

基于分子网络-虚拟对接-实验验证的清咽滴丸抗流感活性物质发现

王欣跃¹, 王长健¹, 李鑫茹¹, 于飞³, 张敏^{1,2*}, 杨静^{1*}

1. 天津中医药大学 现代中药创制全国重点实验室, 天津 301617

2. 现代中医海河实验室, 天津 301617

3. 天津医科大学药学院 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

摘要: **目的** 通过构建分子网络, 结合分子对接与实验验证探究清咽滴丸抗流感的活性物质。 **方法** 用噻唑蓝 (MTT) 法检测不同浓度清咽滴丸对非洲绿猴肾细胞 Vero E6 细胞活力的影响, 确定安全剂量。以甲型 H1N1 流感病毒 (H1N1) 毒株 PR8 构建病毒感染 Vero E6 细胞模型, 评价清咽滴丸的体外抗病毒活性。通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、PubChem 数据库获取清咽滴丸活性成分及其作用靶点, 以 GeneCards、OMIM、DrugBank 和 Swiss Target Prediction 数据库获取流感靶点, 经 Uniprot 数据库进行蛋白-基因的标准化转换, 以活性成分靶点与疾病靶点取交集绘制 Venn 图, 基于 Cytoscape 软件构建“中药-活性成分-关键靶点-疾病”分子网络, 通过 STRING 数据库搭建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 采用 DAVID 数据库进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。通过 BIOVIA Discovery Studio 2020 软件计算系统进行潜在活性成分和关键靶点的分子对接, 基于表面等离子共振技术 (SPR) 对虚拟筛选结果进行验证, 阐释活性分子与靶点的亲和活性, 并通过 ELISA 方法检测了白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达水平, 评价活性分子的抗炎活性。 **结果** 体外实验结果表明清咽滴丸对 H1N1 甲型流感病毒株 PR8 在质量浓度为 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 对流感病毒抑制率为 49.70%。清咽滴丸抗流感的潜在活性成分 118 个, 共有靶点 94 个, 度值排名前 10 位的核心靶点为 IL-6、TNF、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、IL-1 β 、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、原癌基因 (*JUN*)、骨髓细胞瘤癌基因 (*MYC*)、IL-10、白细胞介素-8 (CXCL8), 其主要通过调节 IL-17 信号通路、TNF 信号通路等发挥抗流感作用。组方中的异鼠李素、山柰酚、诃子次酸和鞣花酸与关键靶点 IL-6 与 TNF- α 具有良好的亲和活力, 并具有显著的抗炎作用, 提示其可能是组方发挥抗流感的潜在活性成分。 **结论** 清咽滴丸通过异鼠李素、山柰酚、诃子次酸和鞣花酸等活性物质调节机体免疫功能、作用于细胞因子以及调控炎症相关信号通路, 协同发挥抗流感的作用。

关键词: 清咽滴丸; 流感; 抗炎; 分子网络; 分子对接; 异鼠李素; 山柰酚; 诃子次酸; 鞣花酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)06-1485-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.06.010

Discovery of bioactive compounds from Qingyan Dropping Pills in treatment of influenza by network pharmacology, molecular docking and experimental verification

WANG Xinyue¹, WANG Changjian¹, LI Xinru¹, YU Fei³, ZHANG Min^{1,2}, YANG Jing¹

1. State Key Laboratory of Chinese Medicine Modernization, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To unveil the potential active compounds of Qingyan Dropping Pills (QDP) for the treatment of influenza via an integrated strategy combining molecular networks, molecular docking, and experimental verification. **Methods** First, cell viability

收稿日期: 2024-11-06

基金项目: 天津市教委科研计划项目 (2019KJ178)

作者简介: 王欣跃 (2000—), 女, 硕士研究生在读, 研究方向为药物分析学。E-mail: Wangxy000821@163.com

*通信作者: 张敏, 女, 副研究员, 研究方向为中药活性物质评价。E-mail: zhangm036@tjutcm.edu.cn

杨静, 女, 高级实验师, 研究方向为中药质量评价。E-mail: yangjingoffice@163.com

was assessed by MTT assay at various concentrations. The H1N1 influenza A virus PR8 strain was used to infect Vero E6 cells for evaluating the antiviral activity. Then, the potential active compounds and targets of QDP were retrieved from the TCMSP and PubChem databases. Disease-related targets of influenza were obtained from GeneCards, OMIM, DrugBank, and Swiss Target Prediction databases. Protein-gene symbol conversion was conducted using the Uniprot database. A Venn diagram was generated to identify the intersection between active compound targets and disease targets. The “Herb-compound-target-disease” network was constructed by Cytoscape software. A protein-protein interaction (PPI) network was generated via STRING database, and Gene Ontology (GO) function as well as Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed on key targets using the DAVID database. Potential active compounds were docked with key targets to verify molecular interaction via the BIOVIA Discovery Studio 2020 computational system. Finally, surface plasmon resonance (SPR) assay were explored to verify the binding affinities between active compounds and targets. Additionally, the expression levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) *in vitro* to verify the anti-inflammatory activity of potential active compounds. **Results** QDP were against the H1N1 influenza A virus PR8 strain with the inhibitory rate of 49.70% *in vitro*. A total of 118 potential active compounds and 94 targets were screened. The top 10 core targets, including IL-6, TNF, tumor protein 53 (TP53), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), IL-1 β , caspase-3 (CASP3), Jun proto-oncogene (JUN), myc proto-oncogene (MYC), IL-10, and interleukin-8 (CXCL8), played an important role against anti-influenza virus by regulating the IL-17 signaling pathway and TNF signaling pathway. Isorhamnetin, kaempferol, chebulic acid, and ellagic acid showed good binding affinities with IL-6 and TNF- α , and significantly reduced the levels of inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α). **Conclusion** Isorhamnetin, kaempferol, chebulic acid, and ellagic acid were verified as the active compounds in QDP to perform anti-influenza activity mainly via regulating immune function, inhibiting inflammatory responses, and modulating cytokines and pathways.

Key words: Qingyan Dropping Pills; influenza; anti-inflammation; molecular networks; molecular docking; isorhamnetin; kaempferol; chebulic acid; ellagic acid

流感病毒是一种具有传染性的呼吸道病毒，通常发生在冬季，其典型症状为发烧、肌痛、头痛、喉咙痛、干咳和鼻炎等，严重者可能继发多种疾病，包括肺炎、胃肠道和神经系统相关疾病等^[1-3]。流感每年在全球造成重症病例 300~500 万，死亡病例 29~65 万^[4]。目前，我国防治流感主要采用疫苗预防和药物治疗 2 种策略，但由于病毒突变速度快，疫苗的保护屏障逐渐减弱。因此，寻找和开发广谱的抗病毒药物对流感的治疗仍然是研究的热点。

临床上治疗流感常用的化学药主要是神经氨酸酶 (NA) 抑制剂和聚合酶抑制剂，但由于伴随较多的不良反应和耐药性等问题^[5]，限制了其广泛使用。中药以其“多成分、多靶点、多通路”的协同作用模式，在治疗呼吸系统传染病方面优势显著。临床研究发现清咽滴丸对上呼吸道感染具有显著的疗效，是抗流感潜在的中药复方。清咽滴丸是由《兰台轨范》记载的清音丸和《喉科心法》记载的六神丸组方加减化裁而来，结合现代滴丸剂型研制的一种新型中药制剂，是古代经典名方与现代制药技术融合的产物。全方由诃子、人工牛黄、青黛、甘草、冰片、薄荷脑 6 味药材组成，以青黛和诃子为君药，人工牛黄为臣药，薄荷脑和冰片为佐药，甘草为使药，协同发挥消肿、止痛、解毒、利咽、

祛风等功效，主要用于治疗咽喉肿痛、急性咽炎、扁桃体炎等上呼吸道感染相关疾病，已在临床上得到了广泛应用。尽管清咽滴丸的主要适应证集中在咽喉疾病的治疗上，但近年来研究表明，其某些活性成分可能具有抗病毒活性，尤其是在抑制流感病毒复制方面显示出一定的潜力，这一发现为开发其新的适应证提供了理论依据。

本研究通过体外细胞流感病毒模型评价组方的抗病毒活性，通过构建分子网络，筛选组方治疗流感病毒的潜在活性成分、作用靶点与作用通路，搭建分子对接模型评价活性成分与靶点的潜在相互作用，基于表面等离子共振技术 (SPR) 进行靶点与配体亲和力验证，并通过 ELISA 方法检测了炎症因子白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达水平，阐释组方抗流感的作用机制，为组方开发新的临床适应证提供科学证据支持。

1 材料

1.1 试药

清咽滴丸 (批号: 620054; 规格: 每丸 20 mg, 每瓶 30 丸) 由津药达仁堂集团股份有限公司第六中药厂提供。

1.2 细胞系及流感病毒株

非洲绿猴肾细胞 Vero E6 购自 ATCC 公司 (货

号: CRL-1586); 小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 购买于中国武汉普瑞斯生命科技有限公司; 本研究采用 A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 病毒 (即 PR8 病毒) 进行体外药效学模型制备。

1.3 药品与试剂

高葡萄糖培养基 (DMEM, 批号 D6429) 购自上海 Sigma-Aldrich 公司; 胎牛血清 (FBS, 批号 2500251p)、胰酶 (批号 1859509) 购自美国 Gibco 公司; 青霉素 ($10\,000\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 批号 15140122)、链霉素 ($10\,000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 批号 15140122)、L-谷氨酰胺 ($200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 批号 A2916801)、酪蛋白-EDTA (0.25%, 批号 25200072)、青霉素-链霉素 (批号 SV30010)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号 AG29711569) 购自美国 HyClone 公司; 噻唑蓝 (MTT, 批号 M10)、二甲基亚砜 (DMSO, 批号 3230221001) 购自索莱宝股份有限公司; DMSO (D274279)、甲醇 (F2209030) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; TNF- α 、IL-6 (批号 254494、285810) 购自美国 MCE 生物科技公司; 山柰酚 (质量分数 $\geq 98\%$; 批号 G03J11L117305)、异鼠李素 (质量分数 $\geq 98\%$; 批号 A05IB211848)、鞣花酸 (质量分数 $\geq 98\%$; 批号 S24D11G135548)、诃子次酸 (质量分数 $\geq 98\%$; 批号 G19J9C62812) 购自上海源叶生物科技有限公司; PBS-P (批号 282205)、CM5 芯片、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基卡巴朴胺/N-羟基丁二酰亚胺 (EDC/NHS, 批号 31765)、pH 4.0、4.5、5.0、5.5 醋酸缓冲液 (批号 31483、31822、31491、31825)、 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH}$ (批号 32433)、乙醇胺 (批号 31765) 购自 Cytiva 公司; IL-6 和 TNF- α 炎症因子 ELISA 检测试剂盒购买于上海茁彩生物科技有限公司。

1.4 仪器

Infinite F50 型酶标仪 (瑞士帝肯公司); Celigo-106-0568 型全视野细胞分析仪 (上海耐细隆生物仪器有限公司); HFsafe-1800LC 型生物安全柜、HF240 型二氧化碳培养箱 (上海力申科学仪器有限公司); D-37520 Osterode 型台式高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技公司); MODELECLIPSE Ts2 型显微镜 (南京尼康江南光学仪器有限公司); 201544CD0015 型离心机 (美国贝克曼库尔特有限公司)、HX 0571 型高压灭菌锅 (天津赛力斯自动化科技有限公司); BCD-253WDPDU1 型冰箱 (海尔电器国际股份有限公司); ME 20 型万分之一天平、MS 105DU 型十万

分之一天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q 型超纯水仪 (美国密理博公司); DK-98-IT 型电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司); HFsafe-1800LC 型生物安全柜 (上海力申科学仪器有限公司); XW-80A 型涡旋仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Biacore T200 (Cytiva 公司); CKX41SF 型倒置相差显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 体外抗流感病毒的药效学研究

2.1.1 完全培养基配制 向 50 mL 无菌离心管中加入基础培养基 45 mL, 胎牛血清 5 mL, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素和 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素 500 μL , 封口后放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.1.2 药品溶液配制 取清咽滴丸 1 丸称质量后, 加完全培养液溶解至浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清, 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 无菌滤膜滤过后, 作为母液待用。在体外细胞活力检测中, 以完全培养基对母液进行稀释, 使清咽滴丸终质量浓度分别为 10、20、50、100、200、500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在抗病毒研究中, 以 1:10、1:50、1:100、1:500、1:2 500 和 1:12 500 进行倍比稀释, 然后与病毒等体积混合至 96 孔板, 使清咽滴丸终质量浓度分别为 500.00、50.00、10.00、5.00、1.00、0.20 和 $0.04\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.1.3 MTT 溶液配制 避光条件下精密称取 MTT 100 mg, 加入 PBS 溶液 40 mL 震荡充分溶解, 配制成 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 溶液, 放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存待用。

2.1.4 MTT 细胞活力研究 将 100 μL 含 5×10^4 个 Vero E6 细胞接种至 96 孔板中, 培养 24 h 待细胞贴壁后, 用吸痰器吸出培养基, 加入不同质量浓度 (0、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 清咽滴丸待测样品 200 μL , 每个浓度设置 3 个复孔, 分别培养 24 h 和 72 h 后, 每孔加 MTT 溶液 50 μL , 孵育 4 h, 弃上清, 加入 150 μL DMSO, 于酶标仪在 490 nm 处检测吸光度 (A) 值, 计算细胞半数中毒浓度 (CC_{50})。

2.1.5 清咽滴丸抗病毒活性研究 将 100 μL 含 2×10^4 个 Vero E6 细胞接种至 96 孔板中, 放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温恒湿培养箱培养过夜, 待细胞贴壁后吸弃培养液。每孔分别加入 100 μL 不同浓度 (500.00、50.00、10.00、5.00、1.00、0.20 和 $0.04\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的待测药物, 每个浓度设置 4 个复孔, 并设置对照组。

除对照组外, 其余组加入病毒培养液[感染复数 (MOI) = 0.01], 培养 72 h 后, 以全视野细胞扫描仪记录细胞病变效应 (CPE), 计算抑制率。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 清咽滴丸活性成分和靶点筛选 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、SwissADME 平台 (<http://www.swissadme.ch/index.php>) 获得清咽滴丸活性成分并筛选作用靶点。通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 对获得的药物靶点来源和基因信息进行校正^[6-7]。

2.2.2 药物-疾病靶点预测 通过 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM 数据库, <https://www.omim.org/>) 以及 DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.ca/>), 以 “influenza” 为关键词搜索疾病靶点, 获得疾病靶点数据集。通过 Venny 2.1.0 将清咽滴丸活性成分的相关靶点与流感疾病的相关靶点取交集。

2.2.3 “中药-活性成分-关键靶点-疾病”分子网络的构建 将清咽滴丸药材活性成分与流感的交集靶点及其相互关系导入 Cytoscape 3.10.1 软件, 进行可视化处理, 构建清咽滴丸“中药-活性成分-关键靶点-疾病”相互作用网络, 计算各活性成分的度值。

2.2.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 分子网络的构建 通过 STRING 数据库 (<https://www.string-db.org/>), 选择 “multiple proteins” 模式, 设置置信度为 0.400, 蛋白种属限定为 “Homo sapiens”, 构建 PPI 网络。将结果导入 Cytoscape 3.10.1 软件, 根据度值进行核心靶点筛选。

2.2.5 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析 通过 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 限定物种为 “Homo sapiens”, 设置参数后进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。根据 P 值对富集结果进行筛选, 以 $P < 0.05$ 为有显著差异, 利用微生信分析平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>), 将富集分析结果的前 30 项分别进行可视化。

2.3 分子对接

通过 PubChem 数据库中下载活性成分的 3D 结构, 并转化为 mol2 格式文件, 将其导入 DS 软件进行配体结构优化, 经加氢及能量最小化等操作后, 保存待用。以排名前 2 位靶点: IL-6 (PDB ID:

1ALU)、肿瘤坏死因子超家族 (TNF, PDB ID: 5WIW) 作为受体进行分子对接。通过检索 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 获得蛋白 3D 结构, 将其导入 DS 软件, 进行加氢、去水、调整键序、标准化原子名称等前处理, 以原配体所在的腔隙选取具有相互作用的关键氨基酸残基作为活性位点, 去除原配体后将蛋白文件保存待用。将准备好的蛋白质受体与配体小分子在 CDOCKER 模式下进行精准对接。以对接自由能为评价标准, 指数较高的小分子构象即为最优构象, 将 IL-6、TNF 分别与活性成分进行对接获取结合自由能。

2.4 基于表面等离子共振的蛋白与配体亲和力测定

选取与靶蛋白对接结果较好的 4 个共有小分子, 即异鼠李素、山柰酚、诃子次酸、鞣花酸作为配体, 基于 SPR 进行受体-配体亲和力验证。

2.4.1 蛋白预富集与蛋白偶联 分别将 TNF- α 、IL-6 用去离子水溶解并配成质量浓度为 0.25 mg·mL⁻¹ 的蛋白母液, 用 4 种不同 pH 的醋酸盐缓冲液 (pH = 4.0、4.5、5.0、5.5) 稀释蛋白母液 20 倍, 进样 Biacore 预富集系统分别检测不同 pH 条件下对 TNF- α 和 IL-6 的响应程度, 以确定蛋白偶联的最佳 pH 条件。随后, 以 EDC/NHS 活化 CM5 芯片表面羧基, 通过缩合反应分别将 TNF- α 、IL-6 键合到 CM5 芯片上。最后, 乙醇胺封闭未结合的羧基, 完成蛋白预富集与偶联。

2.4.2 分子动力学分析 将小分子样品用 DMSO 稀释至 10 mmol·L⁻¹, 然后用 1.05×PBS-P 稀释小分子母液 20 倍 (DMSO 终体积分数为 5%) 作为初始溶液浓度, 随后以缓冲液 (1.05×PBS-P, 5% DMSO) 二倍比进行梯度稀释, 使终浓度为 0.487 5~125.000 0 μ mol·L⁻¹。通过 Biacore 微流控系统以 30 μ L·min⁻¹ 体积流量, 设置结合时间 120 s, 解离时间 180 s, 进行蛋白与配体亲和力评价。以结合响应值绘制动力学曲线, 计算平衡解离常数。

2.5 炎症模型的建立及给药

将 100 μ L 含 1×10^5 个 RAW 264.7 细胞接种至 96 孔板中, 放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温恒湿培养箱培养过夜, 待细胞贴壁后吸弃培养液。

称取脂多糖 (LPS) 粉末 10 mg 加入 PBS 10 mL 配制成 1 mg·mL⁻¹ LPS 溶液母液, 每毫升含药全培养基中加入 LPS 母液 1 μ L, 使 LPS 终质量浓度为 1 μ g·mL⁻¹, 除对照组外, 其余组加入 1 μ g·mL⁻¹ LPS, 诱导 RAW 264.7 细胞建立炎症模型。

精密称取化合物 (异鼠李素、山柰酚、诃子次

酸、鞣花酸) 适量, 加入 1% DMSO 预溶, 加入完全培养基配制成浓度为 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 取母液依次稀释成 5、20、40、60、 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行后续实验。每孔分别加入 $200\ \mu\text{L}$ 不同质量浓度的待测药物, 每个质量浓度设置 6 个复孔, 并依次设置对照组、模型组、不同浓度给药组。

干预结束后收集细胞上清液并离心, 通过试剂盒说明书测定上清液中 IL-6、TNF- α 分泌情况, 使用酶标仪在 $540\ \text{nm}$ 下测定 A 值。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析, GraphPad Prism 8.0.2 软件绘制柱状图, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 MTT 细胞活力结果

孵育 24、72 h, 清咽滴丸对 Vero E6 细胞活力影响的结果如表 1 所示, 清咽滴丸在 $10\sim 500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内, 与对照组相比, 细胞活力无显著性差异, $\text{CC}_{50} > 500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对细胞没有毒性。

3.2 体外抗病毒药效实验结果

清咽滴丸抗流感病毒结果如表 2 所示, 以对照组进行归一化分析, 结果显示清咽滴丸对流感病毒具有一定的抑制活性, 在质量浓度为 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 对流感病毒抑制率约为 49.70%, 随着浓度增加, 抑制率增加, 呈现剂量相关性。

3.3 分子网络

3.3.1 清咽滴丸活性成分及靶点信息 通过 TCMSP 数据库和 Swiss Target Prediction 平台以口服生物利用度 (OB) 大于 30%、类药性 (DL) 大于 0.18 初步筛选潜在活性成分 118 个, 成分对应靶点 491 个。通过 OMIM、Genecard 和 Drugbank 数据库合并去重, 得到流感靶点 383 个, 将成分靶点与疾病靶点取交集, 绘制 Venn 图, 如图 2 所示, 得到 94 个共有靶点, 占有靶点的比例为 12.1%。

3.3.2 “中药-活性成分-关键靶点-疾病”网络 利用 Cytoscape3.10.1 软件构建了“中药-活性成分-关键靶点-疾病”的分子网络, 见图 3。网络中共有 904 个节点、3 055 条边。蓝色六边形代表 6 种中药, 不同颜色的圆形代表活性成分, 红色 V 形代表流感, 粉色菱形代表关键靶点。通过分子网络可以看出, 源于清咽滴丸中相同药材的不同成分作用于同一靶点, 突显中医药作用机制的复杂性以及中药的“多成分、多靶点”协同作用的特点。

表 1 清咽滴丸不同浓度对 Vero E6 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

清咽滴丸/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞活力/%	
	孵育 24 h	孵育 72 h
0	100.00 ± 6.76	100.00 ± 4.24
10	99.75 ± 8.03	99.77 ± 1.06
20	99.93 ± 8.36	101.36 ± 6.42
50	99.40 ± 6.91	99.27 ± 4.45
100	99.59 ± 7.47	104.14 ± 2.73
200	98.68 ± 6.88	103.28 ± 4.53
500	100.48 ± 5.57	102.21 ± 1.44

表 2 清咽滴丸不同浓度对 PR8 病毒的抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

清咽滴丸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抑制率/%
500.00	49.70 ± 5.35
50.00	45.94 ± 4.83
10.00	40.81 ± 0.43
5.00	33.43 ± 4.58
1.00	42.36 ± 6.34
0.20	29.30 ± 6.52
0.04	31.83 ± 3.12

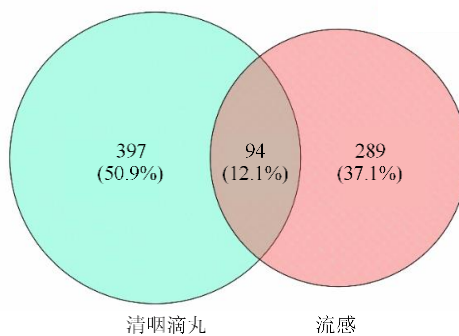
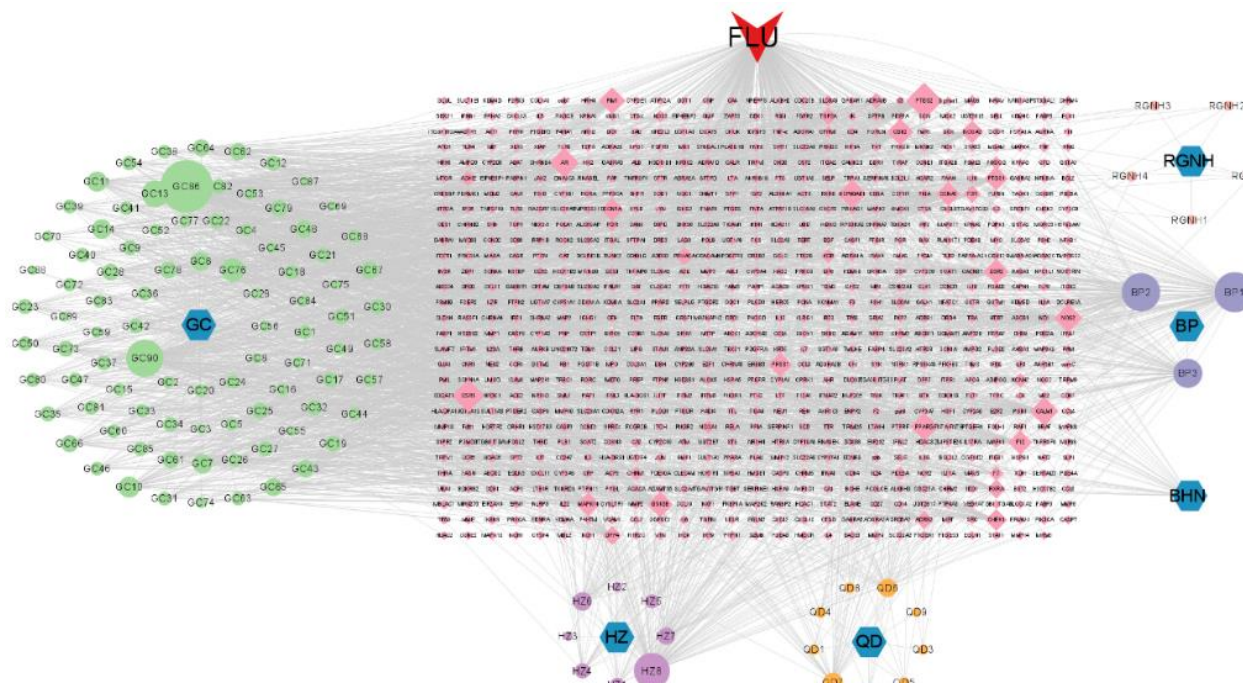


图 2 清咽滴丸活性成分与流感疾病的交集靶点 Venn 图
Fig. 2 Venn diagram of targets of Qingyan Dropping Pills and influenza disease

3.3.3 清咽滴丸抗流感的 PPI 网络分析 将交集靶点导入 STRING 数据库构建可视化 PPI 网络。网络中包含 99 个节点及 2 816 条连线。将该网络导入 Cytoscape 3.10.1 软件进行拓扑分析, 获得各个靶点的度值, 颜色越深, 面积越大, 度值越大, 见图 4。提取排名前 20 的靶点按照度值进行排序绘制柱状图, 见图 5。PPI 网络中的排名前 10 的核心靶点有 IL-6、TNF、TP53、PTGS2、IL1B、Casp3、JUN、MYC、IL-10、CXCL8,

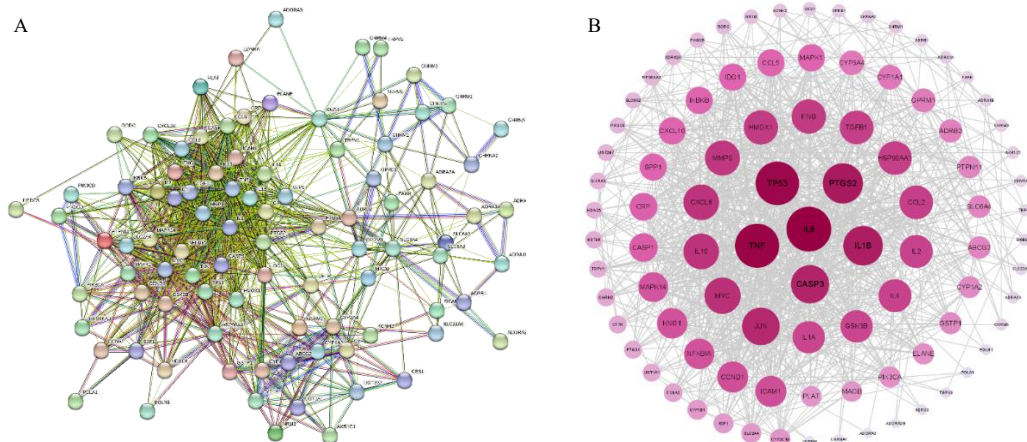


FLU-流感; GC-甘草; HZ-诃子; QD-青黛; BHN-薄荷脑; BP-冰片; RGNH-人工牛黄。

FLU-influenza; GC-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; HZ-Chebulae Fructus; QD-Indigo Naturalis; BHN-menthol; BP-Borneolum Syntheticum; RGNH-Bovis Calculus Artificus.

图 3 “中药-活性成分-关键靶点-疾病”网络分析

Fig. 3 Network analysis of “traditional Chinese medicine-active compound-key target-disease”



A-核心靶点的 PPI 网络; B-度值分析后核心靶点的 PPI 网络。

A-PPI network of core targets; B-PPI network of core targets after degree-value analysis.

图 4 PPI 相互作用网络分析

Fig. 4 PPI interaction network analysis

提示这些靶点可能是清咽滴丸发挥治疗流感作用的主要靶点,其中 IL-6 度值最高。IL-6 是重要的炎症介质,是一种功能广泛的多效性细胞因子,是炎症介质网络的关键成分,IL-6 参与许多疾病的发生和发展,其分泌或基因表达异常可导致一系列疾病的发生^[8]。TNF 包括 TNF- α 及 TNF- β 2 种,是较为

典型的细胞因子,与炎症反应的发生密切相关。TP53 被称为“基因组的守护者”,它通过触发细胞周期停滞、细胞凋亡和衰老来响应 DNA 损伤,研究表明甲型流感病毒的非结构蛋白 1 (NS1) 与 TP53 相互作用,改变其响应基因启动子,从而发挥抗病毒作用^[9]。PTGS2 为前列腺素内过氧化物合酶 2,与炎症因子有

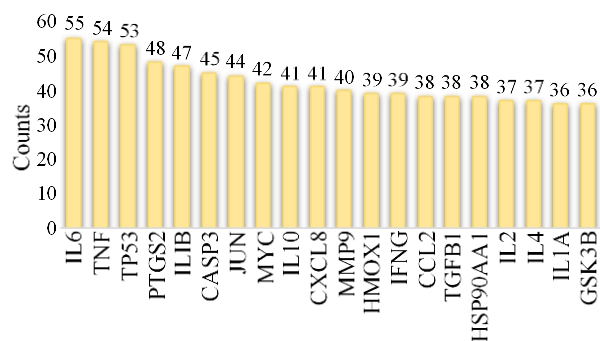


图 5 度值排名前 20 的核心靶点

Fig. 5 Top 20 core targets in terms of degree value

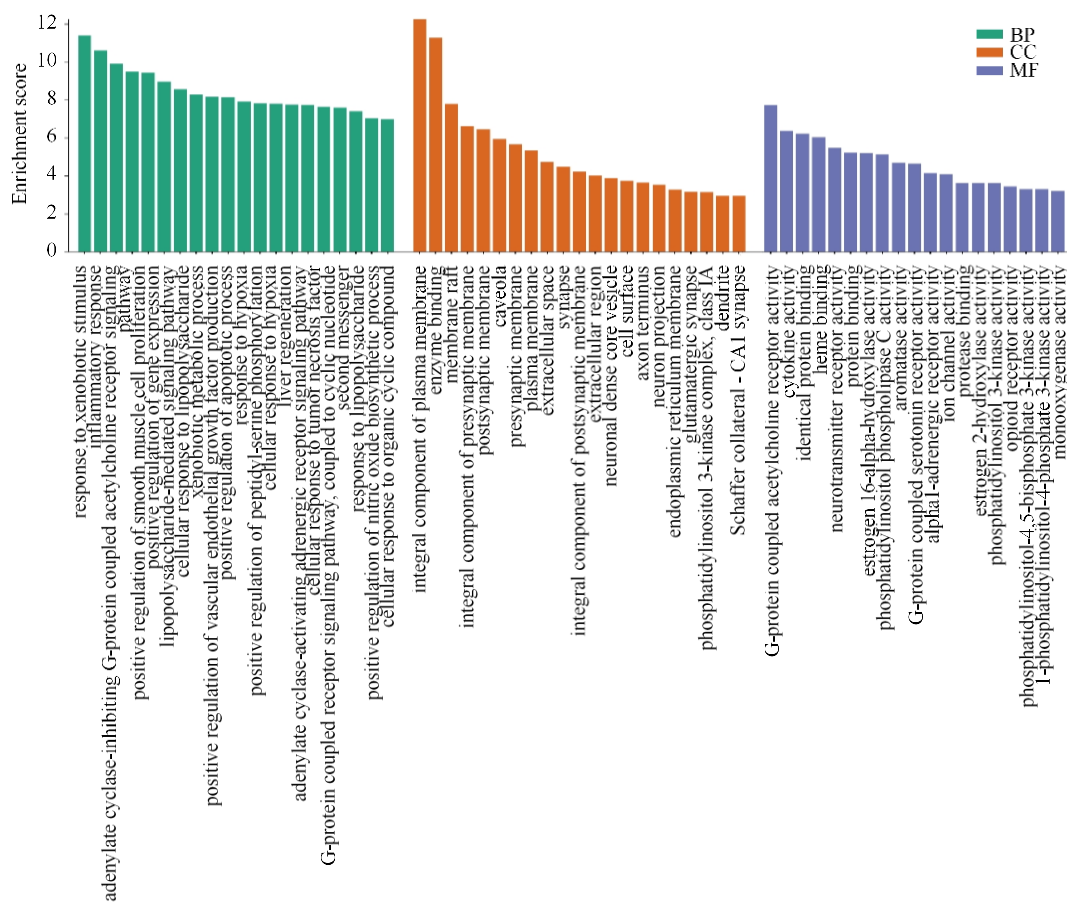


图 6 清咽滴丸抗流感潜在靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 6 GO functional enrichment analysis of potential anti-influenza targets of Qingyan Dropping Pills

腺苷酸环化酶抑制 G 蛋白偶联乙酰胆碱受体、平滑肌细胞增殖的正向调节等相关过程。MF 主要与酶结合、G 蛋白偶联乙酰胆碱受体活性、细胞因子活性、同种蛋白结合有关,推测可能通过抑制病毒相关蛋白酶的结合及抑制作用发挥作用。在 CC 方面主要与质膜的组成成分、膜筏等结构有关。

3.3.5 KEGG 通路富集分析 利用 DAVID 数据库

关,通过催化花生四烯酸生成前列腺素,这些脂质介质在炎症、疼痛和发热中起重要作用。PTGS2 的表达通常受到多种信号通路的调控,如 NF- κ B 和 MAPK 通路,这些通路在炎症和应激反应中被激活^[10]。由此可推测清咽滴丸抗流感的主要作用靶点与免疫功能、炎症反应、细胞凋亡等密切相关。

3.3.4 GO 功能富集分析 利用 DAVID 数据库对关键靶点进行 GO 功能富集分析,得到 432 个生物过程 (BP), 43 个细胞成分 (CC), 79 个分子功能 (MF)。按 *P* 值排序选取每个功能项下前 20 条通路绘制柱状图。见图 6。BP 中主要富集到炎症反应、

进行 KEGG 信号通路富集分析,结果如图 7 所示,主要涉及通路有 IL-17、TNF 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、乙型肝炎、甲型流感、T 细胞受体信号通路等,与免疫调节、信号转导、炎症反应密切相关,协同发挥抗炎抗病毒作用。

3.4 分子对接分析

将网络药理学分析获得的 118 个化合物通过

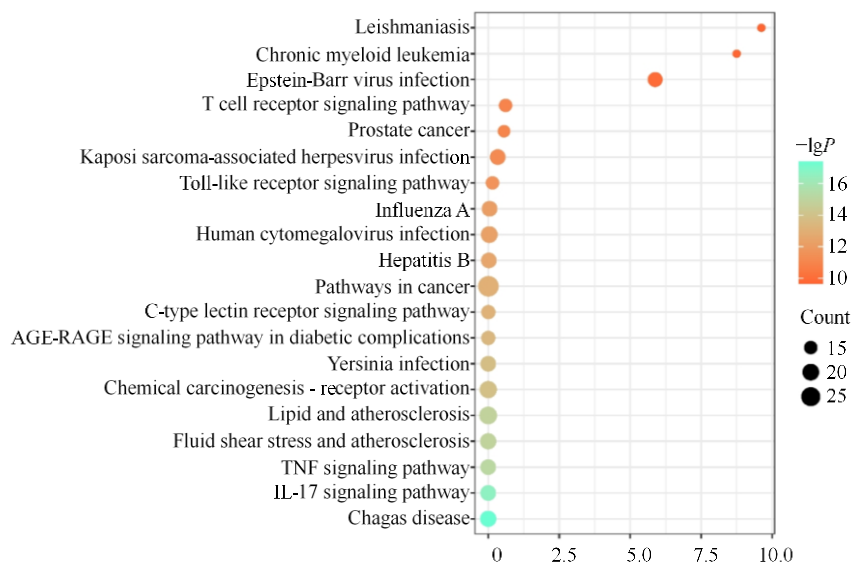


图 7 清咽滴丸抗流感潜在靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 Enrichment analysis of KEGG pathway as a potential target for anti-influenza in Qingyan Dropping Pills

Pubchem 等数据库下载化合物 3D 结构, 将检索到的 98 个化合物与度值排名前 2 位的交集靶点 IL-6、TNF 进行分子对接, 结合自由能排名前 10 的化合物如表 3 所示, 通过 Pymol 软件将其结果可视化如图 8 所示。在与 IL-6 的对接中, 结果显示鳞叶甘草素 A 结合能力最强, 其主要通过氢键与 IL-6 中的氨基酸残基 Arg 302.6、Arg 1792.9、Arg 1822.7 等发生相互作用, 其结合自由能为 $-246.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。鳞叶甘草素 A 是一种黄酮类化合物, 主要存在于甘草中。在与 TNF 的

对接中, 结果显示诃子次酸结合能力最强, 其主要通过氢键与 TNF 中的氨基酸残基如 Lys1132.8、Arg652.8 等发生相互作用; 其结合自由能为 $-290.89 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。诃子次酸是 1 种酚酸类化合物, 属于单宁酸类, 主要存在于诃子中。

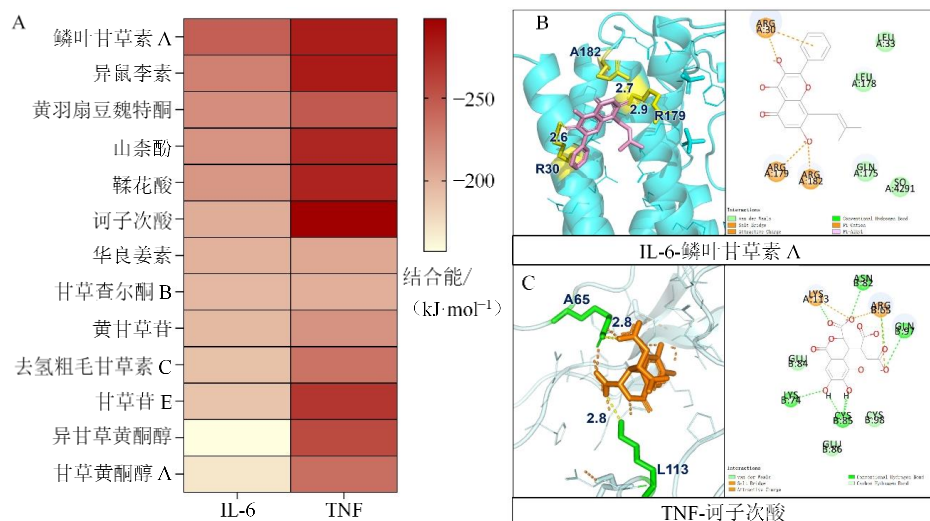
3.5 SPR 分析结果

为了研究 TNF- α 、IL-6 蛋白的最佳耦联条件, 采用不同 pH 的醋酸盐缓冲液稀释蛋白, 进行预富集分析, 结果显示 TNF- α 、IL-6 均在 pH 4.0 的条件下响应值最高。取 TNF- α 、IL-6 蛋白分别用 pH 4.0 醋酸盐缓冲液稀释, 将蛋白耦联至 CM5 芯片上。结果如图 9 所示, 异鼠李素与 TNF- α 和 IL-6 采用亲和力拟合特征, 结果表明异鼠李素与 TNF- α 的平衡解离常数 (KD) 为 $3.44 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 异鼠李素与 IL-6 的 KD 是 $5.59 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结合响应值随着药物浓度的增大而升高, 当浓度增大到一定值时响应值呈水平趋势, 说明高浓度小分子同 TNF- α 、IL-6 的结合存在饱和现象, 即其结合为特异性结合。山柰酚与 IL-6, 诃子次酸与 TNF- α 和 IL-6, 鞣花酸与 TNF- α 和 IL-6 符合动力学拟合特征, 故采用动力学方法进行拟合。结果表明山柰酚与 IL-6 的 KD 是 $8.86 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诃子次酸与 TNF- α 的 KD 是 $1.01 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诃子次酸与 IL-6 的 KD 是 $2.93 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 鞣花酸与 TNF- α 的 KD 是 $5.42 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 鞣花酸与 IL-6 的 KD 是 $6.46 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果表明异鼠李素、诃子次酸、鞣花酸可能是有效的 TNF- α

表 3 分子对接结果

Table 3 Molecular docking results

序号	化合物	结合能/ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	
		IL-6	TNF
1	鳞叶甘草素 A	-246.70	-277.26
2	异鼠李素	-231.07	-278.51
3	黄羽扇豆魏特酮	-225.18	-249.46
4	山柰酚	-222.29	-273.12
5	鞣花酸	-221.41	-274.38
6	诃子次酸	-211.05	-290.89
7	华良姜素	-208.83	-213.35
8	甘草查尔酮 B	-205.82	-209.96
9	黄甘草苷	-205.11	-222.92
10	去氢粗毛甘草素 C	-201.77	-237.63
11	甘草苷 E	-200.31	-265.60
12	异甘草黄酮醇	-173.34	-256.57
13	甘草黄酮醇 A	-184.13	-239.35



A-IL-6、TNF 靶点结合能热图分析；B-鳞叶甘草素 A 与 IL-6 分子对接可视图；C-诃子次酸与 TNF 分子对接可视图。

A-Heatmap analysis of IL-6 and TNF target binding energy; B-Molecular docking visualization of glepidotin A with IL-6; C-Molecular docking visualization of chebulic acid with TNF.

图 8 分子对接结果

Fig. 8 Molecular docking results

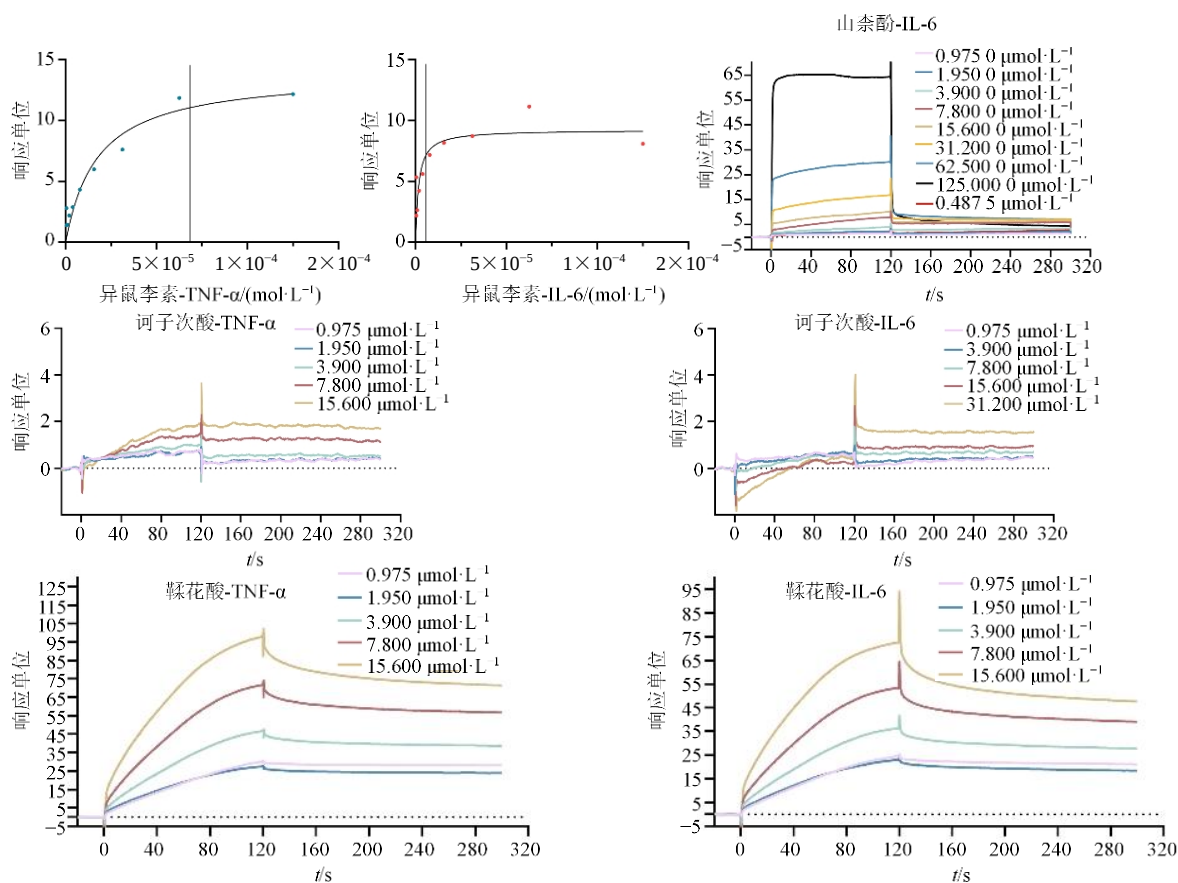


图 9 受体与配体的亲和力研究结果

Fig. 9 Results of affinity studies of receptors and ligands

抑制剂, 异鼠李素、山柰酚、诃子次酸、鞣花酸可能是有效的 IL-6 抑制剂, 组方中的活性成分通过抑制靶蛋白的活性, 从而协同发挥抗炎抗病毒的功效。

3.6 清咽滴丸中活性成分对细胞炎症因子的抑制作用

如图 10、11 所示, 与对照组相比, LPS 刺激显著诱导 RAW264.7 巨噬细胞中促炎细胞因子 TNF- α

和 IL-6 的表达水平升高 ($P < 0.05$)。与 LPS 模型组相比, 异鼠李素、山柰酚、诃子次酸及鞣花酸均能以浓度相关的方式显著抑制 LNF- α 和 IL-6 的分泌 ($P < 0.05$), 表明这些化合物对 LPS 诱导的炎症反应具有显著的抑制作用。其中, 诃子次酸和鞣花酸对促炎细胞因子的抑制作用尤为显著, 提示其可能具有更强的抗炎活性。

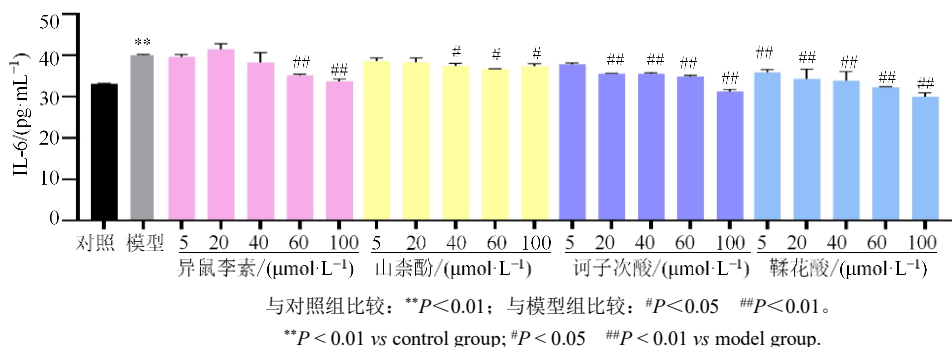


图 10 多成分对炎症因子 IL-6 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 10 Inhibitory effect of multi-compounds on inflammatory factors IL-6 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

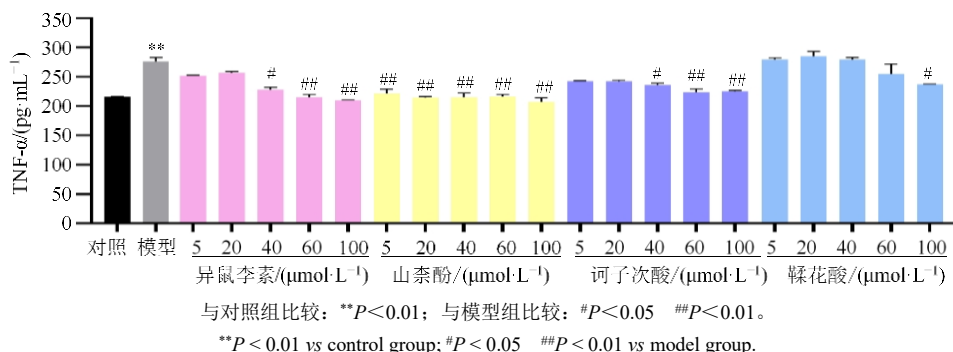


图 11 多成分对炎症因子 TNF- α 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig.11 Inhibitory effect of multi-compounds on inflammatory factors TNF- α ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

4 讨论

流感属中医“时行感冒或时行疔气”, 属疫病类中“风瘟”“春瘟”等范畴。隋代巢元方所著的《诸病源候论》一书中提出: “夫时气病者, 此皆因岁时不和, 温凉失节, 人感乖戾之气而生病者, 多相染者。” 中医认为感冒是由于风邪乘人体御邪能力不足时, 侵袭肺卫皮毛所致。四季之中, 气候失常, 如春应温而反寒, 夏应热而反冷等, 风邪易侵入人体而感冒, 甚至引起时行感冒。中医药治疗流感历史悠久, 具有丰富的理论和实践经验, 其抗流感病毒的基本原理是“扶正”和“祛邪”。现代药理学认为抗病毒的途径是对病毒进行直接的抑制, 亦或通过提高机体免疫力, 促进机体非特异性以及特异性功能提升, 间接发挥抗病毒的功效^[11-13]。清咽滴丸

由诃子、青黛、人工牛黄、薄荷脑、冰片和甘草 6 味药材组成, 诃子利咽散火、止咳解毒, 青黛清热凉血, 人工牛黄清热解毒, 维持内环境稳态, 薄荷脑疏风清热、开窍醒脑, 冰片利咽散火、生肌止痛, 甘草清热利咽、益气和中。诸药联用, 攻补兼施, 共奏疏风清热、解毒利咽之功效。

本研究通过构建分子网络筛选得到清咽滴丸活性成分 118 个, 药物预测靶点 491 个, 疾病靶点 383 个, 共有靶点 94 个, 通过 PPI 和 Cytoscape 3.10.1 可视化分析得到清咽滴丸抗流感核心靶点 92 个(如 IL-6、TNF、TP53 等)。通过 GO 和 KEGG 富集分析, 潜在靶点主要与 IL-17 信号通路、TNF 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路等多条信号通路相关。IL-17 信号通路通过其受体 IL-

17R 诱导相关基因的表达,从而促进产生炎症介质如 IL-6 和 CXCL8,增强局部免疫应答与炎症^[14]。TNF 信号通路与炎症细胞存活、死亡和分化密切相关,其主要细胞因子 TNF- α 参与全身炎症反应,激活 NF- κ B 和 MAPK 等信号通路,增强免疫调节基因如 IL-6、CASP3 和 PTGS2 的表达,具有促炎症、促凋亡、促增殖等作用^[15-16]。此外,IL-10 和 CXCL8 作为调节性和炎症细胞因子,分别在抑制和促进炎症中发挥作用,IL-10 主要通过抑制炎症细胞因子的生成来发挥抗炎作用,而 CXCL8 作为一种趋化因子,能诱导免疫细胞到炎症部位,增强炎症反应。IL-17、TNF 等信号通路与 IL-6、TNF 等靶点在调节人体的免疫应答和炎症反应中相互影响,协同发挥作用。

通过研究筛选得到的主要活性成分异鼠李素、诃子次酸、山柰酚、鞣花酸同属酚类化合物,均存在于诃子中。它们对流感的治疗作用与抑制病毒的血凝素蛋白(HA)和 NA 基因表达、病毒诱导的自噬、活性氧(ROS)产生和丝氨酸蛋白酶活性有关。异鼠李素是一种有效的抗病毒活性成分,在感染甲型流感病毒的小鼠中,异鼠李素能显著降低肺病毒滴度,提高 70%~80%存活率,并明显缓解体质量减轻^[17]。山柰酚具有抗氧化、抗炎、抗癌等作用,能够通过调节炎症相关蛋白表达以及抑制转录因子激活等方式减少炎症因子的产生,推测其可能具有一定的抗病毒发展前景^[18-19]。诃子次酸具有一定的抗病毒作用,能有效抑制人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)以及疱疹病毒 2 型(HSV-2)病毒,其作用机制包括干扰病毒的糖蛋白合成,从而阻止病毒的复制和传播^[20]。鞣花酸可以在体外抑制人 H3N2 流感病毒的复制,并且和奥司他韦组合可协同增强药物的抗流感作用^[21]。

综上所述,本研究表明清咽滴丸具有一定的抗流感病毒作用,基于网络药理学技术,对清咽滴丸中的化学成分、作用靶点、相关通路进行系统性探索研究,提示该方可能通过抗病毒诱导的炎症反应、调节机体免疫、抗细胞凋亡等发挥抗流感的作用。同时,本研究基于分子对接技术,对清咽滴丸中潜在活性物质与 IL-6、TNF- α 流感相关靶点进行分子对接,通过 SPR 进行亲和力或动力拟合,发现异鼠李素、山柰酚、诃子次酸、鞣花酸与靶蛋白具有较好的亲和活性,并通过 ELISA 实验证明其具有一定的抗炎作用,是组方发挥抗病毒功效的主要活

性成分。基于虚拟筛选与实验验证相结合的研究方法为临床筛选治疗流感的有效中药复方提供了思路,为组方开发新的适应证提供了数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Babazadeh A, Mohseni Afshar Z, Javanian M, et al. Influenza vaccination and guillain-Barré syndrome: Reality or fear [J]. J Transl Int Med, 2019, 7(4): 137-142.
- [2] Morens D M, Taubenberger J K. Making universal influenza vaccines: Lessons from the 1918 pandemic [J]. J Infect Dis, 2019, 219(Suppl_1): S5-S13.
- [3] Bridges C B, Kuehnert M J, Hall C B. Transmission of influenza: Implications for control in health care settings [J]. Clin Infect Dis, 2003, 37(8): 1094-1101.
- [4] 世界卫生组织. 季节性流感. 世界卫生组织官方网站. [https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)). World Health Organization (WHO). Influenza (Seasonal). WHO Official Website. [https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
- [5] Ide K, Kawasaki Y, Kawakami K, et al. Anti-influenza virus effects of catechins: A molecular and clinical review [J]. Curr Med Chem, 2016, 23(42): 4773-4783.
- [6] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的研究应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213. Liao Y N, Zhao K L, Guo H W. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [7] Yang M, Zhang X, Liu Q, Wang Y, et al. Network pharmacology, molecular docking, and untargeted metabolomics reveal molecular mechanisms of multi-targets effects of Qingfei Tongluo Plaster improving respiratory syncytial virus pneumonia [J]. Chin Herb Med, 2024, 16(4): 638-655.
- [8] 罗一钧, 王艳. 新型冠状病毒肺炎患者白介素 6 的表达水平变化 [J]. 实验与检验医学, 2022, 40(3): 280-281, 297. Luo Y J, Wang Y. Changes of IL-6 expression level in patients with new coronavirus pneumonia [J]. Exp Lab Med, 2022, 40(3): 280-281, 297.
- [9] Harford J B, Kim S S, Pirollo K F, et al. TP53 gene therapy as a potential treatment for patients with COVID-19 [J]. Viruses, 2022, 14(4): 739.
- [10] 刘贵峰. 线虫作为痛风研究模式生物的评估研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012. Liu G F. Assessment study on gout research using C.

- elegans* as a model organism [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2012.
- [11] Roosenhoff R, Reed V, Kenwright A, et al. Viral kinetics and resistance development in children treated with neuraminidase inhibitors: The influenza resistance information study (IRIS) [J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(5): 1186-1194.
- [12] 程成, 张薇, 史丽云. 中药抗病毒效应组分及其分子靶标研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(10): 5997-6001.
- Cheng C, Zhang W, Shi L Y. Research progress on antiviral components of traditional Chinese medicine and their molecular targets [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2021, 36(10): 5997-6001.
- [13] 齐有胜, 孙毅坤, 刘为萍. 单味中药抗流感病毒研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 210-218.
- Qi Y S, Sun Y K, Liu W P. Research progress of single Chinese herbal medicine against influenza virus [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2017, 23(14): 210-218.
- [14] Gaffen S L, Jain R, Garg A V, et al. The IL-23-IL-17 immune axis: From mechanisms to therapeutic testing [J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(9): 585-600.
- [15] Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages [J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 91.
- [16] Brenner D, Blaser H, Mak T W. Regulation of tumour necrosis factor signaling: Live or let die [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(6): 362-374.
- [17] Abdal Dayem A, Choi H Y, Kim Y B, et al. Antiviral effect of methylated flavonol isorhamnetin against influenza [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121610.
- [18] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山柰酚生物功能研究进展 [J]. 生命科学, 2017, 29(4): 400-405.
- Zhang Y W, Shao D Y, Shi J L, et al. A review on biological activities of kaempferol [J]. Chin Bull Life Sci, 2017, 29(4): 400-405.
- [19] 雷晓青, 陈鳌, 刘毅, 等. 山柰酚药理作用的研究进展 [J]. 微量元素与健康研究, 2017, 34(2): 61-62.
- Lei X Q, Chen A, Liu Y, et al. Research progress on pharmacological effects of kaempferol [J]. Stud Trace Elem Health, 2017, 34(2): 61-62.
- [20] Lin L T, Chen T Y, Lin S C, et al. Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry [J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 187.
- [21] Lin Z, Lin C, Fu C C, et al. The protective effect of ellagic acid (EA) in osteoarthritis: An *in vitro* and *in vivo* study [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109845.

[责任编辑 齐静雯]