、腹泻、热性惊厥、咽部充血、扁桃体肿大等表现的急性上呼吸道感染、急性支气管炎、肺炎等，通常由鼻病毒、合胞病毒、腺病毒、流感病毒、副流感病毒、冠状病毒等感染引起，常见治疗方法包括采用抗病毒药及对症治疗，常用抗病毒药物有神经氨酸酶抑制剂（奥司他韦、帕拉米韦）、离子通道抑制剂（金刚烷胺、金刚乙胺）以及利巴韦林等，对症治疗包括采用支气管解痉剂（沙丁胺醇、特布他林）、解热药物（乙酰氨基酚、布洛芬）等，而对于无针对性治疗的病毒，常采用广谱抗病毒药物及激素进行抗感染，临床应用中常常伴随不良反应和耐药性的发生^[1-3]。

中药因其天然来源的安全性和有效性在防治小儿呼吸道病毒性感染及肠道病毒性感染中占据独特优势，在抗病毒的同时还能调节小儿免疫功能，且不良反应反应小，在治疗小儿病毒感染方面具有一定潜力^[4]。羚珠散来源于苏州市中医院著名儿科专家金邵文主任的临床经验方^[5]，由羚羊角粉、珍珠粉、牛黄、僵蚕、朱砂、琥珀、胆南星、冰片、石菖蒲油等组成，具有退热、镇静、定惊作用，主要用于小儿外感发热、神态不安、咳嗽有痰。临床应用中发现其对儿童水痘、小儿手足口病等病毒性感染具有良好的治疗效果^[6-7]，且被《中成药临床应用指南：感染性疾病分册》^[8]推荐用于多种病毒性感染疾病的治疗。因此，本研究通过网络药理学及分子对接技术探究羚珠散抗小儿易感病毒的作用

机制。

1 材料与方法

1.1 羚珠散的活性化合物筛选

利用 TSMCP 数据库检索羚珠散中 9 味中药的主要活性化合物，并以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (DL) ≥ 0.18 作为筛选标准^[9]，其中未在 TSCMP 数据库中收纳的草药、矿物药以及动物药通过 TCMID 数据库^[10]、ETCM 数据库、BATMAN-TCM 以及相关参考文献进行活性成分检索^[11-18]，并增加《中国药典》2020 年版记载的药材指标成分，最终筛选获得羚珠散的主要活性化合物。

1.2 羚珠散抗小儿易感病毒的潜在靶点预测

1.2.1 羚珠散活性化合物的靶点筛选 在成分检索数据库中查询不到对应靶点的化合物，通过 PubChem 数据库^[19] (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 搜索其 Canonical SMILES 式，导入 Swiss Target Prediction、SEA、STITCH 数据库进行靶点预测^[20-21]，并将获得的靶点名称通过 STRING 数据库^[22] (<https://string-db.org/>) 和 Uniprot 数据库^[23] (<http://www.uniprot.org/>) 进行标准化处理，统一为基因名 (gene symbol)，合并各数据库获得的靶点并删除重复值得到羚珠散主要活性成分的最终作用靶点。

1.2.2 小儿易感病毒的相关疾病靶点筛选 结合临床上常见小儿易感病毒种类以及羚珠散前期研究，选择“rhinovirus”“MERS-CoV”“SARS-CoV”“COVID-19”“HCoV-229E”“HCoV-OC43”“HCoV-NL63”“HCoV-HKU1”“coxsackievirus”“enteric cytopathic human orphan virus”“respiratory enteric orphan virus”“influenza virus”“parainfluenza virus”“respiratory syncytial virus”“human metapneumo virus”“adenovirus”“rubella virus”“varicella-zoster virus”“mumps virus”“rotavirus”“astrovirus”“calicivirus”22 种病毒，通过 GeneCards 数据库^[24] 进行疾病靶点检索，选择 relevance score > 25 的靶点，

合并检索结果，并删除重复项。

1.2.3 羚珠散抗小儿易感病毒的靶点筛选 将 1.2.1 和 1.2.2 项下收集到的成分及疾病靶点绘制 Venn 图取交集，获得羚珠散抗小儿易感病毒的潜在作用靶点。

1.3 蛋白质互相作用 (PPI) 网络的构建及分析

在 STRING 数据库中导入羚珠散抗小儿易感病毒的潜在作用靶点，选择基因物种为人 (homo sapiens)，蛋白之间功能的关联性 (medium confidence) 设置为 0.4 (中等相关性)，构建 PPI 网络^[25]，导出分析结果，统计各靶点的节点 degree 值，筛选出重要靶点。

1.4 潜在靶点的基因本体论 (GO) 功能和京都基因组与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

将 PPI 网络中得到的重要靶点导入 David 数据库^[26] (<https://david.ncifcrf.gov/>)，进行 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析，将 $P \leq 0.01$ 作为通路聚类标准，筛选出富集显著的前 20 条生物功能和前 10 条信号通路分别利用 ImageGP 平台 (<http://www.ehbio.com/ImageGP/>) 进行可视化。

1.5 化合物 - 靶点拓扑分析与药物 - 化合物 - 靶点 - 通路网络构建

1.5.1 化合物 - 靶点拓扑分析 将羚珠散抗易感病毒的作用靶点及与靶点对接的活性化合物导入 Cytoscape 软件构建化合物 - 靶标网络图，进行拓扑参数分析，获得各节点的度中心性 (DC)、中间中心度 (BC)、紧密中心性 (CC) 以及拓扑系数 (TC) 等参数，并以“DC 大于中位数 2 倍，BC、CC、TC 值大于中位数”为标准筛选出该网络中的核心靶点和核心化合物，与 1.3 项下的重要靶点取交集获得羚珠散抗小儿易感病毒的主要核心靶点^[27]。

1.5.2 药物 - 化合物 - 靶点 - 通路网络构建 将羚珠散中的单味药、核心化合物、核心靶点及 KEGG 通路分析得到的前 20 条通路导入 Cytoscape 软件，构建药物 - 化合物 - 靶点 - 通路网络图。

1.6 分子对接验证

将筛选到的核心化合物和主要核心靶点进行分子对接，验证羚珠散抗小儿易感病毒关键靶点筛选的准确性。在 Pubchem 数据库下载核心化合物的 2D 结构文件，经 Chem3D 软件优化力学结构，通过 AutoDock Vina (Version 1.1.2) 软件进行 Torsion Tree 处理；在 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库中搜索合适的靶点受体蛋白，下载 3D 结构，使用

Pymol 软件删除蛋白结构中的溶剂分子和有机物分子，删除重复结构，再利用 AutoDock Vina 对蛋白结构进行加氢、计算电荷、添加原子类型等处理；参考靶点受体相关文献，定位 Grid Box 坐标并调整结合区域空间大小；使用 AutoDock Vina 对化合物和靶点进行分子对接，获得结合能相关数据^[28]，同时通过 Protein-Ligand Interaction Profiler 平台对结合区域进行可视化处理。

2 结果

2.1 羚珠散活性化合物筛选结果

经检索筛选后得到羚珠散活性化合物 91 个，结果见表 1。其中石菖蒲有 30 个，主要为山柰酚、桉叶油素、细辛醚、柏木烯、菖蒲酮等化合物；而胆南星为天南星的发酵炮制品，筛选得到化合物有黄樟素、甲基丁香酚等。人工牛黄、冰片为人工制品，人工牛黄以胆酸、胆红素为代表，冰片则筛选出乙酸龙脑酯、丁香烯、积雪草酸、齐墩果酸等 16 个化合物。组方中含 3 味矿物药，朱砂主要成分为硫化汞，珍珠的主要成分以碳酸钙和各种金属微量元素为主，而琥珀含有较多芳香烃类化合物，如香橙烯、石竹烯、雪松醇、香茅醛等。动物药有羚羊角和僵蚕，羚羊角成分以角蛋白、磷酸钙和多种氨基酸为主，僵蚕则含有白僵菌黄色素、草酸铵、棕榈酸等。其中，冰片、石菖蒲共有成分 1 个 (龙脑)，冰片、琥珀共有成分 1 个 (反式丁香烯)，石菖蒲、琥珀共有成分 1 个 (桉叶油素)。

2.2 羚珠散抗小儿易感病毒的潜在靶点

通过 TCMSp、ETCM、BATMAN-TCM、PubChem、Swiss Target Prediction、SEA 和 STITCH 等数据库进行活性化合物的靶点检索，共得到化合物靶点 1 252 个。运用 GeneCards 数据库检索 22 种易感病毒的相关靶点，删除重复合并后共获得 430 个病毒相关靶点。将化合物靶点和病毒靶点取交集得到 184 个羚珠散抗小儿易感病毒的潜在作用靶点，见图 1。

2.3 羚珠散抗小儿易感病毒潜在靶点的 PPI 网络分析

将 184 个羚珠散抗小儿易感病毒的潜在靶点导入 STRING 数据库中，构建 PPI 网络图 (图 2)。该网络包含 184 个靶点，5 565 条边，平均网络节点 degree 值为 60.5，平均局部聚类系数 (表示节点的聚集程度) 为 0.67，表明该 PPI 网络中平均每个靶点约与 60 个靶点发生相互作用，并且网络中各靶

表 1 羚珠散中活性化合物的基本信息

Table 1 Basic information of active compounds in Lingzhu Powder

成分名称	OB/%	DL	中药来源	成分名称	OB/%	DL	中药来源
(+)-erythro-guaiacylglycerol	—	—	冰片	keratin	—	—	羚羊角
aliphatic acid	23.38	0.77	冰片	leucine	—	—	羚羊角
asiatic acid	41.38	0.71	冰片	bilirubin	—	—	人工牛黄
bata-caryophyllene	—	—	冰片	cholalic acid	22.17	0.72	人工牛黄
borneol	81.8	0.05	冰片、石菖蒲	cholesterol	37.87	0.68	人工牛黄
bronyl acetate	59.3	0.51	冰片	tau	—	—	人工牛黄
camphor	—	—	冰片	eudesmin	52.35	0.62	石菖蒲
caryophyllene	—	—	冰片	3-(4-methoxyphenyl)prop-2-enoate	—	—	石菖蒲
caryophyllene epoxid	—	—	冰片、琥珀	5-hydroxymethyl-furfural	—	—	石菖蒲
diptercarpol	41.71	0.76	冰片	8-isopentenyl-kaempferol	38.04	0.39	石菖蒲
d-isoborneol	—	—	冰片	alpha-asarone	—	—	石菖蒲
dryocrassin	—	—	冰片	asarone	—	—	石菖蒲
L-isoborneol	—	—	冰片	beta-eudesmol	—	—	石菖蒲
oleanolic acid-28-O-beta-D-glucopyranoside	—	—	冰片	beta-humulene derivatives	—	—	石菖蒲
oleanolic acid	—	—	冰片	carotol	—	—	石菖蒲
γ-caryophyllene	—	—	冰片	cedrene	—	—	石菖蒲
spathulenol	—	—	琥珀	cis,cis,cis-7,10,13-hexadecatrienal	—	—	石菖蒲
(+)-4-carene	—	—	琥珀	cis-methylisoeugenol	—	—	石菖蒲
aromadendrene	—	—	琥珀	cycloartenol	38.69	0.78	石菖蒲
caryophyllene	—	—	琥珀	himbaccol	—	—	石菖蒲
caryophylleneoxide	—	—	琥珀	hydroxybenzaldehyde	—	—	石菖蒲
cedrol	—	—	琥珀	isoacoramone	—	—	石菖蒲
citronellal	—	—	琥珀	isoeugenylmethylether	—	—	石菖蒲
cyclosativene	—	—	琥珀	isolekene	—	—	石菖蒲
D-germacrene	—	—	琥珀	isolongifolen-5-one	—	—	石菖蒲
eucalyptol	—	—	琥珀、石菖蒲	kaempferol	41.88	0.24	石菖蒲
humulane-1,6-dien-3-ol	—	—	琥珀	linalool	—	—	石菖蒲
limonene	—	—	琥珀	longicyclone	—	—	石菖蒲
muurolene	—	—	琥珀	methoxymethane	—	—	石菖蒲
terpinen-4-ol	—	—	琥珀	methyleugenol	—	—	石菖蒲、胆南星
valencene	—	—	琥珀	nonanoic acid	—	—	石菖蒲
α-copaene	—	—	琥珀	octanoylcarnitine	—	—	石菖蒲
α-cubebene	—	—	琥珀	phenol,2-methoxy	—	—	石菖蒲
α-pinene	—	—	琥珀	thymol	—	—	石菖蒲
α-selinene	—	—	琥珀	safrole	—	—	胆南星
β-elemene	—	—	琥珀	aluminium	—	—	珍珠
ammonium oxalate	—	—	僵蚕	calcium carbonate	—	—	珍珠
bassianins	—	—	僵蚕	cuprum	—	—	珍珠
chitinase	—	—	僵蚕	iron	—	—	珍珠
palmitic acid	—	—	僵蚕	magnesium	—	—	珍珠
arginine	—	—	羚羊角	manganese	—	—	珍珠
aspartic acid	—	—	羚羊角	silicon	—	—	珍珠
calcium phosphate	—	—	羚羊角	strontium	—	—	珍珠
glutamic acid	—	—	羚羊角	zinc	—	—	珍珠
glycine	—	—	羚羊角	mercuric sulfide	—	—	朱砂
histidine	—	—	羚羊角				

点之间关联性较强。以“degree 值大于平均 degree 值”为标准筛选出重要靶点 77 个，其中 degree 值前 5 个靶点包括蛋白激酶 B (Akt1)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF)、白蛋白 (ALB) 和胰岛素 (INS) 等，羚珠散抗小儿易感病毒可能与以上靶点密切相关，选取 degree 值排名前 20 位的

重要靶点进行整理，见图 3。

2.4 GO 功能分析与 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 平台对羚珠散抗小儿易感病毒的 77 个重要靶点进行 GO 功能富集分析，获得细胞组分 (CC)、生物过程 (BP) 及分子功能 (MF) 3 个方面富集结果，分别取富集显著的前 20 条进行展

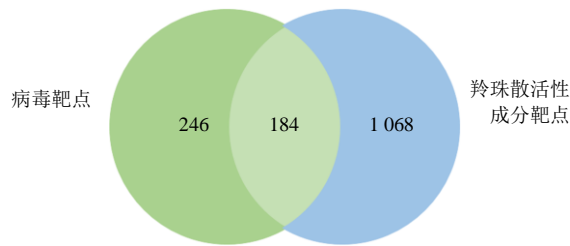


图 1 羚珠散活性成分靶点与病毒靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of targets of Lingzhu Powder active constituents and susceptible virus related targets

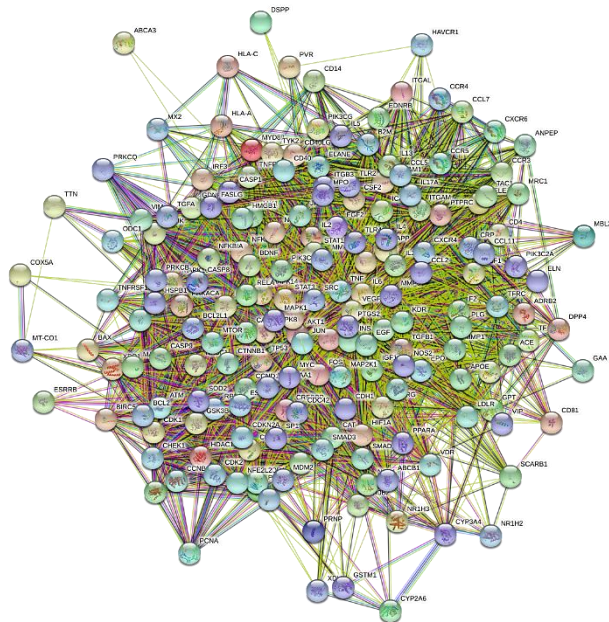


图 2 羚珠散抗小儿易感病毒潜在靶点 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of target of Lingzhu Powder in treatment of children susceptible viruses

示, 见图 4。其中 BP 富集结果显示, 靶点主要参与对炎症反应、免疫反应、MAPK 激酶活性、DNA 模板转录、RNA 聚合酶等生物过程的调控; CC 富集结果显示, 靶点主要分布于胶质溶胶、核质、抑制因子 κB (I- κB) /核因子- κB (NF- κB) 复合体、转录因子复合体、片装脂质体等部分; MF 富集结果显示, 靶点主要参与转录因子结合与激活、染色质结合、蛋白质异二聚体活性以及一氧化氮(NO)酶、丝裂原激活的蛋白激酶(MAP)、蛋白激酶等酶活性的调节。

对重要靶点进行 KEGG 信号通路富集分析, 共获得 97 条富集显著的信号通路 ($P < 0.01$), 其中排名前 20 条信号通路进行气泡图展示, 见图 5。其中甲型流感显示出较强关联, 提示 TNF 信号通路、

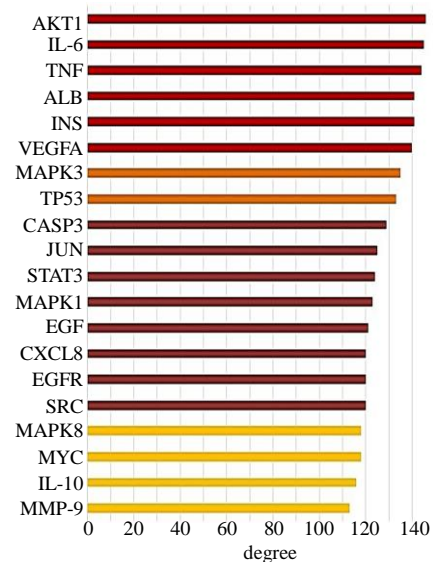


图 3 羚珠散抗小儿易感病毒的前 20 个重要靶点

Fig. 3 Top 20 important targets of Lingzhu Powder in treatment of children susceptible viruses

Toll 样受体信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、叉头框蛋白 O (FoxO) 信号通路、T 细胞受体通路和 NOD 样受体信号通路可能为羚珠散抗小儿易感病毒的关键信号通路。此外, 以膀胱癌、前列腺癌、黑色毒瘤为代表的癌症以及乙型肝炎、恰加斯病 (美国锥虫病)、百日咳等感染性疾病也是羚珠散的潜在治疗疾病。

2.5 羚珠散抗小儿易感病毒的药物 - 化合物 - 靶点 - 通路网络及拓扑分析

2.5.1 化合物 - 靶点网络拓扑分析

利用 Cytoscape 软件构建羚珠散抗小儿易感病毒的活性化合物 - 靶点网络, 对网络中节点进行拓扑参数分析, 网络 node degree distribution 拟合度 (correlation = 0.992, R-squared = 0.865) 显示拟合质量好, 精确度较高; 所有节点的 DC、BC、CC、TC 中位数分别为 3、0.000 713 49、0.289 170 89、0.241 677 35, 按照“节点的 DC 大于中位数 2 倍, BC、CC、TC 值大于中位数”筛选出核心化合物 15 个, 见表 2。根据核心化合物信息及 PPI 筛选出的重要靶点, 筛选得到核心靶点 3 个, 分别为 C 反应蛋白 (CRP)、趋化因子 2 (CCL2)、血红素加氧酶 1 (HMOX1)。

2.5.2 药物 - 化合物 - 靶点 - 通路网络

利用 Cytoscape 软件导入羚珠散组方药物、活性化合物、羚珠散抗小儿易感病毒的重要靶点和前 20 条富集显著的信号通路, 构建药物 - 化合物 - 靶点 - 通路网络, 见图 6, 结果可见 1 个化合物连接多个不同

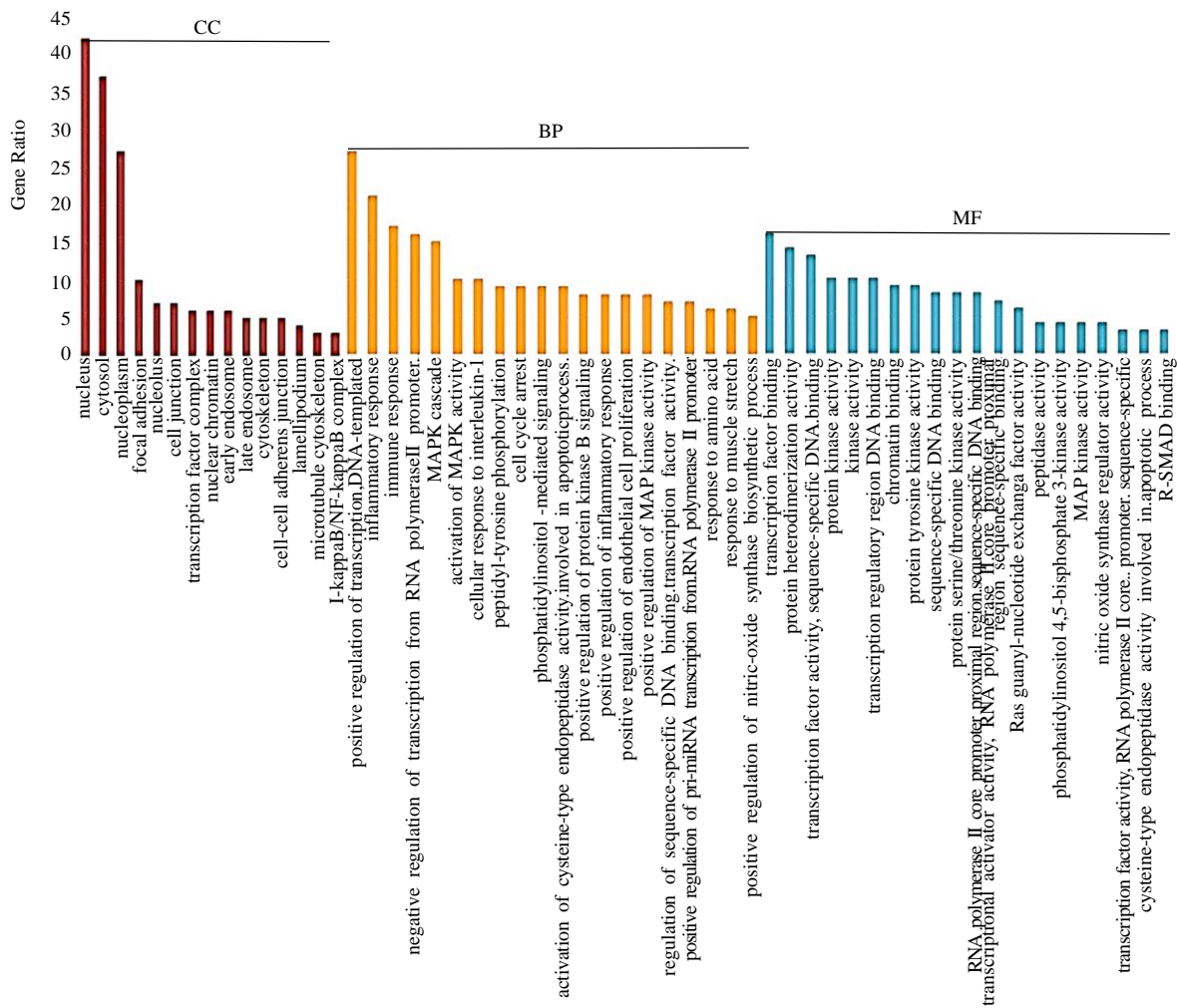


图 4 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis

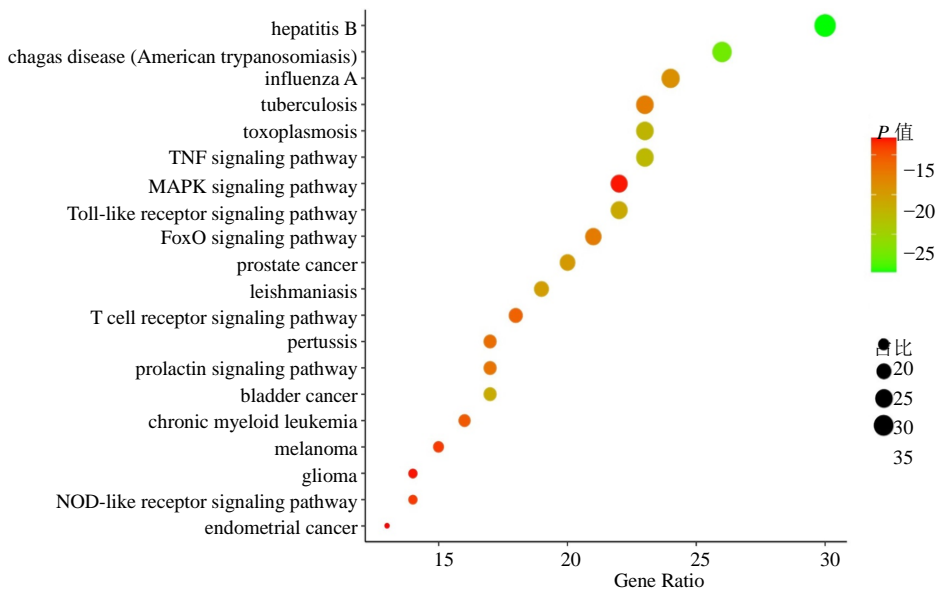


图 5 KEGG 通路富集气泡图

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

表 2 羚珠散抗小儿易感病毒的核心化合物
Table 2 Key compounds of Lingzhu Powder in treatment of children susceptible viruses

化合物	分子式	相对分子质量	来源
spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	琥珀
eudesmin	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	386.48	石菖蒲
ammonium oxalate	C ₂ H ₈ N ₂ O ₄	124.10	僵蚕
aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	琥珀
borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154.28	冰片、石菖蒲
bronyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	447.55	冰片
caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	冰片、琥珀
D-germacrene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	琥珀
dryocrassin	C ₄₃ H ₄₈ O ₁₆	820.80	冰片
glutamic acid	C ₅ H ₁₀ NO ⁴⁺	148.14	羚羊角
iron	Fe ²⁺	55.84	珍珠
manganese	Mn ²⁺	54.94	珍珠
α -copaene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	琥珀
α -pinene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	琥珀
β -elemen	C ₁₅ H ₂₄	204.35	琥珀

靶点和通路,提示羚珠散是通过多靶点和多通路作用发挥抗小儿易感病毒的作用。

2.6 分子对接验证

将筛选获得的 15 个主要核心化合物和 3 个核心靶点利用 AutoDock Vina 软件进行分子对接,各化合物和靶点的分子对接结合能见表 3。结合能小于-5.0 kcal/mol 表示化合物与靶点结合活性良好,结合能小于-7.0 kcal/mol 表示结合活性强^[29]。结果显示,除草酸铵、铁离子、锰离子外,其余核心化合物与核心靶点间均有良好的结合活性。其中桉脂素、右旋大根香叶烯和绵马贯众素均能与 HMOX1 产生强烈结合,而绵马贯众素和 CCL2 也显示出强结合。对接结果显示桉油烯醇、桉脂素、香橙烯、绵马贯众素、乙酸龙脑酯、丁香烯、右旋大根香叶烯、 α -可巴烯和 β -榄烯与 3 个核心靶点均有良好的结合活性,提示羚珠散可能是通过上述化合物来调节核心靶点从而发挥治疗抗小儿易感病毒的作用。

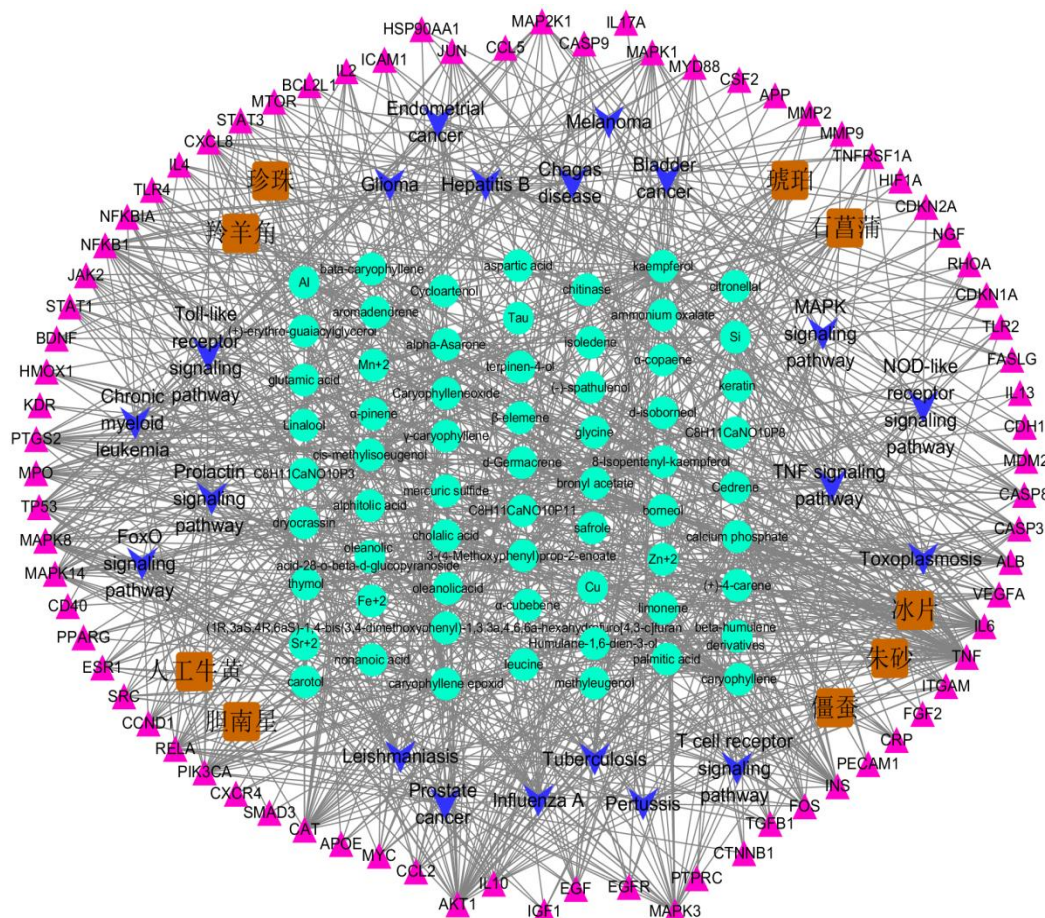


图 6 羚珠散抗小儿易感病毒的药物-化合物-靶点-通路网络

Fig. 6 Medicinal materials-component-target-pathway network of Lingzhu Powder in treatment of children susceptible viruses

表 3 羚珠散抗小儿易感病毒核心化合物和核心靶点的分子对接结果

Table 3 Molecular docking results of key compounds and core targets of Lingzhu Powder in treatment of children susceptible viruses

化合物	分子对接结合能/(kcal mol ⁻¹)		
	CCL2	CRP	HMOX1
spathulenol	-6.0	-6.2	-6.6
eudesmin	-6.8	-6.2	-7.7
ammonium oxalate	-1.5	-1.5	-1.2
aromadendrene	-5.8	-6.0	-6.8
borneol	-4.8	-4.6	-5.4
bronyl acetate	-5.3	-5.1	-6.2
caryophyllene	-5.7	-6.2	-6.7
D-germacrene	-6.0	-5.5	-7.3
dryocrassin	-7.4	-6.7	-7.3
glutamic acid	-4.3	-4.8	-4.3
iron	-1.2	-1.6	-1.1
manganese	-1.2	-1.6	-1.1
α-copaene	-5.9	-5.8	-6.7
α-pinene	-5.1	-4.8	-5.3
β-elemene	-5.0	-5.1	-5.8

其中发生强烈结合的核心化合物 - 核心靶点分子对接模式及结合位点见图 7。

3 讨论

羚珠散由羚羊角粉、珍珠粉、人工牛黄、僵蚕、朱砂、琥珀、胆南星、冰片、石菖蒲油组成。研究表明,组方各中药均有抗炎作用,羚羊角具有解热功效,人工牛黄、僵蚕发挥镇静、抗惊厥作用,此外冰片、胆南星还具有镇痛作用;现代药理学研究显示方中珍珠粉和人工牛黄可提高心肌收缩力、恢复窦性心律改善心功能,人工牛黄的支气管解痉作用可缓解咳嗽、呕吐等症状,石菖蒲油解痉利胆、促进肠道蠕动可改善腹泻,而僵蚕提取液的免疫调节作用和胆南星提取物的抗氧化作用提示羚珠散具有良好的机体调节作用,综上羚珠散对于小儿病毒性感染导致的发热、咳嗽、呕吐、腹泻等临床症状具有治疗和改善作用,有一定抗病毒潜力^[30-39]。

本研究通过检索数据库获得羚珠散活性化合物 91 个,其中在羚珠散抗小儿易感病毒中发挥重要作用的核心化合物有 15 个,包括桉油烯醇、桉脂素、香橙烯、绵马贯众素等成分。经过数据库检索、筛选获得羚珠散抗小儿易感病毒重要靶点 77 个,其中发挥主要调控作用的核心靶点有 CCL2、CRP、HMOX1。

分子对接结果显示,筛选出的核心化合物中有

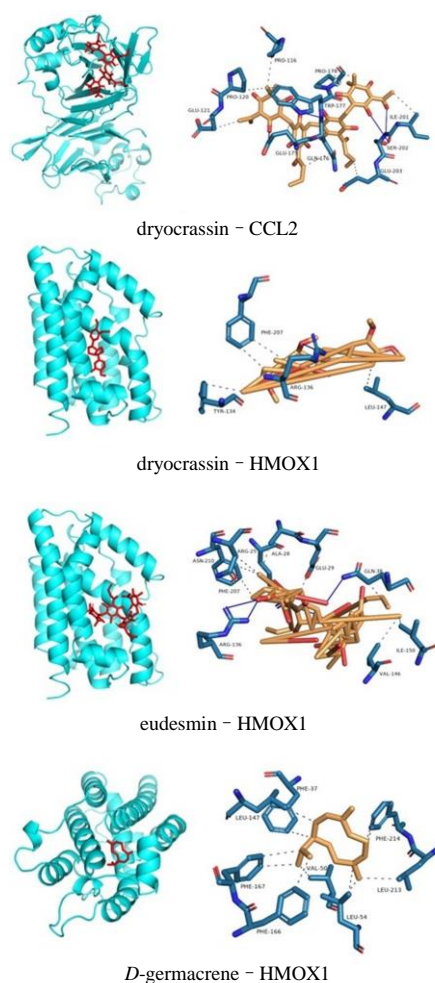


图 7 羚珠散抗小儿易感病毒的核心化合物与核心靶点分子对接模式与对接位点

Fig. 7 Docking model and site of key compounds and core targets of Lingzhu Powder in treatment of children susceptible viruses

10 个能与以上 3 个核心靶点产生良好的结合作用,其中桉脂素、右旋大根香叶烯、绵马贯众素能与核心靶点产生强烈结合,可能是羚珠散抗小儿易感病毒的主要活性成分之一。绵马贯众素是一种间苯三酚衍生物,具有驱虫、抗病毒、抗菌等多重药理作用^[40],高增平研究团队证明绵马贯众素具有良好的体外抗 H5N1 病毒活性,能明显抑制 H5N1 神经氨酸酶活性,阻止病毒颗粒在细胞内扩散,同时对感染 H5N1 病毒小鼠保护率达到 90%,显示出较好的抗病毒潜力^[41-42]。桉脂素是一种天然的木质素,主要存在于存在于芹菜科、木兰科、赭石科和芸香科等植物的细胞壁中,具有抗菌、抗炎、抗惊厥及抗肿瘤等药理活性^[43],体外研究显示桉脂素能抑制脂多糖诱导的巨噬细胞分泌 TNF-α,且在抑制 TNF-α

产生的同时不干扰正常细胞功能^[44]，此外其强烈的抗炎作用还通过抑制 5-脂氧酶和一氧化氮合酶的活性显现。另有研究报道桉脂素能降低碳粒廓清实验小鼠的胃肠动力，并能在体外激活 FRT 细胞和 HT-29 细胞的囊性纤维化跨膜传导调节器，显示出调节胃肠道运动的潜力^[45]。以上报道部分证实了本网络药理学成分筛选的可靠性，证明羚珠散中发挥作用的主要成分具有确实具有抗炎、抗病毒等作用潜力。

此外，本研究对羚珠散中发挥主要作用的核心靶点也进行了相关功能的检索。CRP 是病毒感染的常用诊断指标，有研究显示 CRP 在轮状病毒肠炎、EV71 型手足口病以及新冠肺炎患者中的水平明显较高^[46-48]，也是小儿常见病毒感染的典型指标之一。CCL2 属于趋化因子 CC 亚家族的成员，也称为单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)，在炎症因子或病毒刺激下主要由单核细胞、巨噬细胞和树突细胞分泌^[49]，能通过诱导、调节炎症因子的产生与释放形成级联反应进而介导炎症的发展，在 EV71 感染重症患者血清中 CCL2 水平高于轻症者，血清 CCL2 水平与 EV71 感染程度呈明显的正相关^[50]。此外，赖成材研究发现 H7N9 感染的小鼠血清及肺泡灌洗液中的 CCL2 水平均显著升高，可能在急性肺损伤中起关键作用^[51]。然而 CCL2 作为炎症因子网络的始动因子，在病毒感染过程中的作用也有待进一步挖掘。HMOX1 是一种血红素代谢限速酶，能够催化血红素生成胆绿素、一氧化碳和游离铁，具有细胞保护作用，能够发挥抗氧化、抗炎等作用，目前 HMOX1 与病毒的相互作用研究显示，药物诱导的内源性 HMOX1 表达和外源性 HMOX1 表达均对病毒复制有抑制作用，并且 HMOX1 能够通过免疫调节作用减轻流感病毒引起的肺炎^[52-54]。以上研究侧面佐证 CCL2、CRP、HMOX1 等靶点可能在羚珠散抗小儿易感病毒中发挥核心作用。

小儿易感病毒相关的重要靶点的 KEGG 分析显示，靶点显著富集于 TNF、MAPK、Toll 样受体、FoxO、T 细胞受体等多条炎症信号通路，值得注意的是通路富集分析显示重要靶点与甲型流感具有强关联性，而重要靶点涉及的生物过程主要以调控机体炎症反应和免疫反应为代表。推测羚珠散可能主要通过绵马贯众素、桉脂素、右旋大根香叶烯等关键活性成分，作用于 CRP、CCL2、HMOX1 等核心靶点，来调控 TNF、MAPK、Toll 样受体、FoxO、

T 细胞受体等多种免疫、炎症相关信号通路，从而对以甲型流感为典型的小儿常见病毒感染发挥抗病毒作用。

综上，本研究利用网络药理学以及分子对接技术，发现羚珠散可通过多成分、多靶点、多通路发挥抗小儿易感病毒作用，并主要通过 CRP、CCL2、HMOX1 等核心靶点调控机体炎症反应和免疫反应，而 TNF、MAPK、Toll 样受体、FoxO、T 细胞受体等信号通路可能是羚珠散抗小儿易感病毒主要调控的信号通路，本研究初步挖掘了经典儿科用药羚珠散抗小儿易感病毒的作用机制，为后续的实验研究提供参考，也为该产品后期临床用药提供了新的视角与思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王卫平. 儿科学 [M]. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 195-209.
- [2] 陈灏珠, 林果为, 王吉耀. 实用内科学 [M]. 第 15 版. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 289-405.
- [3] 岳路路, 高敏, 闫滨, 等. 呼吸道病毒靶点的研究进展 [J]. 广东医学, 2016, 37(22): 3474-3476.
- [4] 樊启猛, 潘雪, 贺玉婷, 等. 中药及其复方对病毒性肺炎的免疫调节作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2065-2074.
- [5] 符虹. 金绍文治疗小儿发热的经验 [J]. 江苏中医, 2000(3): 5-6.
- [6] 邝长毅, 赖伯存, 姚燕仙. 羚珠散与喜炎平治疗小儿水痘的临床疗效 [J]. 中国医药科学, 2020, 10(7): 69-71.
- [7] 张繁锦. 羚珠散辅助治疗小儿手足口病邪陷心肝证 79 例临床观察 [J]. 中医儿科杂志, 2019, 15(5): 56-58.
- [8] 王永炎, 晁恩祥, 王贵强. 中成药临床应用指南: 感染性疾病分册 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015.
- [9] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [10] Xue R C, Fang Z, Zhang M X, et al. TCMID: Traditional Chinese medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D1089-1095.
- [11] 李峰, 吴明月, 单舒筠. 羚羊角商品药材各部位中氨基酸分析 [J]. 中成药, 2013, 35(11): 2448-2452.
- [12] 程松, 潘英妮, 孙琦, 等. 琥珀挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国药房, 2014, 25(27): 2556-2558.
- [13] 唐怡, 任刚, 黄群, 等. 石菖蒲挥发油化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 江西中医药, 2014, 45(12): 60-62.
- [14] 吴春华, 陈玥, 李晓霞, 等. 石菖蒲化学成分的分离与结构鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2014, 24(3): 209-213.

- [15] 陈艳红, 冯玉林. 冰片的研究进展 [J]. 中国社区医师: 医学专业, 2013, 15(6): 10-11.
- [16] 顾倬云, 王燕生. 人胆红素结石与牛黄、人工牛黄的主要成分及其含量的比较 [J]. 中国人民解放军军医进修学院学报, 1988(3): 282.
- [17] 程锁明, 翟银成, 薛芳, 等. 僵蚕化学成分的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3630-3636.
- [18] 刘晓月, 陶鑫, 潘多, 等. 胆南星化学成分的研究 [J]. 中成药, 2018, 40(9): 1991-1995.
- [19] Kim, S. Getting the most out of PubChem for virtual screening [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2016, 11(9): 843-855.
- [20] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): 357-364.
- [21] Kuhn M, Szklarczyk D, Pletscher-Frankild S, et al. STITCH 4: Integration of protein-chemical interactions with user data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D401-D407.
- [22] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration [J]. *Nuclc Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D808-815.
- [23] Consortium U P. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic acids Res*, 2019, 47(D1): D506-D515.
- [24] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54(1): 1.30.1-1.30.33.
- [25] Vella D, Marini S, Vitali F, et al. MTGO: PPI Network analysis via topological and functional module identification [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5499.
- [26] Jr G D, Sherman B T, Hosack D A, et al. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(5): P3.
- [27] Tang Y, Li M, Wang J, et al. CytoNCA: A cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks [J]. *Biosystems*, 2015, 127: 67-72.
- [28] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [29] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [30] 吴晓莹. 羚羊角和水牛角的解热作用及其成分研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- [31] 章蕴毅, 顾文, 吴中, 等. 水溶性珍珠粉对心脏的药理作用 [J]. 中成药, 1994(9): 35-37.
- [32] 黄青萍, 盘红梅. 珍珠的药理作用及临床应用 [J]. 时珍国医国药, 2000(6): 564-565.
- [33] 徐秋萍, 李华, 吴金英, 等. 新一代人工牛黄的药理与毒理学研究 V.对呼吸系统的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 1994(2): 104-106.
- [34] 潘善庆, 张梦晖, 袁惠南, 等. 新一代人工牛黄的药理与毒理学研究 I .对中枢神经系统的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 1994(2): 99-103.
- [35] 潘思源, 董继萃, 王凤仁, 等. 新一代人工牛黄的药理与毒理学研IV.对心血管系统的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 1994(3): 172-176.
- [36] 徐冲, 商思阳, 刘梅, 等. 僵蚕化学成分和药理活性的研究进展 [J]. 中国药房, 2014, 25(39): 3732-3734.
- [37] 吴淦锋, 朱泽宇, 陈靖南, 等. 冰片药理作用及冰片酯的研究进展 [J]. 药学研究, 2020, 39(4): 217-224.
- [38] 韩亚亮, 刘萍, 何新荣, 等. 石菖蒲挥发油的基本成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国药物应用与监测, 2011, 8(2): 120-124.
- [39] 唐照琦, 李彪, 王秋红, 等. 胆南星的化学成分、药理作用及相关复方临床应用的研究进展 [J]. 中国药房, 2020, 31(12): 1523-1527.
- [40] 董小云. 绵马贯众素对金黄色葡萄球菌 vWbp 抑制作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [41] Wang J, Yan Y T, Fu S Z, et al. Anti-influenza virus (H5N1) activity screening on the phloroglucinols from Rhizomes of *Dryopteris crassirhizoma* [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 431.
- [42] Ou C B, Zhang Q, Wang J, et al. Corrigendum: Dryocrassin ABBA, a novel active substance for use against amantadine-resistant H5N1 avian influenza virus [J]. *Front Microbiol*, 2016, 15(7): 1464.
- [43] Patel D, Patel K. Potential therapeutic applications of eudesmin in medicine: An overview on medicinal importance, pharmacological activities and analytical prospects [J]. *Pharm Res Mod Chin Med*, 2022, 5: 100175.
- [44] Cho J Y, Yoo E S, Baik K U, et al. Eudesmin inhibits tumor necrosis factor-alpha production and T cell proliferation [J]. *Arch Pharm Res*, 1999, 22(4): 348-353.
- [45] Jiang Y, Yu B, Fang F, et al. Modulation of chloride channel functions by the plant lignan compounds kobusin and eudesmin [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 1041.
- [46] 文燕雄, 陈东梅, 刘喜, 等. 感染性指数(PCT 及 CRP) 在轮状病毒肠炎变化的研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(12): 962-964.

- [47] 李正, 袁文娟, 刘自刚, 等. CRP、CER、AAT 检测在肠道病毒 71 型手足口病中的临床应用 [J]. 包头医学院学报, 2015, 31(2): 32-33.
- [48] 昌仲勇, 杨为斌, 王强, 等. 血清 hs-CRP、IL-6、PCT 对新型冠状病毒肺炎患者的诊断及预后评估的临床意义 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 417-420.
- [49] 姜懿纳, 陈乃宏. CCL2/MCP-1 在其相关疾病的机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(12): 1634-1638.
- [50] 贾文芳, 刘培培, 胡静飞, 等. CCL2-2518 位点基因多态性与重症肠道病毒 71 型感染相关性研究 [J]. 中国实用儿科杂志, 2016, 31(9): 686-689.
- [51] 赖成材. 趋化因子 CCL2 和长链非编码 RNA AVAN 抗流感病毒作用机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- [52] 苏念, 袁军法, 李莉, 等. 血红素加氧酶-1 与病毒感染相互作用的研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(1): 1-4.
- [53] 王凡, 王宏娟, 徐世明. 血红素加氧酶-1 在感染性疾病中的作用及研究进展 [J]. 重庆医学, 2019, 48(20): 3541-3544.
- [54] Wang C H, Zhang Y J, Han L L, *et al.* Hemin ameliorates influenza pneumonia by attenuating lung injury and regulating the immune response [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2017, 49(1): 45-52.

[责任编辑 高源]