

梔子抗呼吸道合胞病毒作用及基于网络药理学和分子对接的机制研究

侯长周^{1,3}, 张建锋^{2*}, 安海², 杨德函³, 侯晓杰^{1*}, 张科⁴

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州威利德制药有限公司, 贵州 贵阳 550016

3. 剑河县民族中医院, 贵州 黔东南 556499

4. 贵州医科大学现代病原生物学特色重点实验室, 贵州 安顺 561113

摘要: 目的 研究梔子抗呼吸道合胞病毒(RSV)作用并预测其机制。方法 通过细胞毒性实验、细胞病变效应(CPE)及实时荧光定量PCR(qRT-PCR)实验,探索梔子提取物对RSV的抑制作用;在中药系统药理学分析平台(TCMSP)中搜索梔子的活性成分并预测其靶点,在GeneCards、OMIM、Disgen数据库中获取RSV相关靶点,获取药物-病毒交集基因后构建关键蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,并用分子对接进行验证;交集基因通过DAVID数据库进行基因本体(GO)功能富集分析和基于京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,预测其作用机制。结果 梔子提取物半数细胞毒性浓度(TC₅₀)为4.621 mg·mL⁻¹,质量浓度为3.543 8、1.771 9、0.886 0 mg·mL⁻¹时有显著抗RSV作用,且随质量浓度增加,抗RSV作用越强。网络药理学共筛选到梔子有效化合物10个[口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)>0.18],可视化结果显示有118个节点,主要靶点有蛋白激酶Bα(AKT1)、非受体酪氨酸激酶(SRC)、表皮生长因子(EGFR)等;GO结果显示主要与蛋白激酶B信号的正向调节、蛋白质磷酸化等生物过程(BP);质膜、大分子复合物等细胞组成(CC);ATP结合、酶结合、蛋白激酶活性等分子功能(MF)有关。KEGG通路富集到117条信号通路(FDR<0.01),主要与肿瘤中程序性死亡分子1配体(PD-L1)的表达和程序性死亡分子1(PD-1)检查点通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K-Akt)、C型凝集素受体(CLRs)等信号通路有关。结论 梔子提取物有显著抗RSV作用,可能主要以豆甾醇、吡嗪环辛烯-4a-羧酸、β-谷甾醇、藏红花酸等成分与EGFR、SRC、丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)等靶点相结合,通过PD-L1表达和PD-1、PI3K-Akt、CLRs通路等信号通路发挥抗呼吸道合胞病毒作用。

关键词: 梔子; 呼吸道合胞病毒; 网络药理学; 分子对接; 豆甾醇; β-谷甾醇**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)09-1985-10**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.005Anti-respiratory syncytial virus effect of *Gardeniae Fructus* and investigation of mechanism based on network pharmacology and molecular dockingHOU Changzhou^{1,3}, ZHANG Jianfeng², AN Hai², YANG Dehan³, HOU Xiaojie¹, ZHANG Ke⁴

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Guizhou Valid Pharmaceutical Co., LTD., Guiyang 550016, China

3. Jianhe Ethnic Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qiandongnan Prefecture 556499, China

4. Key Laboratory of Modern Pathogen Biology, Guizhou Medical University, Anshun 561113, China

Abstract: Objective To study the anti-respiratory syncytial virus (RSV) effect of *Gardeniae Fructus* and predict its mechanism.**Methods** To explore the inhibitory effect of *Gardeniae Fructus* on respiratory syncytial virus (RSV) through drug cytotoxicity assay, cytopathic effect (CPE) and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) assay; to search for the active ingredients of *Gardeniae Fructus* and predict its targets in TCMSP, and to obtain the relevant targets of RSV from GeneCards, OMIM and Disgen**收稿日期:** 2024-04-16**基金项目:** 贵州省十大工业(健康医药)产业振兴专项资金资助(黔财工[2020]247号);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究专项课题(QZYY-2024-188);贵州中医药大学研究生教育创新计划资助项目(YCXKYS2023034)**第一作者:** 侯长周(1992—),男,硕士研究生,研究方向为中药及民族药药物新制剂及新剂型。E-mail: 1428169849@qq.com***共同通信作者:** 张建锋,高级工程师,硕士生导师,研究方向为中药及民族药药物新制剂及新剂型。E-mail: 286911082@qq.com

侯晓杰,女,讲师,研究方向为中药产地加工与炮制机制研究。E-mail: 605128843@qq.com

databases; to construct key protein-protein interactions after obtaining drug-virus intersection genes. RSV related targets were obtained from GeneCards, OMIM, and Disgen databases, and the drug-virus intersection genes were obtained to construct a key protein-protein interaction (PPI) network and validated by molecular docking; the intersection genes were analyzed by Gene Ontology Functional Enrichment (GO) analysis via the DAVID database, and the mechanism of action was predicted by the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-based pathway enrichment analysis. **Results** The half cytotoxicity concentration (TC_{50}) of *Gardeniae Fructus* extract was $4.621 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and significant anti-RSV effects were observed at mass concentrations of 3.543 8, 1.771 9, and 0.886 0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and with the increase of the mass concentration, the anti-RSV effects were stronger. A total of 10 effective compounds of *Gardeniae Fructus* were screened by network pharmacology ($OB \geq 30\%$, $DL > 0.18$), and the visualization results showed that there were 118 nodes, and the main targets were AKT1, SRC, and EGFR, etc.; GO results showed that they were mainly related to the processes of positive regulation of protein kinase B signaling, and protein phosphorylation; the plasma membrane, and the macromolecule complex; and the processes of ATP-binding, enzyme-binding, and protein kinase activity. KEGG pathway was enriched to 117 signaling pathways ($FDR < 0.01$), which were mainly related to PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K-Akt), and C-type lectin receptors (CLRs) signaling pathways in tumors. **Conclusion** *Gardeniae Fructus* extract has significant anti-RSV effects, which may be mainly based on the combination of components such as soy sterol, β -glutamate, and saffron acid with targets such as EGFR, SRC, and MAPK3, and exerts its anti-respiratory syncytial virus effects through the signaling pathways such as PD-L1 expression and the PD-1, PI3K-Akt, and CLRs pathways.

Key words: *Gardeniae Fructus*; RSV; network pharmacology; molecular docking; leguminol; β -sitosterol

呼吸道合胞病毒(RSV)是一种单链RNA病毒,感染初期,可见咳嗽、鼻塞等症状;重症患者有时会出现较明显的呼吸困难、口唇青紫、喘憋、鼻扇和三凹征等^[1]。研究表明,RSV是引起儿童呼吸道感染的主要感染因素之一^[2-3],每年约百万计的儿童感染RSV,而低收入国家的情况更为严重^[4],流行病学调查显示,几乎所有儿童在2岁之前都至少经历过1次RSV感染,该研究充分反映了RSV的高普遍性和传染性^[5];RSV也是老年人患细支气管炎和肺炎的首要发病原因^[6]。临床治疗中,常采用RSV免疫球蛋白、利巴韦林等药物进行预防和治疗,但因耐药性强与毒副作用较大等原因,亟需开发安全有效的替代药物^[7]。

梔子为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实^[8],具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒之功效,可到达心、肺、三焦经络,用于热病心烦、黄疸尿赤、血淋等治疗^[9]。在体外实验中,王意忠等^[10]研究发现梔子提取物ZG具有抗RSV作用,但该提取物抗RSV的机制并不清楚,故本研究基于细胞病变效应(CPE)及实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法研究梔子(甲醇提取物)抗RSV作用,并用网络药理学及分子对接技术预测梔子抗RSV的作用机制,以期为梔子抗RSV的研究提供一定参考和借鉴。

1 材料

1.1 药品

梔子(四川宏康源药业有限公司,批号

230901),经贵州中医药大学魏升华教授鉴定为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。利巴韦林(阿拉丁上海有限公司,货号R101754)。

1.2 试剂及仪器

甲醇(批号20220601),重庆川东化工(集团)有限公司提供;胎牛血清(FBS)、胰酶(0.25%Trypsin-EDTA)、高糖型基础培养基(DMEF/F12-GlutaMAX)均购自于Thermo Fisher Scientific;HFcafo-1200LC(A2)生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);qRT-PCR仪CFX96(美国Biorad公司)。

1.3 细胞

人喉癌上皮细胞(Hep-2)为实验室保种。

1.4 数据库与软件

中药系统药理学分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、SwissTargetPrediction、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、Disgen (<https://www.disgenet.org/>)、Venny平台(<https://biomarker.bioinfo.cnio.es/tools/venny/>)、David (<https://david.ncifcrf.gov/>)、Autodock、PyMOL、GraphPad Prism 8等。

2 方法

2.1 体外药效实验

2.1.1 药物制备 (1)梔子提取物制备:梔子饮片

粉碎成最粗粉,取2 g加入25 mL甲醇超声提取60 min,64 °C水浴挥干,加入无菌水制成质量浓度为0.226 8 g·mL⁻¹的原始溶液(含1.8% 梔子苷),0.22 μm滤膜滤过后用DMEF/F12-GlutaMAX依次2倍稀释成9个质量浓度备用。

(2)对照品利巴韦林溶液制备:取利巴韦林0.1 g,加DMEF/F12-GlutaMAX 10 mL制成终质量浓度为0.024 4 μg·mL⁻¹的溶液,0.22 μm滤膜滤过。

(3)MTT溶液制备:避光取MTT 0.5 g,加入5 mL PBS,制成终质量浓度为5 mg·mL⁻¹的溶液,0.22 μm滤膜滤过。

2.1.2 药物细胞毒性实验 取指数生长的Hep-2细胞,消化、重悬后,每孔 2.8×10^4 个细胞种于96孔板,标记分组为梔子提取物组(浓度0.226 8 g·mL⁻¹稀释为56.7 mg·mL⁻¹作为初始浓度,并依次2倍稀释成9个浓度)和对照组,每组均设4个复孔;CO₂培养箱培育24 h后,药物组给予相应质量浓度药液,每孔100 μL,对照组给予相应体积DMEF/F12-GlutaMAX,继续培育24 h后,弃培养液,PBS洗1遍后,加入MTT溶液,每孔20 μL,继续培育4 h后,吸弃溶液,每孔加入120 μL DMSO后,摇床上摇10 min,酶标仪490 nm测定吸光度。

2.1.3 CPE及qRT-PCR实验 取指数生长的Hep-2细胞,消化、重悬后,每孔 2.8×10^4 个细胞种于96孔板,标记分组为梔子提取物组(质量浓度0.226 8 g·mL⁻¹稀释为56.7 mg·mL⁻¹作为初始浓度,并依次2倍稀释成9个浓度)和利巴韦林(0.024 4 μg·mL⁻¹)组、病毒对照组(RSV)、空白组及对照组,每组均设4个复孔,培育24 h后,PBS洗1遍,取感染复数(MOI)为0.1、病毒毒力(TCID₅₀)为 $10^{-6.26}$ 的病毒16 μL与7.5 mL基础培养基混合,除空白组及对照组外,每孔感染100 μL病毒悬液,培育1 h后,弃培养液,PBS洗1遍后,药物组给予相应质量浓度药液,每孔100 μL,病毒对照组、空白组、对照组给予相应体积DMEF/F12-GlutaMAX,培育48 h后,观察各组出现的CPE并采集图片,收取上清液100 μL,提取病毒RNA,逆转录成cDNA后,每个复孔设置3个平行进行qRT-PCR实验,检测数据进行 t 检验。

2.2 网络药理学研究

2.2.1 梔子活性成分及靶点收集 借助TCMSP^[11] (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>),以“梔子”为关键词,以口服利用度(OB)≥30%、类药性(DL)>0.18为条件,搜索梔子的化学成分。在Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库

中,查询相应成分的Smile号,导入Swiss5 ADME分析平台^[12],以GI absorption项为High,Durg likeness项满足2项为Yes为条件,筛选活性成分,导入SwissTargetPrediction数据库,选取Probability≥0.1的靶点作为药物靶点数据库^[13-14]。

2.2.2 病毒基因及交集基因收集 以“respiratory syncytial virus”为关键词,在GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、Disgen (<https://www.disgenet.org/>)数据库中,检索疾病相关靶点并去重,作为疾病靶点数据库;使用Venny平台(<https://biomarker.bioinfo.cnio.es/tools/venny/>),取药物与RSV的交集靶点作为梔子抗RSV的潜在靶点^[15]。

2.2.3 核心靶点及PPI网络可视化 将潜在靶点导入String数据库(<https://string-db.org/>)并用Cytoscape 3.7.2软件可视化,以大于中位数度值(Degree)靶点作为核心靶点^[16]。

2.2.4 关键药效成分及药物-成分-靶点网络可视化 运用潜在靶点创建Network,核心靶点创建Type文件,导入Cytoscape 3.7.2入软件可视化处理,构建药物-成分-靶点网络^[17-19],通过度值排序,筛选核心成分。

2.2.5 基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将获得的核心靶点导入David(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库,进行GO和KEGG富集,以 $P < 0.01$ 进行排序筛选,并可视化处理。

2.3 分子对接验证

通过TCMSP数据库下载度值排名前10药物成分的MOL-2格式2D结构,RCSB PDB数据库下载度值排名前5靶点PDB结构,分别导入Autodock软件,小分子去水、加氢并转化为qrtpcr格式,靶点去水转化为相同格式,进行分子对接,同时运用PyMOL软件对结合能排名前5的结果可视化处理。

3 结果

3.1 梔子提取物对Hep-2细胞的半数细胞毒性浓度(TC₅₀)

不同质量浓度的梔子提取物作用Hep-2细胞24 h后,490 nm测定吸光度值,经Probit方程回归,结果见图1,可知梔子提取物TC₅₀为4.621 mg·mL⁻¹。

3.2 梔子提取物抗RSV的CPE观察

取低于TC₅₀浓度(3.543 8、1.771 9、0.886 0、0.443 0 mg·mL⁻¹)的梔子提取物进行CPE实验,并对复孔CPE数进行统计,结果见图2,与病毒对照组相

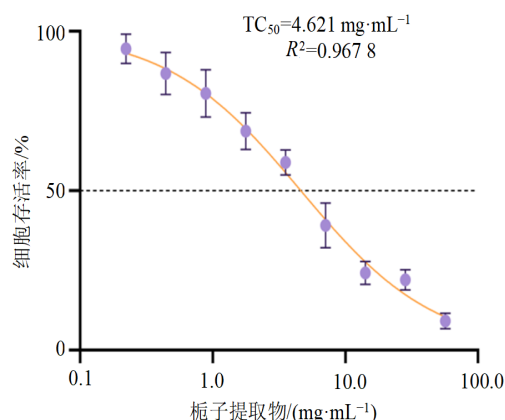


图1 栀子提取物细胞毒性

Fig. 1 Cytotoxicity of *Gardeniae Fructus* extract

比, 栀子提取物质量浓度为 $3.543\ 8\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 CPE 最少, 推测该质量浓度对 RSV 感染细胞有极强抑制作用; 质量浓度 $1.771\ 9\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 与病毒对照组相比 CPE 较少, 推测该质量浓度对 RSV 感染细胞有强抑制作用; 质量浓度为 $0.886\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 与 RSV 组相比 CPE 很少, 推测该质量浓度对 RSV 感染细胞有较强抑制作用; 质量浓度为 $0.443\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞 CPE 数量与病毒组相当, 推测该质量浓度不具抑制 RSV 感染细胞作用, 为了验证观察到的现象, 继续做 qRT-PCR 实验, 检测不同质量浓度药物作用病毒后病毒 RNA 拷贝数, 以确定不同质量浓度药物抗 RSV 的效果。

3.3 栀子提取物抗 RSV 的 qRT-PCR 实验

取栀子提取物 $3.543\ 8$ 、 $1.771\ 9$ 、 $0.886\ 0$ 、

$0.443\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抗 RSV 48 h 后, 进行 qRT-PCR 实验。每个质量浓度设置 3 个复孔, 取 48 h 后含病毒的培养基 $100\ \mu\text{L}$, 提取病毒 RNA, 逆转录成 cDNA 后, 每个复孔设置 3 个平行进行 qRT-PCR 实验, 检测数据进行 t 检验, 结果见图 3。与 RSV 组比, 质量浓度为 $3.543\ 8$ 、 $1.771\ 9$ 、 $0.886\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 栀子提取物有显著抗 RSV 作用 ($P < 0.001$ 、 0.01 、 0.05); 质量浓度为 $0.443\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 栀子提取物与 RSV 组无统计学意义。qRT-PCR 结果与观察到的 CPE 结论一致, 但在各药物组中, 阳性药物利巴韦林抗病毒效果最好 ($P < 0.001$)

3.4 栀子活性成分及靶点

以栀子为关键词, 在 TCMSP 系统中共检索到 98 个化学成分, 限定 $\text{OB} \geq 30\%$ 、 $\text{DL} > 0.18$ 进行筛选, 并经 SwissADME 处理后, 得出 10 个活性成分(表 1), 导入 SwissTarget Prediction 数据库后, 获得去重靶点 429 个。

3.5 疾病靶点的确定

以“respiratory syncytial virus”为关键词, 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、Disgen (<https://www.disgenet.org/>) 数据库中检索, 分别得到疾病靶点 462、1 025、2 个, 去重处理后, 得到疾病靶点 1 461 个。

3.6 PPI 网络构建

将成分靶点和疾病靶点取交集后的 102 个靶点导入 String 数据库, 设置物种为“Homo sapiens”, 点

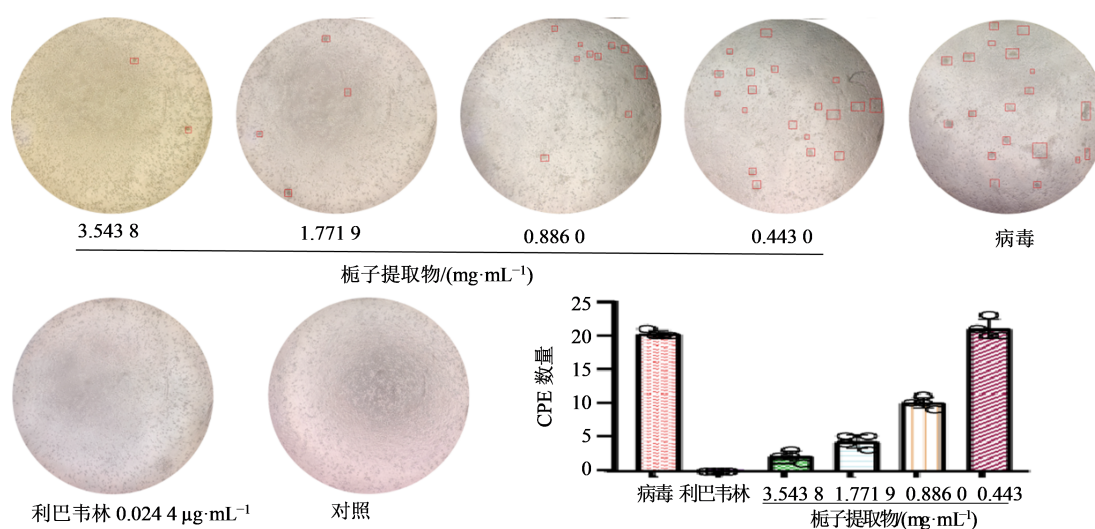
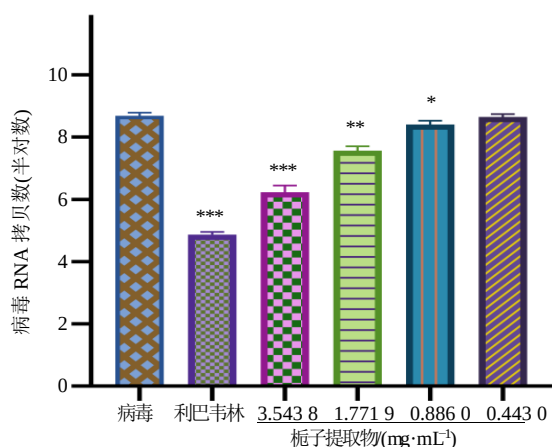


图2 不同质量浓度栀子提取物抗 RSV 感染 Hep-2 细胞 24 h 后细胞病变效应

Fig. 2 Cytopathic effects of different concentrations of *Gardeniae Fructus* extract acting on RSV infection of Hep-2 cells after 24 h



与病毒对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs RSV group.

图3 药物作用48 h后培养液中清中RSV病毒RNA拷贝数

Fig. 3 RSV Viral RNA copy number in culture supernatants after 48 h of drug action

表1 栀子主要活性成分

Table 1 Active components of *Gardeniae Fructus*

代号	MOL	化学成分	OB/%	DL	相对分子质量
ZZ1	MOL001406	藏红花酸	35.30	0.26	328.44
ZZ2	MOL001663	吡嗪环辛烯-4a-羧酸	32.03	0.76	456.78
ZZ3	MOL001941	欧前胡素	34.55	0.22	270.30
ZZ4	MOL004561	苏丹红III	84.07	0.59	352.42
ZZ5	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	302.25
ZZ6	MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75	414.79
ZZ7	MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	286.25
ZZ8	MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	412.77
ZZ11	MOL001942	异欧前胡素	45.46	0.23	270.30
ZZ14	MOL007245	异山柰素	60.16	0.26	300.28

击“Continue”,默认系统设置,下载TSV文件格式并导入到Cytoscape 3.7.2软件中可视化,经插件CytoNCA勾选Closeness、Betweenness、Degree值后,

得到100个节点,1335条边,又经插件filter以大于度值的中位数(26.7)为标准筛选出了25个基因,构建PPI网络(图4)。其中靶点越大,颜色越深,代表度值越大。结果表明AKT1、SRC、EGFR、BCL2、MAPK3等基因处于核心位置,提示其可能是栀子抗RSV的核心靶点。

3.7 药物-成分-靶点网络

运用潜在靶点创建Network,核心靶点创建Type文件,导入Cytoscape 3.7.2入软件,在filter插件功能下提取药物、成分、靶点3者相互关联的靶点,通过度值进行排序(图5),结果提示,排名前10的豆甾醇、 β -谷甾醇、藏红花酸等10个成分可能为栀子抗呼吸道合胞病毒的潜在成分。

3.8 分子对接验证

为验证核心成分和靶点之间的结合强度,取度值排名前10的核心成分(豆甾醇、 β -谷甾醇、异欧前胡素、藏红花酸、吡嗪环辛烯-4a-羧酸、槲皮素、苏丹红III、欧前胡素、山柰酚、异山柰素)分别与Degree排名前5的靶点[AKT1(1UNQ)、SRC(1FMK)、EGFR(8A27)、BCL2(5FC4)、MAPK3(4QTB)],运用Autodock软件进行分子对接验证(图6),PyMOL对结合能最小的前5个结果进行可视化(图7)。结合能 $< 0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时,配体与受体可以自由发生,结合能 $< -5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时,配体与受体结合较好^[20-22]。本研究以结合能 $\leq -32 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 作为筛选标准。结合能 $< -43 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的有豆甾醇与EGFR;结合能 $< -35 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的有吡嗪环辛烯-4a-羧酸与EGFR、豆甾醇与MAPK3、 β -谷甾醇与SRC;结合能 $\leq -32 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的有藏红花酸与EGFR、吡嗪环辛烯-4a-羧酸与(AKT1、SRC),异山柰酚与EGFR。综合以上数据,推测豆甾醇、吡嗪环辛烯-4a-羧酸、 β -谷甾醇、藏红花酸可能为栀子抗RSV的核心成分;EGFR、MAPK3、SRC等可能为其核心靶点。

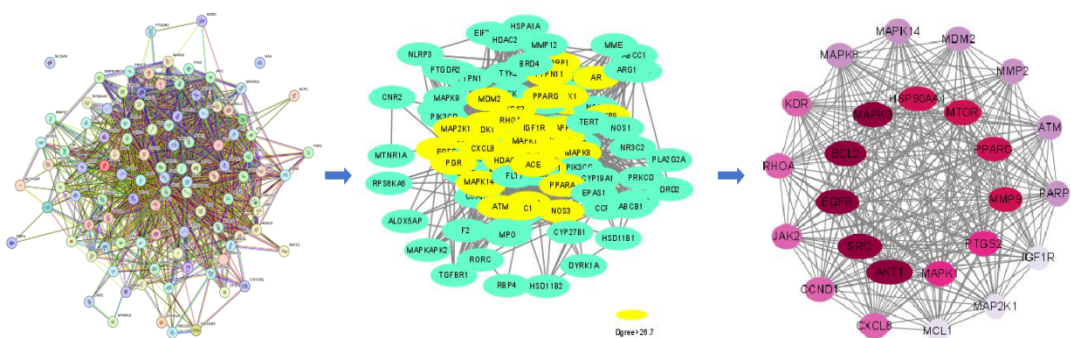


图4 PPI网络

Fig. 4 PPI networks

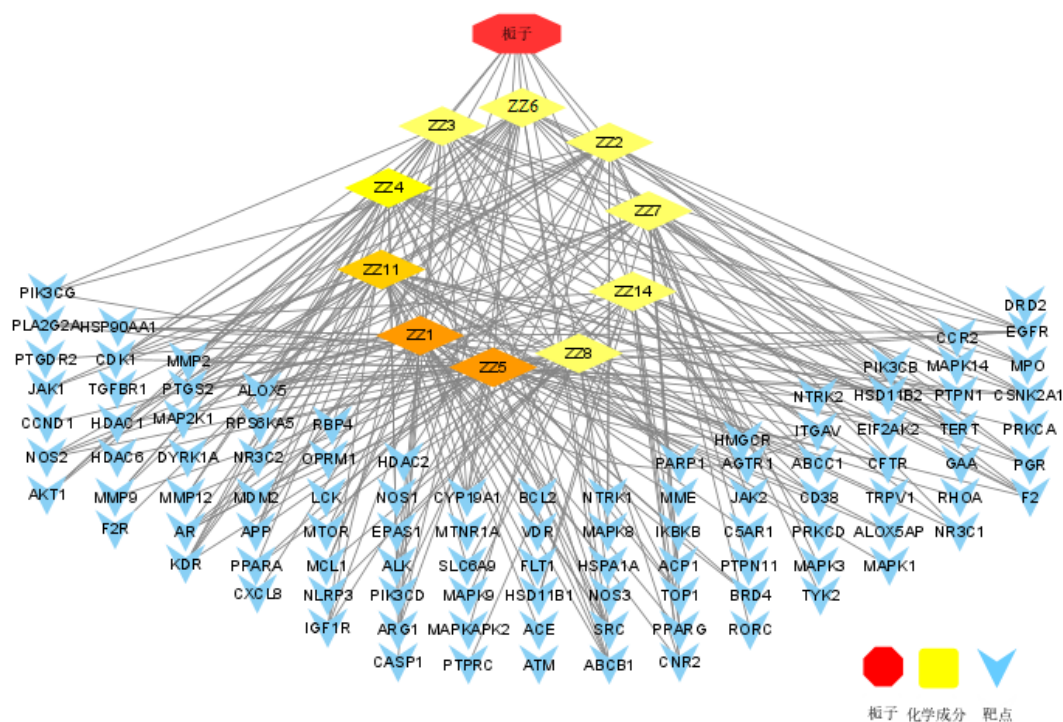


图5 “栀子-活性成分-靶点”网络
Fig. 5 "Gardenia-active ingredient-target" network

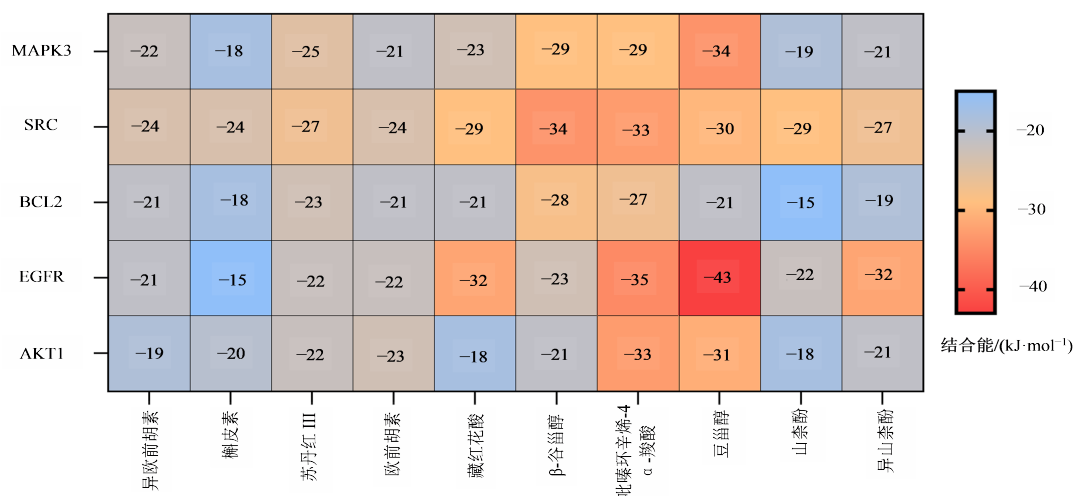


图6 核心成分、靶点分子对接热图
Fig. 6 Heat map of docking of core components, target molecules

3.9 GO分析和KEGG分析

药物-RSV交集靶点导入DAVID数据库,勾选GO项下的生物学过程(BP)、细胞组分(CC)与分子功能(MF),导出数据后分别取前15条进行可视化,见图8。结果显示涉及BP条目221条(FDR<0.05)、CC条目62条、MF条目94条。BP主要包括对外来刺激的反应、凋亡过程负向调控、Akt信号正向调节、蛋白质磷酸化等过程;CC主要包括质膜、

大分子复合物、膜筏、细胞质等;MF主要包括蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、ATP结合、酶结合、蛋白激酶活性等过程。利用DAVID平台对102个潜在靶点进行KEGG通路分析,富集到137条(FDR<0.05),排名前15的通路见图8,主要与肿瘤中程序性死亡分子1配体(PD-L1)的表达和程序性死亡分子1(PD-1)检查点通路、PI3K-Akt、C型凝集素受体(CLRs)等信号通有关,提示上述信号通路

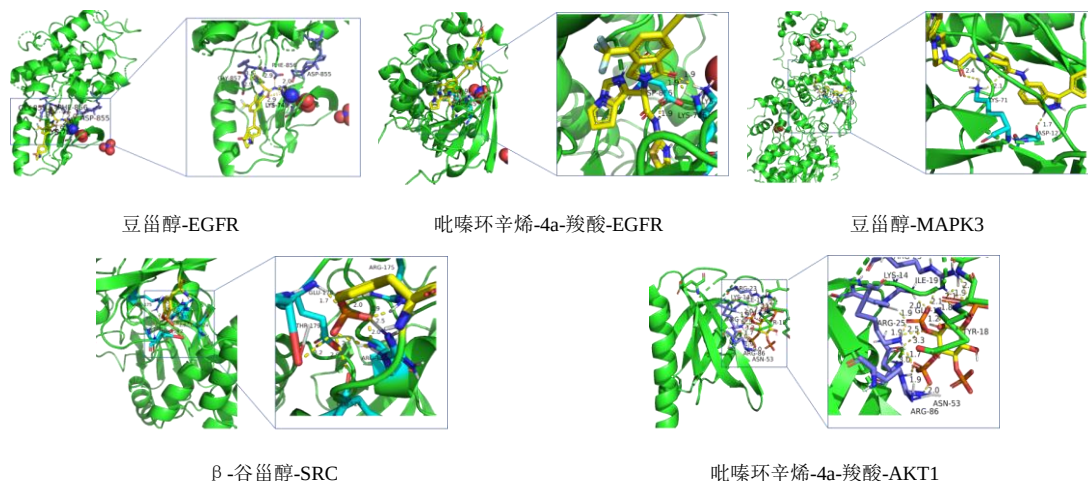


图 7 分子对接结果可视化

Fig. 7 Visualization of molecular docking results

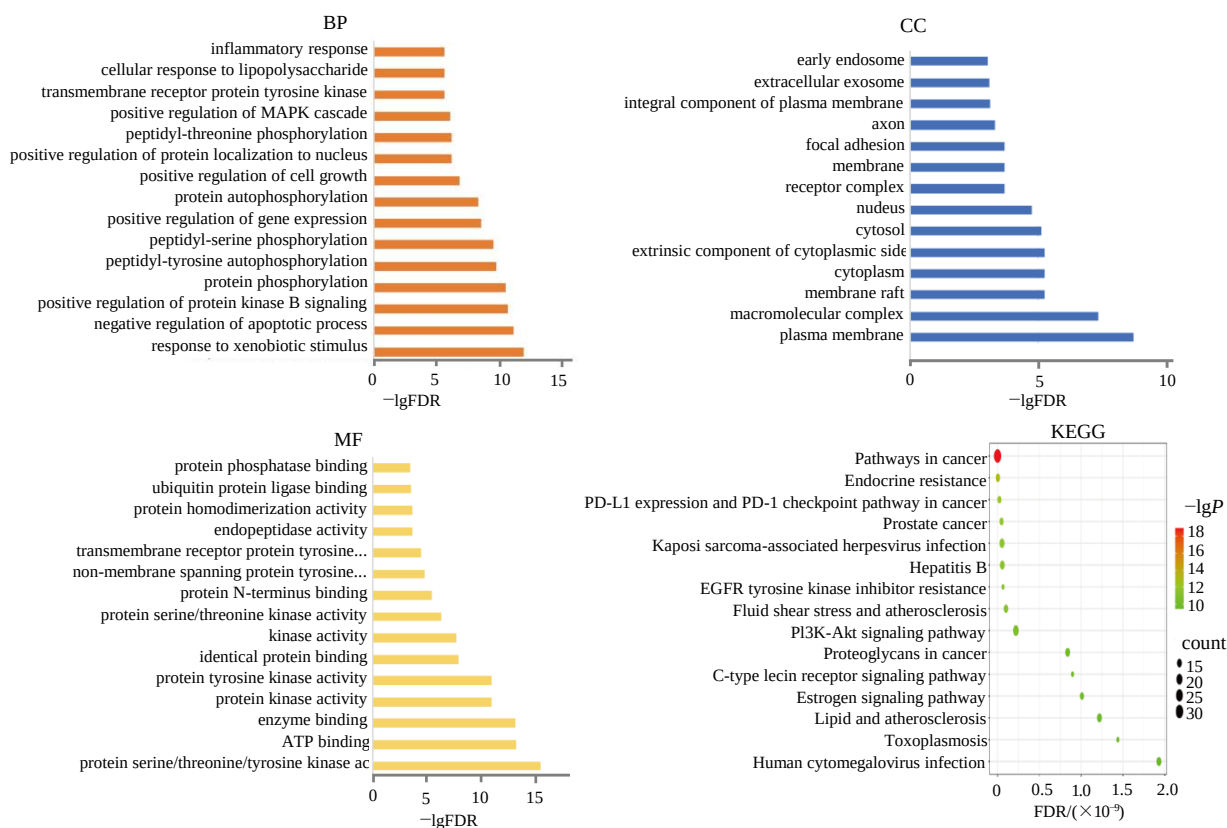


图 8 GO、KEGG 功能富集分析

Fig. 8 GO and KEGG enrichment analysis

可能为槲子抗 RSV 的核心通路。

4 讨论

本研究通过体外实验探究槲子提取物抗 RSV 的作用、网络药理学对其机制进行预测,并结合分子对接技术验证核心靶点与成分之间的结合强度,建立药物-成分-靶点关系网络。研究表明槲子具有抗 RSV 作用,吡嗪环辛烯-4a-羧酸、豆甾醇、β-谷甾醇

、藏红花酸等可能是槲子发挥抗 RSV 的有效成分,其中吡嗪环辛烯-4a-羧酸未见报道。豆甾醇、β-谷甾醇为植物甾醇类成分,广泛存在于自然界中的各种植物油、坚果等中^[23]。研究表明豆甾醇、β-谷甾醇具有消炎解热、抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[24-26],也有阻碍细胞周期诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 的调亡作用^[27]。藏红花酸为槲子中的有效成分之一,

能有效恢复各种酶的代谢水平,降低肺癌的发生率;也可以预防血管紧张素(AGEs)诱导的牛脉管内皮细胞(BEC)的凋亡,发挥抗动脉粥样硬化水平^[28-30]。综上所述,豆甾醇、 β -谷甾醇、藏红花酸均有一定的抗炎特性,与RSV引起的症状密切相关。

PPI网络分析结果提示EGFR、SRC、MAPK3等靶点为槲子发挥抗呼吸道合胞病毒的靶点。气道上皮细胞主要为RSV的靶细胞,感染RSV病毒后,会引起气道上皮细胞发生病理变化^[31]。EGFR的活化可抑制气道上皮细胞防御病毒感染功能,研究发现感染RSV后EGFR活化,下调细胞紧密连接相关蛋白E-cadherin、occludin的表达,上调黏蛋白MUC5AC的表达,破坏气道黏膜的屏障功能^[32-33]。SRC是EGFR的下游因子,磷酸化激活可以参与细胞增殖等生物过程;激活PI3K/Akt信号通路和mTOR信号通路,诱导细胞自噬,增强自身复制^[34-35]。MAPK3是MAPK的成员,刺激、细胞应激及细胞黏附等激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,参与调节细胞的生长分化、炎症反应等多种重要的细胞生理、病理过程^[36-37]。

KEGG信号通路分析显示,槲子提取物抗RSV的作用主要与PD-L1表达和PD-1检查点通路、PI3K/AKT、CLRs通路等信号通路相关。PD-1及PD-L1在免疫进程中发挥重要作用,PD-L1与肿瘤表面的PD1结合后,即可抑制T细胞杀伤功能,从而在肿瘤的免疫逃逸中发挥重要作用,其机制为阻止PD-L1与PD1结合,恢复T细胞的免疫应答,提高抗肿瘤能力^[38]。

本研究通过与RSV对比,以药物干预后细胞CPE数量减少及病毒RNA拷贝数减少为指标,证明槲子提取物有抗RSV作用,又通过网络药理学结合分子对接技术探究槲子抗RSV的核心成分、靶点及通路,充分展示槲子多成分、多靶点、多通路协调抗RSV的优势,对中药槲子的新药研发和抗RSV研究具有重要参考价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 覃黎葵. 银翘散对呼吸道感染小鼠呼吸系统模型的作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
Qin L K. Effect of Yinqiao Powder on respiratory system model of mice infected by respiratory syncytial virus [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016.
- [2] Hall C B, Weinberg G A, Iwane M K, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children [J]. N Engl J Med, 2009, 360(6): 588-598.
- [3] Resch B. Burden of respiratory syncytial virus infection in young children [J]. World J Clin Pediatr, 2012, 1(3): 8-12.
- [4] Zhang H J, Zhu A Q, Gao G F, et al. Epidemiological and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in children aged < 5 years in China, from 2014—2018 [J]. Vaccines, 2022, 10(5): 810.
- [5] Nguyen V H, Dubot-Pérès A, Russell F M, et al. Acute respiratory infections in hospitalized children in Vientiane, Lao PDR—the importance of Respiratory Syncytial Virus [J]. Sci Rep, 2017, 7: 9318.
- [6] Falsey A R. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults [J]. Exp Lung Res, 2005, 31 (Suppl 1): 77.
- [7] 吴哲乾, 戴李华. 血液净化联合乌司他丁治疗脓毒症急性肺损伤的疗效和对基质金属蛋白酶水平的影响 [J]. 安徽医药, 2019, 23(12): 2382-2385.
Wu Z Q, Dai L H. Effect of blood purification combined with ulinastatin on pulmonary function and MMPs/TIMPs in patients with sepsis-induced acute lung injury [J]. Anhui Med Pharm J, 2019, 23(12): 2382-2385.
- [8] 饶志, 张帆, 董毓松, 等. 槲子“辨状论质”及其品质成因研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1998-2004.
Rao Z, Zhang F, Dong Y S, et al. Research progress on "quality evaluation through morphological identification" and cause of quality formation in *Gardeniae Fructus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(6): 1998-2004.
- [9] 陈榕, 何梓炫, 颜焯, 等. 槲子及其主要成分的药理及毒性作用研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 6092-6105.
Chen R, He Z X, Yan Y, et al. Research progress on pharmacological and toxic effects of *Gardeniae Fructus* and its main components [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(18): 6092-6105.
- [10] 王意忠, 崔晓兰, 高英杰, 等. 槲子提取物抗病毒试验研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1176-1178.
Wang Y Z, Cui X L, Gao Y J, et al. Antivirus effects of extract from gardenia [J]. China J Chin Mater Med, 2006, 31(14): 1176-1178.
- [11] 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.
- [12] 王晓, 舒恒, 李洁, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨木瓜抗胃衰老的作用机制 [J]. 中国药学杂志, 2023, 58 (13): 1166-1177.
Wang X, Shu H, Li J, et al. Exploration of the mechanism of *Chaenomeles speciosa* against gastric aging based on network pharmacology and experimental validation [J].

- Chin Pharm J, 2023, 58(13): 1166-1177.
- [13] Ahmed S S S J, Ramakrishnan V. Systems biological approach of molecular descriptors connectivity: Optimal descriptors for oral bioavailability prediction [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40654.
- [14] Ursu O, Rayan A, Goldblum A, et al. Understanding drug-likeness [J]. Wires Comput Mol Sci, 2011, 1(5): 760-781.
- [15] 桂文琪, 方媛, 聊晓玉, 等. 基于网络药理学和体内实验验证霍山石斛治疗胃溃疡的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(7): 151-161.
- Gui W Q, Fang Y, Liao X Y, et al. Mechanism of *Dendrobium huoshanense* in treatment of gastric ulcer: Based on network pharmacology and *in vivo* experiment [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(7): 151-161.
- [16] 孙宝迪, 夏斌, 俞燕露, 等. 基于网络药理学和分子对接技术清咳平喘颗粒治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)分子机制研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(10): 2116-2125.
- Sun B D, Xia B, Yu Y L, et al. Study of molecular mechanisms of Qingke Pingchuan Granule in treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking method [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(10): 2116-2125.
- [17] 范春兰, 张思玉, 左泽平, 等. 基于网络药理学探讨京制牛黄解毒片治疗口腔溃疡的作用机制及实验验证 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(1): 94-106.
- Fan C L, Zhang S Y, Zuo Z P, et al. Mechanism and experimental verification of jingzhi niuhuangjiedu tablets in treatment of oral ulcer based on network pharmacology [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2023, 25(1): 94-106.
- [18] 刘文倩, 高耀, 张立伟, 等. 基于网络药理学研究连翘抗炎作用机制 [J]. 山西大学学报(自然科学版), 2023, 46(1): 208-219.
- Liu W Q, Gao Y, Zhang L W, et al. Study on anti-inflammatory mechanism of forsythiae fructus based on network pharmacology [J]. J Shanxi Univ Nat Sci Ed, 2023, 46(1): 208-219.
- [19] 范秋雨, 武建文, 李春晓, 等. 苦豆子抗炎机制的网络药理学分析及试验验证 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(7): 2951-2965.
- Fan Q Y, Wu J W, Li C X, et al. Network pharmacology analysis of Anti-inflammatory mechanism of *Sophora alopecuroides* and experimental validation [J]. China Anim Husband Vet Med, 2023, 50(7): 2951-2965.
- [20] 徐森楠, 庄莉, 翟园园, 等. 基于网络药理学研究二至丸防治骨质疏松症的物质基础与作用机制 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(22): 1913-1920.
- Xu S N, Zhuang L, Zhai Y Y, et al. Material basis and mechanism of erzhi pill for preventing osteoporosis based on network pharmacology [J]. Chin Pharm J, 2018, 53(22): 1913-1920.
- [21] Sun Z Y, Huang L, Liao J O, et al. Prediction of molecular mechanism of Shengjie Tongyu decoction in the treatment of chronic heart failure based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. Chin Pharm J, 2021, 56(18): 1486-1495.
- [22] 宗阳, 丁美林, 贾可, 等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 836-844.
- Zong Y, Ding M L, Jia K K, et al. Exploring active compounds of Da-Yuan-Yin in treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking method [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(4): 836-844.
- [23] 魏金婷, 刘文奇. 植物药活性成分 β -谷甾醇研究概况 [J]. 莆田学院学报, 2007, 14(2): 38-40, 46.
- Wei J T, Liu W Q. β -sitosterol, one of functional component in phytosterols [J]. J Putian Univ, 2007, 14(2): 38-40, 46.
- [24] Chen W P, Yu C, Hu P F, et al. Stigmasterol blocks cartilage degradation in rabbit model of osteoarthritis [J]. Acta Biochim Pol, 2012, 59(4): 537-541.
- [25] 冯思敏, 宁可, 邵平, 等. β -谷甾醇和豆甾醇对小鼠急性结肠炎的治疗作用研究 [J]. 中国粮油学报, 2018, 33(12): 80-86, 94.
- Feng S M, Ning K, Shao P, et al. Research on the β -sitosterol and stigmasterol therapeutic effect of acute colitis in mice [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2018, 33(12): 80-86, 94.
- [26] Antwi A O, Obiri D D, Osafo N, et al. Stigmasterol alleviates cutaneous allergic responses in rodents [J]. BioMed Res Int, 2018, 2018: 3984068.
- [27] 李庆勇, 姜春菲, 张黎, 等. β -谷甾醇、豆甾醇诱导人肝癌细胞SMMC-7721凋亡 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1173-1175.
- Li Q Y, Jiang C F, Zhang L, et al. Apoptosis-inducing effect of β -sitosterol and stigmasterol on human liver cancer SMMC-7721 cells [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2012, 23(5): 1173-1175.
- [28] 张晓丽, 刘洪海, 杜平, 等. 藏红花酸的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2008, 23(6): 411-414.
- Zhang X L, Liu H H, Du P, et al. Research progress of crocetin [J]. Northwest Pharm J, 2008, 23(6): 411-414.
- [29] Magesh V, Singh J P V, Selvendiran K, et al. Antitumor activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and

- histopathological studies [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 287(1): 127-135.
- [30] Xiang M, Yang M, Zhou C H, et al. Crocetin prevents AGEs-induced vascular endothelial cell apoptosis [J]. Pharmacol Res, 2006, 54(4): 268-274.
- [31] Farrag M A, Almajhi F N. Human respiratory syncytial virus: Role of innate immunity in clearance and disease progression [J]. Viral Immunol, 2016, 29(1): 11-26.
- [32] Ueki I F, Min-Oo G, Kalinowski A, et al. Respiratory virus-induced EGFR activation suppresses IRF1-dependent interferon λ and antiviral defense in airway epithelium [J]. J Cell Biol, 2013, 210(10): 1929-1936.
- [33] 刘娟娟, 张婷, 米芋枚. 呼吸道合胞病毒感染对气道上皮细胞表皮生长因子受体、紧密连接相关蛋白及黏蛋白表达的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(3): 294-299.
- Liu J J, Zhang T, Mi Y M. Effects of respiratory syncytial virus infection on epidermal growth factor receptor, tight junction association proteins and mucin in airway epithelial cells [J]. Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(3): 294-299.
- [34] 张鹤, 赵晓宇, 郑锐, 等. Src 酪氨酸激酶抑制剂对表皮生长因子诱导的肺腺癌细胞生长的作用及机制 [J]. 中国医科大学学报, 2023, 52(2): 132-136.
- Zhang H, Zhao X Y, Zheng R, et al. Mechanism of Src tyrosine kinase inhibitor suppresses the growth of lung adenocarcinoma cells induced by epidermal growth factor [J]. J China Med Univ, 2023, 52(2): 132-136.
- [35] Guo L F, Wang Q H, Zhang D Q. MicroRNA-4485 ameliorates severe influenza pneumonia via inhibition of the STAT3/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2020, 20(5): 215.
- [36] Li S C, Han X J, Lu Z C, et al. MAPK cascades and transcriptional factors: Regulation of heavy metal tolerance in plants [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8): 4463.
- [37] Cheng Y, Chen J, Shi Y, et al. MAPK signaling pathway in oral squamous cell carcinoma: Biological function and targeted therapy [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(19): 4625-4642.
- [38] Wankowicz S A M, Werner L, Orsola A, et al. Differential expression of PD-L1 in high grade T1 vs muscle invasive bladder carcinoma and its prognostic implications [J]. J Urol, 2017, 198(4): 817-823.

【责任编辑 袁永兵】