

· 实验研究 ·

甘露消毒丹调控 PI3K/Akt 信号通路干预
甲型流感病毒感染的作用机制黄廷轩¹ 郭姗姗² 赵荣华² 张悦³ 吕思缘³ 于会勇³ 王成祥³(1. 北京中医药大学东直门医院厦门医院呼吸与危重症医学科, 厦门 361015; 2. 中国中医科学院中药研究所
生物安全实验室, 北京 100700; 3. 北京中医药大学第三附属医院呼吸科, 北京 100029)

【摘要】目的 基于网络药理学探讨甘露消毒丹治疗甲型流感病毒感染的活性成分及作用机制, 并用动物实验加以验证。**方法** 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 获取和筛选药物有效成分, 利用 TCMSP 及 Swiss Target Prediction 数据库预测潜在作用靶点。利用比较毒物基因组学数据库 (CTD)、疾病相关基因与突变位点数据库 (DisGeNET)、GeneCards 数据库、在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM) 获得甲型流感病毒感染的疾病靶点, 将药物预测潜在作用靶点与疾病靶点取交集获得交集靶点。利用 Cytoscape3. 9. 1 构建药物-成分-靶点网络并进行拓扑属性分析, 预测中药主要活性成分。利用蛋白互作数据库 (STRING) 及 Cytoscape3. 9. 1 绘制蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络图, 获取关键作用靶点。利用 Metascape 数据库进行基因本体 (GO) 功能以及京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。将 C57BL/6J 小鼠分为空白组、模型组、中药组及对照组, 每组 5 只, 甲型流感病毒 PR8 滴鼻感染小鼠构建感染模型, 中药组予以甘露消毒丹灌胃, 对照组予磷酸奥司他韦灌胃。观察肺指数、肺组织病理变化, 实时荧光定量逆转录 PCR (RT-qPCR) 法检测肺组织磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (AKT) 基因表达, 双抗体夹心酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测肺组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 。**结果** 共筛选出甘露消毒丹 125 个化合物作为候选有效成分, 获得 286 个潜在作用靶点, 2 223 个甲型流感病毒相关疾病靶点, 61 个交集靶点。药物-成分-靶点网络得到槲皮素、山奈酚、汉黄芩素、木犀草素、黄芩素、葛花昔元、金合欢素、异鼠李素、去氢二异丁香酚、柚皮素等 10 个关键成分。PPI 网络得到 TNF、IL-6、IL-1 β 、AKT1、TP53、JUN、HIF1A、PTGS2、MMP9、ESR1 等 10 个关键靶点。GO 功能富集分析共获得条目 54 条, 其中生物过程 20 条, 细胞组分 14 条, 分子功能 20 条; KEGG 通路富集分析共获得条目共 20 条, 其中包括 AGE-RAGE 信号通路、癌症通路、松弛素信号通路、PI3K-Akt 信号通路等。与空白组比较, 模型组肺指数高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 中药组、对照组肺指数低 ($P<0.05$)。模型组小鼠肺组织间质水肿, 大量淋巴细胞、单核细胞浸润, 肺泡壁明显增宽, 肺泡融合。中药组及对照组小鼠肺组织间质水肿减轻, 淋巴细胞、单核细胞浸润减少, 肺泡壁增宽减轻, 部分肺泡融合。与空白组比较, 模型组小鼠肺组织中 PI3K、AKT mRNA 表达高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 中药组 PI3K、AKT mRNA 表达低 ($P<0.05$), 对照组 PI3K mRNA 表达低 ($P<0.05$)。与空白组比较, 模型组肺组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 中药组肺组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平低 ($P<0.05$); 对照组肺组织中 IL-6、IL-1 β 水平低 ($P<0.05$)。**结论** 甘露消毒丹可通过抑制甲型流感病毒感染小鼠炎症反应改善肺损伤, 其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路的过度激活有关。

【关键词】 网络药理学; 甲型流感病毒; 靶点; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路; 甘露消毒丹; 温病

DOI: 10. 16025/j. 1674-1307. 2024. 08. 006

流感病毒隶属于正黏病毒科, 是诱发呼吸系统急性感染的重要病原体。据世界卫生组织报道, 流感病毒感染每年会导致全球 29 万~65 万病例死亡^[1]。根据流感病毒主要表面糖蛋白、血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA), 可将其分为甲型、乙

型、丙型、丁型。其中甲型流感病毒 (IAV) 变异和传播速度最快, 易导致大流行^[2]。IAV 是重症急性肺炎的主要原因之一, 常导致急性肺损伤 (acute lung injury, ALI), 严重危及人类生命健康^[3]。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074389)**作者简介:** 黄廷轩, 男, 27 岁, 博士研究生。研究方向: 中医药防治呼吸系统感染性疾病。**通信作者:** 王成祥, E-mail: wang601@vip. sina. com**引用格式:** 黄廷轩, 郭姗姗, 赵荣华, 等. 甘露消毒丹调控 PI3K/Akt 信号通路干预甲型流感病毒感染的作用机制[J]. 北京中医药, 2024, 43(8): 871-879.

甘露消毒丹是中医温病学经典名方,为叶天士所创,由滑石、黄芩、茵陈、石菖蒲、川贝母、川木通、广藿香、连翘、豆蔻、薄荷、射干 11 味中药组成,首载于《续名医类案》,在内、外、妇、儿等各科均有运用^[4],尤其适用于急性外感热病湿热证^[5]。流感病毒感染属中医学“温病”范畴。吴鞠通云:“徒清热则湿不退,徒祛湿则热愈炽。”甘露消毒丹利湿化浊、清热解毒、轻清宣透之法,适用于流感病毒感染治疗,取得良好的临床疗效^[6]。目前对该经典名方治疗流感的实验研究较少,鉴于中药多成分、多靶点、多通路的特点,本文拟结合网络药理学技术进行关键药效物质基础和潜在作用靶点预测,用动物实验探索甘露消毒丹治疗流感病毒感染的分子机制,为该方临床运用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析方法

1.1.1 数据库:采用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://www.tcmsp-e.com/>);通用蛋白质数据库(UniProt, <https://www.uniprot.org/>);有机小分子生物活性数据库(PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>);小分子药物靶点预测在线平台(Swiss Target Prediction, <http://www.swisstargetprediction.ch/>);比较毒物基因组学数据库(CTD, <https://ctdbase.org/>);疾病相关基因与突变位点数据库(DisGeNET, <https://www.disgenet.org/>);基因综合数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>);在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>);微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>);蛋白互作数据库(STRING, <https://www.string-db.org/>);基因功能注释分析工具(Metascape, <http://metascape.org/>)。

1.1.2 甘露消毒丹有效成分和药物潜在作用靶点获取和筛选:于TCMSP数据库检索甘露消毒丹各味中药,以口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18为标准筛选中药关键活性成分及其潜在作用靶点。利用PubChem数据库获取中药关键活性成分的2D结构图,于Swiss Target Prediction数据库进行靶点预测,合并2个数据库的药物潜在作用靶点,并用UniProt数据库进行靶点标准化处理。

1.1.3 IAV感染疾病靶点获取和筛选:利用CTD

数据库、DisGeNET数据库、GeneCards数据库、OMIM数据库获取IAV感染相关疾病靶点,以“influenza A virus”“influenza A”“H1N1”为搜索关键词。DisGeNET数据库以Score≥0.1为筛选条件, GeneCards数据库以relevance score≥10为筛选条件,将上述靶点借助UniProt数据库进行标准化处理、汇总、去重以获得疾病靶点。将疾病靶点与药物潜在作用靶点取交集获得交集靶点,利用微生信平台制作Venn图。

1.1.4 药物-成分-靶点网络与蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建:将交集靶点与对应的成分及中药信息,用Cytoscape3.9.1构建药物-成分-靶点网络,并对网络进行拓扑属性分析,预测中药主要活性成分。将交集靶点输入STRING数据库,物种选择“Homo sapiens”,设置最小互作阈值设定为medium confidence (0.400),将获取的数据导入Cytoscape3.9.1,绘制PPI网络图,对PPI网络图进行拓扑分析,获取关键靶点。

1.1.5 基因本体(GO)功能和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析:利用Metascape数据库进行GO功能以及KEGG通路富集分析,设置最小富集数为3,富集因子>1.5, $P<0.01$,用微生信平台进行可视化展示。

1.2 动物实验验证

1.2.1 实验动物与病毒株:SPF级C57BL/6JNifdc雌性小鼠20只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号SCXK(京)2021-0011,体质量(14±1)g,4~5周龄。A/PR8/8/34鼠肺适应株(PR8)病毒由中国疾病预防控制中心传染病所惠赠,由MDCK细胞培养传代,血凝滴度为1:256。动物饲养于中国中医科学院中药研究所生物安全实验室(ABSL-2实验室),涉及的动物实验符合北京市实验动物伦理委员会规定,并通过中国中医科学院中药研究所伦理委员会审批。实验操作均严格按照ABSL-2级生物安全实验室的管理制度及规范化操作规程要求。

1.2.2 药物:甘露消毒丹中药配方颗粒(北京康仁堂药业有限公司),组成:滑石15g,黄芩10g,茵陈11g,石菖蒲6g,川贝母5g,川木通5g,广藿香4g,连翘4g,豆蔻4g,薄荷4g,射干4g。将上药于研钵中研磨后溶解于生理盐水,99℃温浴40min。磷酸奥司他韦胶囊(宜昌东阳光长江药业股份有限公司,国药准字H20065415)给药前溶于生理盐水。

1.2.3 试剂：异氟烷（上海玉研科学仪器有限公司，批号 S200106），4% 多聚甲醛固定液（武汉塞维尔生物科技有限公司，货号 G1101），二甲苯（国药集团化学试剂有限公司，货号 10023418），苏木精-伊红染液（武汉百仟度生物科技有限公司，货号 B1002），无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司，货号 10009218），盐酸（国药集团化学试剂有限公司，货号 10011018），氨水（国药集团化学试剂有限公司，货号 10002108），中性树胶（国药集团化学试剂有限公司，货号 10004160），异丙醇（国药集团化学试剂有限公司，货号：80109218），UltraPure™ Distilled water [赛默飞世尔科技（中国）有限公司，货号 10977-015]，TRIzol Reagent（美国 Ambion 公司，货号 15596026），First-strand cDNA Synthesis Mix（北京兰博利德商贸有限公司，货号 F0202），2x Realab Green PCR Fast mixture 通用型（北京兰博利德商贸有限公司，货号 R0202），IL-6、IL-1 β 、TNF- α ELISA 试剂盒（武汉云克隆科技股份有限公司，货号 SEA079Mu、SEA563Mu、SEA133Mu）。

1.2.4 仪器：A2 型 MSC1.2 生物安全柜（美国 Thermo 公司），Thermo-371 型 CO₂ 培养箱（美国 Thermo 公司），MSC-Advantage 1.8 型 A2 生物安全柜（美国 Thermo 公司），AR1140 型电子天平（美国 Chaus 公司），YP/0001 型电子天平（上海越平科学仪器有限公司），AL204 型电子天平（瑞士梅特勒-托利多仪器公司），BW-AM503 型小动物麻醉机（上海软隆科技发展有限公司），JJ-12J 型脱水机（武汉俊杰电子有限公司），JB-P5 型包埋机（武汉俊杰电子有限公司），RM2016 型病理切片机（上海徠卡仪器有限公司），JB-L5 型冻台（武汉俊杰电子有限公司），KD-P 型组织摊片机（浙江省金华市科迪仪器设备有限公司），DHG-9140A 型烤箱（上海慧泰仪器制造有限公司），Eclipse CI 型正置光学显微镜（日本尼康公司），DS-U3 型成像系统（日本尼康公司），Quant Studio 5 型 RealTime PCR Instrument（美国 Applied biosystems 公司），Enspire 型多功能酶标仪（德国 Perkin Elmer 公司）。

1.2.5 动物分组与造模：将 20 只小鼠按体质量等级分为 4 组，分别为空白组、模型组、中药组、对照组，每组 5 只。将小鼠置于小动物麻醉机中，用异氟烷轻度麻醉。除空白组外，其余各组予 2 倍半

数致死剂量（LD₅₀）PR8 病毒液滴鼻制备 IAV 感染小鼠模型，每只小鼠 50 μ L，共滴鼻感染 1 次；空白组小鼠给予 PBS 50 μ L 滴鼻。造模后 3 d 取材，取材前 12 h 禁食不禁水。称量小鼠体质量，置于小动物麻醉机中用异氟烷麻醉，摘眼球取血处死。将小鼠右中肺叶浸泡于 4% 多聚甲醛中固定，用于制备肺组织病理切片。其余组织装入冻存管中，于液氮中速冻，-80℃ 冰箱保存，右下肺叶用于双抗体夹心酶联免疫吸附法（ELISA）检测，心后叶用于实时荧光定量逆转录 PCR（RT-qPCR）检测。

1.2.6 给药方法：流感病毒感染 2 h 后灌胃给药。按人与小鼠体表面积折算法进行等效剂量换算，根据预实验中药组选择 2 倍等效剂量，即甘露消毒丹 21.84 g/（kg·d），0.3 mL/次，1 次/d，连续灌胃 3 d；对照组给予奥司他韦 22.75 mg/（kg·d），0.3 mL/次，1 次/d，连续灌胃 3 d；空白组和模型组予等体积生理盐水灌胃。

1.2.7 观察指标与方法：（1）肺指数计算：称取小鼠体质量与肺脏总重量，计算肺指数。肺指数=肺脏质量（g）/体质量（g） $\times$ 100%。

（2）肺组织病理变化观察：取小鼠右中肺叶于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h，依次梯度乙醇脱水，经石蜡包埋、切片（4 μ m 厚）、苏木精-伊红染色，显微镜（400 $\times$ ）下观察病理变化。

（3）肺组织中磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）、蛋白激酶 B（AKT）基因表达检测：采用 RT-qPCR 法检测肺组织中核心靶点 PI3K、AKT mRNA 表达。TRIzol 法提取各组样本的总 RNA，分光光度计检测 RNA 浓度。根据 Realab Green PCR Fast mixture 试剂说明进行反转录，合成 cDNA，-20℃ 保存备用。以 cDNA 为模板，按照 2x Realab Green PCR Fast mixture 试剂说明进行引物扩增，引物序列见表 1。反应条件：预变性 95℃ 30 s，变性 95℃ 10 s，退火、延伸 60℃ 30 s，40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

引物	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
PI3K	AATGCACGGCGATTA- CACTC	GGACACTGGGTAGAG- CAACT
AKT	CTGCCCTTCTACAAC- CAGGA	CATACACATCCTGCCA- CACG
β -actin	CACGATGGAGGGGCCG- GACTCATC	TAAAGACCTCTATGC- CAACACAGT

(4) 肺组织中细胞因子检测：按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作，各组小鼠肺组织匀浆后检测白介素 (IL) 6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 (TNF) α 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析，GraphPad Prism7.0 软件对结果进行可视化。符合正态分布及方差齐性的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，多重比较用 *LSD* 法；若不符合正态分布及方差齐性的计量资料比较采用 *Kruskal-Wallis* 秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析结果

2.1.1 甘露消毒丹有效成分和药物靶点预测结果：于 TCMSP 数据库检索及筛选后共得出 125 个化合物，其中黄芩 36 个、茵陈 13 个、石菖蒲 4 个、川贝母 13 个、川木通 8 个、广藿香 11 个、连翘 23 个、豆蔻 12 个、薄荷 10 个、射干 17 个。利用 TCMSP 数据库及 SwissTarget Prediction 数据库预测潜在作用靶点，汇总并去重后共得到 286 个药物靶点。

2.1.2 IAV 感染相关疾病靶点：经检索并筛选 CTD 数据库、DisGeNET 数据库、GeneCards 数据库、OMIM 数据库中 IAV 感染相关靶点，并利用 UniProt 数据库标准化处理，汇总并去重后共得到 2 223 个疾病靶点。利用微生信平台将药物潜在作用靶点与疾病靶点取交集，共得到 61 个交集靶点。见图 1。

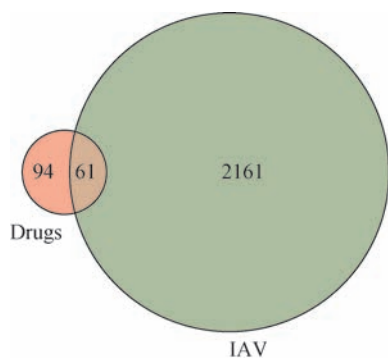
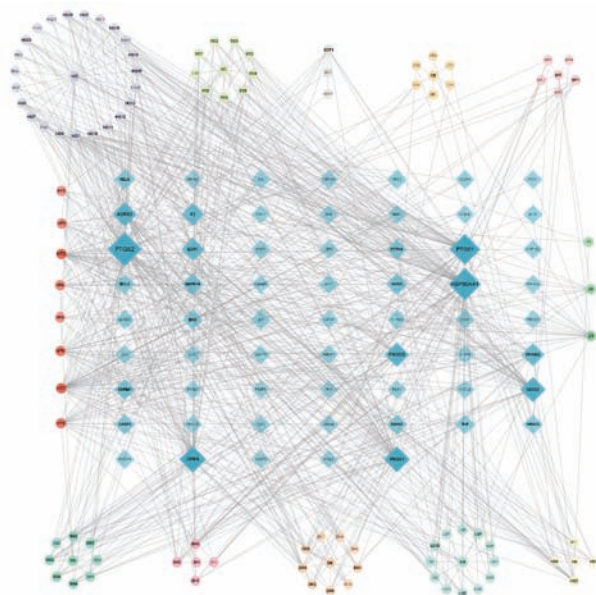


图1 甘露消毒丹治疗 IAV 感染靶点 Venn 图

2.1.3 药物-成分-靶点网络：利用 Cytoscape3.9.1 构建药物-成分-靶点网络，该网络由 806 条边、155 个节点构成。见图 2。利用 Analyze Network 分析功能得到各节点度值

(Degree)。中药成分 Degree 前十位分别为槲皮素、山奈酚、汉黄芩素、木犀草素、黄芩素、葛花苷元、金合欢素、异鼠李素、去氢二异丁香酚、柚皮素，提示这 10 个成分可能为甘露消毒丹干预 IAV 感染的关键成分。见表 2。



图中圆形框代表药物及其成分，蓝色菱形框代表靶点，框的大小、颜色深浅反映其度值大小。HQ: 黄芩; YC: 茵陈; SCP: 石菖蒲; CB: 川贝母; MT: 川木通; HX: 广藿香; LQ: 连翘; DK: 豆蔻; BH: 薄荷; SG: 射干

图2 药物-成分-靶点网络图

表2 甘露消毒丹有效成分 Degree

编号	化合物名	Degree	包含本化合物的中药
HT7	Quercetin(槲皮素)	48	茵陈、连翘、藿香、豆蔻
HT3	Kaempferol(山奈酚)	36	石菖蒲、连翘
HT6	Wogonin(汉黄芩素)	28	连翘、黄芩
HT8	Luteolin(木犀草素)	27	射干、连翘、豆蔻、薄荷
HQ1	Baicalin(黄芩素)	20	黄芩
HX2	Irisolidone(葛花苷元)	18	藿香
HT2	Acacetin(金合欢素)	17	黄芩、薄荷
HT4	Isorhamnetin(异鼠李素)	17	茵陈、射干
DK8	Dehydrodiisoeugenol(去氢二异丁香酚)	14	豆蔻
BH2	Naringenin(柚皮素)	14	薄荷

2.1.4 交集靶点 PPI 网络：利用 STRING 数据库对 61 个交集靶点构建 PPI 网络，导入 Cytoscape3.9.1 绘制并计算 Degree 和介数中心性 (Betweenness Centrality)。选取 Degree 前 10 位作为关键靶点，分别为 TNF、IL-6、IL-1 β 、AKT1、TP53、JUN、HIF1A、PTGS2、MMP9、ESR1。见表 3。

表 3 PPI网络关键靶点

序号	靶点	Degree	介数中心性	序号	靶点	Degree	介数中心性
1	TNF	51	0.049 832 787	6	JUN	44	0.019 029 353
2	IL-6	50	0.043 685 805	7	HIF1A	43	0.021 152 698
3	IL-1β	49	0.045 098	8	PTGS2	43	0.015 441 094
4	AKT1	48	0.054 651 876	9	MMP9	42	0.033 476 303
5	TP53	47	0.028 490 779	10	ESR1	42	0.022 741 83

2.1.5 GO 功能富集分析结果：利用 Metascape 数据库对 61 个交集靶点进行 GO 功能富集分析，共获得具有统计学意义的条目 54 条，其中生物过程 (biological process, BP) 20 条、细胞组分 (cellular component, CC) 14 条、分子功能 (molecular function, MF) 20 条，将 *P* 值排名前 10 位的条目绘制成气泡图。见图 3。BP 主要包括对无机物的反应、对细菌来源分子的反应、炎症反应、程序性细胞死亡的正调控、细胞凋亡信号通路的负调控、细胞迁移的正调控、miRNA 转录的调控、

磷代谢过程的正向调控、细胞对有机氮化合物的反应、对外源性刺激的反应等；CC 主要包括分泌颗粒腔、膜筏、富含 Ficolin-1 的颗粒管腔、血液微粒、转录调节因子复合物、Bcl-2 家族蛋白复合物、内吞囊泡、谷氨酸能突触、膜侧、质膜蛋白复合物等；MF 主要包括蛋白质同源二聚化活性、磷酸酶结合、细胞因子受体结合、血红素结合、一般转录起始因子结合、蛋白激酶结合、蛋白酶结合、BH3 结构域绑定、一氧化氮合酶调节剂活性、肿瘤坏死因子受体超家族结合等。

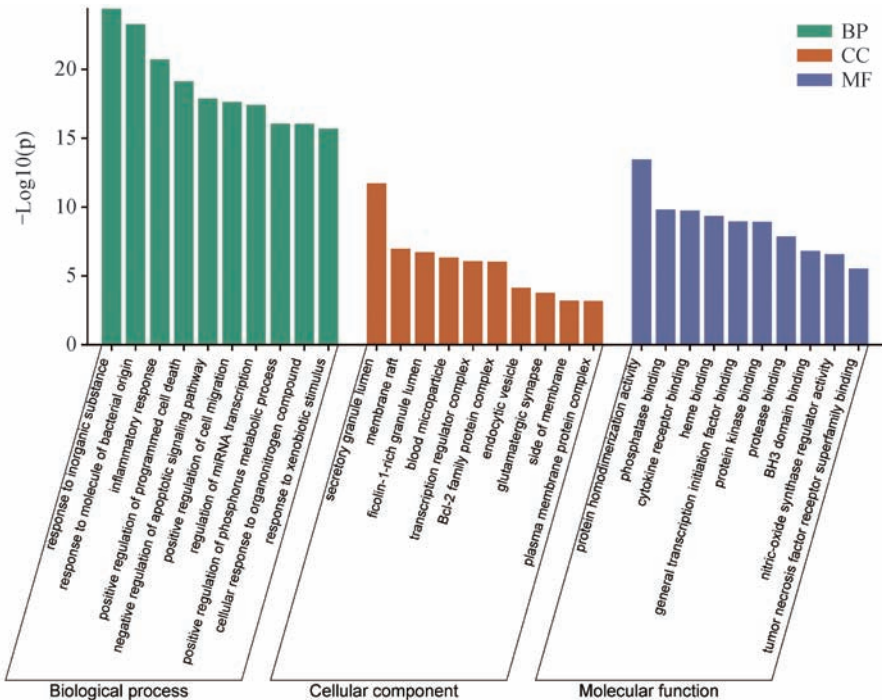


图 3 GO 功能富集分析结果

2.1.6 KEGG 功能富集分析结果：利用 Metascape 数据库对 61 个交集靶点进行 KEGG 通路富集分析，共获得具有统计学意义的条目 20 条，将其绘制成气泡图。见图 4。主要包括糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、癌症通路、松弛素信号通路、PI3K-Akt 信号通路、化学致癌作用-活性氧、癌症中的蛋白聚糖、化学致癌作用-受体激活、利什曼病、结直肠癌、癌症的 MicroRNAs 等。

2.2 动物实验验证结果

2.2.1 各组肺指数比较：与空白组比较，模型组肺指数高 ($P<0.05$)；与模型组比较，中药组、对照组肺指数低 ($P<0.05$)。见图 5。

2.2.2 各组肺组织病理变化比较：HE 染色显示，空白组小鼠肺组织结构正常。模型组小鼠肺组织间质水肿，大量淋巴细胞、单核细胞浸润，肺泡壁明显增宽，肺泡融合。中药组及对照组小鼠肺

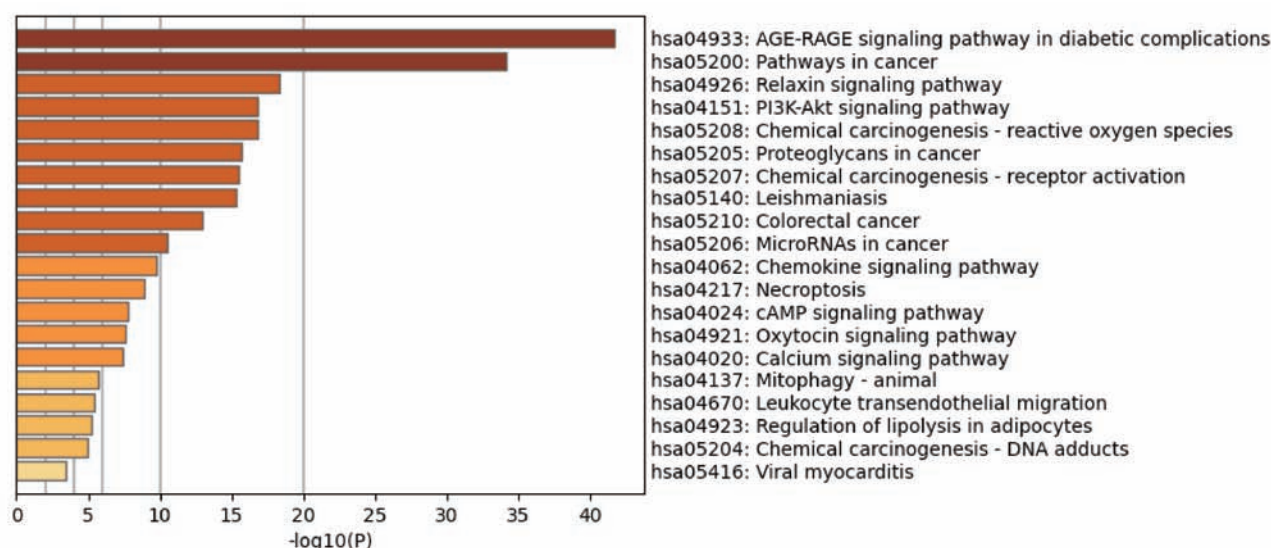


图4 KEGG通路富集分析结果

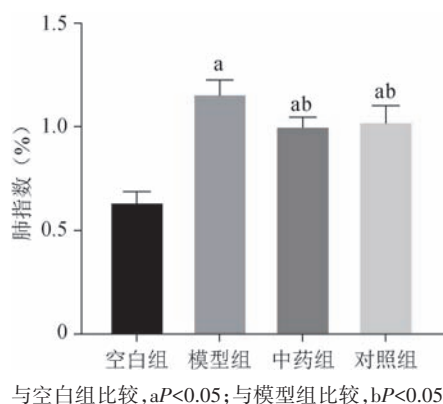


图5 各组肺指数比较

组织间质水肿减轻, 淋巴细胞、单核细胞浸润减少, 肺泡壁增宽减轻, 部分肺泡融合。见图6。

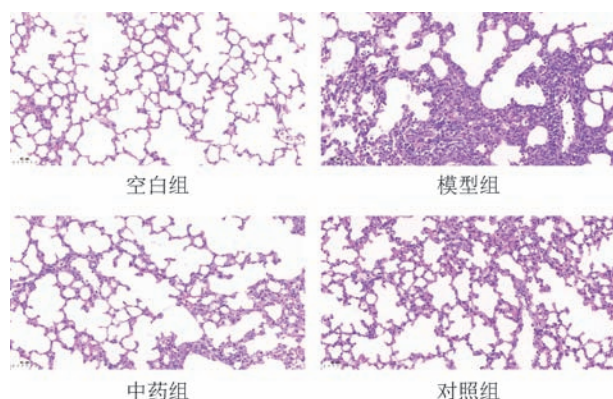


图6 各组肺组织病理变化比较(HE染色, 400×)

2.2.3 各组肺组织中PI3K、AKT mRNA表达比较: 与空白组比较, 模型组小鼠肺组织中PI3K、AKT mRNA表达高 (P <0.05)。与模型组比较, 中

药组PI3K、AKT mRNA低 (P <0.05), 对照组PI3K mRNA表达低 (P <0.05)。见图7。

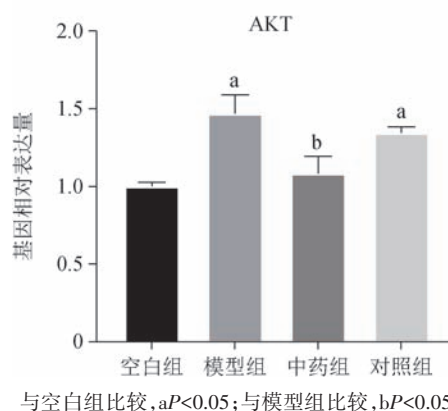
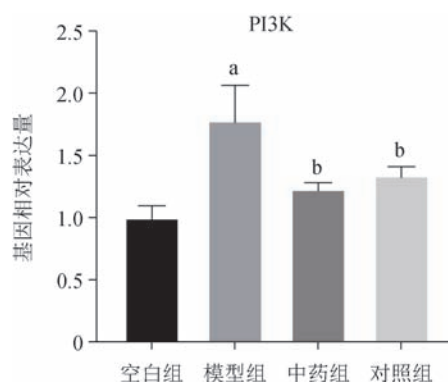
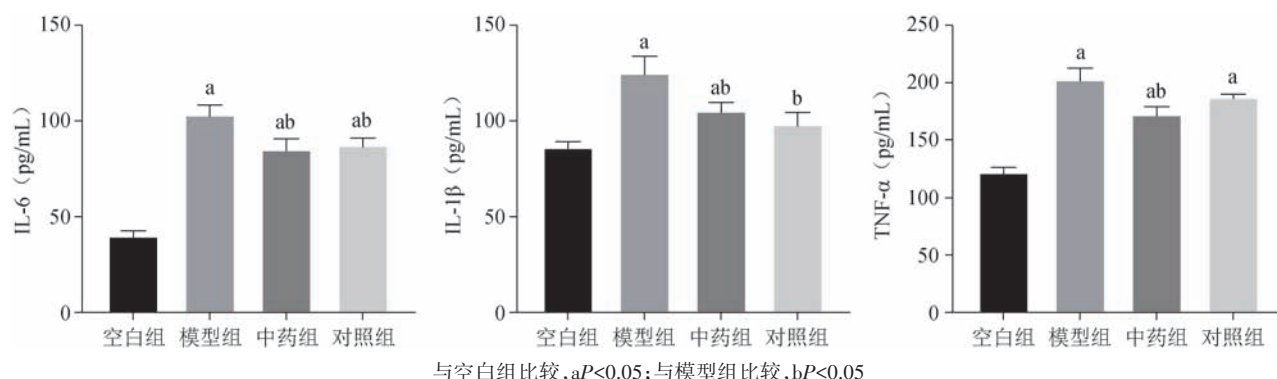


图7 各组肺组织基因相对表达量比较

2.2.4 各组肺组织中细胞因子水平比较: 与空白组比较, 模型组肺组织中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平高 (P <0.05)。与模型组比较, 中药组肺组织中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平低 (P <0.05); 对照组肺组织中IL-6、IL-1 β 水平低 (P <0.05)。见图8。



与空白组比较, $aP<0.05$; 与模型组比较, $bP<0.05$

图8 各组肺组织细胞因子水平比较

3 讨论

本研究通过构建药物-成分-靶点网络发现槲皮素、山奈酚、汉黄芩素、木犀草素、黄芩素可能是甘露消毒丹干预流感病毒感染的关键药效物质基础。据报道, 槲皮素对呼吸道合胞病毒、IAV、新型冠状病毒等多种病原体均表现出良好的抗病毒作用^[7], 槲皮素可减轻流感病毒诱导的氧化应激和细胞自噬以减轻病毒对机体的损伤^[8]。山奈酚具有抗氧化、损伤保护及免疫调节作用^[9], 可以抑制病毒基因的转录及病毒蛋白的合成而具有成为新型抗病毒剂的前景^[10]。汉黄芩素可通过抑制TNF- α 、IL-1等炎症细胞因子的产生发挥抗炎作用^[11]。木犀草素具有抗炎、抗感染作用^[12], 在感染早期可干扰IAV复制^[13]。黄芩素可干扰甲型H5N1流感病毒NP蛋白的产生而发挥直接抗病毒作用^[14], 还可抑制多种炎症因子的分泌而发挥抗炎作用^[15]。槲皮素、山奈酚、汉黄芩素、木犀草素、黄芩素均为黄酮类物质, 研究显示多种黄酮类化合物具有神经氨酸酶抑制活性^[16], 黄酮类化合物作为抗病毒药物具有广阔的开发前景。

分析PPI网络发现, TNF、IL-6、IL-1 β 、AKT1、TP53可能是甘露消毒丹干预流感病毒感染的关键靶点, GO及KEGG功能富集分析亦发现甘露消毒丹可能通过PI3K/Akt信号通路干预IAV感染。其中, AKT1是AKT家族重要成员之一^[17], TNF、IL-6、IL-1 β 为PI3K/Akt信号通路下游重要细胞因子, 故本研究选择PI3K/Akt信号通路进行进一步研究。

动物实验结果表明, PR8病毒感染3 d后, 模型组肺指数较空白组明显上升, 病理检查显示模型组小鼠肺组织可见间质水肿、炎症细胞浸润等明显炎症反应, 表明流感病毒滴鼻感染小鼠模型造模成功。甘露消毒丹可降低小鼠肺指数, 且使

肺组织免疫细胞浸润及水肿减轻, 表明甘露消毒丹可明显减轻小鼠病毒性肺炎病变程度。RT-qPCR检测结果显示甘露消毒丹可降低PI3K、AKT mRNA表达, 提示甘露消毒丹可能通过下调PI3K/Akt信号通路的过度激活发挥炎症调节作用。PI3K/Akt信号通路的主要功能为维持细胞稳态并保证细胞生长^[18], 是调控细胞增殖、凋亡、炎症反应等过程的重要信号通路。该信号通路由PI3K和AKT两个关键分子构成, AKT是PI3K下游的关键信号通路分子^[19]。既往研究表明, IAV感染可激活PI3K/Akt信号通路^[20], PI3K和AKT依次磷酸化后调节下游mTOR、GSK-3 β 、eNOS、NF- κ B等多种信号分子, 实现对细胞增殖、自噬、凋亡、炎症反应的调控^[21]。ELISA结果显示, 模型组小鼠TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等细胞因子水平明显上升, 甘露消毒丹可以抑制上述炎症因子的过度释放。PI3K/Akt信号通路激活后可通过eNOS、NF- κ B等多种途径上调TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等炎症细胞因子的释放。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6是常见的促炎因子, 与炎症强度及机体损伤程度密切相关, 与临床流感症状严重程度正相关^[22], 在病毒性肺炎的发生发展中具有重要意义^[23]。IL-6和TNF- α 可增加白细胞在血管内皮细胞上的黏附, 促进白细胞的炎性渗出^[24], 还可激活细胞因子网络, 导致微血管损伤和急性肺损伤^[25], 从而增加脓毒症的发生风险^[26]。在流感病毒感染过程中, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等炎症因子的大量释放可以诱导炎症反应级联放大, 产生细胞因子风暴, 造成严重的肺损伤^[27]。甘露消毒丹可通过抑制促炎因子的过度表达发挥抗炎作用, 从而减轻炎症损伤。

综上所述, 本研究利用网络药理学技术预测了甘露消毒丹干预IAV感染的可能机制, 并佐以实

验证实。网络药理学结果表明槲皮素、山奈酚、汉黄芩素、木犀草素、黄芩素可能为甘露消毒丹干预流感病毒感染的关键有效活性成分，能作用于 TNF、IL-6、IL-1 β 、AKT1、TP53 等核心靶点，可能对癌症通路、松弛素信号通路、PI3K/Akt 信号通路等信号通路具有干预作用。动物实验结果表明甘露消毒丹可以降低 IAV 感染小鼠的肺指数，减轻肺组织病理损伤，抑制 PI3K 及 AKT 的转录，并下调 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎因子水平，提示该方治疗 IAV 感染的分子机制之一可能是抑制 PI3K/Akt 信号通路的过度激活，发挥炎症调节作用。

参考文献

- [1] 朱爱琴,郑亚明,秦颖,等.中国流感经济负担研究系统综述[J].中华预防医学杂志,2019,53(10):1043-1048.
- [2] 李金桐,晏军,任志鸿,等.甲型流感病毒 H1N1 感染致小鼠肠道损伤机制的研究[J].疾病监测,2023,38(9):1108-1115.
- [3] ZHU M, MA X, HUANG J, et al. Extracellular vesicle-derived miR-1249-5p regulates influenza A virus-induced acute lung injury in RAW246.7 cells through targeting SLC4A1[J]. Microbes Infect, 2022, 24 (8): 104998.
- [4] 魏宇博,刘光华.甘露消毒丹在传染病领域基础与临床研究进展[J].实用中医内科杂志,2023,37(8):6-9.
- [5] 艾碧琛,贺又舜.甘露消毒丹抗病毒作用的临床与实验研究现状[J].中华中医药学刊,2013,31(8):1664-1667.
- [6] 姚卫海,周爱国,曲剑华,等.甘露消毒丹加减治疗流感高热的临床分析[J].医学研究通讯,2003,32(5):64-65.
- [7] 史俊薇,朱城璧,孙亚磊,等.槲皮素抗呼吸道病毒机制研究进展[J].中医儿科杂志,2023,19(2):96-100.
- [8] NILE SH, KIM DH, NILE A, et al. Probing the effect of quercetin 3-glucoside from *Dianthus superbus* L against influenza virus infection-In vitro and in silico biochemical and toxicological screening[J]. Food Chem Toxicol, 2020,135:110985.
- [9] 雷晓青,陈鳌,刘毅,等.山奈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.
- [10] HAO K, WANG Y, XU JH, et al. Kaempferol is a novel antiviral agent against channel catfish virus infection through blocking viral attachment and penetration in vitro [J]. Front Vet Sci, 2023,10:1323646.
- [11] 玛热古丽·苏甫尔,阿吉古丽·苏甫尔.汉黄芩素对流感病毒感染肺泡巨噬细胞炎症相关因子的影响分析[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(11):23,21.
- [12] WU B, SONG H, FAN M, et al. Luteolin attenuates sepsis-induced myocardial injury by enhancing autophagy in mice[J]. Int J Mol Med, 2020,45(5):1477-1487.
- [13] YAN H, MA L, WANG H, et al. Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex expression[J]. Nat Med, 2019,73(3):487-496.
- [14] SITHISARN P, MICHAELIS M, SCHUBERT-ZSILAVECZ M, et al. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells [J]. Antiviral Res, 2013,97(1):41-48.
- [15] 冯金连,梁本娟,夏红,等.黄芩素防治感染性肺炎的作用机制研究进展[J].现代药物与临床,2023,38(8):2100-2104.
- [16] 王海娣,杜冠华,刘艾林.天然黄酮类化合物的神经氨酸酶抑制活性评价[J].中国新药杂志,2009,18(15):1435-1439.
- [17] 刘菲菲,钟艳,陈丽萍,等.中药调控 PI3K/Akt 信号通路改善认知障碍的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(7):281-289.
- [18] 方正远,岳冬辉.PI3K/AKT 信号通路与流感病毒感染相关性研究[J].吉林中医药,2022,42(3):370-372.
- [19] FRANKE TF, YANG SI, CHAN TO, et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase[J]. Cell, 1995,81(5):727-736.
- [20] 尹香琳,张婧瑶,刘卫东,等.1-磷酸鞘氨醇受体 2 介导 PI3K/AKT/eNOS 通路抑制甲型流感病毒诱导的病毒性肺炎[J].中国病理生理杂志,2018,34(11):2062-2067.
- [21] OLIVEIRA JSS, SANTOS GDS, MORAES JA, et al. Reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase and PI3K/Akt pathways contribute to invasion of *Streptococcus agalactiae* in human endothelial cells[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2018,113(6):e140421.
- [22] 邓玉荣,孙建辉,郝莉雨,等.百蕊颗粒抗小鼠流感病毒性肺炎作用及机制研究[J].中国药物警戒,2023,20(11):1249-1255.
- [23] 任韩雯婧,张川,乐涛,等.ICU 重症肺部感染患者血清 IL-6、IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 水平变化及其与预后的关系[J].热带医学杂志,2022,22(10):1371-1375,1390,1461.
- [24] GAO R, BHATNAGAR J, BLAU DM, et al. Cytokine and chemokine profiles in lung tissues from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1): role of the host immune response in pathogenesis[J]. Am J Pathol, 2013, 183(4):1258-1268.
- [25] ZHANG XX, WU QF, YAN YL, et al. Inhibitory effects and related molecular mechanisms of total flavonoids in *Mosla chinensis* Maxim against H1N1 influenza virus[J]. Inflamm Res, 2018,67(2):179-189.

[26] TEUFFEL O, ETHIER MC, BEYENE J, et al. Association between tumor necrosis factor- α promoter -308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and sepsis mortality: a systematic review and meta-analysis[J]. Crit

Care Med, 2010,38(1):276-282.

[27] GU Y, ZUO X, ZHANG S, OUYANG Z, et al. The Mechanism behind Influenza Virus Cytokine Storm[J]. Viruses, 2021,13(7):1362.

Mechanism of Ganlu Xiaodu Dan's intervention in influenza A virus infection by regulating PI3K/Akt signaling pathway

HUANG Tingxuan¹, GUO Shanshan², ZHAO Ronghua², ZHANG Yue³, LYU Siyuan¹, YU Huiyong³, WANG Chengxiang³

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Dongzhimen Hospital Xiamen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Xiamen 361015, China; 2. Biosecurity Laboratory, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; 3. Respiratory Department, the Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

ABSTRACT Objective To investigate the active ingredients and mechanism of Ganlu Xiaodu Dan in the treatment of influenza A virus infection based on network pharmacology, and to verify it by animal experiments. **Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) database were used to obtain and screen the active ingredients, and TCMSP and Swiss Target Prediction database were used to predict the potential targets. Comparative Toxicogenomics Database (CTD), Disease Gene Network (DisGeNET) database, GeneCards database and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database were used to obtain the disease targets of influenza A virus infection, and the potential targets of drug prediction were intersected with the disease targets to obtain the intersection targets. The drug-ingredient-target network was constructed by using Cytoscape3.9.1 and topological attribute analysis was performed to predict the main active ingredients of traditional Chinese medicine. Protein-protein interaction (PPI) network was mapped using Search Tool for the Retrieval of Interaction Gene/Proteins (STRING) database and Cytoscape3.9.1 to obtain key targets. Gene Ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) path enrichment were analyzed using Metascape database. C57BL/6J mice were divided into blank group, model group, traditional Chinese medicine group and oseltamivir group, with 5 mice in each group. Mice infected with influenza A virus PR8 nasal drops were constructed to establish the infection model. The traditional Chinese medicine group was given Ganlu Xiaodu Dan with gavage administration and the control group was given oseltamivir phosphate with gavage administration. V bThe lung index and lung tissue pathology were observed. The expression levels of Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Protein kinase B (AKT) gene were detected by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), and the expression levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** A total of 125 compounds were selected as candidate effective ingredients, and 286 potential targets, 2223 disease targets associated with influenza A virus and 61 intersection targets were obtained. Ten key components, including quercetin, kaonaphthol, baicalein, luteolin, baicalein, puerarin, acacia, isorhamnetin, dehydrodiisoeugenol and naringenin, were obtained by drug-ingredient-target network. The PPI network obtained 10 key targets including TNF, IL-6, IL-1 β , AKT1, TP53, JUN, HIF1A, PTGS2, MMP9 and ESR1. A total of 54 items were obtained by GO functional enrichment analysis, including 20 biological processes, 14 cell components, and 20 molecular functions. A total of 20 items were obtained by KEGG pathway enrichment analysis, including AGE-RAGE signaling pathway, cancer signaling pathway, relaxin signaling pathway, and PI3K-Akt signaling pathway. Compared with the blank group, the lung index in the model group was higher ($P<0.05$). Compared with the model group, the lung index of the Chinese medicine group and the control group was lower ($P<0.05$). In the model group, interstitial edema of lung tissue, infiltration of a large number of lymphocytes and monocytes, obvious widening of alveolar wall and alveolar fusion were observed. The interstitial edema of lung tissue, the infiltration of lymphocytes and monocytes, the widening of alveolar wall and partial alveolar fusion were reduced in the Chinese medicine group and the control group. Compared with the blank group, the expression of PI3K and AKT mRNA in the lung tissue of the model group was higher ($P<0.05$). Compared with model group, PI3K mRNA and AKT mRNA expression were lower in TCM group ($P<0.05$), and PI3K mRNA expression was lower in control group ($P<0.05$). Compared with blank group, the levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in lung tissue of model group were higher ($P<0.05$). Compared with model group, the levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in lung tissue of TCM group were lower ($P<0.05$), while the levels of IL-6 and IL-1 β in lung tissue of control group were lower ($P<0.05$). **Conclusion** Ganlu Xiaodu Dan can improve lung injury by inhibiting inflammatory response in mice infected with influenza A virus, and the mechanism may be related to inhibiting the over-activation of PI3K/Akt signaling pathway.

Keywords Network pharmacology; influenza A virus; target point; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway; Ganlu Xiaodu Dan; febrile disease