

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

孙资金¹, 张凤君², 吉 静¹, 徐 甜¹, 程发峰¹, 刘 媛³, 张 林⁴, 彭 敏³, 赵 琼^{3*}

1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

2. 山东中医药大学针灸推拿学院, 山东 济南 250014

3. 山东第一医科大学附属省立医院 中医科, 山东 济南 250021

4. 绍兴市人民医院 药学部, 浙江 绍兴 312000

摘要: **目的** 利用生物信息学、分子对接与分子动力学的方法, 识别仙方活命饮的生物活性成分和靶点, 寻找仙方活命饮治疗猴痘的靶点与通路, 以期对相关治疗药物与治疗策略的开发提供帮助。 **方法** 使用中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) 筛选仙方活命饮的活性成分和相关靶点, 利用高通量基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 获取猴痘病毒感染相关靶点。构建蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 通过基因本体论 (gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 获得关键的靶点和信号通路。将预测的活性化合物与核心靶点进行分子对接验证。使用 GROMACS 对对接的部分结果进行分子动力学分析, 通过不同指标判断其结合的稳定性与作用效果。 **结果** 通过 TCMSP 共筛选出仙方活命饮 191 种活性成分, 296 种相关蛋白, 259 个相关基因。通过 GEO 数据库获得 321 个猴痘差异基因。二者交集靶点基因共有 9 个。GO 富集分析获得 502 条有意义条目, KEGG 富集分析获得 73 条有意义通路。有 520 组活性成分-靶点对接成功, 其中前列腺素过氧化物内合酶 1 (prostaglandin-endoperoxide synthase 1, PTGS1)-甘草异黄酮、PTGS1-3'-甲氧基光甘草定、PTGS1-shinpterocarpin、PTGS1-4'-甲氧基光甘草定作为有继续研究意义的构象进一步进行分子动力学模拟分析, 结合自由能分别为 (-86.380 ± 1.257) 、 (-61.168 ± 1.088) 、 (-103.463 ± 1.371) 、 (-96.986 ± 1.236) kJ/mol, 均可以稳定结合。 **结论** 仙方活命饮治疗猴痘的作用机制可能为甘草异黄酮、3'-甲氧基光甘草定、shinpterocarpin、4'-甲氧基光甘草定分别与 PTGS1 结合, 通过抗炎、抗氧化作用降低猴痘引发的炎症反应, 减轻炎症损伤。其中, shinpterocarpin 的结合能最优, 可能发挥了主要作用效果。所得结果为猴痘后续的治疗方案与相关治疗药物的开发提供新的研究方向。

关键词: 仙方活命饮; 猴痘; 生物信息学; 分子对接; 分子动力学; 甘草异黄酮; 3'-甲氧基光甘草定; shinpterocarpin; 4'-甲氧基光甘草定

中图分类号: R286

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)07-2197-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.020

Mechanism and molecular target prediction of Xianfang Huoming Drink in treatment of monkeypox based on bioinformatics and molecular dynamics

SUN Zi-jin¹, ZHANG Feng-jun², JI Jing¹, XU Tian¹, CHENG Fa-feng¹, LIU Yuan³, ZHANG Lin⁴, PENG Min³, ZHAO Qiong³

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Acupuncture and Tuina, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

3. Department of Traditional Chinese Medicine, Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, China

4. Department of Pharmacy, Shaoxing People's Hospital, Shaoxing 312000, China

收稿日期: 2022-10-24

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2020QH306); 绍兴市医学重点学科建设项目计划 (2019SZD06)

作者简介: 孙资金 (1998—), 男, 汉族, 山东淄博人, 硕士研究生, 从事中医药大数据、计算机虚拟药物筛选研究。

Tel: 17706384436 E-mail: 20210931013@bucm.edu.cn

*通信作者: 赵 琼 (1987—), 女, 博士, 主治医师, 从事中医药大数据、产后抑郁与脑病的治疗研究。

Tel: 15866602903 E-mail: fanxingqq1234@126.com

Abstract: Objective Bioinformatics, molecular docking and molecular dynamics methods were used to identify the bioactive ingredients and targets of Xianfang Huoming Drink (仙方活命饮), and to find the targets and pathways of Xianfang Huoming Drink in the treatment of monkeypox, in order to provide help for the development of related therapeutic drugs and strategies. **Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) was used to identify the active ingredients and related targets of Xianfang Huoming Drink, and the Gene Expression Omnibus (GEO) was used to obtain the targets related to monkeypox virus infection. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed. The key potential targets and signaling pathways related to monkeypox virus infection through gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analyses. Subsequently, molecular docking was performed to predict the combination of active compounds with core targets. Afterwards, the results of the docking performed were subjected to molecular dynamics calculations using GROMACS to determine the stability and effect of the binding by calculating different indicators. **Results** A total of 191 active ingredients, 296 related proteins, and 259 related genes of Xianfang Huoming Drink were screened. A total of 321 monkeypox differential genes were obtained through the GEO database. There were nine intersecting target genes between the two. GO enrichment analysis yielded 502 meaningful entries, and KEGG enrichment analysis yielded 73 meaningful pathways. A total of 520 groups of active ingredient-target docked successfully, among which prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (PTGS1)-licoisoflavanone, PTGS1-3'-methoxyglabridin, PTGS1-shinpterocarpin, and PTGS1-4'-methoxyglabridin were further analyzed for molecular dynamics simulations as conformations of further research significance, and the binding free energies (-86.380 ± 1.257), (-61.168 ± 1.088), (-103.463 ± 1.371), and (-96.986 ± 1.236) kJ/mol, respectively, could be stably bound. **Conclusion** The mechanism of Xianfang Huoming Drink in the treatment of monkeypox may be that licoisoflavanone, 3'-methoxyglabridin, shinpterocarpin and 4'-methoxyglabridin are combined with PTGS1, respectively, to reduce the inflammatory response caused by monkeypox and reduce the inflammatory damage through anti-inflammatory and anti-oxidant effects. Among them, shinpterocarpin had the best binding energy, which may have played the main role. The results provide a new research direction for the follow-up treatment of monkeypox and the development of related therapeutic drugs.

Key words: Xianfang Huoming Drink; monkeypox; bioinformatics; molecular docking; molecular dynamics; licoisoflavanone; 3'-methoxyglabridin; shinpterocarpin; 4'-methoxyglabridin

猴痘是一种罕见的人畜共患性疾病，由猴痘病毒引起。猴痘病毒是一种双链 DNA 病毒，与天花病毒均系痘病毒科正痘病毒，一般通过与受感染的人或动物或被病毒污染的物品密切接触等途径传播。人类猴痘临床表现与天花相似，可引起类似于天花的皮疹、发热、寒战和肌肉酸痛等临床症状^[1]，病死率为 3%~6%。其中儿童、年轻人和免疫缺陷个体的死亡率相对较高，当猴痘并发败血症、脑膜炎、骨髓炎等症时，死亡率高达 10%^[2]。已有抗病毒药物及疫苗被批准用于猴痘的治疗与预防。但治疗及预防效果仍处于研究阶段。

猴痘之前多见于中非和西非雨林附近，目前有扩散流行的趋势。2022 年 6 月 1 日，世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 表示，全球 30 个非猴痘流行国家和地区已报告 550 多例猴痘确诊病例。2022 年 7 月 23 日，WHO 再次拉响警报，宣布将猴痘疫情列为国际关注的突发公共卫生事件 (Public Health Emergency of International Concern, PHEIC)，上次发布全球卫生紧急事件是在 2020 年 1 月，以应对新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 疫情。这是截至目前以来 WHO

宣布的第 7 次 PHEIC，也是 WHO 能够给出的最高预警级别。目前猴痘尚无特效治疗方法，主要采用对症支持治疗。虽然天花疫苗对猴痘有一定的治疗作用，但天花疫苗在世界上使用并不普遍，人群普遍缺乏对天花病毒的免疫力。鉴于中医药的免疫调节和抗病毒作用，本研究拟探讨中医药治疗猴痘的可能性。

仙方活命饮由金银花、防风、白芷、当归、陈皮、甘草、赤芍、浙贝母、天花粉、乳香、没药、穿山甲、皂角刺组成，具有清热解毒、散结消肿、祛瘀止痛的作用。药理实验证明，其组成药物具有抑菌、消炎、镇痛等作用^[3-4]。仙方活命饮在临床上被广泛应用于治疗脓肿、疮疮、疖、皮疹、皮炎等疮疡性皮肤病^[5-6]以及糖尿病足、盆腔炎、肛周脓肿等感染性炎症疾病^[7-9]，被称为“疮疡之圣药，外科之首方”，通治一切阳证疮疡肿毒。在国家卫生健康委办公厅与国家中医药管理局办公室出台的《猴痘诊疗指南 (2022 年版)》中，其临床表现多见寒战、发热、皮疹与其他中医常见的阳证疮疡症状，且中医治疗推荐方以紫雪散、升麻鳖甲汤、升麻葛根汤等一系列用于治疗阳证疮疡之方为主^[10]。因此，仙

方活命饮在治疗猴痘，尤其是皮疹预后恢复和预防病毒外溢方面具有巨大潜力。但仙方活命饮治疗疾病的潜在机制尚未被完全了解，其对猴痘的治疗效果尚无报道。

网络药理学是基于系统生物学的理论，对生物系统的网络分析，选取特定信号节点 (nodes) 进行多靶点药物分子设计的新学科。其强调对信号通路的多途径调节以及多成分-多靶点-多途径的调节，从分子学与生物学角度将中药中有效成分与靶点基因相联系。分子对接技术是通过计算机直接分析受体的特征以及受体和药物分子之间的相互作用方式来进行药物设计的方法，主要研究分子间 (如配体和受体) 相互作用，并预测其结合模式和亲和力的一种理论模拟方法。近年来，分子对接方法已成为计算机辅助药物研究领域的一项重要技术^[11]。而分子动力学则是对于原子核和电子所构成的多体系统，用计算机模拟原子核的运动过程，从而计算系统的结构和性质的方法^[12]，其作为一种较为优秀的研究方法，被广泛应用于材料学、化学、生物学等领域。在药学领域，分子动力学常被用于药动学研究，以进行新药开发的筛选与预测。本研究采用网络药理学和分子动力学方法探讨仙方活命饮治疗猴痘的可能分子机制，以期为猴痘的治疗方案与相关治疗药物的开发提供科学依据。

1 方法

1.1 仙方活命饮活性成分的收集及相关靶点的预测

从中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)^[13]获取仙方活命饮各组成药物 (金银花、防风、白芷、当归、陈皮、甘草、赤芍、浙贝母、天花粉、乳香、没药、皂角刺) 的成分及其对应靶点。因穿山甲被列为中国国家保护动物，已不入药，故本研究将其排除在外。

中药中的大多数化合物由于其药理特性无法到达细胞中的特定蛋白质靶点，故选择合适的筛选指标对于网络药理学十分重要。口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) 是药物最重要的药动学参数之一，对于 TCMSP 数据库来说更是如此。而类药性 (drug-likeness, DL) 是指 1 个分子含有一些特定的官能团或呈现出与大多数药物相同的物理特性。在定性分析中，DL 常用于药物设计。这些参数最终会影响药物的吸收、分布、代谢、排泄 (absorption、distribution、metabolism、excretion, ADME) 特性。

本研究以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为阈值，筛选仙方活命饮活性成分，并将其对应的蛋白质靶点纳入研究。使用 UniProt (<https://uniprot.org/>) 数据库中的 UniProtKB 搜索功能，物种限制为“智人”，通过输入蛋白质名称来获得每种蛋白质的官方基因名称^[14-15]。

1.2 猴痘病毒相关靶点的挖掘与预测

从高通量基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO)^[16]获取猴痘病毒的相关作用靶点，GSE24125 数据集是储存于 GEO 数据库的人猴痘病毒的芯片数据集。根据样本信息，筛选巨噬细胞的 16 个猴痘病毒样本作为疾病组，20 个模拟感染样本作为对照组。矩阵信息和平台信息被下载以进行 ID 转换、缺失值处理、标准化处理等。将探针 ID 与 gene symbol 进行替换以获得基因名称 (如 1 个基因的 symbol 与多个探针 ID 对应，则该基因的表达水平由探针的平均值表示)，删除存在缺失值的基因所属行，并进行标准化处理。R 软件的 Limma 包被用于筛选猴痘病毒疾病组与对照组的差异基因。在本研究中，猴痘差异基因的阈值被设定为 $\log_2$ fold change ($\log_2FC$) 的绝对值 ≥ 0.5 ，并且 $P < 0.05$ 。R 软件的 ggplot2 包被用于制作渐变火山图以展示差异基因的分布和表达量^[17]。

1.3 仙方活命饮与猴痘病毒共同作用靶点分析

将已经收集到的仙方活命饮的靶点与猴痘病毒的靶点取交集，并使用 R 语言 (4.0.2) 与相关 R 包 (venn) 绘制韦恩图，以交集靶点作为仙方活命饮对猴痘病毒的干预靶点。

1.4 蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建

为了进一步确定核心靶点基因，将仙方活命饮干预猴痘病毒的作用靶点提交至目前拥有最多生物与蛋白质以及广泛和多样化的 STRING (<https://stringdb.org/>) 数据库^[18]，物种设置为“Homo sapiens”，最低相互作用阈值设为 0.4，并隐藏了独立存在的节点。

1.5 基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析

将收集到的共有靶点转化为相关的 Entrez ID 后，使用 R 语言 (4.0.2) 与相关 R 包 (clusterProfiler、org.Hs.eg.db、enrichplot、ggplot2、pathview、ggnewscale、stringr)，进行 GO 与 KEGG 富集分析

与制图, $P < 0.05$ 被认为有显著性差异。

1.6 分子对接

分子对接是药物发现中常用的方法, 其可准确预测适当结合位点与小分子配体构象, 并评估结合亲和力。研究使用 AutoDock tools 1.5.6 与 AutoDock Vina 2 种工具 (广泛使用的分子对接策略, 并已被验证可以提高分子对接的速度与准确性) 进行分子对接。对接过程如下: 首先从 PDB (Protein Data Bank) 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>) 检索蛋白质的三维结构, 并将其转化为 PDBQT 蛋白受体文件。然后从 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) [19-20] 下载小分子配体文件后, 对其进行修饰, 保存为 PDBQT 配体文件。将配对口袋、对接次数等参数设置完毕后, 将活性成分 (配体) 与靶点 (受体) 进行对接。最后使用 Discovery Studio (DS, V2019) 进行可视化。

1.7 分子动力学模拟与评估

为确保所获得的配体-受体组合的稳定性, 使用 GROMACS 软件, 对分子对接结合能排名前 4 的配体-受体构象进行 50 ns 分子动力学模拟研究。

首先, 对靶点蛋白 (受体) 的 PDB 文件进行处理, 生成相关拓扑结构。然后, 使用 SwissParam 对小分子物质 (配体) 进行处理。将小分子物质的信息添加至蛋白拓扑文件中, 使其形成复合物信息文件。使用 charmm 36 力场 [21] 与 TIP3P 水模型进行计算, 设置大小为 1.2 的正立方体为限制盒子; 随后向其中加入溶剂 (SPC216 水)。通过向系统中添加 Na^+/Cl^- 离子对以平衡电荷。为尽可能地避免蛋白与小分子物质之间的碰撞, 使用最速下降法对体系进行优化, 使其达到势能最优的状态。正则系统以 300 K 进行平衡, 等温等压系统平衡采用 Parrinello-Rahman 压力耦合、1 bar 的条件下进行 (1000 ps, 动力学步长为 2 fs), 系统的坐标与能量每 10 ps 保存 1 次。最后, 在对每个系统进行了 50 ns 的模拟之后, 对系统分子轨迹进行校正, 以其进行评估与计算。

1.8 分子力学泊松-玻尔兹曼表面积 (molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area, MMPBSA) 结合自由能的计算

使用结合自由能计算的方式, 以完善分子动力学轨迹所获得的结果, 将蛋白质与小分子配体的亲和力以数值的方式进行量化呈现。MMPBSA 方法广泛应用于结合自由能的计算, 以预测分子动力学模拟后配体-受体的稳定性 [22]。通过 MMPBSA 方法计

算所有系统的蛋白质与小分子配体之间的结合自由能。使用 50 ns 的分子动力学轨迹进行计算, 具体公式如下。

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{complex}} - (\Delta G_{\text{receptor}} + \Delta G_{\text{ligand}}) = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta H = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}}$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdW}} + \Delta E_{\text{int}}$$

最终合并变换公式得到

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{int}} + \Delta E_{\text{vdW}} + \Delta E_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{PB}} + \Delta G_{\text{SA}}$$

其中, ΔG_{bind} 为结合自由能, $\Delta G_{\text{complex}}$ 为复合物的结合自由能, $\Delta G_{\text{receptor}}$ 为受体结合自由能, ΔG_{ligand} 为配体结合自由能, $T\Delta S$ 为体系熵变值, ΔH 为焓变量, ΔE_{MM} 为气相能, ΔG_{sol} 为溶剂化能, ΔG_{PB} 为极性溶剂化贡献能, ΔG_{SA} 为非极性溶剂化自由能。而在上述公式中, ΔE_{MM} 被分解为 ΔE_{ele} 、 ΔE_{vdW} 、 ΔE_{int} (分别代表静电项、范德华项和内能项)。 ΔE_{int} 内能由键能、键角能和扭转能组成。本研究中, 蛋白质和小分子配体的构象结构是由单一的分子动力学轨迹 (只有复合物轨迹) 获得的, 其将蛋白质-小分子配体结构视为 1 个刚体。这意味着复合物和单独个体 (即蛋白和小分子配体) 之间的 ΔE_{int} 可以相互抵消, 因为该能量项是由同一个分子动力学模拟轨迹所计算的。因此, 本研究仅对 ΔE_{ele} 和 ΔE_{vdW} 进行具体研究。

2 结果

2.1 仙方活命饮活性成分筛选

以 $\text{OB} \geq 30\%$ 、 $\text{DL} \geq 0.18$ 作为阈值, 筛选仙方活命饮中的化合物, 其中浙贝母 10 个、皂角刺 10 个、天花粉 2 个、乳香 6 个、没药 34 个、金银花 17 个、甘草 88 个、防风 18 个、当归 2 个、赤芍 14 个、陈皮 5 个、白芷 20 个。将其合并, 去除重复项后, 共得到 191 个化合物, 将其作为仙方活命饮的活性成分。

2.2 仙方活命饮靶点预测

使用 TCMSP 数据库得到仙方活命饮的药物组分的预测靶点后去重, 共得到 296 个靶点蛋白。使用 Uniport 数据库进行蛋白名称与基因名称的转换, 经去重后, 共得到 248 个相关基因, 作为仙方活命饮有效成分对人体的作用靶点。

2.3 猴痘靶点预测

根据 $|\log_2 \text{FC}| \geq 0.5$ 且 $P < 0.05$ 的阈值, 获得 321 个猴痘差异基因。其中只有 5 个是上调的, 其余的差异基因均为下调。以渐变火山图展示基因的分布情况, 排名前 10 位的差异基因被标识在图中 (图 1)。

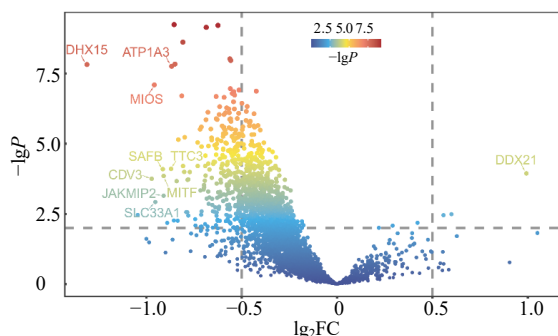


图 1 猴痘差异基因火山图

Fig. 1 Volcano plot of differential genes in monkeypox

将猴痘的差异基因与仙方活命饮的靶点基因取交集，得到的共同的靶点基因进行相关生物信息学分析。

2.4 仙方活命饮-猴痘共同靶点分析

将仙方活命饮靶点基因与猴痘差异基因取交集，共得到 9 个交集靶点，包括前列腺素过氧化物内合酶 1 (prostaglandin-endoperoxide synthase 1, PTGS1)、花生四烯 5-脂氧合酶 (arachidonate 5-lipoxygenase, ALOX5)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPARG)、组织蛋白酶 D (cathepsin D, CTSD)、螺旋环螺旋结构域扩散激酶 (component of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase complex, CHUK)、NFE2 样 BZIP 转录因子 2 (NFE2 like BZIP transcription factor 2, NFE2L2)、RUNX1 伴转录共抑制因子 1 (RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1, RUNX1T1)、白三烯 A₄ 水解酶 (leukotriene A₄ hydrolase, LTA4H)、激酶插入区受体 (kinase insert domain receptor, KDR)，认为是仙方活命饮作用于猴痘的有效靶点。

2.5 PPI 网络分析

将数据上传 STRING 数据库后，得到 1 个包含 6 个点、7 条边的 PPI 网络，平均节点度 (average node degree) 值为 1.56，见图 2。

2.6 GO 和 KEGG 富集分析

为了阐明仙方活命饮治疗猴痘的潜在机制与生物通路，本研究进行了 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析。

GO 分析结果显示，共获得了 502 个条目，包括 446 个生物过程条目、9 个细胞成分条目与 47 个分子功能条目。其中，生物过程包括类二十烷素生

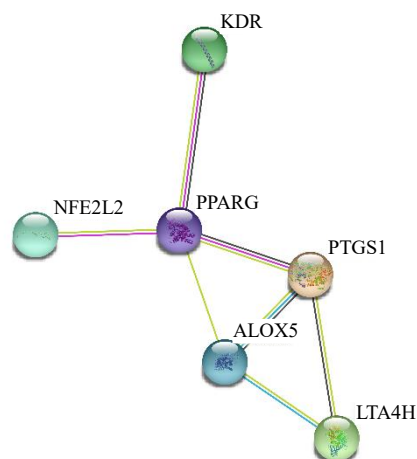


图 2 仙方活命饮和猴痘交集靶点的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network diagram of intersection targets of Xianfang Huoming Yin and monkeypox

物合成 (GO: 0046456)、血管生成调控 (GO: 0045765)、血管发育调节 (GO: 1901342) 等。细胞成分包括核基质 (GO: 0016363)、富含纤维胶凝蛋白的颗粒内腔 (GO: 1904813)、核外围 (GO: 0034399) 等。分子功能包括氧化还原酶活性，作用于单个供体与分子氧合并，合并 2 个氧原子 (GO: 0016702)；氧化还原酶活性，作用于单一供体与分子氧掺入 (GO: 0016701)；白三烯 A₄ 水解酶活性 (GO: 0004463) 等，见图 3。

KEGG 分析结果显示，共有 73 条具有统计学意义的相关通路，前 3 位分别为花生四烯酸代谢 (ko00590)、急性髓性白血病 (ko05221)、弓形虫病 (ko05145)，见图 4。由此不难看出，仙方活命饮是通过多靶点、多途径在猴痘的治疗中发挥重要作用，且主要作用方式是抗炎和抗感染。

2.7 分子对接结果

将小分子配体与蛋白质受体进行下载、修饰，转化为 pdbqt 后，共得到 103 个小分子配体 (仙方活命饮活性成分) 与 9 个蛋白质受体，分别是 PTGS1 (PDB ID: 6Y3C)、ALOX5 (PDB ID: 3V98)、PPARG (PDB ID: 6MS7)、CTSD (PDB ID: 6QCB)、CHUK (PDB ID: 3BRT)、NFE2L2 (PDB ID: 2FLU)、RUNX1T1 (PDB ID: 1WQ6)、LTA4H (PDB ID: 3U9W)、KDR (PDB ID: 2XIR)。将小分子配体与蛋白质受体分别进行对接，共形成 927 种组合，最终对接成功 520 种蛋白质受体-小分子配体组合。

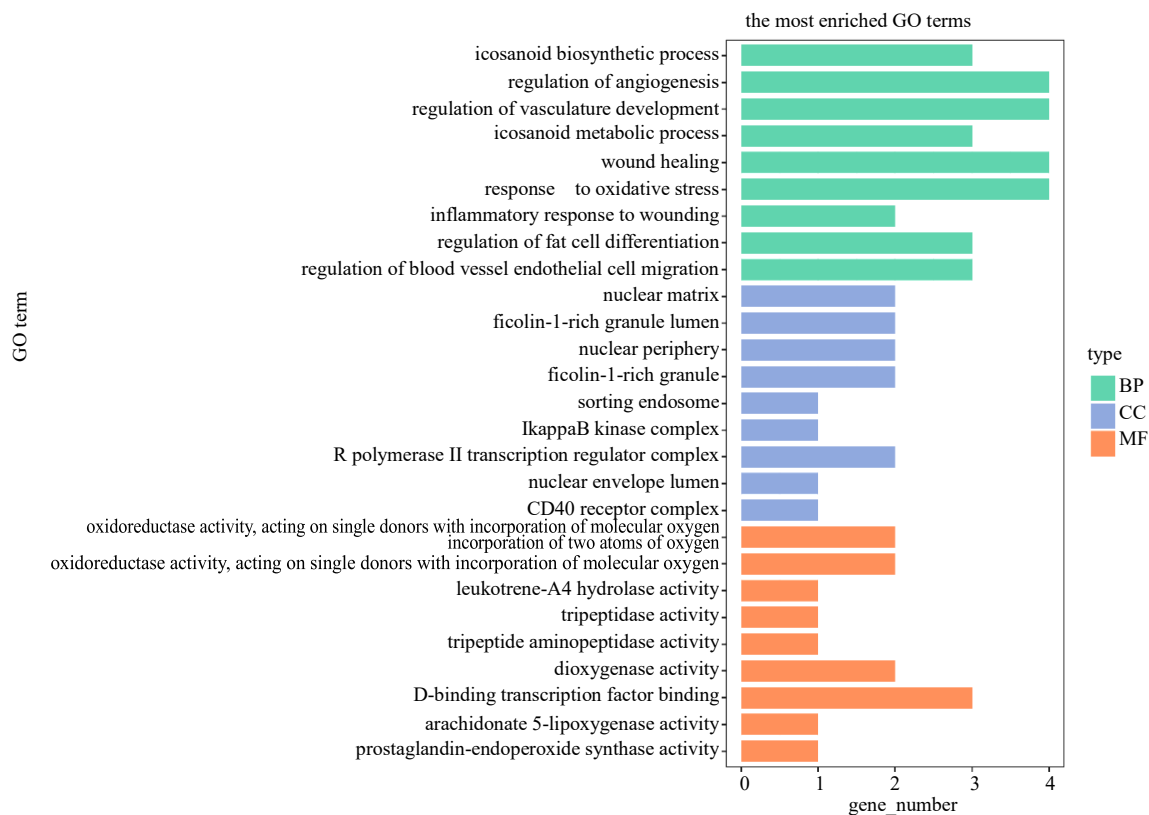


图 3 交集基因的 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of intersection genes

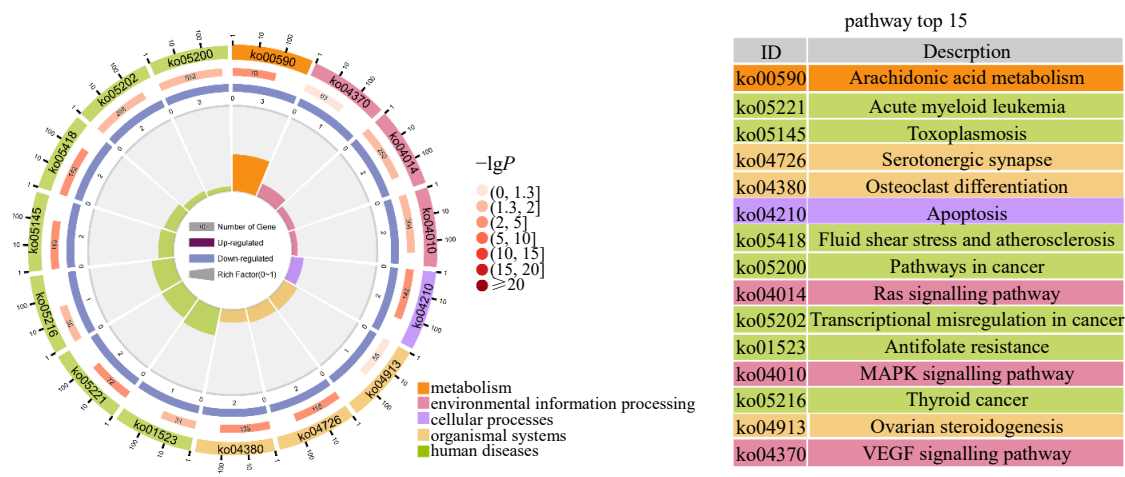


图 4 交集基因的 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of intersection genes

在实践中,经常使用结合能来评估受体与配体的亲和力程度。一般认为,结合能小于-4.25、-5.0或-7.0 kcal/mol (1 kcal=4.2 kJ) 分别表明受体与配体之间具有一定、良好或强的结合活性。结合能反映了受体与配体结合的可能性。结合能越低,受体与配体的亲和力越高,构象越稳定。本研究结果显

示,结合能 ≤ -4.25 kcal/mol 的有 409 个, ≤ -5.0 kcal/mol 的有 399 个, ≤ -7.0 kcal/mol 的受体-配体组合有 179 个,表明大多数受体-配体之间均能较好结合发挥作用。结合能排名前 10 位的受体-配体复合物为 PTGS1-甘草异黄酮、PTGS1-3'-甲氧基光甘草定、PTGS1-shinpterocarpin、PTGS1-4'-甲氧基光

甘草定、PPARG-豆甾醇、PTGS1-甘草苷、PPARG-光甘草定、PPARG-shinpterocarpin、PTGS1-光甘草定、PPARG- β -谷甾醇。结合能见表 1。在这 10 种受体-配体组合中,受体为 PTGS1 和 PPARG,说明在猴痘的治疗过程中 PTGS1 与 PPARG 发挥主要作用。对接结合能排名前 4 位的受体均为 PTGS1,且结合能小于 -12 kcal/mol,说明 PTGS1 能够与小分子配体形成较为稳定的构象(图 5),从而发挥作用。

表 1 分子对接结合能绝对值前 10 的受体-配体组合
Table 1 Top 10 receptor-ligand combinations of molecular docking binding energies

受体-配体	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
PTGS1-甘草异黄烷酮	-12.5
PTGS1-3'-甲氧基光甘草定	-12.2
PTGS1-shinpterocarpin	-12.2
PTGS1-4'-甲氧基光甘草定	-12.0
PPARG-豆甾醇	-11.8
PTGS1-甘草苷	-11.8
PPARG-光甘草定	-11.7
PPARG-shinpterocarpin	-11.7
PTGS1-光甘草定	-11.7
PPARG- β -谷甾醇	-11.6

2.8 分子动力学结果

2.8.1 均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 分子动力学模拟的 RMSD 可反映受体-配体复合物的运动过程,复合物的 RMSD 越大,波动越剧烈,则不稳定性越高;相反则复合物体系越稳定。其中,PTGS1-3'-甲氧基光甘草定、PTGS1-shinpterocarpin、PTGS1-4'-甲氧基光甘草定 3 个复合物体系的 RMSD 在模拟的前 5 ns 逐渐收敛,并在随后的模拟中保持较为稳定的波动。PTGS1-甘草异黄烷酮的 RMSD 在 15 ns 后也保持较为稳定的波动,表明 4 种复合物体系的运动在结合之后得到稳定。相比之下 PTGS1-甘草异黄烷酮的 RMSD 最高,然后依次是 PTGS1-shinpterocarpin、PTGS1-4'-甲氧基光甘草定、PTGS1-3'-甲氧基光甘草定。说明这些复合物体系的稳定性由高到低依次为 PTGS1-3'-甲氧基光甘草定 > PTGS1-4'-甲氧基光甘草定 > PTGS1-shinpterocarpin > PTGS1-甘草异黄烷酮。结果表明,这 4 种小分子均能与 PTGS1 结合并保持相对稳定的状态,计算结果见图 6。

2.8.2 结合自由能 基于分子动力学模拟的轨迹,使用 MMPBSA 方法计算结合自由能,这可以更准确地反映靶蛋白与小分子(受体-配体)的结合方式。负值表示小分子与靶蛋白具有结合亲和力,值越低表示结合力越强。计算结果表明,这些小分子与相应的蛋白质具有一定的结合亲和力,而且非常强。其中 PTGS1-shinpterocarpin 的结合亲和力最高,为 (-103.463 ± 1.371) kJ/mol (表 2)。

2.8.3 氢键分析 氢键是最强的非共价结合相互作用之一。氢键数量越多,则证明结合效果越好。结果表明,受体-配体的氢键数量由多到少依次是 PTGS1-3'-甲氧基光甘草定 > PTGS1-4'-甲氧基光甘草定 > PTGS1-甘草异黄烷酮 > PTGS1-shinpterocarpin。由图 7 中所呈现的氢键数量可推测 PTGS1-3'-甲氧基光甘草定、PTGS1-4'-甲氧基光甘草定、PTGS1-甘草异黄烷酮的相互作用可能是以氢键为主。PTGS1-shinpterocarpin 的相互作用可能不是通过氢键,而是通过疏水作用发生的。

2.8.4 目标蛋白在残基水平上的稳定性 为了探索大分子蛋白在残基水平上的局部波动,引入均方根波动 (root mean square fluctuation, RMSF),用以反映蛋白质在分子动力学模拟过程中的灵活性。通常药物与蛋白质结合后,蛋白质的柔性降低,从而达到稳定蛋白质的作用,发挥酶促作用。结果表明,4 种复合物的 RMSF 峰值与谷值位置基本相同,表明 4 种药物起效部位近似,可能是通过类似的机制发挥功效的。RMSF 计算结果见图 8。

2.8.5 回转半径 (radius of gyration, ROG) 分析 ROG 反映了受体-配体结合的紧密性,并能反映结合体系的约束程度。4 个受体-配体复合物 ROG 平均值均为 2.5,表明系统的密度较高,结合紧密。计算结果见图 9。

2.8.6 溶剂可及表面积分析 溶剂可及表面积按照被溶剂包围的界面来计算。溶剂在不同条件下表现出不同的行为,因此溶剂可及表面积是研究溶剂环境中蛋白质构象动力学的有用参数。4 种复合物接触溶剂面积相近,小分子物质对蛋白靶点的作用受溶剂的影响较小。结果见图 10。

3 讨论

天花是由天花病毒感染引起的,具有高传播性与死亡率的疾病,在集中接种疫苗后,天花已被消灭。猴痘是一种源于非洲的人畜共患疾病,与天花临床表现相似。在 1980 年宣告消灭天花后,猴痘逐

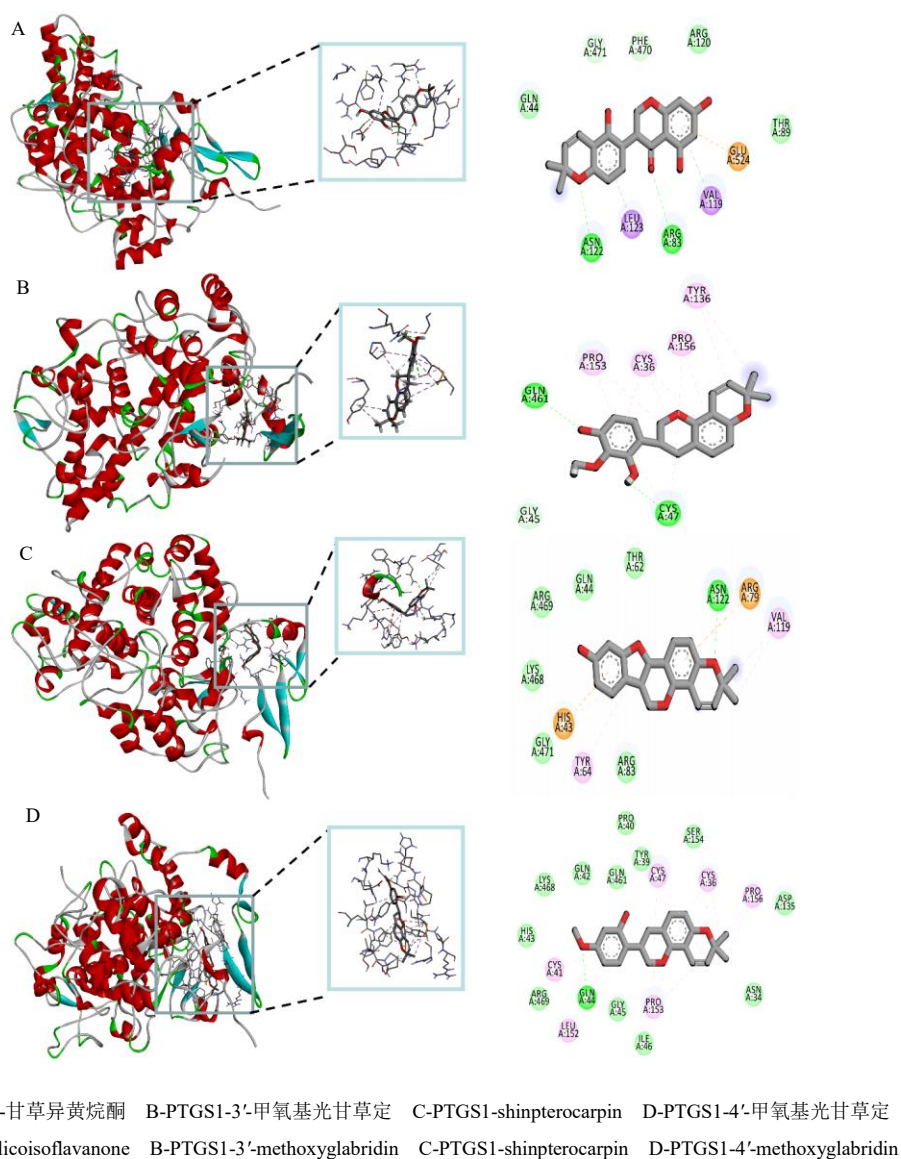


图 5 分子对接结果展示

Fig. 5 Display of molecular docking results

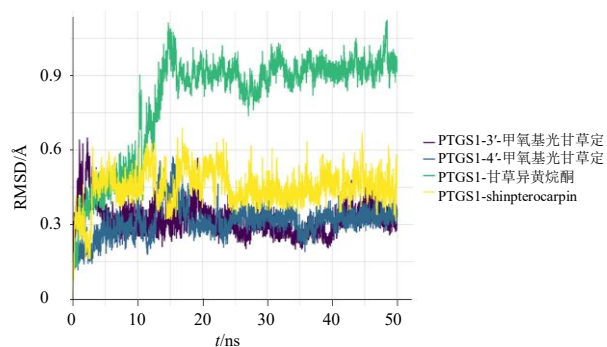


图 6 受体-配体复合物 50 ns 的均方根偏差

Fig. 6 Root mean square deviation of receptor-ligand complexes at 50 ns

渐成为影响公共卫生最重要的正痘病毒感染疾病。目前，多个非猴痘流行国家和地区相继报道了猴痘病例，且呈现上升态势。一旦猴痘出现大范围传播，可能造成新一轮的全球“疫情”。与其他病毒感染一样，猴痘也可以引起人体的炎症因子风暴和脓毒症，而现在尚无针对猴痘的特异性治疗药物或疫苗。

有研究发现，在感染猴痘 24 h 后开始使用抗病毒药物治疗，可显著降低死亡率并减低猴痘所造成的皮肤损伤，从一定程度上证明了抗病毒疗法对猴痘的治疗潜力^[23]。目前研究发现，特考韦瑞与布林西多福韦均显示出对双链 DNA 病毒（包括痘病毒）的抗病毒活性^[24]。但因病毒易突变的特点，针对病

表 2 各受体-配体复合物的结合自由能及能量值

Table 2 Binding free energy and energy value of each receptor-ligand complex

受体-配体复合物	范德华力/ (kJ·mol ⁻¹)	静电势能/ (kJ·mol ⁻¹)	极性溶剂化作用能量/ (kJ·mol ⁻¹)	溶剂可及表面积能量/ (kJ·mol ⁻¹)	结合自由能/ (kJ·mol ⁻¹)
PTGS1-甘草异黄酮	-173.913±1.172	-9.284±1.382	115.465±1.075	-18.629±0.083	-86.380±1.257
PTGS1-3'-甲氧基光甘草定	-129.036±1.093	-31.567±0.569	115.420±1.374	-15.961±0.101	-61.168±1.088
PTGS1-shinpterocarpin	-155.086±1.249	-22.980±0.756	91.212±0.999	-16.612±0.087	-103.463±1.371
PTGS1-4'-甲氧基光甘草定	-177.885±0.923	-22.853±0.513	123.332±1.353	-19.611±0.078	-96.986±1.236

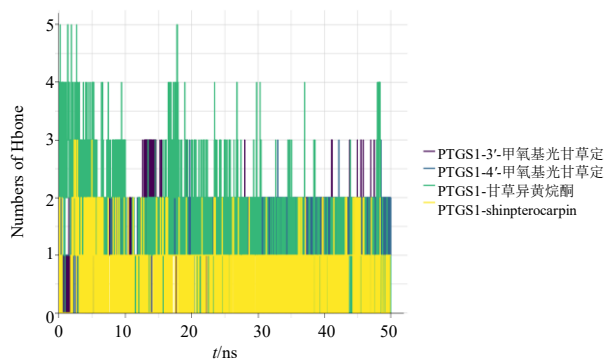


图 7 受体-配体复合物 50 ns 氢键数目

Fig. 7 Number of hydrogen bonds in receptor-ligand complexes at 50 ns

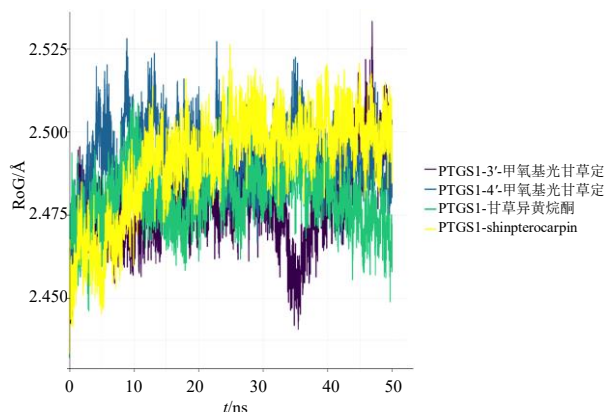


图 9 受体-配体复合物 50 ns 回转半径计算

Fig. 9 Calculation of 50 ns radius of gyration of receptor-ligand complex

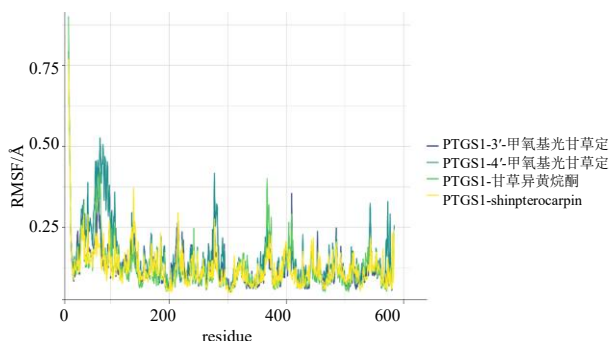


图 8 受体-配体复合物 50 ns 的均方根波动

Fig. 8 root mean square fluctuation of receptor-ligand complex 50 ns

毒的特效药常常在使用一段时间后产生耐药性。因此，寻找合适的药物预防与治疗猴痘的前瞻性研究迫在眉睫。且研究显示，对于猴痘病毒而言，抗病毒治疗或许比接种疫苗能够起到更好的效果^[23]。

中医药因其多靶点作用以及较为安全的特点，近年来逐渐被人们关注。仙方活命饮是中国传统医学的经典方剂，其具有多种药物组分，常用于疱疹、脓肿合并发热的治疗，具有多靶点协同治疗及毒性低的优势。实验证实仙方活命饮中的组成药物金银花、白芷、皂角刺、浙贝母等提取物及其含有的单

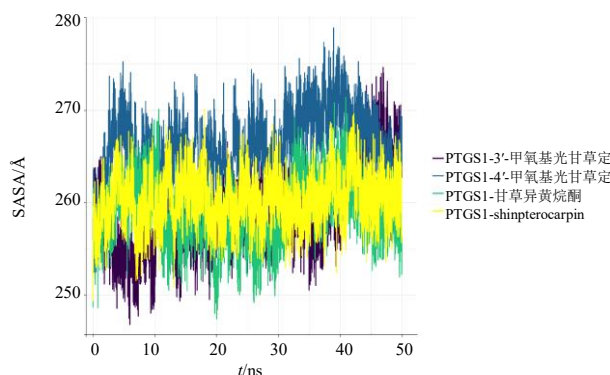


图 10 受体-配体复合物 50 ns 溶剂可及表面积

Fig. 10 Solvent accessible surface area of receptor-ligand complexes at 50 ns

体成分在体外具有一定的抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒作用^[25-32]，而这也是治疗猴痘的可能机制。由于猴痘病毒的不易获取，加之其临床病例较少，故本研究通过网络药理学与多数据库协作，探讨了仙方活命饮治疗猴痘的潜在治疗靶点，预测了相关药理作用机制，并使用分子对接与分子动力学的方法来确定活性化合物-靶点蛋白所形成构象的稳定性，为未来的临床治疗与研究提供了新的思路。

通过 PPI 与分子对接分析筛选可知仙方活命饮主要通过 ALOX5、PPARG、CTSD、PTGS1、CHUK、NFE2L2、RUNX1T1、LTA4H、KDR 等靶点发挥抗猴痘病毒的作用。这些蛋白从不同角度,发挥着抗炎、抑菌、止痛的效果,尤其是这其中的 PTGS1 与 PPARG。

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是体内催化花生四烯酸合成的关键酶,属于膜结合蛋白,主要存在于哺乳动物的微粒体中,是非甾体类抗炎药物的作用靶点。在哺乳动物细胞中,COX 表达为 2 个亚型,分别为 COX-1 与 COX-2,分别由 PTGS1 与 PTGS2 基因编码。其中 COX-1 与正常细胞的前列腺素家族合成有关,参与正常的生理活动,维持体内的炎症水平。其不仅是要素酶,更是诱导酶,参与炎症活动,具有加重炎症的作用。COX-1 可催化花生四烯酸转化为前列腺素 H₂ (prostaglandin H₂, PGH₂), PGH₂ 是多种细胞特异性前列腺素和血栓素合酶的直接底物^[33]。除此之外,COX-1 尚具有促使血小板聚集的作用,先前的研究发现,血小板定位的 COX-1 合成血栓素的前体,而血栓素则是一种有效的血小板聚集诱导剂。缺乏 COX-1 的血小板不能产生合成血栓素的前体,因此表现出聚集的延迟。实验表明,将鼠的 PTGS1 基因敲除后,鼠的 COX-1 合成减少,且它们的花生四烯酸相关的炎症反应降低,这从另一个角度证明 PTGS1 具有生成 COX-1 从而调节炎症水平的作用^[34]。在生物体中,PTGS2 基因编码 COX-2 蛋白,与炎症相关。COX-2 是催化花生四烯酸产生前列腺素的关键限速酶之一,当细胞受到各种刺激因素包括生长因子、细胞因子、炎性介质等作用时,COX-2 的表达迅速上调。前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 是 COX-2 催化花生四烯酸生成的主要产物。由此推测,仙方活命饮治疗猴痘的机制类似于非甾体类抗炎药物,即通过作用于 COX 家族,调节前列腺素的分泌进而调节炎症反应来进行治疗。

PPAR 是一类配体激活的核转录因子超家族成员。主要包括 PPAR α 、PPAR β/δ 和 PPAR γ (即 PPARG) 3 种表型,其中以 PPAR γ 的研究最为深入。PPAR γ 在炎症、动脉粥样硬化、胰岛素抵抗和糖代谢、肿瘤和肥胖中起到重要的调节作用。在炎症反应中, γ -干扰素(interferon- γ , INF- γ) 与 PPAR γ 相关信号密切相关。据报道,IFN- γ 刺激后可诱导并活化 Janus 激酶(Janus kinase, JAK)/信号转导和转

录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)通路,使肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 分泌增多^[35]。在大鼠巨噬细胞和人结肠腺癌上皮细胞中,IFN- γ 可通过激活 JAK2 和下游的 STAT1 和 STAT3,增强诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达并加重炎症反应。Li 等^[36]研究表明,与配体结合的 PPAR γ 可以抑制 IFN- γ /脂多糖介导的 iNOS 合成,从而发挥抗炎效应。除此之外,PPAR γ 可以直接与核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的亚基结合,形成转录抑制复合物,降低了 NF- κ B 与 DNA 结合活性,抑制 NF- κ B 合成。PPAR γ 还可以通过与竞争结合协同转录辅激活子 p300/CBP 来抑制 NF- κ B 的转录。在大鼠结肠炎的模型中,应用 PPAR γ 激动剂,可以观察到大鼠组织中 COX-2、PGE₂、TNF- α 等炎症因子表达显著减少,证实了上述说法^[37]。

本研究仍有一些局限性。当前的网络信息技术有待进一步完善,数据库数据的准确性和及时性有待科学验证。同时,数据库中未记载或未经验证的化合物本研究未纳入分析。本研究筛选出的主要活性成分并不能完全代表仙方活命饮,因此需要考虑药效学实验和分子生物学实验来进一步验证本研究结果。由于这些潜在活性成分对猴痘病毒的作用及机制尚未得到阐释和验证,因此该研究具有很大的发展空间和研究意义。

本研究结果显示,仙方活命饮治疗猴痘具有多成分、多靶点、多通路、联系复杂的特点,特别是通过 GO 和 KEGG 富集分析发现,仙方活命饮对猴痘具有多种协同治疗作用。后续可对仙方活命饮中各成分相互作用、配伍变化及不同含量对猴痘病毒的影响进行实验验证,为相关药物的开发提供方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jezek Z, Grab B, Paluku K M, et al. Human monkeypox: Disease pattern, incidence and attack rates in a rural area of Northern Zaire [J]. *Trop Geogr Med*, 1988, 40(2): 73-83.
- [2] McCollum A M, Damon I K. Human monkeypox [J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 58(2): 260-267.
- [3] 朱艺欣, 李宝莉, 马宏胜, 等. 白芷的有效成分提取、药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(31): 159-162.
- [4] 冯秀丽, 许庆华, 赵晓云, 等. 金银花及其复方的体外抑菌活性与体内抗炎作用 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2013, 30(1): 35-39.
- [5] 黄静, 黄玲, 王敏华, 等. 仙方活命饮加减联合异维 A

- 酸治疗中重度痤疮临床观察 [J]. 中国美容医学, 2016, 25(10): 97-99.
- [6] 甘海芳, 杨文志, 李广莹, 等. 加减仙方活命饮治疗肺胃热毒型中重度寻常痤疮的疗效及对患者血清细胞因子白介素-1 α 与白介素-4 的影响 [J]. 四川中医, 2018, 36(7): 172-175.
- [7] 吴明汉. 仙方活命饮合五味消毒饮加减治疗肛周脓肿 52 例 [J]. 福建中医药, 2006, 37(5): 52.
- [8] 刘海芳, 鲍惠君, 田娜. 仙方活命饮加减方治疗糖尿病足的临床观察 [J]. 中国民间疗法, 2022, 30(10): 59-61.
- [9] 盛国强, 徐红霞. 仙方活命饮对急性化脓性扁桃体炎血清炎症因子的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(30): 3362-3364.
- [10] 国家卫生健康委办公厅, 国家中医药管理局办公室. 猴痘诊疗指南(2022 年版) [J]. 全科医学临床与教育, 2022, 20(8): 676-677.
- [11] Yao L, Wu L L, Li Q, *et al.* Novel berberine derivatives: Design, synthesis, antimicrobial effects, and molecular docking studies [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(10): 774-781.
- [12] 文玉华, 朱如曾, 周富信, 等. 分子动力学模拟的主要技术 [J]. 力学进展, 2003, 33(1): 65-73.
- [13] 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.
- [14] Consortium U. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D506-D515.
- [15] Consortium T U, Bateman A, Martin M J, *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D480-D489.
- [16] Barrett T, Troup D B, Wilhite S E, *et al.* NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets: 10 years on [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: D1005-D1010.
- [17] Zhang F J, Yu C, Xu W C, *et al.* Identification of critical genes and molecular pathways in COVID-19 myocarditis and constructing gene regulatory networks by bioinformatic analysis [J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0269386.
- [18] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, *et al.* STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [19] Wang Y L, Xiao J, Suzek T O, *et al.* PubChem: A public information system for analyzing bioactivities of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: W623-W633.
- [20] 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.
- [21] Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, *et al.* CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(4): 671-690.
- [22] Kumari R, Kumar R, Consortium O S D D, *et al.* G_mmpbsa: A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations [J]. *J Chem Inf Model*, 2014, 54(7): 1951-1962.
- [23] Stittelaar K J, Neyts J, Naesens L, *et al.* Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection [J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 745-748.
- [24] Hutson C L, Kondas A V, Mauldin M R, *et al.* Pharmacokinetics and efficacy of a potential smallpox therapeutic, brincidofovir, in a lethal monkeypox virus animal model [J]. *mSphere*, 2021, 6(1): e00927-e00920.
- [25] 胡政宇, 周鸿立. 白芷多糖提取分离及其生物活性的研究进展 [J]. 中国调味品, 2017, 42(12): 174-177.
- [26] 薛遥. 几种香辛料提取液抗氧化、抑菌、抗病毒活性的比较 [D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2014.
- [27] 祝家玺, 高维浩, 范红艳. 金银花提取物药理作用的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2022, 43(2): 130-132.
- [28] 陈冉, 王婷婷, 李开铃, 等. 免疫调节抗病毒中药的特性与应用 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1412-1426.
- [29] 董杰德, 陈晨华, 仇素英, 等. 四种中草药抗柯萨奇及埃柯病毒的实验研究 [J]. 山东中医学院学报, 1993, 17(4): 46-48.
- [30] 陈谊, 王彤光, 郭抗抗, 等. 中药土贝母、川白芷提取物的体外抑菌试验 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009(3): 109-110.
- [31] 张明发, 沈雅琴. 浙贝母药理研究进展 [J]. 上海医药, 2007, 28(10): 459-461.
- [32] 刘建建, 时鹏, 黄涛, 等. 皂角刺提取物体外抑菌杀菌作用研究 [J]. 医药导报, 2013, 32(3): 300-302.
- [33] Williams C S, Mann M, DuBois R N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development [J]. *Oncogene*, 1999, 18(55): 7908-7916.
- [34] Langenbach R, Morham S G, Tian H F, *et al.* Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration [J]. *Cell*, 1995, 83(3): 483-492.
- [35] Li Q T, Verma I M. NF-kappaB regulation in the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(10): 725-734.
- [36] Li M, Pascual G, Glass C K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(13): 4699-4707.
- [37] Sánchez-Hidalgo M, Martín A R, Villegas I, *et al.* Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(12): 1733-1744.

[责任编辑 潘明佳]