

基于生物信息学与分子动力学模拟探讨连花清瘟方治疗流行性感冒的作用机制

陈思敏¹, 李伟煊¹, 张东剑¹, 许海钧¹, 杨小燕¹, 李旭洪¹, 巫祖强¹, 叶林虎^{1,2*}

1. 华南理工大学附属第六医院 药学部, 广东 佛山 528200

2. 遵义医科大学, 贵州 遵义 563000

摘要: **目的** 通过生物信息学和分子动力学模拟探讨连花清瘟方的体内成分治疗流行性感冒的关键靶点和作用机制。**方法** 查阅文献筛选连花清瘟方体内暴露量较大的成分, 并结合 TCMSP 数据库获取连花清瘟方潜在的活性成分, 通过 SwissTargetPrediction 和 Super-PRED 数据库收集相关靶点。通过 GEO、GeneCards、Drugbank 数据库收集流行性感冒的作用靶点, 进一步获得连花清瘟治疗流感的潜在靶标, 构建“成分-疾病-靶点”网络。使用 STRING 数据库对潜在靶标进行蛋白互作分析, 利用 DAVID 数据库进行基因本体 (GO) 功能富集和基因百科全书 (KEGG) 通路富集。最后采用 Autodock 软件进行分子对接验证, 采用 GROMACS v2020.6 软件对分子对接复合物进行分子动力学模拟。**结果** 共筛选出连花清瘟方活性成分 25 个和 520 个相关靶点, 收集到与流感相关的作用靶点 3 255 个, 取交集后得到连花清瘟治疗流感的潜在作用靶点 244 个, 其中类固醇受体辅激活因子 (SRC)、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)、磷酸肌醇-3-激酶调节亚基 1 (PIK3R1)、表皮生长因子受体 (EGFR) 等为关键靶标, 主要涉及 Th17 细胞分化、T 细胞受体信号通路、PI3K/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路等炎症信号通路。分子对接结果显示 SRC 为最关键的作用靶标, 与各活性成分的结合能力最强。分子动力学模拟结果显示绿原酸-SRC 复合物结合稳定。**结论** 连花清瘟方可能通过绿原酸、大黄酸、苦杏仁苷、连翘酯苷 A 等活性成分调控 SRC、STAT3 等靶点发挥治疗流行性感冒的作用, 与介导 Th17 细胞分化、T 细胞受体信号通路等炎症信号通路有关, 为临床应用与研究提供理论基础。

关键词: 连花清瘟方; 生物信息学; 流行性感冒; 分子动力学模拟; 绿原酸; 大黄酸; 苦杏仁苷; 连翘酯苷 A; 类固醇受体辅激活因子

中图分类号: R286.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)10-2426-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.10.003

Mechanism of Lianhua Qingwen formula in treatment of influenza based on bioinformatics analysis and molecular dynamics simulation

CHEN Simin¹, LI Weixuan¹, ZHANG Dongjian¹, XU Haijun¹, YANG Xiaoyan¹, LI Xuhong¹, WU Zuqiang¹, YE Linhu^{1,2}

1. Department of Pharmacy, The Sixth Affiliated Hospital of South China University of Technology, Foshan 528200, China

2. Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Abstract: Objective To explore the key targets and mechanism of Lianhua Qingwen formula absorbed components in treatment of influenza by bioinformatics analysis and molecular dynamics simulation. **Methods** The literature was reviewed to search the components with high exposure of Lianhua Qingwen formula *in vivo* as potential active ingredients of Lianhua Qingwen formula combined with the TCMSP database, and relevant targets were collected through SwissTargetPrediction and Super-PRED database. The targets of influenza were collected from GEO, GeneCards, and Drugbank databases, further the potential targets of Lianhua Qingwen formula in treatment of influenza were obtained. A network of “ingredient-disease-target” was constructed. Protein-protein interactions were analyzed for potential targets using the STRING database. GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment

投稿日期: 2025-08-03

基金项目: 佛山市卫生健康局医学科研课题 (20240050); 佛山市“十四五”医学重点专科项目 (FS2D145035); 佛山市工程技术研究中心项目

作者简介: 陈思敏, 硕士, 从事临床中药学研究。E-mail: lychemsm@scut.edu.cn

*通信作者: 叶林虎, 博士, 主任药师, 硕士生导师, 从事医院药学研究。E-mail: yelinhu@126.com

were performed using the DAVID database. Autodock software was used for molecular docking validation and GROMACS v2020.6 software was used for molecular dynamics simulation of molecular docking complexes. **Results** A total of 25 active ingredients of Lianhua Qingwen formula and 520 related targets were screened, and 3255 targets related to influenza were collected. A total of 244 potential targets of Lianhua Qingwen formula in treatment of influenza were obtained after taking the intersection, among which SRC, STAT3, PIK3R1, PIK3CA, and EGFR were the key targets. The above targets are mainly related to the differentiation of Th17 cells, the T-cell receptor signaling pathway, PI3K/Akt signaling pathway, TNF signaling pathway and other inflammatory signaling pathways. The molecular docking results showed that SRC was the most critical target, which had the strongest binding ability with each active ingredient, and the molecular dynamics simulation results showed that the SRC-chlorogenic acid complex was stable in binding. **Conclusion** Lianhua Qingwen formula may exert effects on influenza through the modulation of SRC, STAT3 and other targets by active ingredients such as chlorogenic acid, rhein, amygdalin, and forsythoside A. It is associated with inflammatory signaling pathways such as Th17 cell differentiation and T cell receptor signaling pathways. This study provides a theoretical basis for the follow-up research. **Key words:** Lianhua Qingwen formula; bioinformatics; influenza; molecular dynamics simulation; chlorogenic acid; rhein; amygdalin; forsythoside A; SRC

流行性感冒是一类由流感病毒引起的传染病，其症状表现为高热、肌肉酸痛、头痛、咽痛、鼻塞流涕等，甚至可能会引起病毒性肺炎。流行性感冒传染性极高，其中甲型流感病毒（IVA）常引发区域大流行，据统计，全球每年流感导致约超过 300 万例危重症病例^[1]。中医将流行性感冒归属为疫病中的一种，疫毒从口鼻而入，肺是主要受邪之处，肺失宣降，导致气道壅滞，呼吸不畅；疫毒袭肺，损伤正气，机体防御功能下降，激活免疫反应，热毒内生炼液成痰，痰涎壅堵，导致呼吸功能障碍^[2-3]。

莲花清瘟组方由麻杏甘石汤、银翘散为基础方加减而成，配伍大黄，在此基础上加入绵马贯众、板蓝根、鱼腥草、广藿香以及红景天^[4]。莲花清瘟方具有清瘟解毒、宣肺泄热的功效，在临床上用于热毒袭肺证，症见发热或高热、恶寒、肌肉酸痛、鼻塞流涕，舌偏红、苔黄或黄腻等。流行性感冒属中医辨证中热毒袭肺证的范畴，主要治法治则为清肺解毒、宣肺化痰，这与莲花清瘟方的功能主治一致^[5-6]。莲花清瘟全方清热与辛温兼备，解毒与芳化并用，扶正与通腑同施，符合中医对疫毒的治疗思路。

生物信息学是对大量生物信息数据进行有效处理、挖掘分析及可视化呈现的重要手段，在感染性疾病的中医药防治方面，尤其是针对流感病毒，生物信息学分析为揭示中药的抗病毒作用机制与物质基础提供了重要支持^[7-8]。应用莲花清瘟胶囊/颗粒治疗流行性感冒在临床上具有确切的治疗效果。因此本研究采用生物信息学方法挖掘莲花清瘟方治疗流行性感冒的作用机制，并采用分子对接技术和分子动力学模拟方法进行进一步的验证，以期

为莲花清瘟方的临床应用提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 莲花清瘟方活性成分的筛选及相关靶点的预测

本研究以莲花清瘟方在人体内成分为基础，口服莲花清瘟方后，检索同时暴露于人体血清和尿液且暴露量较高的化学成分^[9-10]，同时使用 TCMSP 数据库（<http://tcmsp.com/>）筛选口服利用度（OB）≥ 30%和类药性（DL）≥ 0.18 的成分，结合文献报道的成分进行补充^[11-12]，筛选出符合条件的成分作为莲花清瘟方的潜在活性成分。通过 SwissTarget Prediction 数据库（<http://swisstargetprediction.ch/>）和 Super-PRED 数据库（<https://prediction.charite.de/>）预测上述成分的相关靶点，将 2 个数据库的靶点合并，去除重复靶点，得到莲花清瘟方活性成分相关靶点。

1.2 流行性感冒相关靶点的收集

在 GEO 数据库（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>）中以“influenza”为关键词进行检索，筛选出 GSE21802 和 GSE185576 数据集，均为人类样本，样本数量大于 10，包含正常与疾病样本，采用 GEO2R 对数据集进行数据分析，以 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1.5$ 为条件，获取健康者与流感患者的差异表达基因。使用 GeneCards 数据库（<https://www.genecards.org/>）和 Drugbank 数据库（<https://go.drugbank.com/>），以流行性感冒及其典型临床症状作为关键词，输入“influenza”“hyperthermia”“muscle soreness”“sore throat”进行检索，收集与疾病相关靶点。将上述所有与流行性感冒相关的靶点进行整合，删除冗余靶点，并将靶点名称转化为具有唯一 Uniprot ID 的基因名。

1.3 “成分-疾病-靶点”网络的构建

将连花清瘟方潜在活性成分相关靶点、与流感相关的所有靶点导入在线平台 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 绘制韦恩图, 获得连花清瘟治疗流行性感冒的潜在作用靶点。将潜在作用靶点、连花清瘟方活性成分及流行性感冒导入 Cytoscape 3.9.1 软件中, 构建“成分-疾病-靶点”网络。

1.4 连花清瘟方治疗流行性感冒潜在作用靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络的构建

将连花清瘟方治疗流行性感冒的潜在作用靶点导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 选择物种为“homo sapiens”, 设定最小相互作用阈值为 0.9, 获得 PPI 网络, 结果以 TSV 格式导出后, 使用 Cytoscape 3.9.1 软件对其进行可视化, 计算网络中每个节点的 degree 值, 以 degree 值对所有蛋白的重要程度进行排序。

1.5 基因本体 (GO) 功能富集和基因百科全书 (KEGG) 富集分析

将连花清瘟方治疗流行性感冒的潜在作用靶点导入 DAVID 数据库 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>), 选择识别符号为 GENE SYMBOL, 物种为 homo sapiens, 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路分析。选择排名前 10 位 GO 功能富集结果和排名前 20 位 KEGG 信号通路结果, 使用微生物信在线平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 对结果进行可视化, 输出 KEGG 富集气泡图和 GO 功能分析柱状图。

1.6 连花清瘟方关键成分与核心靶点的分子对接

从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载连花清瘟方关键成分的 sdf 格式文件, 利用 Open Babel 软件转化为 pdb 格式。通过 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载核心靶点的三维结构, 并使用 PyMOL 软件对其进行去除水分子、去除配体残基等操作。采用 Autodock 1.5.6 软件对蛋白进行加氢、计算电荷数等处理, 保存为 pdbqt 格式文件, 进而对蛋白与关键成分进行分子对接, 设置对接迭代次数为 50 次, 获取结合能并根据结合情况判断结合紧密性, 采用 PyMOL 软件对最优构象模型进行可视化。

1.7 分子动力学模拟

为了验证分子对接结果的合理性与稳定性, 将分子对接得到的最优构象选择为初始结构, 采用

GROMACS v2020.6 软件对复合物进行 10000 ps 的分子动力学 (MD) 模拟。力场采用 CHARMM36, 首先准备蛋白和配体拓扑文件, 再构建复合物拓扑文件, 使用 TIP3P 水模型水解复合物, 置于立方体水盒子中, 蛋白质原子距离水盒子边缘最近距离至少 1 nm, 添加适当的离子模拟系统电荷。采用最陡峭下降算法进行能量最小化, 最大步数设为 50000 步, 随后在等温等容系统 (NVT) 中进行 5 ns 的平衡, 体系温度从 0 K 缓慢升温至 300 K, 进行温度耦合。在等温等压 (NPT) 系统中再次进行 5 ns 的平衡, 保持恒温 (300 K) 和恒压 (1.0 bar) 对压力进行耦合。完成平衡后执行 10 000 ps 的分子动力学模拟。根据动力学模拟结果计算复合物均方根偏差 (RMSD)、均方根波动 (RMSF)、回旋半径 (Rg) 和溶剂可及表面积 (SASA)。

2 结果

2.1 连花清瘟体内潜在活性成分及其相关靶点

本研究共筛选出 25 个成分, 这些成分来源于麻黄、连翘、苦杏仁、金银花、红景天、甘草、大黄、板蓝根和鱼腥草, 而来源于绵马贯众的成分仅检测到绿原酸的异构体, 无法确定其结构; 石膏为矿物药, 主要成分为硫酸钙, 口服后体内成分较难检出, 多为钙离子或其他微量元素; 广藿香中的挥发油和薄荷脑具有易挥发性, 可能由于其体内暴露量太低, 本研究方法也暂未检出, 所筛选出成分的见表 1。在 SwissTargetPrediction 和 Super-PRED 数据库中预测这些成分的相关靶点, 共找到 520 个作用靶点。

2.2 流行性感冒靶点的收集

以数据集 GSE21802、GSE185576 为研究对象, 分别对这 2 个数据集中健康样本与流感患者样本进行了基因差异分析。在 GSE185576 数据集中得到了 250 个基因, 其中有 57 个差异基因; 在 GSE21802 数据集中得到了 250 个基因, 其中有 62 个差异基因, 上调及下调基因结果如图 1A 所示。从 GeneCards 数据库中获取 3 082 个与流行性感冒相关的作用靶点, 从 DrugBank 数据库中获得 155 个靶点, 合并 3 个数据库的靶点信息, 去除重复靶点, 共得到 3255 个与流行性感冒相关的作用靶点, 如图 1B 所示。

2.3 连花清瘟治疗流行性感冒的潜在作用靶点

通过连花清瘟方潜在活性成分相关靶点与流感的作用靶点取交集, 得到连花清瘟方治疗流感的

表 1 连花清瘟方潜在活性成分

Table 1 Potential active ingredients of Lianhua Qingwen formula				
MOL ID	成分名称	化学式	相对分子质量	来源
MOL006594	麻黄碱	C ₁₀ H ₁₅ NO	165.23	麻黄
MOL006637	伪麻黄碱	C ₁₀ H ₁₅ NO	165.23	麻黄
MOL009189	甲基麻黄碱	C ₁₁ H ₁₇ NO	179.26	鱼腥草
MOL001811	致甲状腺肿素	C ₅ H ₇ NOS	129.18	板蓝根
MOL000415	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.50	金银花、麻黄、甘草、连翘
MOL000701	槲皮素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.40	麻黄
MOL003341	红景天苷	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	300.30	红景天、连翘
MOL006370	新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	金银花
MOL006503	隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	金银花
MOL003871	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	金银花
MOL003022	断氧化马钱子苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	404.40	金银花
MOL000561	紫云英苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.40	连翘
MOL003336	连翘酯苷 E	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	462.40	连翘
MOL003331	连翘酯苷 A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	642.60	连翘
MOL003339	连翘酯苷 I	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.60	连翘
MOL003305	连翘苷	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	534.60	连翘
MOL003330	连翘脂素	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	372.40	连翘
MOL001320	苦杏仁苷	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	457.40	苦杏仁
MOL006221	野黑樱苷	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	295.29	苦杏仁
MOL004903	甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.40	甘草
MOL004876	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	822.90	甘草
MOL002268	大黄酸	C ₁₅ H ₈ O ₆	284.22	大黄
MOL000472	大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24	大黄
MOL001729	大黄酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.24	大黄
MOL000476	大黄素甲醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.26	大黄

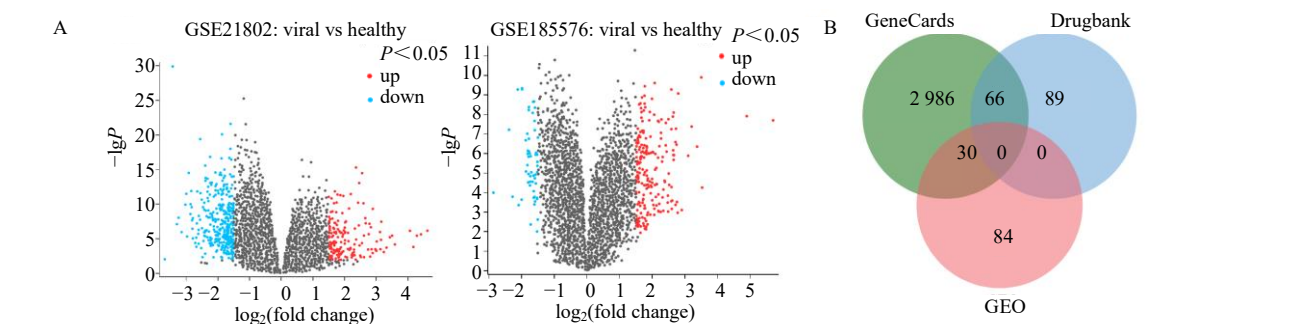


图 1 GSE21802 和 GSE185576 数据集差异基因火山图 (A) 及 GeneCards、Drugbank、GEO 数据库中与流行性感冒相关作用靶点韦恩图 (B)

Fig. 1 Differential gene volcano map of GSE21802 and GSE185576 data set (A) and Venn diagram of targets about influenza in GeneCards、Drugbank and GEO database (B)

潜在作用靶点, 共 244 个, 见图 2。将连花清瘟方活性成分、流行性感冒、连花清瘟治疗流感的潜在作用靶点及导入 Cytoscape 3.9.1 软件中, 构建“成分-疾病-靶点”网络, 见图 3, 构建了 1 个包含 280 个节点和 1 521 条边的网络。进一步采用 STRING 数据库建立蛋白互作关系, 对 degree 值排名前 100 位的靶点通过 Cytoscape 3.9.1 软件可视化, 见图 4。结果显示 PPI 网络中类固醇受体辅激



图 2 连花清瘟方与流行性感冒交集靶点韦恩图
Fig. 2 Venn diagram of intersection targets of active ingredients in Lianhua Qingwen formula and influenza

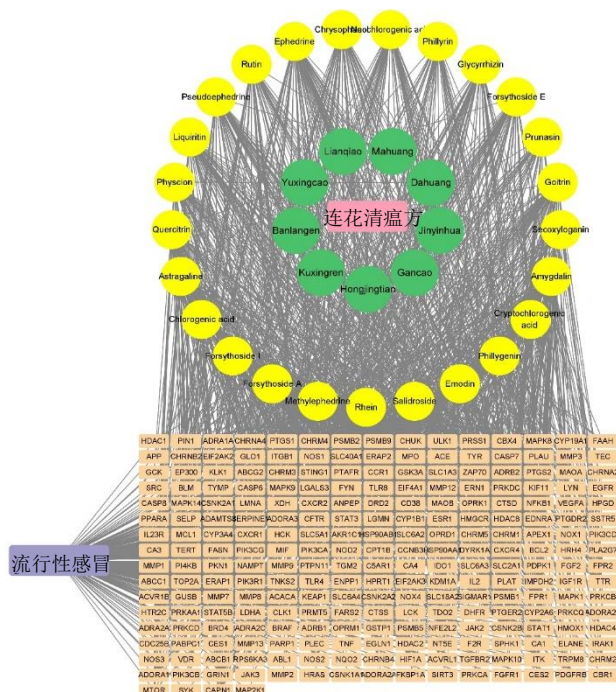


图 3 “成分-疾病-靶点”网络图
Fig. 3 Network of “ingredient-disease-target”

活因子 (SRC) 为最关键的靶点, 其次为信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)、磷酸肌醇-3-激酶调节亚基 1 (PIK3R1) 和表皮生长因子受体 (EGFR) 等, 这些靶点有可能是连花清瘟方干预流行性感冒较为重要的潜在靶标。

2.4 GO 功能分析及 KEGG 富集结果

对连花清瘟治疗流行性感冒的 244 个潜在作用靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 对 GO 生物过程 (BP)、细胞成分 (CC) 和分子功能 (MF) 前 10 个条目进行注释, 见图 5。连花清瘟方治疗流行性感冒涉及信号转导、染色质重塑、炎症反应等相关 BP; CC 与细胞质膜、细胞质基质、细胞核、外泌体等部分相关; 其 MF 主要与蛋白质结合、核苷酸结合、

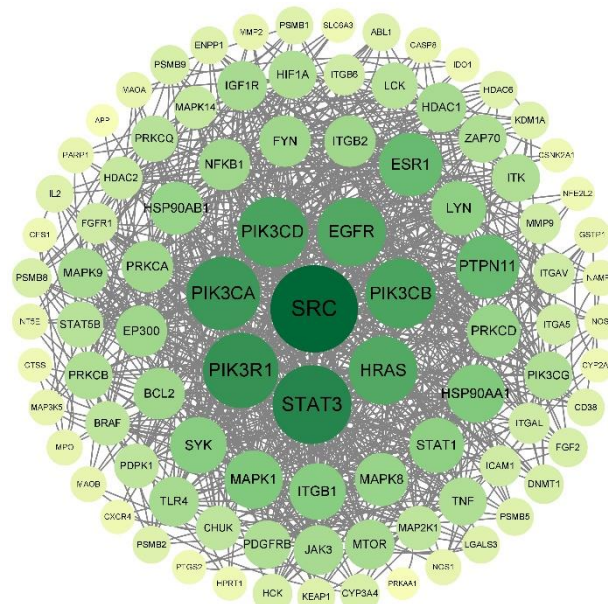


图 4 排名前 100 位的 PPI 网络图
Fig. 4 PPI network of targets in top 100

金属离子结合、丝氨酸/苏氨酸激酶活性等有关。

KEGG 富集分析共得到 180 条通路, 取排名前 20 条通路绘制气泡图, 见图 6, 主要富集的通路有鞘脂信号通路、Th17 细胞分化、T 细胞受体信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路等。

2.5 连花清瘟方活性成分与关键靶点的分子对接

通过文献调研, 苦杏仁苷^[13]、绿原酸^[14]、麻黄碱^[15]、连翘酯苷 A^[16]、大黄酒^[17]和红景天苷^[18]具有抗炎、抗病毒、抑菌、调节机体免疫等良好药理活性, 可以明确上述成分对连花清瘟方发挥药效贡献作用, 因此选择上述活性成分作为分子对接中的小分子配体。基于 PPI 网络结果, SRC 和 STAT3 为连花清瘟方治疗流行性感冒最重要的靶点, 故以 SRC 和 STAT3 作为连花清瘟方治疗流行性感冒的关键蛋白进行分子对接, 各活性成分对接结合能见表 2。

结果显示, 所有成分与靶点对接结合能均具有较强的结合亲和力, 其中所有活性成分与 SRC 的结合力最强, 以氢键相互作用为二者结合的主要作用力, 提示 SRC 在连花清瘟方治疗流行性感冒中发挥关键作用。通过 PyMOL 软件对 SRC 与各活性成分的进行可视化, 见图 7。

2.6 分子动力学模拟

由分子对接结果可知, 绿原酸-SRC 复合物具有最低结合能, 因此对其进行分子动力学模拟验证, 结果如图 8 所示。RMSD 可以反映复合物整体

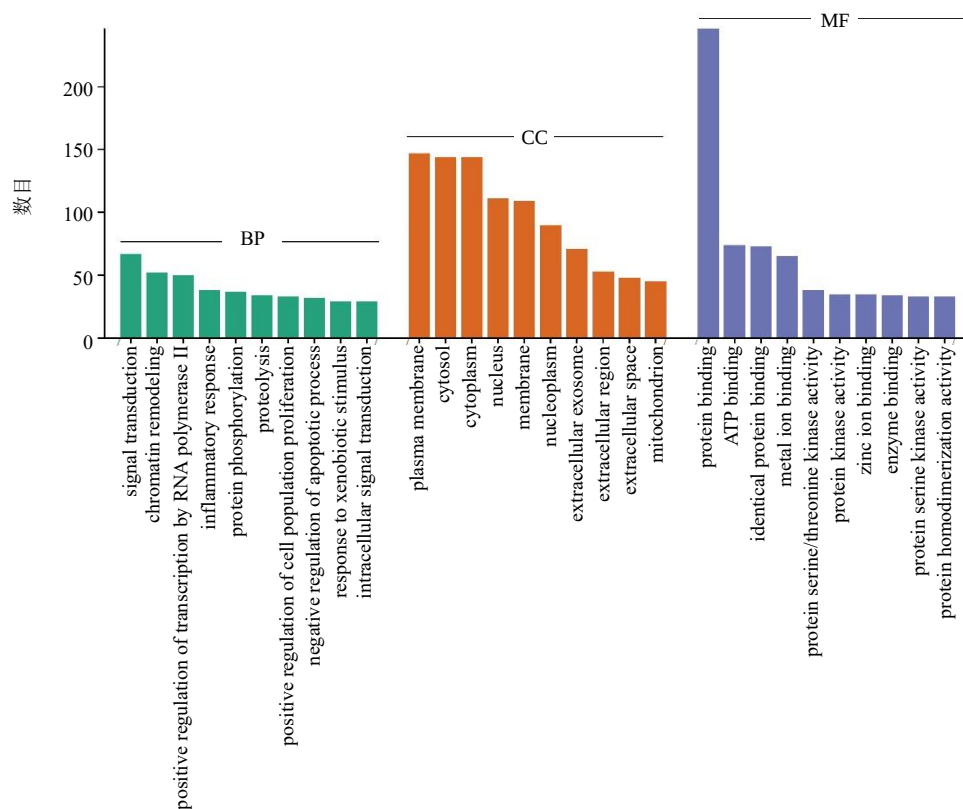


图 5 GO 生物功能分析

Fig. 5 Analysis of GO function

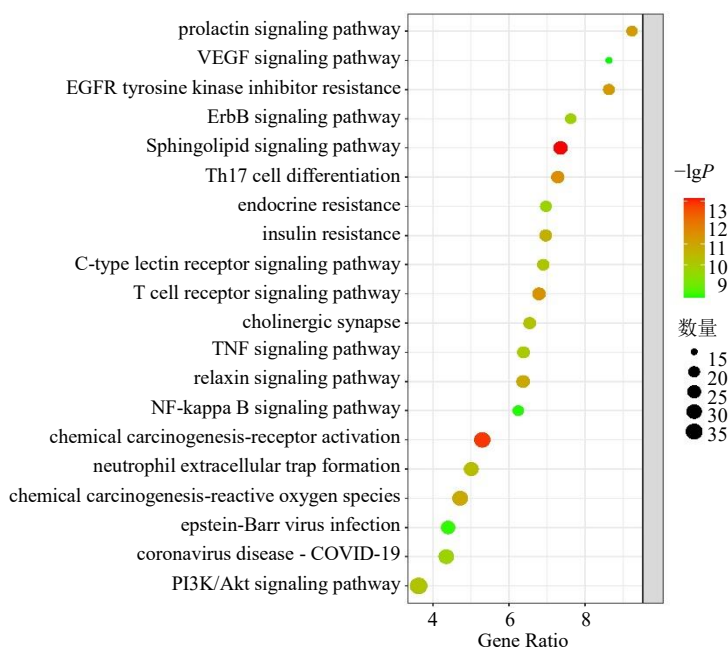


图 6 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 Enrichment analysis KEGG pathway

结构在模拟期间的变动幅度, RMSD 值越小, 表明结合物的构象变化越少, 从而指示出系统具有较高

的动态稳定性。RMSD 结果显示, 绿原酸 - SRC 复合物在 4 000 ps 后体系趋于平衡, 在 0.3~0.4 nm 稳

表 2 连花清瘟活性成分与关键靶点的对接结合能
Table 2 Docking energy of active ingredients of Lianhua Qingwen formula with key targets

成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)	
	SRC	STAT3
麻黄碱	-3.85	-1.96
连翘酯苷 A	-4.17	-1.88
苦杏仁苷	-5.30	-3.85
绿原酸	-7.80	-4.08
红景天苷	-4.37	-2.68
大黄酸	-5.37	-3.88

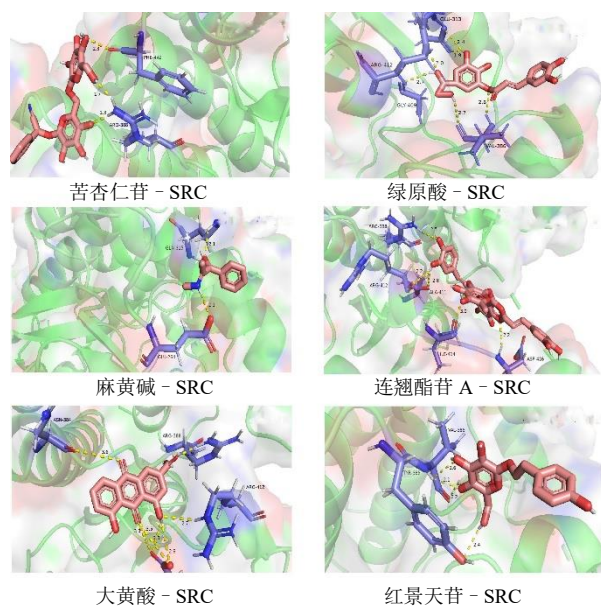


图 7 连花清瘟方活性成分与 SRC 的分子对接
Fig. 7 Molecular docking of active ingredients of Lianhua Qingwen formula with SRC

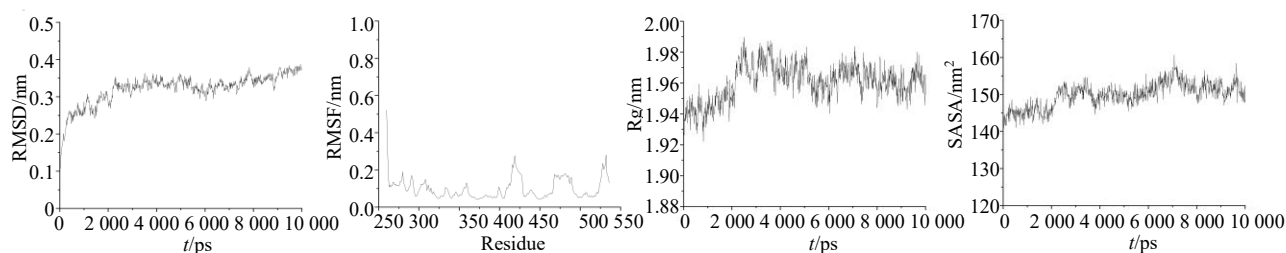


图 8 绿原酸 - SRC 复合物分子动力学模拟分析
Fig. 8 Molecular dynamics simulation analysis of chlorogenic acid - SRC complex

表明, 连花清瘟方明显提高热毒袭肺证证候疗效和体温疗效显效率, 明显减轻咽干咽痛、肌肉酸痛、咳嗽等症状, 缩短发热时间, 提高体温复常率^[20]。现代药理学研究证实连花清瘟胶囊具有广谱抗病毒的功效, 对流感病毒、SARS-CoV-2、SARS 病毒

定, 均值为 0.32 nm, 表明复合物具有高结合稳定性。Rg 分析结果显示, Rg 的均值为 1.96 nm, 波动幅度较小, 表明复合物结构稳定, 全程维持平衡状态。SASA 分析结果显示, SASA 的均值为 149.8 nm², SASA 曲线自 4 000 ps 后体系趋于平衡, 复合物结构无明显变化, 表明复合物结构紧凑稳定。RMSF 可以表示小分子配体中的每一个原子或者残基在一定时间内运动后的空间结构波动参数, 值越大则证明蛋白质的残基与小分子间越容易发生动态变化, 相关研究指出, RMSF 值在 0.1~0.3 nm 波动可表明对接复合物体系相对稳定, RMSF 结果显示, 波动范围在 0.0~0.3 nm, 其中 260~270、410~430、460~470、525~535 氨基酸残基构象变化较大, 可能存在较大柔性。以上分析结果均表明, 在 10 000 ps 的分子动力学模拟中, 绿原酸 - SRC 复合物均达到平衡状态, 表明绿原酸与靶蛋白 SRC 的结合稳定, 进一步验证分子对接结果的可靠性。

3 讨论

近年来, 流行性感冒、新型冠状病毒感染等呼吸系统类疾病频发, 甚至造成大范围流行, 极大地危害公共卫生安全。几千年来, 中医药治疗疫病早已形成了特定的体系, 如东汉张仲景六经辨治体系、清代叶天士卫气营血辨治体系、清代吴鞠通三焦辨治体系等, 连花清瘟方集两千年治疗温病经验于一体, 根据“清瘟解毒, 清肺泄热”的治法, 研制出可针对缓解呼吸道疾病发热、头痛、鼻塞流涕、咽干咽痛等症状的创新中药, 既能散外邪, 又能清里热, 对于热毒袭肺证具有显著疗效^[19]。临床试验

等呼吸道病毒均具有抑制作用^[21]。研究表明, 连花清瘟方可能通过阻断 SARS-COV-2 与血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 的结合, 进而抑制病毒的复制^[22], 发挥该药效作用的成分主要来自金银花、连翘等药物^[23]。连花清瘟方的应用体现了清而不过凉、温而

不助火、扶正不留邪、祛邪不伤正的药效特点。

Chen 等^[24]对连花清瘟方在大鼠血液中的药动学研究中明确了包括麻黄碱、连翘酯苷 A、苦杏仁苷、红景天苷等 15 个血浆中高暴露成分作为连花清瘟潜在的质量标志物。基于此,本研究筛选了连花清瘟方在人体内既能够入血又能被尿液代谢的成分作为连花清瘟方的潜在活性成分库^[9-10],这些体内高暴露的成分来源于麻黄、连翘、苦杏仁、金银花、红景天、甘草、大黄、板蓝根和鱼腥草,而方中来源于石膏、广藿香、绵马贯众和薄荷脑的成分可能在体内的暴露量较低因而未检出,对筛选出的成分所涉及的靶点与流行性感冒相关的作用靶点进行归纳分析,构建了包含 280 个节点和 1521 条边的“成分-疾病-靶点”网络,进一步通过蛋白互作分析发现,连花清瘟方治疗流行性感冒的靶点与 SRC、STAT3、PIK3R1、EGFR 等靶点密切相关。蛋白激酶 SRC 具有调控细胞增殖、分化等生理功能,在病毒感染疾病方面是关键信号调节剂,与病毒感染性疾病密切相关。SRC 激酶几乎影响了所有主要激酶家族, SRC 通过激活信号激酶 ABL 参与痘苗病毒的复制,研究发现 ABL 激酶抑制剂达沙替尼对 SARS-CoV-1 病毒具有活性,同时还能抑制登革热病毒的组装^[25]。磷酸化的 STAT3 通过介导下游基因的表达,在各种细胞生物过程的调节中发挥关键作用,如细胞增殖、存活、分化、迁移、血管生成、炎症和自噬。SRC 可以与 Akt 的 SH2 功能域结合使 Akt 磷酸化,而 STAT3 正是 Akt 下游的重要靶标, Akt 磷酸化可介导 STAT3 的转录。在流感患者中 STAT3 在各类免疫细胞中表达明显上调^[26]。Li 等^[27]发现, IVA 上调的宿主蛋白血管生成素样 4 (ANGPTL4) 通过白细胞介素-6 (IL-6) /STAT3 相关性途径增强了肺组织渗漏和损伤。此外,有学者研究发现,连花清瘟方可以抑制感染 IVA 肺炎小鼠体内 Janus 激酶 (JAK) /STAT 信号通路,减轻炎症细胞浸润,缓解肺部病变,增强小鼠免疫力^[28]。连花清瘟方的基础方麻杏甘石汤通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路的激活,进而缓解 IVA 导致的肺损伤^[29]。本研究通过生物信息学分析表明 SRC、STAT3 等靶点较为重要,可能是连花清瘟方治疗流行性感冒的关键靶标。

对连花清瘟方治疗流行性感冒的作用靶标进行 GO 和 KEGG 富集分析,结果均提示连花清瘟方发挥效应的作用机制与炎症过程相关。在感染流感

病毒后,流感病毒血凝素 (HA) 蛋白与上皮细胞表面唾液糖结合,启动受体介导的病毒粒子内吞作用,随后与内体膜融合,将病毒核糖核蛋白 (vRNP) 释放到细胞质中,紧接着, vRNP 被转运到发生复制的细胞核中^[30]。流感病毒感染至肺部,会发生肺部严重损伤,其原因是流感病毒与上呼吸道上皮细胞的亲和力很高,如高致死率的 H5N1 型流感病毒与远端肺上皮中 α -2,3 唾液酸受体具有强亲和力,导致肺部感染和严重的炎症反应发生,即“细胞因子风暴”,主要的细胞因子会驱动中性粒细胞和大量的炎症细胞募集到肺部^[31]。有研究表明,连花清瘟方的活性化合物会影响多种通路,其中靶向 TNF 的 TNF 信号通路和靶向 Toll 样受体 4 (TLR4) 的 TLR 信号通路是连花清瘟方抗流感病毒感染作用的核心机制,阐明了连花清瘟方具有同时破坏流感病毒的生命周期和调节宿主因子的双重作用^[32]。张悦等^[33]基于网络药理学和实验验证了基于千金三黄汤加减的“麻黄-黄芩-黄芪-鱼腥草”配伍通过 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等核心靶点调控 PI3K/Akt 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 等信号通路减轻 IVA 所致的肺组织免疫性损伤。周莎莎等^[34]证实了清热消炎宁抗甲型流感 H₃N₂ 病毒的药效作用与调节免疫功能与核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路有关。还有研究发现, SRC 可能介导急性炎症反应的发生,在脂多糖 (LPS) 刺激的巨噬细胞中介导触发下游炎症信号通路如丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、NF- κ B 等^[35]。TLR4 和 SRC 形成的复合物被激活后,可以启动下游髓样分化因子 88 (MyD88) 的募集,随后诱发 MAPK 和 NF- κ B 通路的激活,分泌 TNF- α 、IL-1 β 、环氧化酶-2 (COX2) 等大量炎症介质,引起炎症反应^[36],而抑制 SRC 蛋白的表达进而抑制其下游炎症信号途径的调控可发挥抗炎作用^[37]。本研究结果提示,连花清瘟方治疗流行性感冒的作用机制与 Th17 细胞分化、T 细胞受体信号通路和 TNF 信号通路有关,可能介导调控炎症反应,对于感染流感病毒后体内产生剧烈的炎症反应,连花清瘟可能通过 SRC 等关键靶点发挥治疗作用。

本研究所筛选的连花清瘟方体内暴露量高的成分主要为糖苷类成分、黄酮类成分等,大多数来源于麻黄、金银花、连翘和大黄,这些药物均为基础方中的君药,也从侧面验证了连花清瘟组方的合理性。研究发现连翘酯苷 A 通过影响小鼠肺免疫细胞中的 RIG-I 样受体 (RLR) 信号通路来抑制甲型

流感病毒 FM1 毒株在小鼠肺中引起的炎症反应^[38]。绿原酸可以抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体的激活来降低细胞因子风暴^[39]。大黄酸能够抑制 IVA 对细胞的吸附和增殖过程,也会抑制 IAV 引起的氧化应激反应和 TLR4、Akt、MAPK、NF- κ B 等信号通路的激活,从而减轻小鼠流感性肺炎模型的急性肺损伤^[40]。莲花清瘟胶囊中麻黄碱、绿原酸、红景天苷、连翘酯苷 A 等成分对于 LPS 刺激后人外周血单核细胞的免疫及炎症相关基因具有调节作用,能够抑制包括细胞因子活性、细胞因子产生、信号受体调节活性、先天免疫反应、炎症反应、T 细胞活化的经典炎症免疫通路^[24]。本研究中分子对接结果显示, SRC、STAT3 与莲花清瘟方各活性成分均具有较强的结合能力,对接结果良好, SRC 为最关键的靶标,其中 SRC 与绿原酸的结合能力最强,为验证其结构稳定性,进一步通过分子动力学模拟手段证明了绿原酸-SRC 复合物体系结合稳定,从生物信息学模拟的角度验证了通过网络药理学预测作用靶点的方法具有良好的可靠性和科学性,为进一步采用分子生物学探究小分子药物与蛋白的结合提供了重要方向。

综上所述,本研究通过生物信息学分析、分子对接技术及分子动力学模拟方法初步预测了莲花清瘟方可能通过调控 SRC、STAT3 等关键靶点,介导 Th17 细胞分化、T 细胞受体信号通路等炎症信号通路发挥治疗流行性感冒作用,为莲花清瘟方的药效作用机制和临床应用提供了一定的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wautlet A J, Patel P D, Chavez P, *et al.* Influenza epidemics: The role of allergists-immunologists [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2021, 126(4): 350-356.
- [2] 陈吉全, 陈瑞祺. 基于中医卫气理论探讨流行性感冒的病机及治则方药 [J]. *湖南中医杂志*, 2023, 39(8): 104-106.
- [3] 穆杰, 冯全生, 鲁法庭, 等. 论《伤寒论》“伤寒”本疫之说, 参辨奥密克戎感染证治 [J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(9): 27-29.
- [4] 陈凡, 张子桢, 乐意, 等. 基于 UPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别的金(山)银花入药对莲花清瘟方的质量差异研究 [J]. *中草药*, 2025, 56(16): 5792-5803.
- [5] 吴芳芳, 刘灵杰, 谭梈恩, 等. 莲花清瘟胶囊(颗粒)抗病毒药理作用及临床应用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(5): 1121-1130.
- [6] 陈莉莉, 葛广波, 荣艳, 等. 中药在新冠肺炎防治中的应用和研究进展 [J]. *上海中医药大学学报*, 2020, 34(3): 1-8.
- [7] 王珂欣, 游志业, 单晓茜, 等. 网络药理学在中医药防治呼吸系统疾病中的应用与创新 [J]. *山西大学学报: 自然科学版*, 2025, 48(2): 302-313.
- [8] 孙资金, 张凤君, 吉静, 等. 基于生物信息学与分子动力学的仙方活命饮治疗猴痘作用机制与分子靶点预测 [J]. *中草药*, 2023, 54(7): 2197-2207.
- [9] Chen X F, Wu Y L, Chen C, *et al.* Identifying potential anti-COVID-19 pharmacological components of traditional Chinese medicine Lianhuaqingwen capsule based on human exposure and ACE2 biochromatography screening [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(1): 222-236.
- [10] 于华, 贾伟娜, 刘金平, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析莲花清瘟胶囊的入血成分 [J]. *天津中医药*, 2016, 33(12): 756-759.
- [11] 周千千, 李艳, 侯媛芳, 等. 基于化学模式识别法的莲花清瘟胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41(12): 1709-1716.
- [12] 王海娟, 韩玉洁, 张晓雪, 等. 基于网络药理学与分子对接探讨莲花清瘟胶囊入血成分干预细胞因子风暴防治新型冠状病毒肺炎的作用机制 [J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(11): 1957-1968.
- [13] 柏寒, 贺梦媛, 徐洋, 等. 中药苦杏仁研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(9): 199-209.
- [14] 马培都, 李一洋, 陈磊, 等. 绿原酸抗菌作用及免疫调节的研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2024, 45(23): 2932-2936.
- [15] 刘丛颖, 丛竹凤, 贺梦媛, 等. 麻黄治疗呼吸系统疾病的研究进展及质量标志物预测分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(10): 175-181.
- [16] 马雪百合, 郭健敏, 温玉莹, 等. 连翘化学成分、药理作用及安全性评价的研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(7): 1093-1100.
- [17] 金丽霞, 金丽军, 栾仲秋, 等. 大黄的化学成分和药理研究进展 [J]. *中医药信息*, 2020, 37(1): 121-126.
- [18] 南星梅, 于洋, 杨进, 等. 唐古特红景天化学成分和药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(16): 5433-5441.
- [19] 吴芳芳, 刘灵杰, 谭梈恩, 等. 莲花清瘟胶囊(颗粒)抗病毒药理作用及临床应用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(5): 1121-1130.
- [20] Xia K Y, Zhao Z Y, Shah T, *et al.* Composition, clinical efficiency, and mechanism of NHC-approved “Three Chinese Medicines and Three Chinese Recipes” for COVID-19 treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12:

- 781090.
- [21] Shen X H, Yin F G. The mechanisms and clinical application of Traditional Chinese Medicine Lianhua-Qingwen capsule [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 142: 111998.
- [22] Li R F, H Y L, Huang J C, *et al*. Lianhuaqingwen exerts anti-viral and anti-inflammatory activity against novel coronavirus (SARS-CoV-2) [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 156: 104761.
- [23] Niu M, Wang R L, Wang Z X, *et al*. Rapid establishment of traditional Chinese medicine prevention and treatment of 2019-nCoV based on clinical experience and molecular docking [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2020, 45(6): 1213-1218.
- [24] Chen S M, Qi H, Zhu C Y, *et al*. Quality and composition control of complex TCM preparations through a novel “Herbs-*in vivo* Compounds-Targets-Pathways” network methodology: The case of Lianhuaqingwen capsules [J]. *Pharmacol Res*, 2025, 213: 107650.
- [25] Pillaiyar T, Laufer S. Kinases as potential therapeutic targets for anti-coronaviral therapy [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(2): 955-982.
- [26] Zhu L N, Yang P H, Zhao Y Z, *et al*. Single-cell sequencing of peripheral mononuclear cells reveals distinct immune response landscapes of COVID-19 and influenza patients [J]. *Immunity*, 2020, 53(3): 685-696.
- [27] Li L, Chong H C, Ng S Y, *et al*. Angiopoietin-like 4 increases pulmonary tissue leakiness and damage during influenza pneumonia [J]. *Cell Rep*, 2015, 10(5): 654-663.
- [28] 樊高薇, 薛敬东, 李警卓. 基于 JAK/STAT 信号通路探讨连花清瘟颗粒对甲型 H1N1 流感病毒性肺炎小鼠肺组织的保护作用及机制 [J]. *检验医学与临床*, 2022, 19(9): 1153-1157.
- [29] 陈纯静, 赵澄, 张香港, 等. 结合网络药理学从 JAK2/STAT3 信号通路探讨麻杏甘石汤抗流感病毒的效应机制 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(2): 281-289.
- [30] Flerlage T, Boyd D F, Meliopoulos V, *et al*. Influenza virus and SARS-CoV-2: Pathogenesis and host responses in the respiratory tract [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(7): 425-441.
- [31] Hartshorn K L. Innate immunity and influenza A virus pathogenesis: Lessons for COVID-19 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 563850.
- [32] Fang L J, Li C Y, Ding H M, *et al*. Integrated bioinformatics and network pharmacology analysis to reveal the therapeutic targets and potential molecular mechanism of traditional Chinese medicine Lianhua-Qingwen capsule on children’s influenza [J]. *Phytomed Plus*, 2025, 5(3): 100807.
- [33] 张悦, 于会勇, 宋利琼, 等. 基于网络药理学和实验验证探索千金三黄汤加减治疗甲型流感病毒的作用机制 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2023, 18(6): 1168-1177.
- [34] 周莎莎, 程雪清, 彭冬冬, 等. 清热消炎宁抗甲型流感 H3N2 病毒的药效及作用机制研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2025, 30(3): 347-354.
- [35] Brian B F, Freedman T S. The Src-family kinase lyn in immunoreceptor signaling [J]. *Endocrinology*, 2021, 162(10): bqab152.
- [36] Ren Q, Guo F, Tao S B, *et al*. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF- κ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109772.
- [37] 乌里盼·托乎达阿里, 丁宛婷, 孙媛, 等. 鞣花酸通过 TLR4-SRC/MAPK/NF- κ B 途径抑制脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应 [J]. *中南药学*, 2024, 22(4): 943-949.
- [38] Zheng X, Fu Y J, Shi S S, *et al*. Effect of forsythiaside A on the RLRs signaling pathway in the lungs of mice infected with the influenza A virus FM1 strain [J]. *Molecules*, 2019, 24(23): 4219.
- [39] Zeng J H, Wan X Y, Liu T, *et al*. Chlorogenic acid ameliorates *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumonia in immunosuppressed mice via inhibiting the activation of NLRP3 inflammasomes [J]. *Food Funct*, 2021, 12(19): 9466-9475.
- [40] Wang Q W, Su Y, Sheng J T, *et al*. Anti-influenza A virus activity of rhein through regulating oxidative stress, TLR4, Akt, MAPK, and NF- κ B signal pathways [J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0191793.