

# 桑菊饮治疗呼吸道病毒感染作用机制的生物信息学探讨与免疫分析

祁钰涵<sup>1</sup>,马晓北<sup>2</sup>

(1. 中国中医科学院 中医基础理论研究所,北京 100700;2. 中国中医科学院 研究生院,北京 100700)

**摘要:**通过生物信息学、网络药理学、免疫浸润分析及分子对接方法从分子层面探讨桑菊饮治疗呼吸道病毒感染的作用机制。通过 TC MSP 数据库获取桑菊饮所含化学成分及靶点,通过 GEO 数据库搜索并下载上呼吸道感染相关芯片并提取差异 mRNA,整理矩阵后运用 R 语言 CIBERSORTx 包进行免疫浸润分析;limma 包分析得到关键差异 mRNA 作为疾病靶点,与药物靶点相互映射后得到治疗靶点;STRING 11.5 数据库进行 PPI 分析,借助 R 语言 clusterProfiler 包进行 GO 和 KEGG 富集分析( $p < 0.05$  且  $qvalue < 0.2$ );利用 Cytoscape 3.8.1 软件,构建相关网络图并通过 cytoHubba 筛选核心靶点;采用 AutoDock Vina 软件进行分子对接验证。筛选共得到桑菊饮中 8 味药共计 169 个活性成分及 248 个作用靶点,CIBERSORTx 对 22 种免疫细胞进行了反卷积分析。PPI 分析显示 CXCL8、PPAR $\gamma$ 、IL1 $\beta$ 、MAPK14 为关键靶点,GO 分析及 KEGG 通路富集提示,桑菊饮的作用机制主要涉及对脂多糖的反应、巨噬细胞源性泡沫细胞分化、白细胞趋化性、MAPK 活性的激活等生物过程,以及 AGE-RAGE、Toll 样受体、EB 病毒感染、IL-17、HIF-1、甲型流感等信号通路。分子对接结果表明组方中主要活性成分与关键靶点具有较为稳定的结合活性。桑菊饮可能是通过柚皮素、木犀草素、槲皮素、花生四烯酸等活性成分作用于 IL1 $\beta$ 、MAPK14 等靶点来改善细胞免疫状态、炎症反应及抗病毒感染等发挥作用,是多成分、多蛋白靶点、多通路过程。

**关键词:**呼吸道病毒感染;桑菊饮;免疫浸润分析;生物信息学;网络药理学;分子对接

**中图分类号:**R373.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-8513(2024)03-0294-13

呼吸道病毒感染(respiratory viruses-infected, RVI)是最为常见的呼吸道感染性疾病,病毒是最常见的呼吸道致病原<sup>[1]</sup>。据不完全统计,急性呼吸道感染中大约有 90% 以上是病毒感染,病毒由于自身结构的特殊性极易发生变异且病毒种类较多,相互之间没有交叉免疫,在短时间内容易造成暴发流行<sup>[2]</sup>。常见的呼吸道病毒包括流感病毒、呼吸道合胞病毒、肠道病毒、鼻病毒、巨细胞病毒、登革热病毒、EB 病毒和腺病毒等<sup>[3]</sup>。感染呼吸道病毒后其临床症状主要以发热、咳嗽、咽痛等上呼吸道症状为主,患者一般需要住院治疗,同时还可能加重其他呼

吸系统以及全身性疾病,从而威胁生命<sup>[4]</sup>。呼吸道病毒感染的治疗主要是以对症治疗为主,目前尚无特殊的抗病毒药物,在应对感染引发的持续性高热时,大量糖皮质激素的应用也给患者带来较多的不良影响,其防治仍是世界性难题<sup>[5]</sup>。近年来,中医学以宏观整体辨证施治的独特优势在多种疾病的防治中取得了较为明显的效果。病毒感染性疾病在中医学中属于“温病”、“疫病”等范畴,关于此病的描述最早见于《黄帝内经》,明代吴又可可在《温疫论》中提出戾气学说对温病等进行详细论述,至清代医家叶天士和吴鞠通创立卫气营血辨证及三焦辨证后,温

收稿日期:2022-08-19.

基金项目:中国中医科学院院科技创新工程项目(CI2021A00103);四川省中医药管理局重大项目(2020ZD006)。

作者简介:祁钰涵(1993-),女,博士研究生。主要从事中医学理论体系及其临床应用研究。

通信作者:马晓北(1970-),女,研究员,博士生导师。主要从事中医学理论体系及其临床应用研究。

病学成为一门独立的中医传染病学<sup>[6-7]</sup>. 中医学认为其病机为六淫邪气侵袭人体,破坏了人体的动态平衡,导致脏腑功能障碍,气血阴阳失调,从而使人体发生病理性的改变.

桑菊饮出自清代医学名著《温病条辨》,该方由桑叶、菊花、杏仁、连翘、薄荷、桔梗、甘草、芦根八味中药组成<sup>[8]</sup>. 方中桑叶、菊花甘凉轻清,疏散上焦风热,且桑叶善走肺络、清泻肺热为主药. 辅以薄荷助桑、菊疏散上焦之风热;杏仁、桔梗以宣肺止咳;连翘苦寒清热解毒,芦根甘寒清热生津止渴,共为佐药;甘草调和诸药,且有疏风清热、宣肺止咳作用为使药. 八味药配伍共行疏风清热解毒,宣肺止咳之效. 多项研究表明,桑菊饮对于呼吸道病毒感染具有良好的效果,能够明显改善肺部炎症、免疫状态以及中医证候<sup>[9-10]</sup>. 网络药理学和分子对接是以生物信息学为基础的新兴学科,集化学信息学、生物信息学、网络生物学、网络分析和传统药理学于一体,运用整合数据、多路径多靶标从分子层面探究药物的作用机制,为新药研发以及药物安全使用提供理论参考. 免疫浸润分析能够表明不同样本间免疫细胞以及免疫功能的差异,并可以反映出该种疾病免疫细胞类型的显著性. 由于桑菊饮中所含化学成分较为复杂,并且在分子层面治疗 RVI 的作用机制尚不明确,因此本研究借助网络药理学、生物信息学、免疫浸润分析及分子对接方法从分子蛋白水平探究桑菊饮治疗 RVI 的作用机制,为后续实验研究提供思路及理论基础.

## 1 方法

### 1.1 桑菊饮有效成分收集与靶蛋白筛选

通过中药系统药理学分析平台 TCMSP<sup>[11]</sup> (<https://www.tcmsp-e.com/>) 检索并收集桑菊饮中各个药物所含有的化学成分,根据毒物动力学 (ADME) 原理,以 TCMSP 最新筛选标准:口服利用率 (OB)  $\geq 30\%$ ,类药性 (DL)  $\geq 0.18$  为筛选条件,筛选组方中所含有的有效化学成分. 基于 TCMSP 将筛选得到的有效成分进行靶点蛋白获取,去重后借助 Uniprot 数据库<sup>[11]</sup> (<https://www.uniprot.org/>) 对靶点蛋白标准化处理.

### 1.2 “中药-有效成分-靶点”网络的构建及主要有效成分筛选

将筛选得到的有效成分以及有效作用靶点导入 Cytoscape 3.8.1 软件中,构建“中药-有效成分-靶点”网络并进行拓扑分析. 将有效成分按节点度

值大小排名,选取度值排名前 4 位的成分作为主要有效成分.

### 1.3 GEO 芯片分析与疾病靶点的获取

在高通量基因表达 (gene expression omnibus, GEO) 数据库<sup>[12]</sup> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中下载 GSE157240 数据集 (基于 GPL20301 平台, Illumina HiSeq 4000), 该数据集共包含 167 例 RVI 患者外周血液样本和 20 例健康人外周血液对照样本. 运用 R 语言“limma”包进行分析,设定校正后  $P(\text{FDR}) < 0.05$ ,且差异倍数 (fold change, FC)  $> 1$  或  $< -1$  为差异基因的筛选条件,获取差异 mRNA 作为疾病靶点.

### 1.4 用 CIBERSORTx 进行免疫浸润分析

为了深入了解呼吸道病毒感染后外周血中的免疫微环境,对 GSE157240 中 187 个样本进行免疫浸润分析. 数据归一化处理后,使用 CIBERSORT 方法<sup>[13]</sup> 来分析数据. 在 R 软件中运行带有签名矩阵文件“LM22”的 CIBERSORT,同时对 1 000 个排列进行运算,得到 22 种免疫细胞的比例,包括幼稚 B 细胞、记忆性 B 细胞、浆细胞、CD8 + T 细胞、幼稚 CD4 + T 细胞、静息记忆性 CD4 + T 细胞、激活记忆性 CD4 + T 细胞、滤泡辅助 T 细胞、调节性 T 细胞、 $\gamma$ -增量 T 细胞、静息 NK 细胞、激活的 NK 细胞、单核细胞、M0 巨噬细胞、M1 巨噬细胞、M2 巨噬细胞、静息树突状细胞、激活的树突状细胞、静息肥大细胞、激活的肥大细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞. 按  $p < 0.05$  进行筛选,计算各免疫细胞在样本中的百分比. 然后用“ggplot2”和“ggpubr”包显示免疫细胞的浸润程度,以及 RVI 和正常标本之间的差异.

### 1.5 桑菊饮治疗 RVI 潜在作用靶点预测与蛋白互作网的构建分析

将 1.3 项下得到的差异 mRNA 与药物靶点取交集,得到桑菊饮治疗 RVI 的潜在作用靶标. 将桑菊饮治疗 RVI 的潜在作用靶点输入 STRING 数据库<sup>[14]</sup> (<https://string-db.org/>),物种设定为“Homo sapiens”,获得蛋白与蛋白之间的相互作用关系,将数据保存为 TSV 格式,利用 Cytoscape 3.8.1 进行可视化处理并借助 cytoHubba<sup>[15]</sup> 筛选出核心靶点.

### 1.6 富集分析

将桑菊饮治疗 RVI 的潜在作用靶点输入 R 软件中,利用“org.Hs.eg.db”包 [3.10.0 版本] 进行 ID 转换,“clusterProfiler”包 [3.14.3 版本] 进行 GO 分析与 KEGG 富集分析 ( $p < 0.05$  且  $q\text{value} < 0.2$ ). 其中 GO 分类富集分析包括生物学过程 (biological

process, BP)、分子功能(molecular function, MF)、细胞组成(cellular component, CC), 选取 BP、MF、CC 排名前 20 的条目进行可视化, KEGG 通路富集根据富集在通路上基因数目以及与疾病的相关性, 用“ggplot2”包进行可视化.

### 1.7 分子对接验证

从 PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 平台下载 1.2 项下药物排名前 4 活性化合物的二维结构信息, 利用 ChemBio3D 软件将药物化学成分的二维结构信息转化为三维结构, 进行 MM2 能量优化, 完成小分子配体的制备; 从 RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>) 数据库下载候选靶蛋白的三维结构, 用 PYMOL2.4.0 软件去除水分子和配体, 制备蛋白质受体. 使用 AutodockTools 软件读取受体文

件, 经过加氢处理离子修饰后转换为 PDBQT 格式, 并将配体文件转换为 PDBQT 格式保存. 使用 AutoDock Vina 软件进行分子对接, 选择结合能最低的模型进行可视化分析.

## 2 结果

### 2.1 桑菊饮有效成分及作用靶点的筛选

通过 TCMS 检索到桑菊饮化学成分共计 201 个, 其中桑叶 29 个、菊花 20 个、杏仁 19 个、连翘 23 个、薄荷 10 个、桔梗 7 个、甘草 92 个、芦根 1 个, 合并删除重复值后筛选出有效成分 169 个. 桑叶、菊花、杏仁、连翘、薄荷、桔梗、芦根中 OB 值排名前 3 位与甘草中 OB 值排名前 5 位的有效成分信息见表 1.

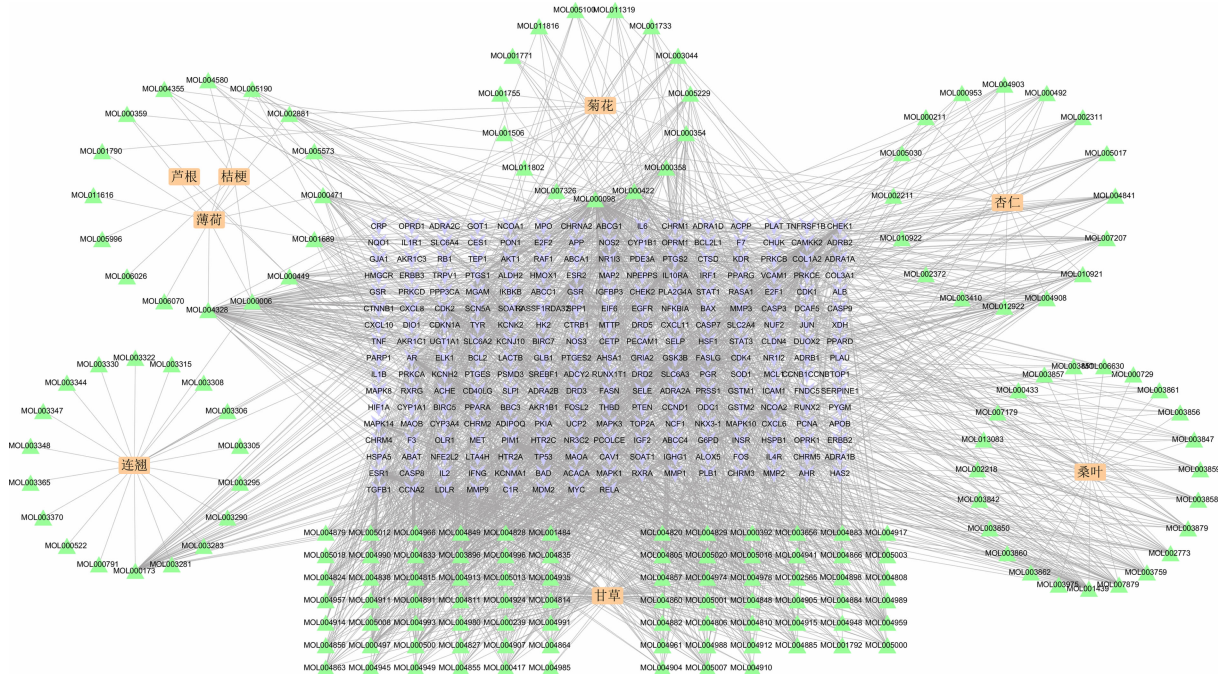
表 1 桑菊饮有效成分基本信息

中药	Mol ID	成分	OB/%	Caco-2 渗透率/%	DL	药物半衰 期(HL)
桑叶	MOL003842	albanol	83.16	0.41	0.24	9.27
	MOL003857	moracin C	82.13	0.87	0.29	9.13
	MOL003861	moracin G	75.78	0.98	0.42	6.69
菊花	MOL004328	naringenin	59.29	0.28	0.21	16.98
	MOL000354	isorhamnetin	49.6	0.31	0.31	14.34
	MOL005229	artemetin	49.55	0.81	0.48	15.01
杏仁	MOL002311	glycyrol	90.78	0.71	0.67	9.85
	MOL012922	1-SPD	87.35	0.76	0.54	1.68
	MOL007207	machiline	79.64	0.78	0.24	3.7
连翘	MOL003330	(-)-phillygenin	95.04	0.75	0.57	1.97
	MOL003306	ACon1_001697	85.12	0.76	0.57	2.12
	MOL003322	forsythinol	81.25	0.59	0.57	2.72
薄荷	MOL000471	aloe-emodin	83.38	-0.12	0.24	31.49
	MOL005190	eriodictyol	71.79	0.17	0.24	15.81
	MOL004328	naringenin	59.29	0.28	0.21	16.98
芦根	MOL000449	stigmasterol	43.83	1.44	0.76	5.57
	MOL004580	cis-dihydroquercetin	66.44	-0.34	0.27	14.51
桔梗	MOL005996	2-O-methyl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl platycogenate A	45.15	-1.46	0.25	6.03
	MOL004355	spinasterol	42.98	1.44	0.76	5.32
	MOL002311	glycyrol	90.78	0.71	0.67	9.85
甘草	MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin	83.71	0.23	0.27	17.66
	MOL004904	licopyranocoumarin	80.36	0.13	0.65	16.98
	MOL000098	quercetin	46.43	0.05	0.28	14.40
	MOL004949	isolicoflavonol	45.17	0.54	0.42	15.55

### 2.2 “中药 - 有效成分 - 靶点”网络分析

为明确有效成分与其作用靶点之间的关系, 通过 Cytoscape 3.8.1 软件构建“中药 - 有效成分 - 靶点”网络, 见图 1. 该网络包含 425 个节点, 2 107 条作用关系. 通过观察网络可以发现, 169 个有效成分中存在一个有效成分对应多个靶点, 也存在一个靶点对应多个有效成分, 说明桑菊饮以多成分多靶点

作为治疗疾病的特点. 通过 Network analyze 网络分析, 筛选出度值 (Degree) 较大的节点, 这些节点在网络中起到枢纽作用, 很可能是主要有效成分或靶点. 该网络中有效成分的平均靶点度值为 12.47, 排名前 4 位的为槲皮素 (quercetin)、柚皮素 (naringenin)、木犀草素 (luteolin)、花生四烯酸 (arachidonic acid), 分别能与 137、67、55、34 个靶点相互作用.



绿色三角形: 桑菊饮有效成分; 黄色长方形: 桑菊饮所含药物; 紫色箭头: 靶点

图 1 “中药 - 有效成分 - 靶点”网络

### 2.3 疾病靶点的获取

GSE157240 数据集中包含 167 例 RVI 患者外周血液样本和 20 例健康人外周血液对照样本. 以 P (FDR) < 0.05, 且 logFC > 1 或 < -1 为筛选条件, 共得到 2 689 个差异 mRNA, 其中上调基因 1 471 个, 下调基因 1 218 个. 使用“ggplot2”包分别绘制 PCA、聚类图和火山图 (见图 2、3).

### 2.4 免疫浸润分析

由于技术的限制, 免疫浸润在呼吸道感染中的情况尚未完全揭示, 特别是在细胞丰度较低的亚群中. 使用 CIBERSORT 算法, 探究 22 个免疫细胞亚群中 RVI 和正常人外周血之间免疫浸润的差异. 图 4 总结了 20 名正常对照和 167 名 RVI 患者的研究结果. 与正常组织相比, RVI 组织中记忆性 B 细胞、幼稚 CD4 + T 细胞、幼稚 CD4 + T 细胞、调节性 T 细胞、静息树突状细胞和静息肥大细胞比例普遍较

高, 而幼稚 CD4 + T 细胞、活化 NK 细胞、活化肥大细胞和嗜酸性粒细胞比例相对较低 (图 4、5, p < 0.05).

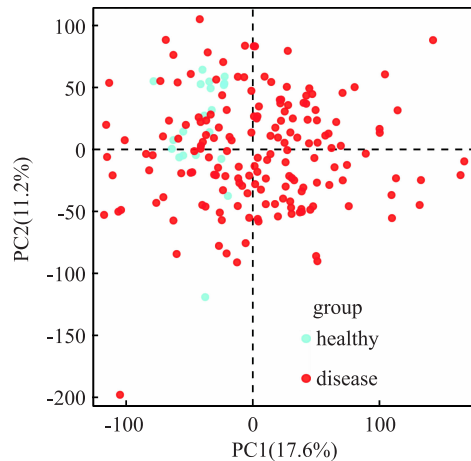


图 2 GSE157240 主成分分析 (PCA)

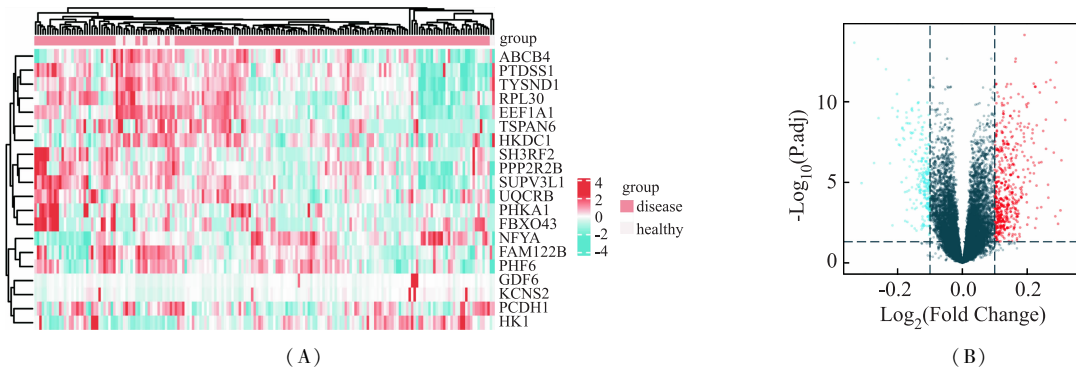


图 3 GEO 芯片差异 mRNA 表达

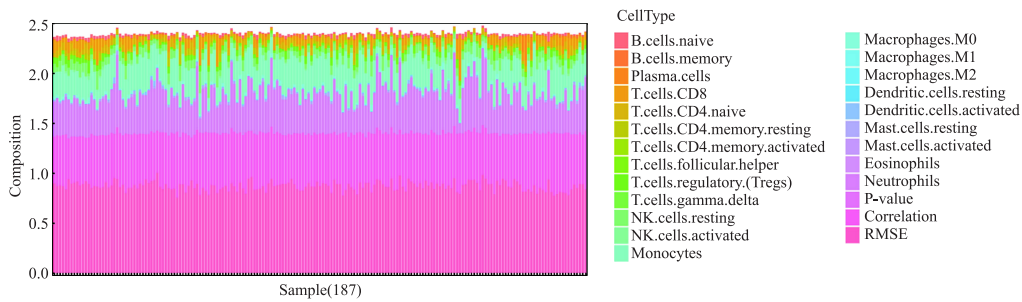


图 4 来自 GSE157240 数据集的 187 个样本中 22 个免疫细胞亚群的相对百分比

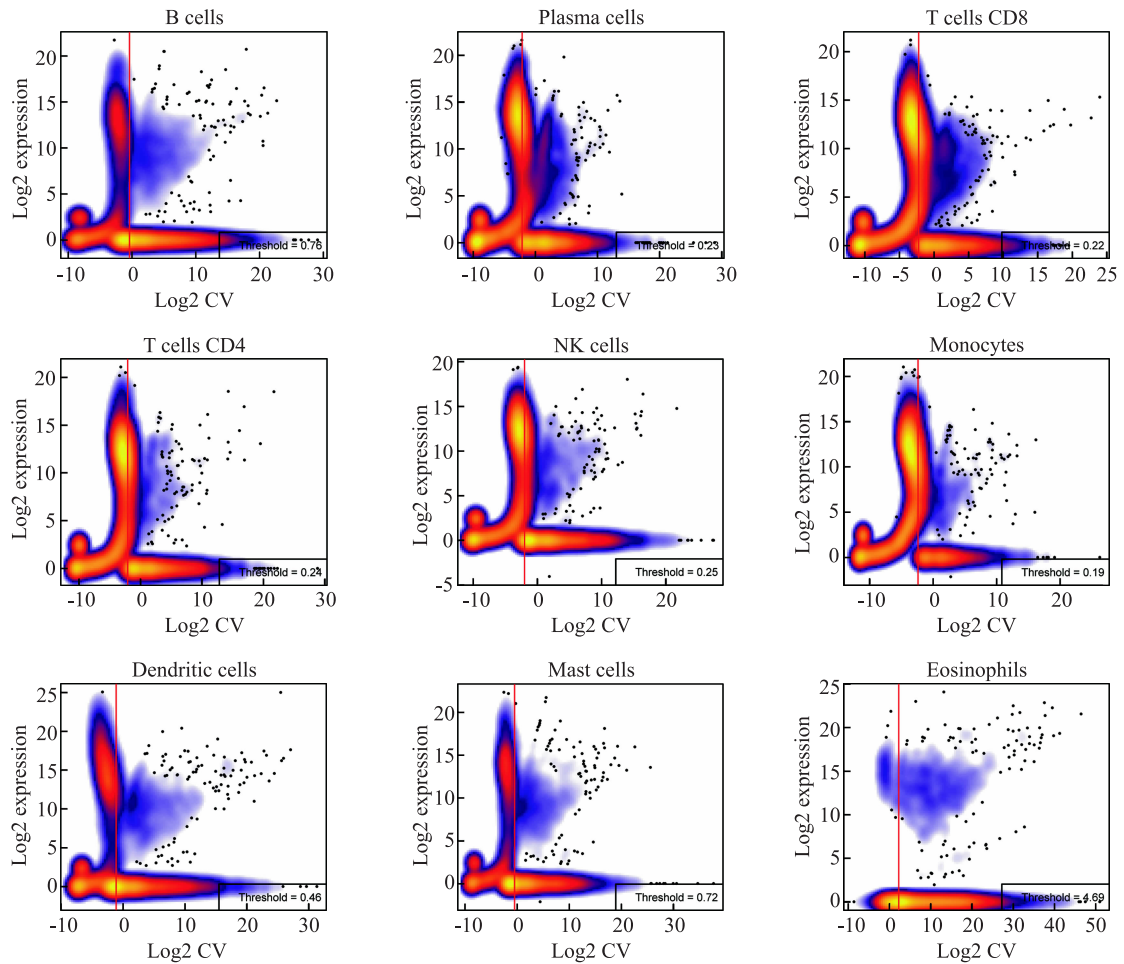


图 5 部分免疫细胞亚群的噪声阈值图

鉴于免疫细胞在呼吸道感染发生中的重要作用, 通过斯皮尔曼相关性分析可以看出, 幼稚 B 细胞、巨噬细胞 M0、幼稚 CD4 + T 细胞、静息记忆 CD4T 细胞、

单核细胞、CD8T 细胞、中性粒细胞与正常对照组呈负相关, 而肥大细胞静止、NK 细胞静止、记忆性 B 细胞、调节性 T 细胞与正常对照组呈正相关(图 6)。

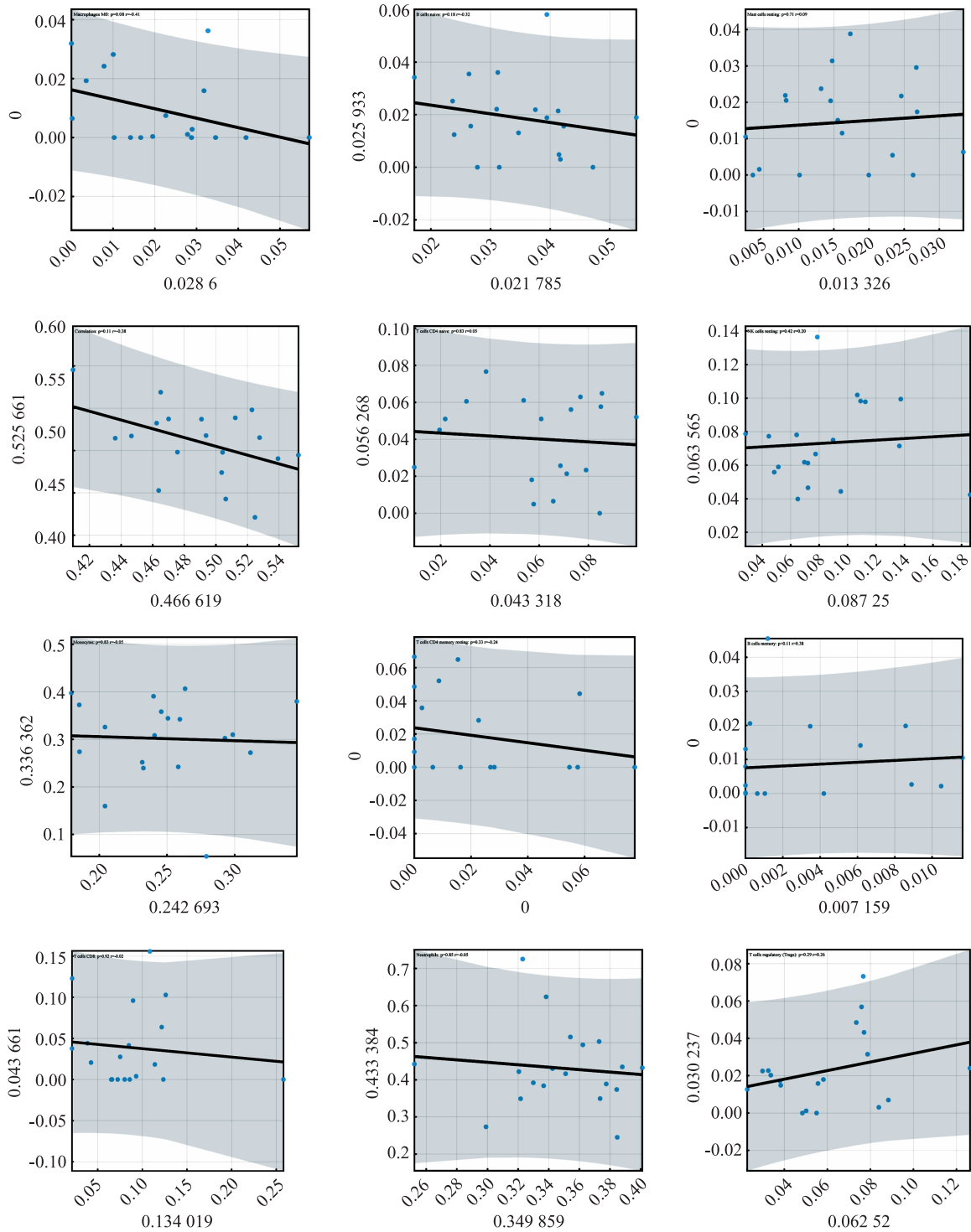


图 6 免疫细胞相关性分析

### 2.5 桑菊饮治疗 RVI 潜在作用靶点预测与 PPI 分析

将 2 689 个疾病相关基因与药物靶点取交集,最终得到桑菊饮治疗 RVI 的潜在作用靶标 55 个,见图 7.

PPI 网络显示(见图 8),该网络中共有节点 51 个(其中有 4 个靶点未参与网络共建),204 条边,通过 cytoHubba 筛选出核心靶点.结合现有的研究结果推测桑菊饮治疗 RVI 与有丝分裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)、白细胞介素 1 $\beta$ (IL1 $\beta$ )、白细胞介

素 8(CXCL8)、过氧化物酶体增植物激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )等关键靶点有关.

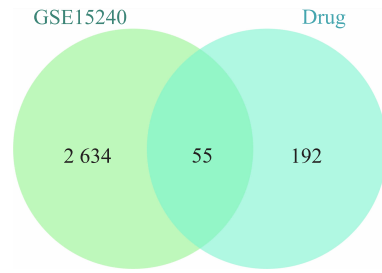


图 7 桑菊饮治疗 RVI 潜在作用靶点的筛选

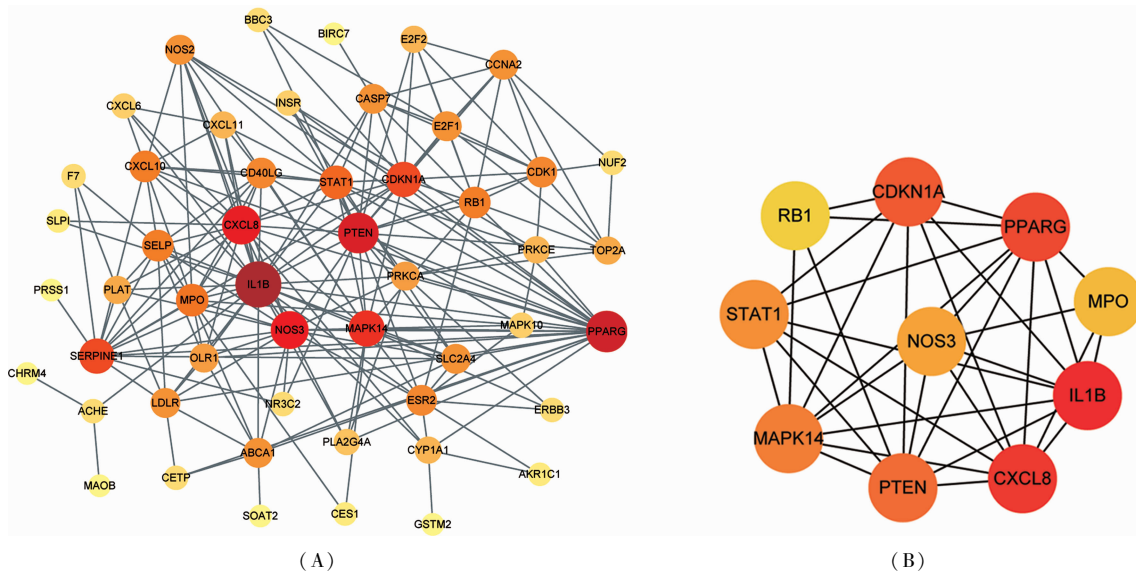


图 8 PPI 网络(A)与 cytoHubba 核心靶点(B)

### 2.6 基因富集分析

通过 R 分析共筛选得到 86 条 KEGG 通路( $p < 0.05$  且  $qvalue < 0.2$ ),692 条生物学过程(biological process, BP)、59 个分子功能(molecular function, MF)、10 个细胞组分(cellular component, CC),筛选出富集显著的前 20 个条目进行可视化,同时结合各富集基因在样本中所表现出的差异值计算其 Z-score 值并绘制丰都气泡图及弦图(图 9).分析发现桑菊饮治疗 RVI 核心靶点主要通过调控对脂多糖的反应、巨噬细胞源性泡沫细胞分化、白细胞趋化性、MAPK 活性的激活、炎症反应等来发挥生物学作用,作用于细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物、质膜外侧、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物、膜筏、膜微区等组分,参与了趋化因子受体结合、CXCR 趋化因子受体结合、氧化还原酶活性、趋化因子活性、细胞因子受体结合等分子功能.相关信号通路主要涉及 AGE-RAGE、Toll 样受体、IL-17、HIF-1 等细胞因子通路以及甲型流感、EB 病毒感染等多种疾病通路,选取富集较为显著的前 20 条通路,

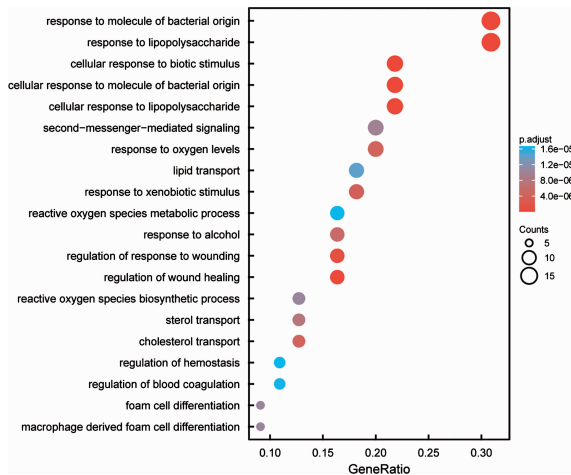
绘制气泡图可视化(图 10A),并根据其 Z-score 值绘制 KEGG 圈图(图 10B).桑菊饮中关键有效成分治疗 RVI 的作用模式图见图 11.

### 2.7 分子对接验证

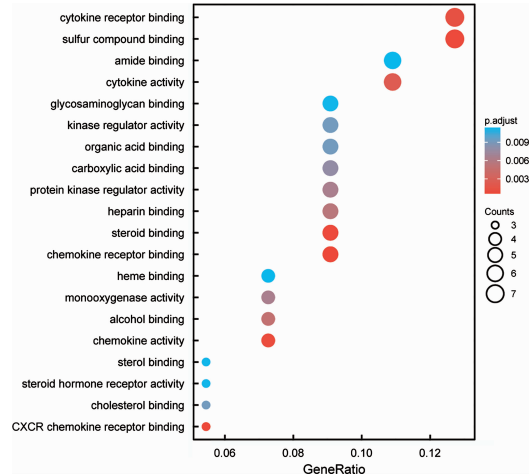
将“药物-活性成分-靶点”网络中度值排名前 4 位的有效成分(槲皮素、柚皮素、木犀草素、花生四烯酸)与基于 PPI 网络分析筛选出的 4 个靶点蛋白(MAPK14、IL1 $\beta$ 、CXCL8、PPAR $\gamma$ )在 AutoDock Vina 中进行分子对接,对接结果见表 2.由表 2 可知桑菊饮主要有效成分与治疗关键基因对接良好(结合能均小于 -5 kcal/mol).其中木犀草素、槲皮素与 MAPK14 的对接结合能较低,分别为 -8.9 和 -8.8 kcal/mol,说明木犀草素和槲皮素可能通过结合 MAPK14 来发挥治疗作用.由对接模式图(见图 12)可知,槲皮素与 MAPK14 在 MET-109、LYS-53 和 LEU-104 处形成氢键;与 IL1 $\beta$  在 ASP-85、ASN-107 及 LYS-102 形成氢键;柚皮素与 PPAR $\gamma$  在 SER-342、GLU-343、MET-329 处形成氢键;与 MAPK14 在 SER-32、VAL-30、SER-154 处形成氢键;与 IL1 $\beta$  在 ARG-9、LEU-25、LEU-81 处形

成氢键;花生四烯酸与 CXCL8 在 LYS - 320 处形成氢键;与 PPAR $\gamma$  在 LEU - 228、MET - 329 处形成氢键;木犀草素与 PPAR $\gamma$  在 LEU - 228、GLU - 343 处形成氢键;

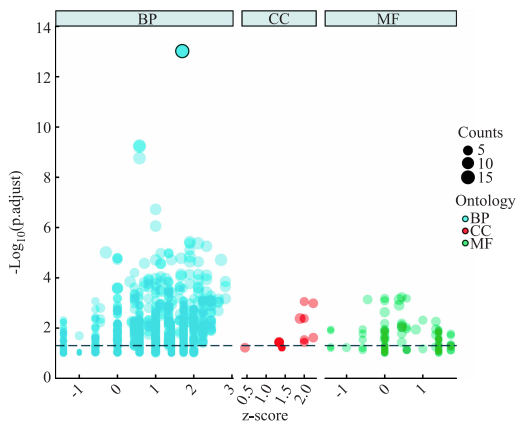
与 MAPK14 在 SER - 32、LEU - 104、LYS - 53 以及 MET - 109 处形成氢键;与 IL1 $\beta$  在 ASP - 85、ASN - 107、LYS - 102 处形成氢键。



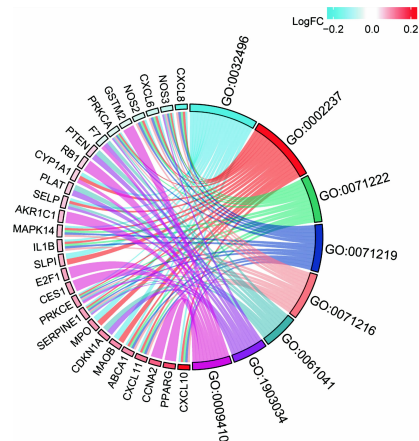
(A) BP 气泡图



(B) MF 气泡图

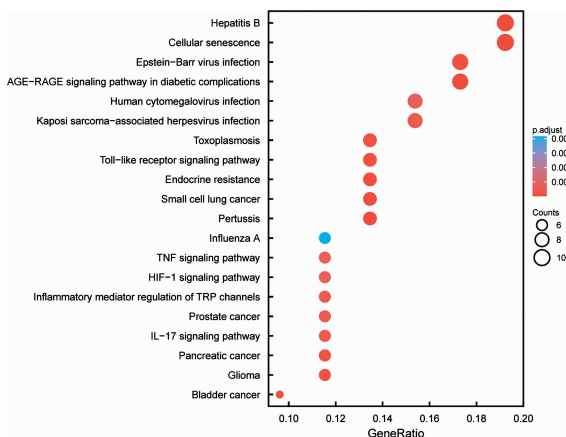


(C) 计算 Z - score 值后富集丰度图

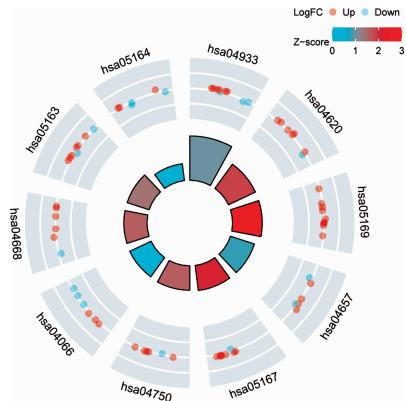


(D) BP 弦图.

图 9 GO 富集分析



(a)



(b)

图 10 KEGG 富集分析

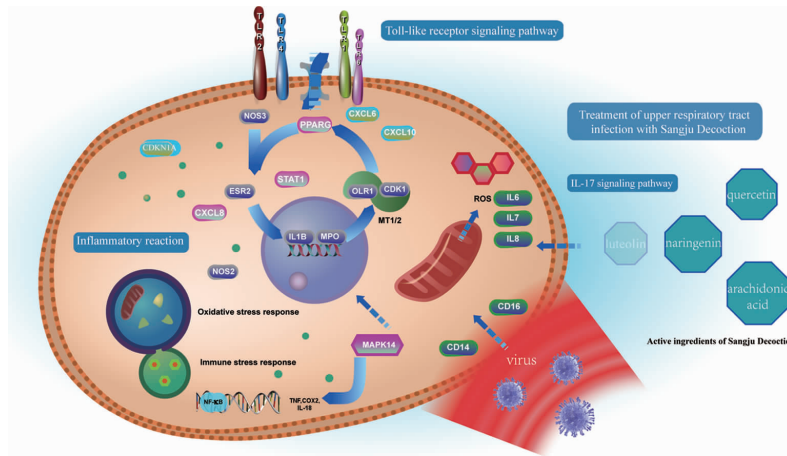


图 11 桑菊饮治疗 RVI 的作用模式图

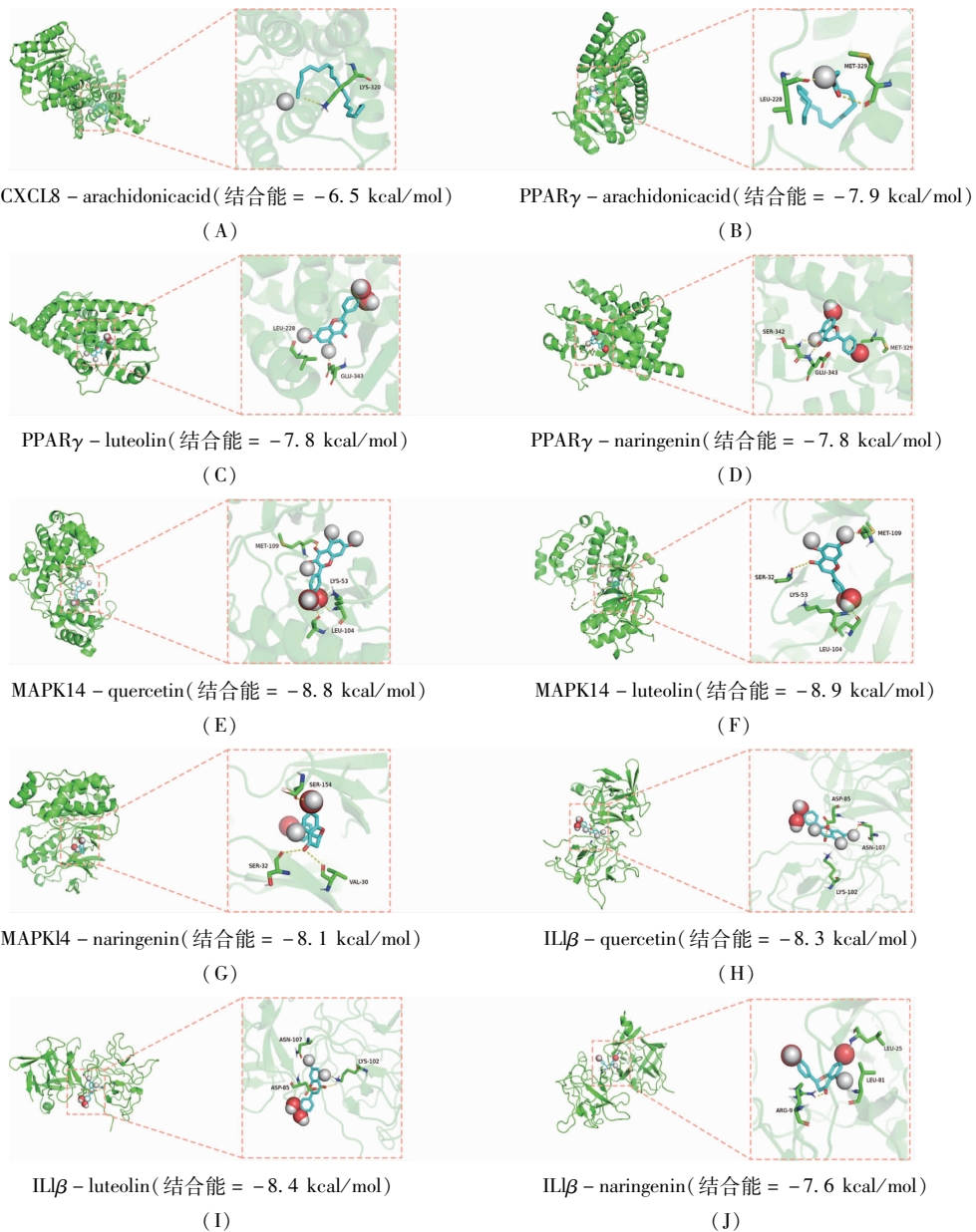


图 12 关键有效成分—核心靶点分子对接模式图

表2 关键有效成分—核心靶点结合能

(kcal · mol<sup>-1</sup>)

Gene ID	PDB ID	槲皮素	花生四烯酸	柚皮素	木犀草素
PPAR $\gamma$	6ms7	-8.1	-6.3	-8.1	-8.1
CXCL8	6lfl	-7.0	-6.5	-6.7	-7.3
MAPK14	6sp9	-8.8	-6.2	-8.1	-8.9
IL1 $\beta$	4gai	-8.3	-5.8	-7.6	-8.4

### 3 讨论与结语

呼吸道病毒感染是世界范围内对人类健康的重大威胁.在新型冠状病毒大流行之前,流感是成人呼吸道病毒感染发病和死亡的最常见原因<sup>[16]</sup>.多项研究显示,患有全身性或肺部慢性疾病、合并其他部位感染等是RVI重症病例的危险因素,甚至可导致死亡<sup>[17-18]</sup>,根据WHO的统计报道,2019年全球大约有260万人因感染呼吸道病毒而死亡<sup>[19]</sup>.现代医学研究发现,RVI的致病原结构较为复杂且容易发生变异,目前暂无特效药物治疗.对于感染后出现的发热、咳嗽等症状主要采取对症治疗,缓解表证.RVI属中医学“温病”、“疫病”范畴,是由于外感六淫邪气致使机体气血阴阳失衡,三焦气化不利,进而影响脏腑功能而发为本病.治疗应以祛邪解毒,清热宣肺止咳为法则.桑菊饮可疏风清热解毒,宣肺止咳化痰,主要用于温病风温初起.且临床研究显示在治疗RVI方面疗效明显,功效确切,安全性相对较高,但其作用机制尚不明确<sup>[10]</sup>.

本研究借助网络药理学方法,构建“药物-有效成分-靶点”网络,通过拓扑分析初步筛选出槲皮素、柚皮素、花生四烯酸、木犀草素等为桑菊饮治疗RVI的主要有效成分.现代研究的表明,槲皮素具有抗病毒活性,在动物试验中显著降低了感染动物的死亡率,并降低了平均病毒载量<sup>[20]</sup>.此外,在感染呼吸道病毒动物模型中,槲皮素及其衍生物减少了促炎细胞因子、趋化因子、活性氧物种、粘液的产生,并降低了呼吸道阻力<sup>[20]</sup>.槲皮素可以通过浓度诱导来降低病毒的传染性.在肺部细胞的感染过程(即病毒进入、复制、释放、成熟和蛋白质组装)中,槲皮素还可以影响病毒的多个毒力步骤<sup>[21]</sup>.此外,槲皮素及其衍生物的体内抗病毒活性也与其对免疫应答机制的调节作用有关.例如,槲皮素类黄酮醇可以上调辅助性T细胞1(Th1)的干扰素 $\gamma$ ,增加细胞介导的免疫活性,并下调辅助性T细胞2(Th2)释放IL-4<sup>[22]</sup>.在多种抗病毒方剂中也发现了槲皮素,不仅可以降低肺炎小鼠淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞的数量,而且还可以下调血清肿瘤坏死因子 $-\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 的水

平,从而抑制炎症反应<sup>[23-24]</sup>.柚皮素是一种存在于柑橘类水果中的黄酮类化合物,已被证实具有抗病毒和抗炎作用,如减少病毒复制和细胞因子的产生<sup>[25]</sup>.研究表明,口服柚皮素可以减少小鼠模型中的急性肺损伤,并减少促炎细胞因子IL-6以及肿瘤坏死因子的产生<sup>[26]</sup>.此外,在新冠肺炎相关危险因素和SARS-CoV-2感染研究中,柚皮素被发现具有潜在抗炎作用<sup>[27]</sup>.木犀草素是一种常见的生物类黄酮,存在于各种水果和蔬菜中.据报道,木犀草素具有许多有益的药用特性,如抗肿瘤、抗炎、心脏保护和神经保护作用<sup>[28]</sup>.木犀草素已被证实对登革热病毒、EB病毒、乙型脑炎病毒、乙肝病毒和丙型肝炎病毒有抑制作用<sup>[29-30]</sup>.这些抑制作用包括激活细胞外信号调节激酶,下调肝细胞核因子4,以及抑制宿主原蛋白转换酶Furin<sup>[31]</sup>.此外,有研究显示木犀草素可以抑制小鼠的STAT3活性,以抵消IL-22/IL-6信号通路的增殖效应,可作为治疗炎症和增殖性疾病的候选药物<sup>[32]</sup>.花生四烯酸是一种生物活性脂类(BALs)化合物,研究发现花生四烯酸可以灭活包膜病毒,如丙型肝炎病毒、乙肝病毒、流感和其他冠状病毒,具有促进促炎BAL产生M1和M2巨噬细胞的能力,同时具有抑制IL-6、肿瘤坏死因子 $-\alpha$ 和其他促炎细胞因子的产生<sup>[33]</sup>.此外,花生四烯酸还具有细胞保护作用,保护正常细胞免受包括病毒在内的内源性和外源性毒素的伤害<sup>[34]</sup>.分子对接结果亦表明,槲皮素、柚皮素、花生四烯酸、木犀草素与RVI相关治疗核心靶点MAPK14、IL1 $\beta$ 、CXCL8、PPAR $\gamma$ 结合活性较强.因此,推测桑菊饮可能主要通过槲皮素、柚皮素、花生四烯酸、木犀草素等有效成分治疗RVI,缓解局部免疫反应,减少病毒复制并发挥积极抗炎作用.

免疫浸润分析中发现,记忆B细胞、初始CD4+T细胞、调节性T细胞、静息树突状细胞、静息肥大细胞、初始CD4+T细胞、活化的NK细胞、活化的肥大细胞和嗜酸性粒细胞的相对细胞含量在两组间有显著差异.然而,这些差异表达的趋化因子对外周血免疫浸润的具体影响还有待进一步研究.适应性免疫反应信号下调是呼吸道病毒感染的一个共同

特征.除了免疫细胞趋化和细胞因子活性外,MAPK14、IL1 $\beta$ 、CXCL8和PPAR $\gamma$ 也是桑菊饮治疗RVI的主要靶点.MAPK14是MAPK家族的成员,可以调节多种细胞过程,如氧化应激反应、抗炎、免疫反应、细胞凋亡和细胞增殖<sup>[35]</sup>.Joseph等<sup>[36]</sup>发现,SASR-CoV-2可通过直接激活p38MAPK通路而诱导严重炎症,因此抑制MAPK通路的表达是抗炎的途径.IL1 $\beta$ 是炎症因子中的一员,研究显示在病毒侵入人体后,IL1 $\beta$ 的表达会迅速上升,并引发炎症反应,破坏细胞环境<sup>[37]</sup>.CXCL8也称为IL-8,是CXC家族的典型成员,通常通过与细胞表面受体GPCR、CXCR1和CXCR2的相互作用负责炎症细胞的募集和激活<sup>[38]</sup>.在病毒感染中,CXCL8仅在重症患者中表达较高,且与中性粒细胞百分比呈正相关,提示CXCL8可能通过募集中性粒细胞而导致病情恶化<sup>[39]</sup>.实验表明,肺巨噬细胞中PPAR $\gamma$ 的表达在调节肺部炎症、急性宿主疾病的发展以及呼吸道感染后恢复组织内稳态方面发挥了关键作用<sup>[40]</sup>.对接结果亦显示,MAPK14、IL1 $\beta$ 、CXCL8和PPAR $\gamma$ 核心靶点蛋白与桑菊饮大部分有效成分的结合活性较好.因此,桑菊饮可能主要通过调节MAPK14、IL1 $\beta$ 、CXCL8和PPAR $\gamma$ 等核心靶点治疗RVI.

KEGG富集分析显示桑菊饮治疗RVI的核心靶点主要涉及AGE-RAGE、Toll样受体、IL-17、HIF-1等细胞因子通路以及甲型流感、EB病毒感染等多种疾病通路.众所周知,Toll样受体(TLR)属于天然免疫受体家族,在激活天然免疫、调节细胞因子表达、间接激活获得性免疫系统、识别病原体相关分子模式(PAMPs)等方面发挥重要作用<sup>[41]</sup>.TLR还通过上调树突状细胞上的主要组织相容性复合体(MHC)来激活适应性免疫系统<sup>[41]</sup>.IL-17信号通路是促炎因子信号通路,研究表明,通过抑制IL-17信号通路可以有效减缓机体炎症反应,并可能较少炎症风暴的发生<sup>[42]</sup>.HIF-1在病毒感染和促炎反应中起关键作用,RNA测序显示,COVID-19患者的HIF-1信号传导、免疫反应和代谢途径失调,HIF-1和促炎细胞因子在患者和受感染的细胞中产生<sup>[43]</sup>.根据分析结果推测桑菊饮可能是通过AGE-RAGE、Toll样受体、IL-17、HIF-1等信号通路调节细胞内炎症反应,改善免疫状态以及增强免疫反应来治疗RVI.

综上所述,桑菊饮可能是通过槲皮素、柚皮素、花生四烯酸、木犀草素等活性成分作用于MAPK14、IL1 $\beta$ 等靶点来缓解局部免疫反应,减少病毒复制,改善炎症反应等发挥作用,是多成分、多蛋白靶点、

多通路过程.同时还可以保护受损细胞、改善炎症带来的微环境变化.本研究为进一步探究桑菊饮治疗RVI的作用机制提供了思路及理论基础.但鉴于网络药理学、生物信息学和分子对接的局限性,仅从分子角度浅析了桑菊饮发挥药理作用的机制,后续还需通过临床和实验验证,使得桑菊饮在治疗RVI方面更具有临床意义.

#### 参考文献:

- [1] CHOI H S, KIM M N, SUNG H, et al. Laboratory - based surveillance of hospital - acquired respiratory virus infection in a tertiary care hospital [J]. *Am J Infect Control*, 2017, 45(5): 45 - 47.
- [2] MENDOZASM C, RUIZC J, VIVANCOJ L, et al. Respiratory virus infections in children with cancer or HIV infection [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2006, 28(3): 154 - 159.
- [3] WARK P A B, RAMSAHAI J M, PATHINAYAKE P, et al. Respiratory viruses and asthma [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2018, 39(1): 45 - 55.
- [4] PRASETYO A A, DESYARDI M N, TANAMAS J, et al. Respiratory viruses and torque teno virus in adults with acute respiratory infections [J]. *Intervirology*, 2015, 58(1): 57 - 68.
- [5] BRENDISH N J, CLARK T W. Antiviral treatment of severe non - influenza respiratory virus infection [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2017, 30(6): 573 - 578.
- [6] 王雅欣, 崔晓兰, 郭姗姗. 中药防治呼吸道病毒感染性疾病的研究进展 [J]. *中国药物警戒*, 2021, 18(6): 592 - 596.
- [7] 王泽颖. 卫气营血辨证感染性疾病应用简况 [J]. *实用中医内科杂志*, 2017, 31(5): 85 - 88.
- [8] 雍凤娇, 宋登丽, 刘菡, 等. 张晓慧运用桑菊饮加减治疗急性感染性呼吸系统疾病经验 [J]. *四川中医*, 2022, 40(8): 3 - 6.
- [9] 刘叶, 钟嘉熙. 钟嘉熙教授“三方”辨治上呼吸道感染经验摘要 [C] // 全国温病论坛暨温病临床应用高级研修班论文集. 北京: 北京中医药大学, 2012: 43 - 46.
- [10] 吴晓慧. 桑菊饮加减治疗上呼吸道感染 40 例 [J]. *陕西中医*, 2009, 30(4): 401 - 402.
- [11] JINLONG R, PENG L, JINAN W, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *Cheminformatics*, 2014, 6(1): 13.
- [12] BARRETT T, WILHITESE, LEDOUXP, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets - update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: D991 - D995.
- [13] STEEN C B, LIU C L, ALIZADEH A A, et al. Profiling cell type abundance and expression in bulk tissues with CIBERSORTx [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2117: 135 - 157.
- [14] VON M C, JENSEN L J, SNEEL B, et al. STRING: known

- and predicted protein – protein associations, integrated and transferred across organisms[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005,33:D433 – D437.
- [15] CHIN C H, CHEN S H, WU H H, et al. CytoHubba: identifying hub objects and sub – networks from complex interactome[J]. *BMC Syst Biol*, 2014,8(4):S11.
- [16] STAMBAS J, LU C, TRIPP R A. Innate and adaptive immune responses in respiratory virus infection; implications for the clinic[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2020,14(11):1141 – 1147.
- [17] TO KKW, CHAN KH, HO J, et al. Respiratory virus infection among hospitalized adult patients with or without clinically apparent respiratory infection: a prospective cohort study [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019,25(12):1539 – 1545.
- [18] BRUDER D, SRIKIATKHACHORN A, ENELOW R I. Cellular immunity and lung injury in respiratory virus infection[J]. *Viral Immunol*, 2006,19(2):147 – 155.
- [19] HUANG H S, TSAI C L, CHANG J, et al. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection; systematic review and meta – analysis[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018,24(10):1055 – 1063.
- [20] COLUNGARM L, BERRILL M, CATRAVAS J D, et al. Quercetin and vitamin c: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS – CoV – 2 related disease (COVID – 19) [J]. *Front Immunol*, 2020,11:1451.
- [21] RUSSO M, MOCCIA S, SPAGNUOLO C, et al. Roles of flavonoids against coronavirus infection[J]. *Chem Biol Interact*, 2020,328:109 – 211.
- [22] TAO Q, DU J, LI X, et al. Network pharmacology and molecular docking analysis on molecular targets and mechanisms of Huashi Baidu formula in the treatment of COVID – 19[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2020,46(8):1345 – 1353.
- [23] LOPES B R P, DA C M F, GENOVA R A, et al. Quercetin pentaacetate inhibits in vitro human respiratory syncytial virus adhesion[J]. *Virus Res*, 2020,276:197805.
- [24] HUANG Y F, BAI C, HE F, et al. Review on the potential action mechanisms of Chinese medicines in treating Coronavirus Disease 2019 (COVID – 19) [J]. *Pharmacol Res*, 2020,158:104939.
- [25] LIN H, WANG X, LIU M, et al. Exploring the treatment of COVID – 19 with Yinqiao powder based on network pharmacology[J]. *Phytother Res*, 2021,35(5):2651 – 2664.
- [26] JUNIOR A G, TOLOUEI S E L, DOS R L F, et al. Natural agents modulating ACE – 2: a review of compounds with potential against SARS – CoV – 2 infections [J]. *Curr Pharm Des*, 2021,27(13):1588 – 1596.
- [27] ALBERCA R W, TEIXEIRA F M E, BESERRA D R, et al. Perspective: the potential effects of naringenin in COVID – 19[J]. *Front Immunol*, 2020,11:570919.
- [28] THEOHARIDES T C, CHOLEVAS C, POLYZOUIDIS K, et al. Long – COVID syndrome – associated brain fog and chemofog: Luteolin to the rescue[J]. *Biofactors*, 2021,47(2):232 – 241.
- [29] RUSSO M, MOCCIA S, SPAGNUOLO C, et al. Roles of flavonoids against coronavirus infection[J]. *Chem Biol Interact*, 2020,328:109211.
- [30] THEOHARIDES T C. COVID – 19, pulmonary mast cells, cytokine storms, and beneficial actions of luteolin [J]. *Biofactors*, 2020,46(3):306 – 308.
- [31] WANG S, LING Y, YAO Y, et al. Luteolin inhibits respiratory syncytial virus replication by regulating the MiR – 155/SOCS1/STAT1 signaling pathway[J]. *Virology*, 2020,17(1):187.
- [32] GOUR A, MANHAS D, BAG S, et al. Flavonoids as potential phytotherapeutics to combat cytokine storm in SARS – CoV – 2 [J]. *Phytother Res*, 2021,35(8):4258 – 4283.
- [33] DAS U N. Can bioactive lipid arachidonic acid prevent and ameliorate COVID – 19? [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020,56(9):418.
- [34] LIU Z, FAN P, CHEN M, et al. miRNAs and leukotrienes in respiratory syncytial virus infection[J]. *Front Pediatr*, 2021,9:602195.
- [35] CHENG Y, SUN F, WANG L, et al. Virus – induced p38 MAPK activation facilitates viral infection[J]. *Theranostics*, 2020,10(26):12223 – 12240.
- [36] GRIMES J M, GRIMES K V. p38 MAPK inhibition: a promising therapeutic approach for COVID – 19[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020,144:63 – 65.
- [37] CHUA R L, LUKASSEN S, TRUMP S, et al. COVID – 19 severity correlates with airway epithelium – immune cell interactions identified by single – cell analysis [J]. *Nat Biotechnol*, 2020,38(8):970 – 979.
- [38] ZHANG R, CHEN X, ZUO W, et al. Inflammatory activation and immune cell infiltration are main biological characteristics of SARS – CoV – 2 infected myocardium[J]. *Bioengineered*, 2022,13(2):2486 – 2497.
- [39] WU Y, MA Z, ZHANG Y, et al. The role of cyclophilins in viral infection and the immune response[J]. *Infect*, 2022,85(22):365 – 373.
- [40] OLIVARRIA G, LANE T E. Evaluating the role of chemokines and chemokine receptors involved in coronavirus infection[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2022,18(1):57 – 66.
- [41] KHANMOHAMMADI S, REZAEI N. Role of toll – like receptors in the pathogenesis of COVID – 19 [J]. *J Med*

- Viol,2021,93(5):2735-2739.
- [42] HASAN M Z, ISLAM S, MATSUMOTO K, et al. SARS-CoV-2 infection initiates interleukin-17-enriched transcriptional response in different cells from multiple organs[J]. Sci Rep,2021,11(1):16814.
- [43] TIAN M, LIU W, LI X, et al. HIF-1 $\alpha$  promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19[J]. Signal Transduct Target Ther,2021,6(1):308.

## Bioinformatics study and immune analysis on the mechanism of Sangju decoction in the treatment of respiratory virus infection

QI Yu-han<sup>1</sup>, MA Xiao-bei<sup>2</sup>

(1. Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
2. Graduate School of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**Abstract:** This study aims to explore the mechanism of Sangju decoction in the treatment of respiratory tract virus infection from the molecular level by means of bioinformatics, network pharmacology, immune infiltration analysis and molecular docking. The chemical constituents and targets of Sangju decoction were obtained by TCMSDB database. The upper respiratory tract infection related chips were searched and downloaded through the GEO database, and the differential mRNA was extracted. After sorting out the matrix, the immune infiltration analysis was performed using the R language CIBERSORTX package. The key differential mRNA obtained by LIMMA package analysis is used as the disease target, and the therapeutic target is obtained after mapping with the drug target. The STRING 11.5 database was used for PPI analysis, and the R language CLUSTERPROFILER package was used for GO and KEGG enrichment analysis ( $p < 0.05$  and  $Q\text{value} < 0.2$ ). The relevant network diagram was built by using CYTOSCAPE 3.8.1 software and the core targets by CYTOHUBBA were screened; AUTODOCK VINA software was used for molecular docking verification. A total of 169 active components and 248 action targets were obtained from 8 drugs in Sangju decoction. CIBERSORTX was used to analyze 22 kinds of immune cells. PPI analysis showed that CXCL8, PPAR $\gamma$ , IL1 $\beta$  and MAPK14 were the key targets. GO analysis and enrichment of KEGG pathway suggested that the mechanism of Sangjud decoction was mainly involved in biological processes such as lipopolysaccharide response, macrophage-derived foam cell differentiation, leukocyte chemotaxis and activation of MAPK activity, as well as AGE-RAGE, Toll-like receptors, EBV infection, IL-17, HIF-1, influenza A and other signal pathways. The results of molecular docking showed that the main active components in the prescription had stable binding activity with key targets. Sangju decoction may play a role in improving cellular immune state, inflammatory reaction and anti-virus infection by acting on IL1 $\beta$ , MAPK14 and other active components such as naringin, luteolin, quercetin and arachidonic acid. It is a multi-component, multi-protein target and multi-pathway process.

**Key words:** respiratory virus infection; Sangju decoction; immune infiltration analysis; bioinformatics; network pharmacology; molecular docking

(责任编辑 王煜丹)