

基于网络药理学和体外实验研究亚麻木酚素抗轮状病毒的作用机制

周玉晶¹, 杨芷胭¹, 余润宇¹, 周芸涓¹, 江小英¹, 余俊贤¹, 赵文昌¹, 宋丽军^{1,2*}

1. 广东医科大学 药学院, 广东 东莞 523808

2. 广东医科大学 天然药物研发重点实验室, 广东 湛江 524023

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接和体外细胞实验探讨亚麻木酚素抗轮状病毒的作用机制。**方法** 利用 TCMSP、SwissTarget Prediction、PharmMapper 数据库收集亚麻木酚素的作用靶点, 利用 GeneCards、OMIM、DisGeNET 数据库获取轮状病毒的作用靶点。构建韦恩图并获得交集靶点, 并利用 Metascape 数据库进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。利用 Pymol、AutoDock 软件进行分子对接验证。采用轮状病毒感染 MA104 细胞模型研究亚麻木酚素的抗轮状病毒吸附、直接抑制轮状病毒和抗轮状病毒生物合成作用。测定细胞丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 含量表达, 研究亚麻木酚素对轮状病毒引起的氧化应激的影响。利用 RT-qPCR 和 Western blotting 探讨亚麻木酚素对轮状病毒感染的磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/叉头框蛋白 O1 (FoxO1) 信号通路的影响。**结果** 通过网络药理学分析, 共获取 369 个亚麻木酚素靶点, 445 个轮状病毒靶点, 38 个交集靶点, KEGG 富集分析获得 144 条富集通路。分子对接表明靶蛋白受体与亚麻木酚素配体可以稳定结合。实验表明亚麻木酚素具有抗轮状病毒生物合成作用, 无抗轮状病毒吸附和直接抑制轮状病毒作用。与模型组相比, 亚麻木酚素药物 2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 MDA 显著含量下降、GSH 含量升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。RT-qPCR 和 Western blotting 结果显示, 亚麻木酚素可以上调 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路中相关基因和蛋白的表达, 降低 VP6 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。**结论** 亚麻木酚素可以通过 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路抑制轮状病毒诱导的氧化应激, 从而发挥抗轮状病毒作用。

关键词: 亚麻木酚素; 轮状病毒; 氧化应激; 网络药理学; 分子对接; 磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/叉头框蛋白 O1 信号通路
中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)11-2760-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.11.004

Mechanism of flax lignans against rotavirus based on network pharmacology and *in vitro* experiments

ZHOU Yujing¹, YANG Zhiyan¹, YU Runyu¹, ZHOU Yunmei¹, JIANG Xiaoying¹, YU Junxian¹, ZHAO Wenchang¹, SONG Lijun^{1,2}

1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

2. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of flax lignans against rotavirus based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* cellular assays. **Methods** TCMSP, SwissTargetPrediction, PharmMapper databases were used to collect the targets of flax lignans. GeneCards, OMIM, DisGeNET databases were used to obtain the targets of rotavirus. Venn diagram was constructed to obtain intersection targets, and GO and KEGG enrichment analysis was performed using Metascape database. Molecular docking validation was performed using Pymol, AutoDock software. The inhibition of rotavirus attachment, direct inhibition of rotavirus and inhibition of rotavirus replication effects of flax lignans were studied using the rotavirus -infected MA104 cell model. The effects of flax lignans on rotavirus-induced oxidative stress were investigated by measuring the content expression of MDA and GSH oxidation indicators. RT-qPCR and Western blotting were used to explore the effect of flax lignans on PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rotavirus infection. **Results** A total of 369 flax lignans targets, 445 rotavirus targets, and 38 crossover targets were obtained

收稿日期: 2024-08-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81473401, 81973548); 广东省高校创新团队项目 (2022KCXTD011); 湛江市科技计划项目 (2021B01139); 广东医科大学学科重点项目 (45G23006G)

作者简介: 周玉晶, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: zyj_yjs927@163.com

***通信作者:** 宋丽军, 女, 教授, 博士, 研究方向为中药药理。E-mail: songlijun6981@126.com

by network pharmacological analysis, and 144 enriched pathways were obtained by KEGG enrichment analysis. Molecular docking showed that the target protein receptors could bind stably to the flax lignans. The results showed that flax lignans had anti-rotavirus replication effect without anti-rotavirus adsorption and direct inhibition of rotavirus. Compared with the model group, the content of MDA were decreased, and GSH were increased in the flax lignans 2.0 and 4.0 $\mu\text{mol/L}$ group ($P < 0.05, 0.01$). RT-qPCR and Western blotting results showed that flax lignans could upregulate the expression of related genes and proteins in the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway, and decreased VP6 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Flax lignans can exert anti-rotavirus effects by inhibiting rotavirus-induced oxidative stress through the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway.

Key words: flax lignans; rotavirus; oxidative stress; network pharmacology; molecular docking; PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway

轮状病毒是一种常见的婴幼儿肠道病毒,感染后多表现为急性水样便腹泻、发热、腹痛、呕吐等症状,严重的可能还会危及生命^[1]。据估计,每年约有 20 万名儿童因感染轮状病毒死亡,主要集中在发展中国家^[2-3]。自 2006 年以来,已有至少 5 种口服轮状病毒减毒活疫苗(Rotarix、Rotateq 等)获准上市,但轮状病毒株变异较快,疫苗的预防作用有限^[4-6]。目前尚无特效的治疗药物,临床上主要采用口服补液或利巴韦林等广谱抗病毒药物^[7-8],疗效不确切,因此筛选发现抗轮状病毒新药具有重要的意义。

亚麻木酚素作为一种多酚类化合物,具有显著的抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗心血管疾病、抗骨质疏松、抗凋亡以及降糖作用,对糖尿病、心血管疾病、肾脏病,尤其是乳腺癌经期综合征、骨质疏松等雌激素依赖性疾病有较好的预防作用^[9],其中亚麻木酚素的代谢物肠内酯、肠二醇表现出明显的生物活性,主要通过调节雌激素发挥作用。已有研究发现具有雌激素样作用的染料木素和葛根素有较好的抗轮状病毒作用^[10-11]。本研究拟采用轮状病毒感染细胞模型和网络药理学研究亚麻木酚素抗轮状病毒的作用机制。

1 网络药理学

1.1 亚麻木酚素作用靶点的获取

通过 TCMSP^[12] (<https://tcmsp.com/tcmsp.php>)、PharmMapper^[13] (http://lilab.ecust.edu.cn/pharm_mapper/index.php) 以及 SwissTarget Prediction^[14] (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库检索亚麻木酚素的作用靶点。将所有收集到的靶点合并去重,利用 UniProt^[15] (<https://www.uniprot.org/>) 数据库将靶点名称标准化。

1.2 轮状病毒作用靶点的收集

使用 OMIM^[16] (<http://omim.org/>)、DisGeNET^[17] (<https://www.disgenet.org/>) 和 GeneCards^[18] (<https://www.genecards.org/>) 数据库收集轮状病毒的作用靶点,合并去重,得到轮状病毒的潜在靶点。

www.genecards.org/) 数据库收集轮状病毒的作用靶点,合并去重,得到轮状病毒的潜在靶点。

1.3 亚麻木酚素治疗轮状病毒的交集靶点的筛选

通过 Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 将获得的亚麻木酚素靶点与筛选的轮状病毒靶点进行匹配,得到亚麻木酚素治疗轮状病毒的潜在靶点。将其导入 STRING^[19] 数据库 (<https://cn.string-db.org/>),生成靶点间相互作用关系,再导入 Cytoscape 软件中进行可视化分析。

1.4 亚麻木酚素治疗轮状病毒靶点的基因本体(GO)功能分析

采用 Ri386 软件、Cytoscape 软件的 app Glue GO 插件及 DAVID 数据库,对亚麻木酚素对轮状病毒作用关键靶点的 GO 进行分析,选取阈值 $P < 0.05$ 的靶点,并根据 P 值从小到大筛选。从基因靶点的分子功能(MF)、参与生物过程(BP)和细胞成分(CC)3 个方面进行分析。

1.5 京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析及“靶点-通路”网络的构建

对交集基因进行 KEGG 富集分析,选取前 20 个通路在微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 中构建富集分析气泡图,利用 Cytoscape 软件构建“靶点-通路”网络,获得亚麻木酚素抗轮状病毒的相关通路、靶点。

1.6 分子对接验证

为进一步阐明所选蛋白的生物活性,将亚麻木酚素与关键靶点进行分子对接。在 PDB^[20] (<https://www.rcsb.org/>) 数据库中优先选择物种为“homo sapiens”、已有小分子且分辨率较高的蛋白晶体结构。利用 Pymol 和 AutoDock 软件移除水,删除活性中心的原始配体,并使目标氢化。从 PubChem^[21] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>) 数据库中下载亚麻木酚素 2D 结构的 sdf 格式文件,并使用 Chem 3D 绘制最小化亚麻木酚素的能量,然后将其

加载到 AutoDock 软件中,以找到活动的口袋与亚麻木酚素对接后的结合能。通过 Pymol 进行可视化处理,进一步评价网络分析结果。

2 体外实验

2.1 试剂、细胞、仪器

2.1.1 试剂亚麻木酚素(质量分数 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司,批号 A16GB157943),胎牛血清、高糖培养基(美国 GIBCO 公司),胰蛋白酶消化液(Solarbio 公司)、封闭山羊血清(Solarbio 公司)、DAPI 溶液(Solarbio 公司)、GSH 试剂盒(Solarbio 公司)、QuickBlock™ 免疫染色一抗稀释液(江苏碧云天生物技术公司)、免疫染色二抗稀释液(江苏碧云天生物技术公司)、丙二醛(MDA)试剂盒(江苏碧云天生物技术公司)、PBS-Triton 溶液(破膜剂,0.3%,艾迪生生物科技有限公司)、VP6(Santa Cruz Biotechnology 公司)、 β -肌动蛋白(β -actin)、蛋白激酶 B(Akt, Proteintech 公司)、磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)、p-PI3K、叉头框蛋白 O1(FoxO1)、p-FoxO1(Cell Signaling 公司)、HPR 标记山羊抗兔 IgG、HPR 标记山羊抗鼠 IgG(江苏碧云天生物技术公司)。

2.1.2 细胞与病毒恒河猴胎肾细胞系(MA104)购自中山大学细胞库、轮状病毒毒株由本实验室保存。

2.1.3 仪器倒置荧光显微镜 DMI8(德国徕卡公司)、高压灭菌锅(日本 Sany 公司)、CO₂ 恒温培养箱(Thermo Scientific 公司)、多功能酶标仪(BioTek 公司)、活细胞成像仪、Roche 荧光定量 PCR 仪(Thermo Scientific 公司)、激光共聚焦(德国 Wetzlar Leica TCS SP8)、低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2.2 方法

2.2.1 轮状病毒的培养、扩增与滴度的测定将轮状病毒与 10 $\mu\text{g/mL}$ 无 EDTA 的胰酶等体积混合,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 CO₂ 细胞培养箱中孵育 30 min,接种至 MA104 细胞后在培养箱中继续培养,直至在显微镜下观察到细胞出现的细胞病变效应(CPE)达到+++时,取出细胞培养瓶置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。反复冻融 3 次后收集于离心管中,离心并分装,标记后-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[1]。

将孵育的轮状病毒病毒液以 1:10 用 DMEM 培养液分别稀释成 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 系列浓度,感染生长于 96 孔

板的单层 MA104 细胞。当显微镜下观察到最低稀释度轮状病毒的孔内不再出现 CPE 时,记录下每一个稀释度出现 CPE 的孔数^[1]。同时,在避光条件下往孔内加入 10 μL MTT 试剂后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 4 h。最后吸走混合培养液,加入 150 μL DMSO 震荡混匀,在 490 nm 波长条件下,用酶标免疫检测仪检测样品的吸光度(A)值。按照 Reed and Muench 方法计算出病毒的半数细胞感染剂量(TCID₅₀)^[22]。

$\lg \text{TCID}_{50} = \text{距离比例} \times \text{稀释度对数之间的差} + \text{高于 50\% 病变率的稀释度的对数}$

$\text{距离比例} = (\text{高于 50\% 病变率的百分数} - 50\%) / (\text{高于 50\% 病变率的百分数} - \text{低于 50\% 病变率的百分数})$

2.2.2 MTT 法检测亚麻木酚素对 MA104 细胞的毒性 MA104 细胞以 8×10^4 个/mL 的细胞密度孵育至细胞长成单层,加入 0.5、1、2、4、8、16、32、64、128 $\mu\text{mol/L}$ 亚麻木酚素,对照组加入相同体积的不含 FBS 的 DMEM 培养液。各组设置 6 个平行孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 恒温培养箱中,连续培养 48 h 后,于超净台内避光加入 10 μL /孔的 MTT 溶液,培养箱中孵育 4 h,吸出培养液,加入 150 μL /孔的 DMSO 溶液,水平置于摇床上摇 10 min,酶标仪检测 490 nm 波长下每孔 A 值,计算细胞存活率。

$\text{细胞存活率} = \text{药物组平均 A 值} / \text{对照组平均 A 值}$

2.3 亚麻木酚素体外抗轮状病毒实验

2.3.1 亚麻木酚素抗轮状病毒吸附作用 采用 96 孔培养板进行实验。首先,在培养板内加入浓度为 0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 的亚麻木酚素,每个药液重复 6 孔,每孔加入 100 μL 药液。同时,阳性对照组加入 1 mg/mL 利巴韦林,对照组和轮状病毒组均只加入等体积不含 FBS 的 DMEM 培养液。接下来,将培养板放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 恒温培养箱中,孵育 2 h 后,将药液吸出,使用 PBS 洗涤一次。除了对照组外,其余组别均加入 100 TCID₅₀ 的轮状病毒(病毒与 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min),并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的恒温培养箱中孵育 2 h。接着,将病毒液吸出,PBS 洗涤 1 次。随后,加入 100 μL 细胞维持液。显微镜下连续观察。当细胞出现范围在 CPE 在 ++~+++ 时,加入 5 mg/mL MTT,10 μL /孔,并继续孵育 4 h。弃去上清液,并加入 150 μL DMSO/孔,室温震荡混匀约 10 min。最后,在波长 490 nm 的条件下,使用多功能酶标仪读取 A 值并计算病毒抑制率,重复此实验至少 3 次。

2.3.2 亚麻木酚素直接抑制轮状病毒作用 首先,将浓度为 0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 的亚麻木酚素分别与 100 TCID₅₀ 病毒液(病毒与 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min)等体积混合作用 2 h。接着,于培养箱中取出长至单层细胞的 96 孔板,弃旧液,用 PBS 清洗 1 次后,将上述混合液加入到培养板内。利巴韦林组将 1 mg/mL 利巴韦林与轮状病毒液进行同样的操作。对照组、病毒组均只加入等体积的 DMEM 培养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 孵育 2 h,然后将混合液吸出,PBS 洗 1 次后每孔加入 100 μL 体积的细胞维持液。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 孵育连续观察,培养 48 h 后加入 MTT,10 μL /孔,孵育 4 h 后弃上清。加入 DMSO,150 μL /孔,室温下震荡混匀约 10 min。最后,490 nm 条件下多功能酶标仪读取 A 值,计算病毒抑制率,重复实验至少 3 次。

2.3.3 亚麻木酚素抗轮状病毒生物合成作用 首先,从培养箱中取出长至单层细胞的 96 孔板,PBS 清洗 1 次。接着,将 100 TCID₅₀ 病毒液(病毒与 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min)加入到培养板内,每孔 100 μL 体积。对照组加入等体积 DMEM 培养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 孵育 2 h,然后将病毒液吸出,加入浓度为 0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 的亚麻木酚素,100 μL /孔,病毒组只加入等体积的轮状病毒维持液。

37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 孵育连续观察 2 d 后进行 MTT 检测,并计算药物对病毒的抑制率,重复实验 3 次。

病毒抑制率=(药物组平均 A 值-病毒对照组平均 A 值)/(对照组平均 A 值-病毒对照组平均 A 值)

2.4 间接免疫荧光测定

将 MA104 细胞接种于 35 mm 的共聚焦皿中。待细胞融合至 80%后,病毒与 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min 后加入细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 h,然后加入 2 $\mu\text{mol/L}$ 亚麻木酚素。室温固定、渗透、封闭。洗涤,加入一抗稀释液,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBST 洗涤 3 次,加入二抗稀释液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h。PBST 洗涤,用 DAPI 室温避光染色。用徕卡 SP8 激光共聚焦显微镜观察,拍照,计算含病毒质细胞的阳性百分比。

2.5 RT-qPCR 检测相关基因的表达

分组用 TRIzol 提取细胞总 RNA。测定提取的 RNA 浓度,随后使用逆转录试剂盒将该 RNA 逆转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 荧光标记,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,引物序列见表 1 所示。采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算相关基因 mRNA 的相对表达量。

2.6 Western blotting 检测相关蛋白的表达

分组提取细胞的总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。以 12% SDS-PAGE 凝胶上样后进行电泳、转

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	正向 (5'-3')	反向 (5'-3')
GAPDH	CATGACCACAGTCCACGCCATC	GATGACCTTGCCCACAGCCTTG
VP6	GACCAAACATGACCATCTG	CATCGGCACCCGTCAGACT
PIK3CA	CGGTGACTGTGTGGGACTTATTGAG	ATGTAGAGTGTGGCTGTTGAACTGC
Akt1	CATCACACCACCTGACCAAGACG	CCGCCTCTCCATCCCTCCAAG
FoxO1	ACCTGTCCTACGCTGACCTCATC	GCACGCTCTTGACCATCCACTC

膜、封闭。与一抗(VP6、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、FoxO1、p-FOXO1)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;次日用 TBST 洗涤 3 次,二抗室温孵育 1 h;随后,用 TBST 洗涤 3 次后,进行显影定影并使用 Image J 软件测量灰度值。

2.7 氧化指标丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)含量的测定

将 MA104 细胞以每孔 20 万的数目接种于 6 孔板中,细胞长至单层后对照组加 DMEM,模型组和亚麻木酚素组均加入等体积的 100 TCID₅₀ 病毒液,

吸附 2 h,对照组和模型组分别加入 DMEM 培养液,亚麻木酚素组加入等体积不同浓度(1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$)的亚麻木酚素药液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 孵育箱中孵育 24 h。在冰上用细胞裂解液充分裂解,12 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清用于后续测定。按照试剂盒说明书检测 MDA、GSH 含量的表达。

2.8 统计分析

采用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验用于比较两组对照实验,使用单因子方差分析法比较多个样本的均值。

3 网络药理学研究结果

3.1 亚麻木酚素药物靶点的获取

在 TCMSP、Swiss Target Prediction、Pharm Mapper 数据库中搜索亚麻木酚素药物靶点, 利用 UniProt 数据库将靶点名称标准化, 合并去重后共获取 369 个药物靶点。

3.2 轮状病毒疾病靶点的收集

使用 GeneCards、OMIM、DisGeNET 数据库以

“rotavirus”为关键词进行检索, 去重后共获得疾病靶点 445 个。

3.3 亚麻木酚素抗轮状病毒的交集靶点的收集

利用 Venny 2.1 软件, 将亚麻木酚素靶点与轮状病毒靶点相交, 得到 44 个交集靶点, 可能为亚麻木酚素抗轮状病毒的潜在靶点。对其进行 STRING 分析, 用 Cytoscape 进行可视化, 最终得到一个具有 43 个节点、248 条边的 PPI 网络, 见图 1。

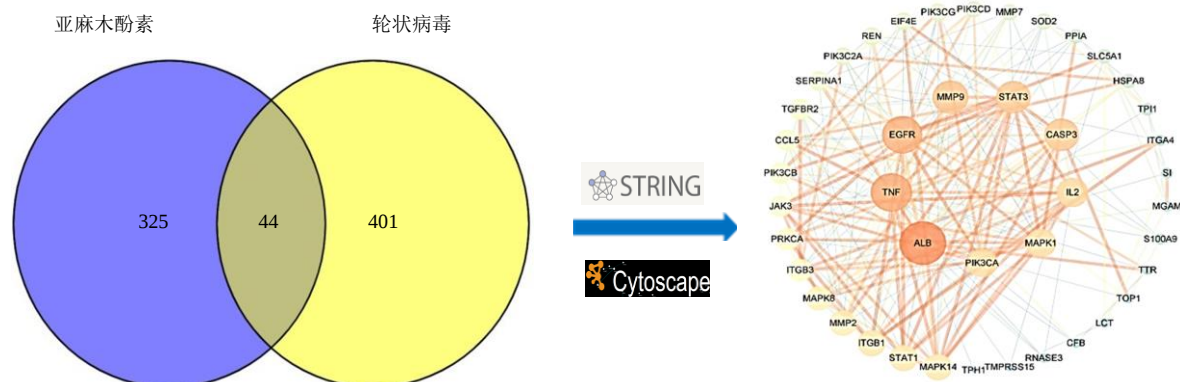


图 1 亚麻木酚素与轮状病毒的交集靶点

Fig. 1 Intersection targets of flax lignans and rotavirus

3.4 亚麻木酚素治疗轮状病毒靶点的 GO 分析

经 R 语言及 David 数据库对核心靶点进行 GO 分析, 并将前 10 位的 CC、MF、BP 筛选出来, 见图 2。GO 分析共得到 74 个 BP, P 值靠前的有磷酸化、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号转导、对外源性刺激的反应、对活动的反应、平滑肌细胞增殖的正向调控等; 115 个 CC, P 值靠前的有细胞外泌体、细胞外间隙、磷脂酰肌醇 3-激酶复合物、胞外区、磷脂酰肌醇 3-激酶复合物-1A 类等; 98 个 MF, P 值靠前的有 1-磷脂酰肌醇-4-磷酸 3-激酶活性、1-磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶活性、1-磷脂酰肌醇 3-激酶活性、酶结合、ATP 结合等。

3.5 KEGG 富集分析

利用 Metascape 数据库对交集靶点进行 KEGG 富集分析。结果显示, 这 44 个关键靶点参与了 144 条通路, 在微生信平台中构建富集分析气泡图, 见图 3。KEGG 富集分析结果显示共同的靶点主要富集在 TNF 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、FoxO 信号通路、Toll 样受体等信号通路上。

3.6 亚麻木酚素治疗轮状病毒的“靶点 - 通路”网络图的构建

为了进一步说明关键 KEGG 通路 with 相应靶点

之间的关系, 根据 P 值大小构建了“靶点 - 通路”图, 见图 4。

3.7 分子对接验证

筛选 PPI 网络中 degree 值排名前 10 位的靶点白蛋白 (ALB)、肿瘤坏死因子 (TNF)、表皮生长因子受体 (EGFR)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、信号转导子和转录激活子 3 (STAT3)、白细胞介素-2 (IL-2)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK) 1、磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚单位 α (PIK3CA)、MAPK14 作为对接受体。一般认为, 配体和受体的结合构象越稳定, 结合越强, 能量越低^[23]。用 Pymol 和 AutoDock 软件对其结构进行加氢、去水预处理及可视化处理, 如图 5 所示, 各靶点与亚麻木酚素靶点的分子结合能均小于 0, 表明亚麻木酚素能稳定对接到每个蛋白结构的活性口袋中。

4 体外实验研究结果

4.1 轮状病毒的培养与扩增

如图 6 所示, 正常的 MA104 细胞在显微镜下观察为短梭形或不规则圆形, 细胞轮廓明显, 细胞间排列紧密。当 RV 感染 MA104 细胞后, 镜下观察到细胞发生空泡化, 细胞拉长变形, 感染末期, 大

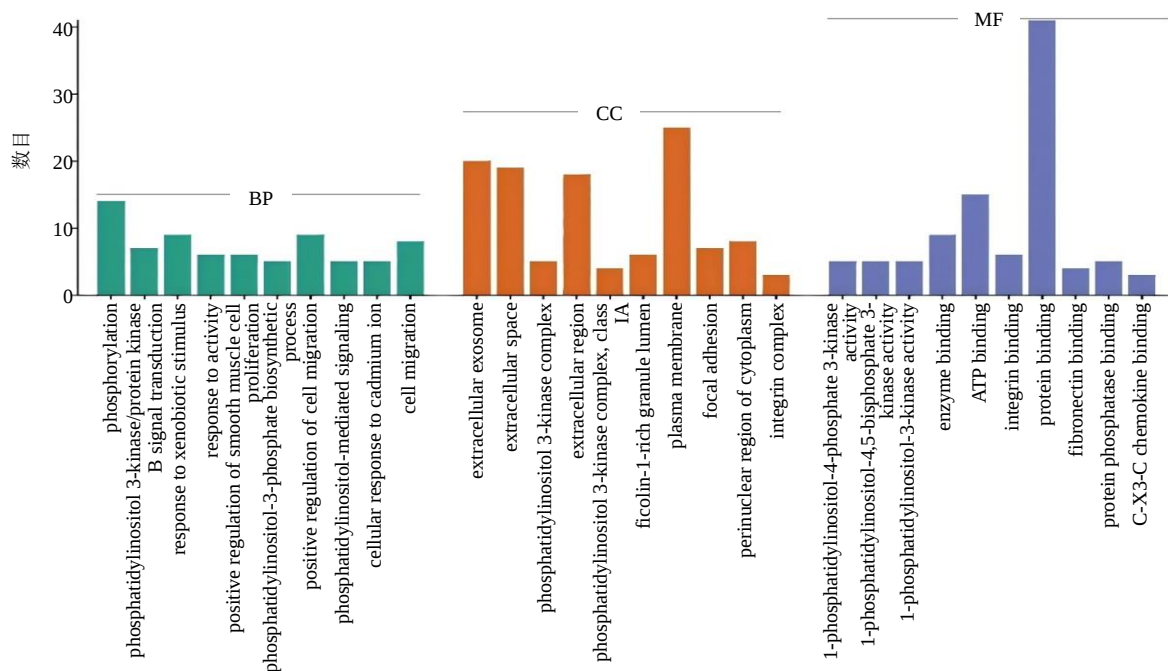


图 2 亚麻木酚素治疗轮状病毒靶点的 GO 分析

Fig. 2 GO analysis of rotavirus targets treated with flax lignans

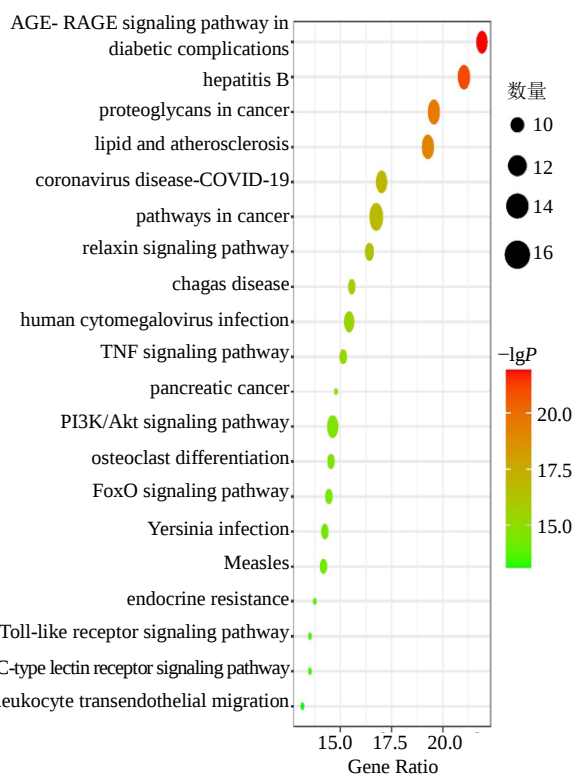


图 3 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 3 Bubble map of KEGG channel enrichment analysis

量细胞漂浮在培养基中。当 CPE +++ ~++++ 时收集病毒，此时的病毒活性强。

4.2 病毒滴度测定

根据 Reed-Muench 公式计算得出 RV 的滴度为

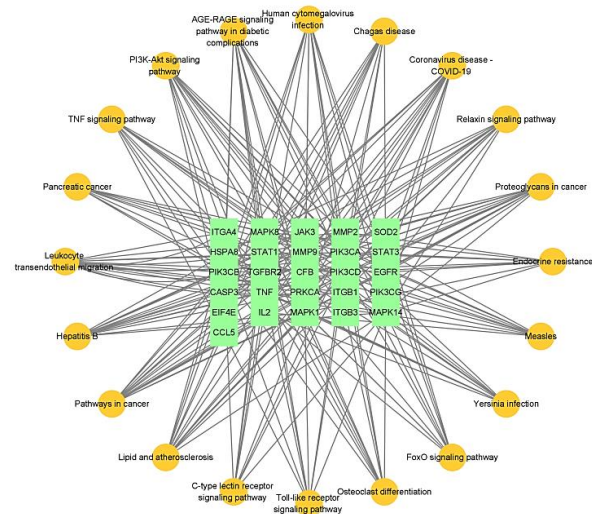


图 4 “靶点-通路”网络图

Fig. 4 “Target-pathway” network diagram

$10^{-3.81}$ TCID₅₀/0.1 mL, 见表 2。

4.3 亚麻木酚素的细胞毒性实验

亚麻木酚素对 MA104 的细胞毒性作用如图 7 所示。结果表明, 亚麻木酚素的安全浓度为 0.5~4 $\mu\text{mol/L}$, 此时细胞存活率均达到 95% 以上。

4.4 亚麻木酚素抗轮状病毒的 3 种作用

采用轮状病毒感染 MA104 细胞模型进行亚麻木酚素抗轮状病毒的 3 种作用研究, 见图 8。

4.4.1 抗轮状病毒吸附作用 轮状病毒感染的

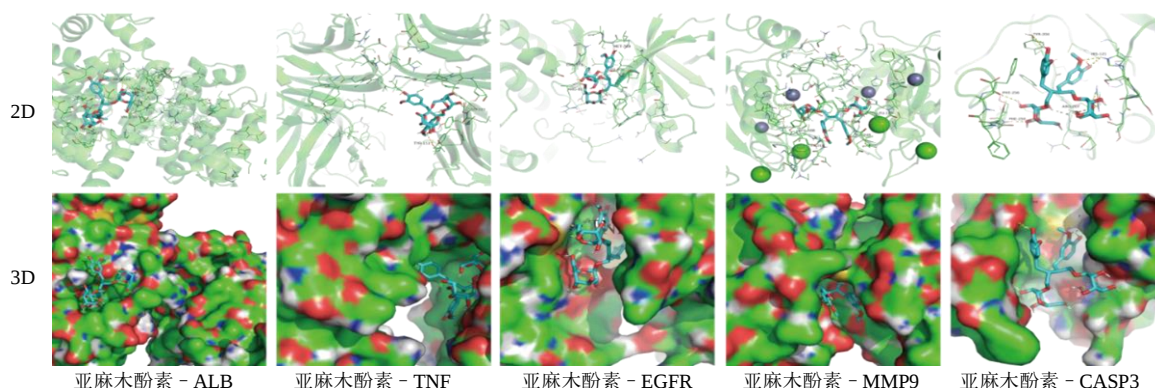


图 5 亚麻木酚素靶点 - 靶蛋白分子对接结果示意图

Fig. 5 Schematic diagram of flax lignans-target protein molecular docking results

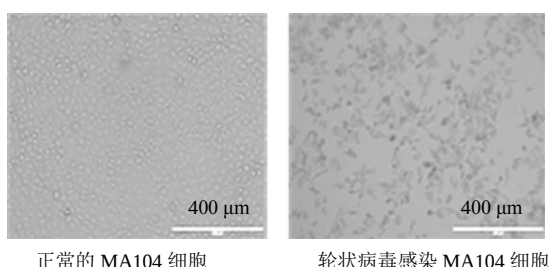


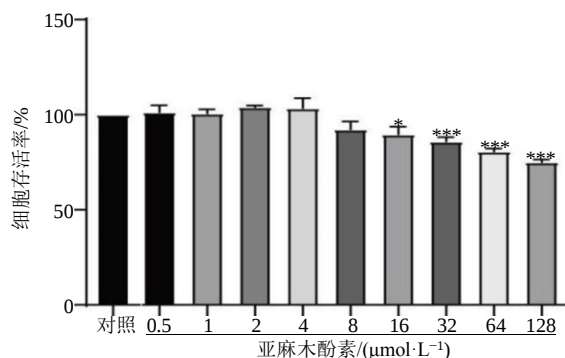
图 6 轮状病毒感染 MA104 细胞的病变情况 (×10)

Fig. 6 Rotavirus infection in MA104 cells (×10)

表 2 不同稀释度轮状病毒感染 MA104 细胞的病变情况

Table 2 Pathological changes of MA104 cells infected by rotavirus in different dilutions

RV 稀释度	CPE 比率	CPE +	CPE -	累积总计		
				CPE +	CPE -	CPE 百分率/%
10 ⁻¹	9/9	9	0	30	0	100.0
10 ⁻²	9/9	9	0	21	0	100.0
10 ⁻³	7/9	7	2	12	2	85.7
10 ⁻⁴	4/9	4	5	5	7	41.7
10 ⁻⁵	1/9	1	8	1	15	6.3
10 ⁻⁶	0/9	0	9	0	24	0.0



与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 7 亚麻木酚素对 MA104 细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of flax lignans on cytotoxicity of MA104

($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

MA104 细胞模型上, 亚麻木酚素在 0.5~4.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 与利巴韦林组相比, 亚麻木酚素各浓度组病毒抑制率较低 ($P < 0.001$), 表明亚麻木酚素无抗轮状病毒吸附作用。

4.4.2 直接抑制轮状病毒作用 轮状病毒感染的 MA104 细胞模型上, 亚麻木酚素 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组的病毒抑制率最高达到 35.46%, 但作用效果不如利巴韦林 ($P < 0.001$), 表明亚麻木酚素无明显直接抑制轮状病毒作用。

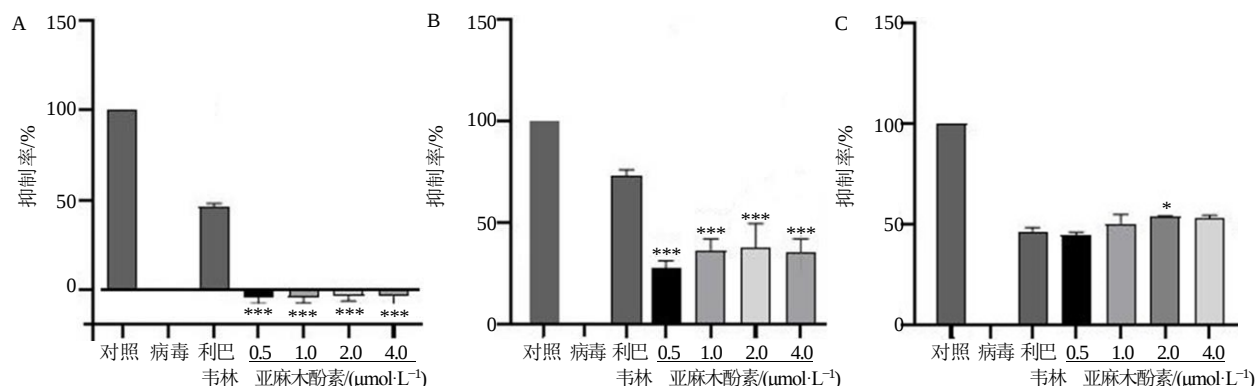
4.4.3 抗轮状病毒生物合成作用 亚麻木酚素 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组病毒抑制率与利巴韦林组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其他亚麻木酚素浓度组抗轮状病毒生物合成效果与利巴韦林相当, 表明亚麻木酚素具有较明显的抗轮状病毒生物合成作用。

4.5 间接免疫荧光测定

荧光染色结果见图 9, 与病毒组相比, 亚麻木酚素组轮状病毒 VP6 数量明显减少 ($P < 0.001$)。表明亚麻木酚素抑制了细胞中轮状病毒的复制和病毒蛋白的合成。

4.6 亚麻木酚素对 VP6、PIK3CA、Akt1、FoxO1 基因表达的影响

结果如图 10 所示, 对照组未检测到 VP6 基因



A-亚麻木酚素抗轮状病毒吸附作用, B-亚麻木酚素直接抑制轮状病毒作用, C-亚麻木酚素抗轮状病毒生物合成作用; 与利巴韦林组比较: $*P < 0.05$ $***P < 0.001$ 。

A-flax lignans inhibit rotavirus adsorption, B-flax lignans directly inhibit rotavirus action, C-flax lignans inhibit rotavirus biosynthesis; $*P < 0.05$ $***P < 0.001$ vs ribavirin group.

图 8 亚麻木酚素抗轮状病毒作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Antirotavirus effect of flax lignans ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

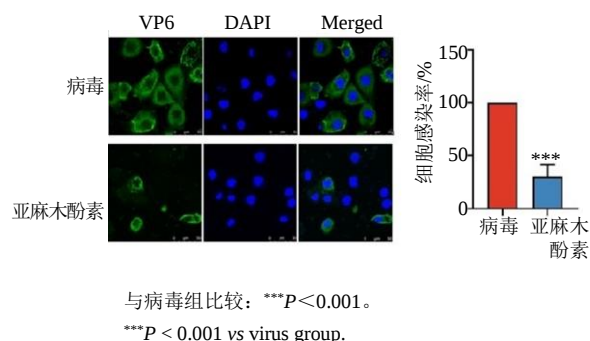


图 9 亚麻木酚素抗轮状病毒免疫荧光染色图 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Immunofluorescence staining of flax lignans against rotavirus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

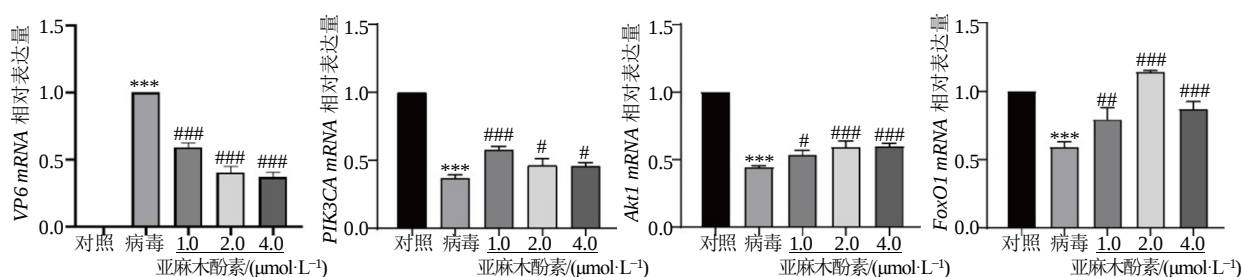
的存在, 与病毒组相比, 亚麻木酚素 1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 VP6 mRNA 表达量明显降低, *PIK3CA*、*Akt1*、*FoxO1* mRNA 表达量明显上调 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

4.7 亚麻木酚素对 VP6、PI3K、Akt、FoxO1 蛋白相对表达的影响

结果如图 11 所示, 与病毒组比较, 亚麻木酚素可显著上调 p-PI3K、p-Akt、p-FoxO1 蛋白表达, 降低 VP6 的蛋白表达量 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

4.8 MDA、GSH 含量的测定

图 12 可知, 与对照组相比, 病毒组 MDA 含量



与对照组比较: $***P < 0.001$; 与病毒组比较: $\#P < 0.05$ $\#\#P < 0.01$ $\#\#\#P < 0.001$ 。
 $***P < 0.001$ vs control group; $\#P < 0.05$ $\#\#P < 0.01$ $\#\#\#P < 0.001$ vs virus group.

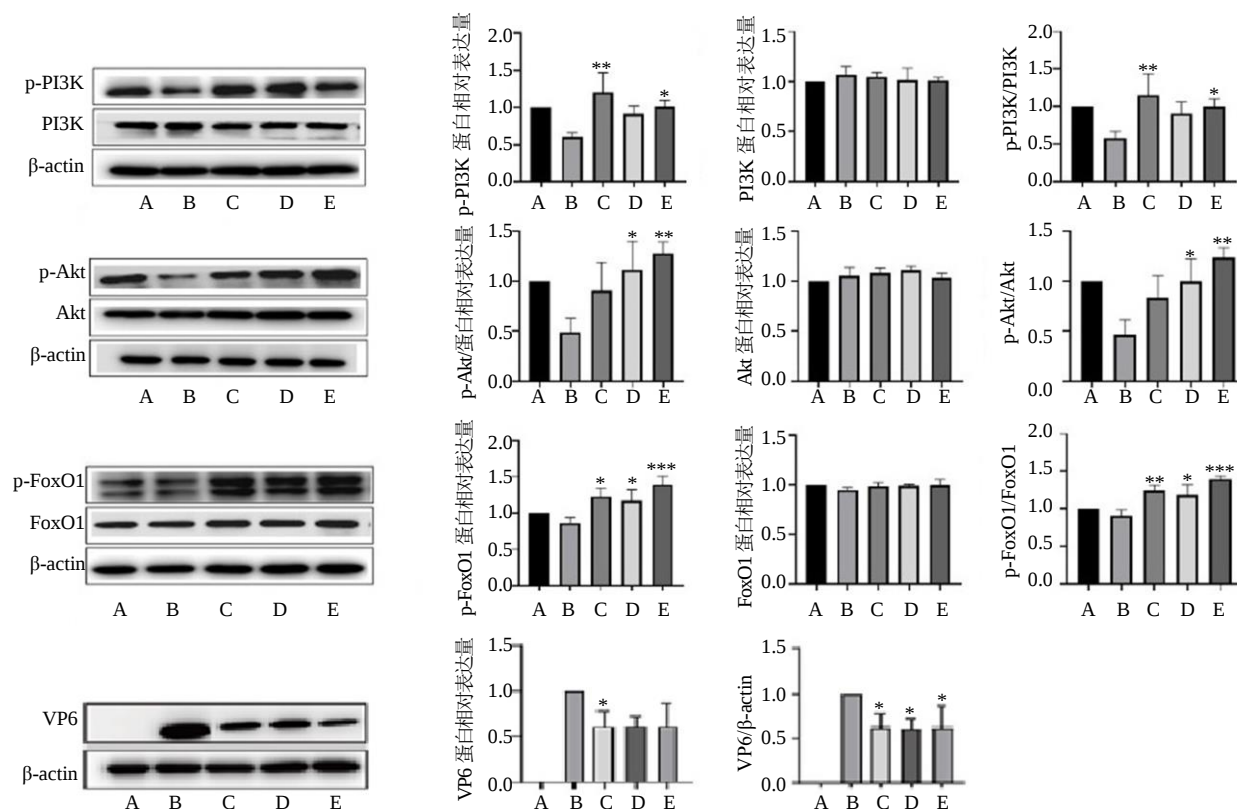
图 10 亚麻木酚素对 VP6、PIK3CA、Akt1、FoxO1 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of flax lignans on the expression of VP6, PIK3CA, Akt1, and FoxO1 genes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

显著升高, 而 GSH 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001); 与病毒组相比, 亚麻木酚素 2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 MDA 含量显著降低, 而 GSH 含量显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

5 讨论

轮状病毒感染的发病机制复杂, 已有研究报道, 轮状病毒主要通过侵犯小肠细胞绒毛引起腹泻等症状^[24]。但越来越多实验证明, 轮状病毒感染人

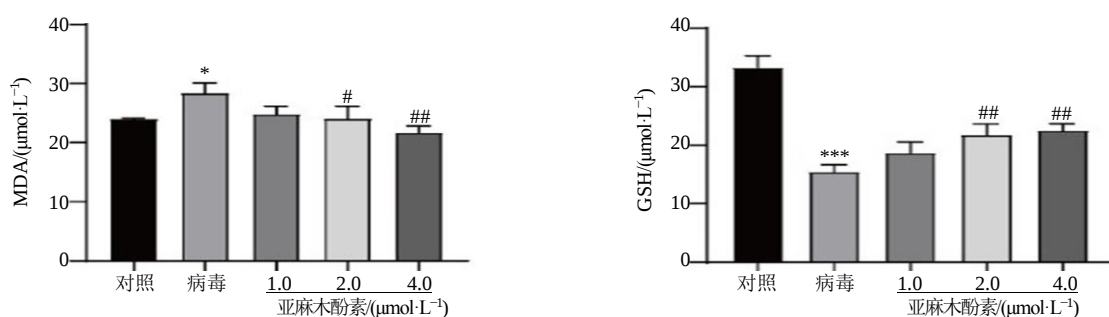


A-对照, B-病毒, C-亚麻木酚素 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, D-亚麻木酚素 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, E-亚麻木酚素 4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 与病毒组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-control, B-virus, C-flax lignans 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, D-flax lignans 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, E-flax lignans 4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs virus group.

图 11 亚麻木酚素对 VP6、PI3K、Akt、FoxO1 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 11 Effect of flax lignans on the expression of VP6, PIK3CA, Akt1, and FoxO1 protein ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与病毒组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs virus group.

图 12 亚麻木酚素对 MDA、GSH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Effect of flax lignans on MDA and GSH content ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

或动物后不只局限于肠内, 对大脑、心脏、肝脏、肺、肾脏等多种肠外器官也存在严重致病作用^[25], 相关致病机制尚不清楚。同时随着生物信息学的发展, 网络药理学越来越多的应用于药物抗病毒的作

用机制研究^[26-28], 为全面、整体分析药物抗轮状病毒的作用机制提供了新的手段。本实验通过建立轮状病毒感染 MA104 细胞模型, 发现亚麻木酚素在轮状病毒感染的 MA104 细胞模型上具有抗轮状病

毒生物合成作用,无明显抗轮状病毒吸附和直接抑制轮状病毒作用。VP6作为轮状病毒主要结构蛋白,可以维持病毒粒子的稳定性,在轮状病毒的复制、装配过程中起到重要作用^[29]。本研究结果显示亚麻木酚素可以抑制 MA104 细胞中 VP6 病毒粒子的表达量。

本实验结合中药多靶点、多通路的特点,采用网络药理学方法预测了亚麻木酚素抗轮状病毒的潜在机制与炎症、免疫反应、氧化应激、细胞增殖和凋亡等密切相关,尤其与细胞氧化应激^[30]。病毒感染会导致氧化应激的发生,这对揭示病毒的生命周期和病毒性疾病的发病机制至关重要^[31-32]。早期研究表明,在轮状病毒感染小鼠的肠道匀浆中,SOD 和谷胱甘肽过氧化酶活性下降,表明存在氧化应激现象^[31]。亚麻木酚素因含有酚羟基而表现出良好的抗氧化特性,本研究结果也表明,亚麻木酚素可通过抗氧化应激发挥抗轮状病毒的作用,深入机制值得进一步探讨。

总之,本研究结合网络药理学、分子对接以及实验验证了亚麻木酚素体外具有抗轮状病毒生物合成作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周若夏,宋丽军,施晓莹,等.白术内酯 I、II、III 体外抗轮状病毒作用研究[J].中草药,2019,50(1):104-110.
- [2] Hasso-Agopsowicz M, Ladva C N, Lopman B, et al. Global review of the age distribution of rotavirus disease in children aged 5 years before the introduction of rotavirus vaccination [J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 69(6): 1071-1078.
- [3] Song L J, Wang X T, Zhong P C, et al. Host miR-4301 promotes rotavirus replication via PPP1R3D in Caco-2 cells [J]. *J Med Virol*, 2021, 93(11): 6210-6219.
- [4] Burke R M, Tate J E, Parashar U D. Global experience with rotavirus vaccines [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224(12 Suppl 2): S792-S800.
- [5] Burnett E, Parashar U D, Tate J E. Real-world effectiveness of rotavirus vaccines, 2006-19: A literature review and meta-analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(9): e1195-e1202.
- [6] Donato C M, Bines J E. Rotaviruses and rotavirus vaccines [J]. *Pathogens*, 2021, 10(8): 959.
- [7] Churgay C A, Aftab Z. Gastroenteritis in children: Part II. Prevention and management [J]. *Am Fam Physician*, 2012, 85(11): 1066-1070.
- [8] Donovan S M, Comstock S S. Human milk oligosaccharides influence neonatal mucosal and systemic immunity [J]. *Ann Nutr Metab*, 2016, 69(Suppl 2): 42-51.
- [9] 王尉,贺天雨,赵新颖,等.高纯度亚麻木酚素的分离纯化和分析[J].食品科学,2019,40(8):149-154.
- [10] Huang H H, Liao D, Liang L P, et al. Genistein inhibits rotavirus replication and upregulates AQP4 expression in rotavirus-infected Caco-2 cells [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(6): 1421-1433.
- [11] Chen T, Lin Y J, Cao Z Q, et al. Network pharmacology analysis and experimental study strategy reveals the potential mechanism of puerarin against rotavirus [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(1): 14.
- [12] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [13] Liu X F, Ouyang S S, Yu B, et al. PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue): W609-W614.
- [14] Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(23): 3073-3079.
- [15] Consortium U. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D506-D515.
- [16] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, et al. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D789-D798.
- [17] Piñero J, Bravo À, Queralt-Rosinach N, et al. DisGeNET: A comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D833-D839.
- [18] Safran M, Dalah I, Alexander J, et al. GeneCards Version 3: The human gene integrator [J]. *Database*, 2010, 2010: baq020.
- [19] Szklarczyk D, Gable A L, Nastou K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612.
- [20] Berman H M, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 235-242.
- [21] Kim S, Chen J, Cheng T J, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces [J]. *Nucleic*

- Acids Res*, 2021, 49(D1): D1388-D1395.
- [22] 傅继华. 病毒学实用实验技术 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 62-64.
- [23] Hu Y L, Liu S, Liu W Y, *et al.* Potential molecular mechanism of yishen capsule in the treatment of diabetic nephropathy based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2022, 15: 943-962.
- [24] 范佳欣, 李丹地. 轮状病毒肠道外感染研究进展 [J]. 疾病监测, 2021, 36(8): 785-788.
- [25] Ramig R F. Systemic rotavirus infection [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2007, 5(4): 591-612.
- [26] Li J J, Zhang K, Bao J M, *et al.* Potential mechanism of action of Jing Fang Bai Du San in the treatment of COVID-19 using docking and network pharmacology [J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(2): 213-224.
- [27] Zhang H, Gao M H, Chen Y, *et al.* Network pharmacology-based systematic analysis of molecular mechanisms of *Geranium wilfordii* maxim for HSV-2 infection [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 1009551.
- [28] Cao X, Chen H N, Li Z G, *et al.* Network pharmacology and in vitro experiments-based strategy to investigate the mechanisms of KangXianYiAi formula for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 985084.
- [29] 王奕斐, 洪大林, 米雪, 等. 猪轮状病毒 VP4、VP6 蛋白原核表达及多克隆抗体的制备 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42(11): 2171-2180.
- [30] Lee C. Therapeutic modulation of virus-induced oxidative stress via the Nrf2-dependent antioxidative pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 6208067.
- [31] 黎祖鸣, 封杰妮, 陈雪如, 等. 基于单细胞转录组探讨新型冠状病毒感染后慢性疲劳综合征与炎症反应、氧化应激、细胞凋亡之间分子机制及其潜在干预中药预测 [J]. 中草药, 2024, 55(11): 3774-3788.
- [32] Sodhi C P, Katyal R, Rana S V, *et al.* Study of oxidative-stress in rotavirus infected infant mice [J]. *Indian J Med Res*, 1996, 104: 245-249.

[责任编辑 高源]