

基于网络药理学和分子对接探讨甘露消毒丹治疗肺炎支原体肺炎的机制

王晓¹, 贺红安¹, 张葆青^{2*} (1.山东中医药大学, 济南 250355; 2.山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

摘要: 目的 通过网络药理学和分子对接的研究方法预测甘露消毒丹治疗肺炎支原体肺炎(mycoplasmal pneumoniae pneumonia, MPP)的分子作用机制。方法 通过 TCMSP 和 BATMAN-TCM 筛选甘露消毒丹中的药物活性成分和靶点, 并与通过 GeneCards 和 CTD 数据库获得 MPP 的疾病靶点做交集获得关键靶点, 运用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建蛋白互作网络; 利用 R 软件对有效靶点进行 GO 分析及 KEGG 相关通路的富集分析; 通过 Mestro 对成分靶点进行分子对接验证。结果 筛选出甘露消毒丹有效活性成分 142 个, 获得 143 个甘露消毒丹治疗 MPP 潜在作用靶点。其中 10 个核心靶点, 20 条显著富集信号通路。分子对接结果发现槲皮素、 β -谷固醇、木犀草素等 10 个化学成分与核心靶点及肺炎支原体产生的社区获得性呼吸窘迫综合征毒素和细胞受体膜联蛋白 A2 的亲合力较高。结论 本研究初步揭示了甘露消毒丹治疗 MPP 的潜在靶点、涉及的生物过程及信号通路, 提示其具有多成分、多靶点、多通路的特点, 为进一步研究奠定了基础。

关键词: 甘露消毒丹; 肺炎支原体肺炎; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)03-0343-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.03.010

引用本文: 王晓, 贺红安, 张葆青. 基于网络药理学和分子对接探讨甘露消毒丹治疗肺炎支原体肺炎的机制[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 343-351.

Mechanisms of Ganlu Xiaodu Elixir on the Treatment of Mycoplasma Pneumoniae Pneumonia Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

WANG Xiao¹, HE Hong'an¹, ZHANG Baoqing^{2*} (1.Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2.Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To predict the molecular mechanism of Ganlu Xiaodu elixir in the treatment of mycoplasma pneumoniae pneumonia(MPP) by the method of network pharmacology and molecular docking. **METHODS** The active ingredients and targets of Ganlu Xiaodu elixir were screened by TCMSP and Batmann-TCM and the key targets were obtained by intersection with the disease targets of MPP obtained through GeneCards database and CTD. The protein interaction network was constructed by using STRING and Cytoscape. R software was used for GO analysis and enrichment analysis of KEGG related pathways. The molecular docking verification of the component targets was carried out by Mestro. **RESULTS** One hundred and forty two active ingredients of Ganlu Xiaodu elixir were screened out, and 143 potential therapeutic targets were obtained. Among them, there were 10 core targets and 20 significantly enriched signaling pathways. Molecular docking results showed that quercetin, β -sitosterol, luteolin and other 10 compounds had high affinity with the core target, community acquired respiratory distress syndrome toxin produced by mycoplasma pneumoniae and cellular receptor Annexin A2. **CONCLUSION** This study preliminarily revealed the potential targets, biological processes and signal pathways involved in the treatment of MPP by Ganlu Xiaodu elixir, suggesting that it has the characteristics of multiple components, multiple targets and multiple pathways, laying a foundation for further research.

KEYWORDS: Ganlu Xiaodu elixir; mycoplasma pneumoniae pneumonia; network pharmacology; molecular mechanism

肺炎支原体肺炎(mycoplasma pneumoniae pneumonia, MPP)是由肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, MP)引起的急性呼吸道感染性疾病, 是学龄儿童及青年常见的一种肺炎, 临床以咳嗽、

发热、头痛、咽喉疼痛和肌肉酸痛等为主要表现, MP 导致的儿童社区获得性肺炎约占肺炎总发病率的 10%~40%, 且重症肺炎及难治性肺炎比例增加, 为临床治疗带来难题^[1]。

基金项目: 中医药循证能力建设项目(2019XZZX-EK004); 中西医结合专病防治项目(鲁财社指[2019]74 号); 山东省中医药科技项目(2020M014)

作者简介: 王晓, 女, 硕士, 主治医师
baoqing09009@126.com

E-mail: erkexw20@126.com

*通信作者: 张葆青, 女, 博士, 主任医师

E-mail:

MPP 归属于祖国医学“肺炎喘嗽”范畴。有学者^[2-3]发现湿热内蕴证是临床上小儿肺炎喘嗽的一个重要证型,MP 感染与湿热之邪关系密切。临床中部分 MPP 患儿反复发作,缠绵难愈,并伴有食欲不振、腹胀、便溏、舌苔白腻或黄厚腻等湿热证候。吴鞠通曰“湿邪之为病,上焦与肺合”。肺主宣发肃降,通调水道,湿邪困肺,气化不利,则咳嗽、咳痰;清浊相干湿滞大肠则排泄物黏腻不爽。治疗上,以清热祛湿、宣肺通络为治疗原则,用甘露消毒丹为底方加减,临床收效明显^[4-5]。甘露消毒丹是清·叶天士所创之方,由藿香、茵陈、连翘、黄芩、射干、川贝、白蔻仁、石菖蒲、薄荷、木通、滑石 11 味药组成。临床研究发现甘露消毒丹对多种传染性疾病有良好的治疗作用,但作用机制尚不明确。因此,本研究通过网络药理学和分子对接技术,综合分析药物-疾病-基因-靶点之间的关系,以期揭示甘露消毒丹治疗 MPP 的作用机制,为临床进一步运用提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 筛选中药复方有效成分及靶点

甘露消毒丹中 11 味药物[藿香、茵陈、连翘、黄芩、射干、浙贝(根据临床儿童实际用药情况将原方“川贝”改为“浙贝”)、白蔻仁、石菖蒲、薄荷、木通、滑石]的有效活性成分主要在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, <http://www.tcmispw.com/tcmispsearch.php>)和 BATMAN-TCM 数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)中进行筛选。筛选条件:TCMSP 数据库参照药动学吸收、分布、代谢和排泄(absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME)原则,设定药物口服生物利用度(oral bioavailability, OB $\geq$ 30%)和类药性指数(drug like, DL $\geq$ 0.18);BATMAN-TCM 数据库中设定 Score $\geq$ 20,获得相应的蛋白质靶点。利用 Uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>)将获得的靶点蛋白名称进行标准化处理。

1.2 筛选疾病靶点

通过 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和毒性与基因比较数据库(comparative toxicogenomics database, CTD)(<http://ctdbase.org/>)、以“mycoplasma pneumoniae pneumonia in children”“mycoplasma pneumoniae pneumonia”为关键词进行检索,获得 MPP 相关基因,将 2 个数据库得到

的靶点基因合并去重后即为甘露消毒丹的靶点。

1.3 分析构建蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络

通过分析工具 Venny 2.1.0 将药物与疾病靶点对比分析,获得甘露消毒丹治疗 MPP 的潜在作用靶点;将上述靶点通过 STRING 11.0 数据库,获得相应的 PPI 网络图;将 TSV 格式的互作关系文件导入 Cytoscape 3.7.2 软件,分析筛选核心靶点,并构建相关网络图。

1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

利用 R 软件(V4.0.2)的 ClusterProfiler 包,对甘露消毒丹治疗 MPP 的潜在作用靶点进行生物学过程、信号通路分析,获得 GO 富集分析结果($P<0.01$)、KEGG 信号通路富集分析结果($P<0.01$)。

1.5 甘露消毒丹治疗 MPP 药物成分与靶基因分子对接

利用 Cytoscape 插件 Cytohubba 筛选出排名前 10 的活性成分,在 PubChem 数据库下载其 2D 结构,通过 Chem3D 19.0 软件界面进行化合物能量最小化处理,力场选择 MM2,完成能量最小化处理后保存为 MOL2 格式备用。在 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)下载需要对接的靶点蛋白,筛选原则如下:①人源蛋白;②年代近,分辨率高;③具有原始配体且与要对接的活性成分结构相似。另外,下载 MPP 感染相关的社区获得性呼吸窘迫综合征毒素(communitary-acquired respiratory distress syndrome toxin, CARDS TX, PDB ID: 4TLV)和细胞受体膜联蛋白 A2(annexin II, ANXA2, PDB ID: 2HYV)的蛋白结构。应用 Mestrov(v11.5)进行半柔性分子对接,具体方法如下:Protein preparation wizard 模块进行蛋白准备,加氢,加电荷,删掉水分子;核心靶点蛋白受体格点创建以及活性口袋坐标的确定,以晶体结构中原配体为中心生成格点文件,盒子大小设为 1 nm(10 Å),其他参数选择系统默认值;MP 感染相关蛋白 CARDS TX 和 ANXA2 无原配体,应用 Binding site detect 模块寻找可能的结合位点。采用 LigPrep 模块进行配体处理,选择 Epik 方法产生 pH(7.0 $\pm$ 2.0)所有的构象,其他的选择系统默认值;Ligand Docking 模块进行配体对接,Receptor grid 模块上选中已经创建好的受体蛋白格点,File name 模块上选中已经创建好的配体^[6];选取结合能最低的化合物,分析其关键残基和作用力,做出对接示意图。

2 结果

2.1 甘露消毒丹有效成分及靶点筛选

通过前述筛选条件检索 TCMSP 和 BATMAN-TCM 数据库, 共获得甘露消毒丹有效活性成分 142 个。方中诸药有效活性成分和预测靶点数目见表 1。

表 1 甘露消毒丹“有效活性成分-潜在靶点”基本信息
Tab. 1 Basic information of “active ingredient-potential target” of Ganlu Xiaodu elixir

药物名称	有效活性成分数	潜在靶点预测数
黄芩	36	112
连翘	23	65
射干	17	65
茵陈	13	113
豆蔻	12	109
藿香	11	98
薄荷	10	66
木通	8	74
浙贝	7	56
石菖蒲	4	67
滑石	1	2

2.2 甘露消毒丹治疗 MPP 的潜在作用靶点

将甘露消毒丹有效活性成分对应的 143 个潜在药物靶点与 MPP 对应的 370 个疾病靶点进行映射后获得 43 个共有靶点, 即为甘露消毒丹作用

于 MPP 发挥治疗作用的潜在靶点, 见图 1。形成药物、有效药物成分与疾病靶点网络关系图, 见图 2。

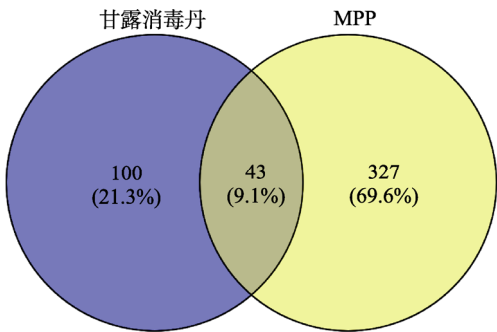


图 1 药物与疾病交集靶点图
Fig. 1 Drug and disease intersection target map

2.3 PPI 网络构建及核心靶点筛选

将关键靶点导入 STRING 数据库, 以置信度 ≥ 0.4 和 “Human sapiens” 为条件, 构建关键靶点之间的相互作用网络, 见图 3。通过 Cytoscape 构建相关网络图, 利用插件 cytoHubba 的连接度算法计算网络中的关键基因, 筛选出 10 个核心靶点, 见表 2, 并认为这些靶点对甘露消毒丹治疗 MPP 起到关键作用。

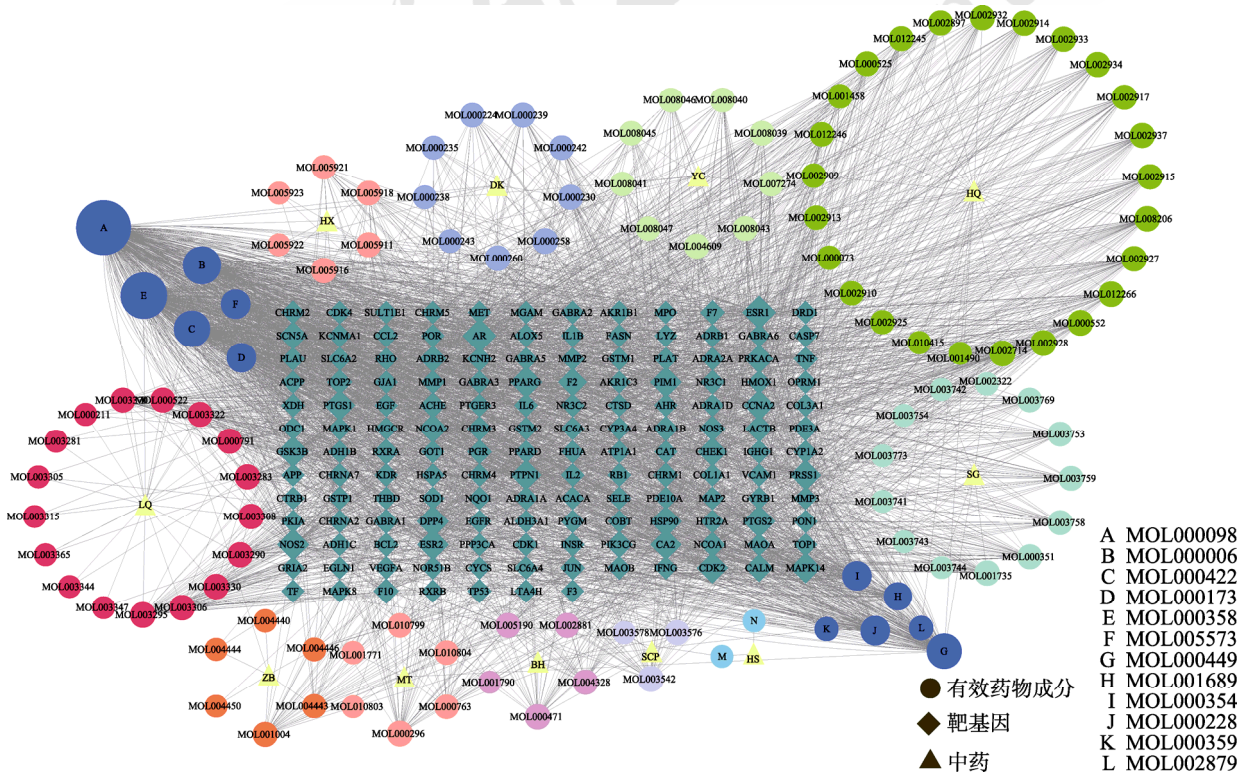


图 2 药物-化合物-靶点网络图

化合物 A~L 为 ≥ 2 味药物共同含有的化合物。

Fig. 2 Drug-compound-target network diagram
Compounds A to L were compounds that were common to at least 2 drugs.

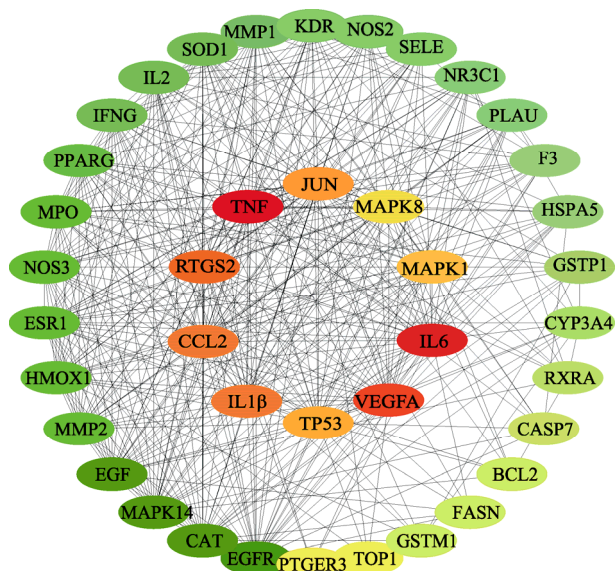


图3 关键靶点 PPI 网络图

内圈为 10 个核心靶点；从深红色或深绿到浅黄色，靶基因的重要性逐渐减低。

Fig. 3 Key target PPI network diagram

Inner circle consists of 10 core targets; from dark red or dark green to light yellow, the importance of target genes decreases gradually.

表 2 PPI 网络核心靶点

Tab. 2 PPI network core target

基因名称	基因描述	连接度
<i>TNF</i>	肿瘤坏死因子	32
<i>IL-6</i>	白介素 6	33
<i>VEGFA</i>	血管内皮生长因子 A	33
<i>PTGS2</i>	前列腺素 G/H 合酶 2	31
<i>IL-1β</i>	白介素 1β	29
<i>CCL2</i>	C-C 基序趋化因子 2	29
<i>JUN</i>	转录因子 AP-1	32
<i>TP53</i>	细胞肿瘤抗原 p53	35
<i>MAPK1</i>	丝裂原活化蛋白激酶 1	32
<i>MAPK8</i>	丝裂原活化蛋白激酶 8	32

2.4 GO 生物功能及 KEGG 通路富集分析

运用 R 软件的 ClusterProfiler 包对甘露消毒丹治疗 MPP 的 43 个潜在作用靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析，根据 $P < 0.05$ ，得到了 1 541 个生物学过程(biological process, BP)，主要涉及细胞对脂多糖等细菌来源物质的反应、活性氧代谢及生物合成过程、炎症反应调节、肌肉细胞增殖等；获得细胞成分(cell component, CC)相关条目 18 个，主要涉及细胞膜和质膜微结构；分子功能(molecular function, MF)相关条目 233 条，主要涉及细胞因子活性、细胞因子受体结合、受体配体活动、信号受体激活器的活性、血红素结

合、氧化还原酶活性等。选取前 10 个最显著的条目绘制 BP、CC、MF 气泡图，见图 4。KEGG 富集分析，根据 $P < 0.01$ 获得 106 条显著信号通路，主要富集于液体剪切应力和动脉粥样硬化、AGE-RAGE、IL-17、TNF、HIF-1、Toll 样受体、T 细胞受体信号通路、凝集素信号通路、Th17 细胞分化、病毒感染、寄生虫病相关疾病通路，免疫炎症疾病通路等，按富集数目排序后取前 20 条绘制气泡图，见图 5。

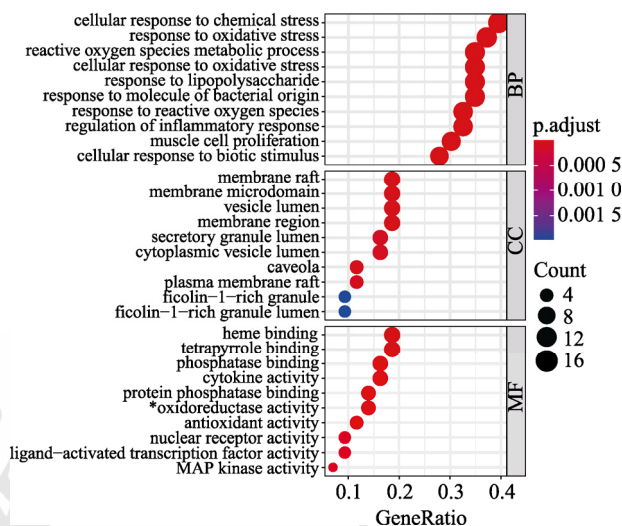


图4 GO 功能富集分析图(BP、CC、MF)

Fig. 4 GO functional enrichment analysis diagram(BP, CC, MF)

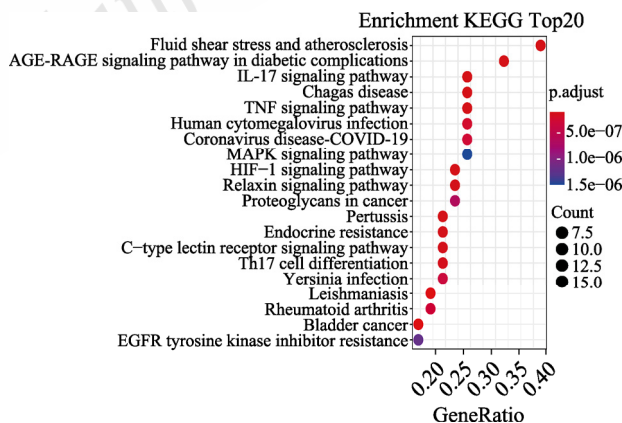


图5 KEGG 信号通路富集分析图

Fig. 5 Enrichment analysis diagram of KEGG signal pathway

2.5 有效化合物-核心靶基因的分子对接结果

通过 Cytoscape 筛选出将甘露消毒丹中活性化合物度值最大(Degree)的前 10 个成分，分别是槲皮素、β-谷固醇、木犀草素、山柰酚、豆甾醇、芫花素、异鼠李素、山姜素、汉黄芩素、刺槐素，

与 PPI 网络中度值排名前 5 的基因(*TNF*、*IL6*、*VEGFA*、*PTGS2*、*IL-1β*)和 MP 释放的 CARDS TX(PDB ID: 4TLV)及 ANXA2(PDB ID: 2HYV)进行分子对接试验,验证其相互作用活性,结果见表 3。Mestro(V11.5)软件评价小分子与蛋白质结合情况通过结合能表示,即计算后拟合得到的 Glide gscore 值,结合能<0 说明配体与受体可以自发结合,且值越小表示结合能越高,活性成分越容易与受体结合,本研究筛选与每个靶蛋白对应的结合能最低的化合物,并对其关键残基和作用力进行分析,并做出结合示意图,结果见图 6。据图可知甘露消毒丹活性成分与关键靶点的 5 次对接中,化合物均进入了活性位点,并与活性位点的关键残基形成 1~4 个氢键(*PTGS2* 蛋白与汉黄芩素未形成氢键)。其中来自豆蔻、黄芩的化合物山姜素与 *TNF* 蛋白残基 *GLU135* 形成 1 个氢键;来自黄芩、连翘的化合物汉黄芩素与 *IL6* 蛋白残基 *GLU51*、*LYS171* 之间形成阳离子- π 作用,与残基 *ARG40*、*LYS171* 各形成 1 个氢键;与 *PTGS2* 蛋白残基 *ARG120* 形成阳离子- π 作用,与残基 *TRP387* 形成 π - π 堆积作用;来自豆蔻、薄荷、连翘的木犀草素与 *VEGFA* 蛋白残基 *GLU23*、*THR70*、*GLN91* 各形成 1 个氢键;来自藿香、茵陈、薄荷的化合物芫花素与 *IL1β* 蛋白 *TYR24*、*LEU80*、*GLN81* 分别形成 1 个氢键。来自连翘、石菖蒲的山柰酚与 *CARDS* 残基 *ARG544*、

GLN193、*ASN89*、*ASP589*、*ASN3*、*ASP586* 各形成 1 个氢键,与残基 *ARG530* 形成阳离子- π 作用;来自藿香、豆蔻、茵陈、连翘的槲皮素与 *ANXA2* 蛋白残基 *LYS323*、*ASP284*、*ASP32* 各形成 1 个氢键。

3 讨论

MP 为儿童期社区获得性肺炎的常见致病菌。大环内酯类抗生素被推荐为 MPP 的一线抗生素^[7]。有研究表明^[8],大环内酯类治疗由 MP 引起的下呼吸道感染儿童有一定的优势,但随机分配到大环内酯组和非大环内酯组的儿童的临床反应没有差异。近年来,大环内酯类耐药问题日益严峻,亚洲地区耐药率为 13.6%~100%,可能成为导致难治性 MPP 的重要原因之一^[9],故寻找其他治疗药物或方法尤为重要。中医药在治疗呼吸系统感染性疾病方面有着悠久的历史 and 显著的疗效,而在此次抗击 COVID-19 中所发挥的作用得到了较大的认可^[10]。因此中药复方在感染性疾病中的特殊作用值得深入研究。临床研究^[11-13]表明,甘露消毒丹在治疗表现为湿热证的多种感染性疾病中有较好的疗效,可通过调节黏膜免疫、控制炎症因子、维持免疫稳态等途径减轻流感病毒^[14-15]、手足口病毒^[16]、柯萨奇病毒^[17]、乙肝病毒^[18]等病毒感染造成的炎症损伤、免疫紊乱。笔者所在课题组多年来应用甘露消毒丹加减方治疗表现为湿热证的 MPP 收效甚佳,其抗病原体、抗炎及调节免疫的作用值得深入探讨。

表 3 关键化合物与核心靶点蛋白及 CARDS TX 和 ANXA2 的分子对接信息

Tab. 3 Docking information of key compounds with core target proteins, CARDS TX and ANXA2

化合物 MOL 号	化合物名称	来源药物	靶蛋白						
			<i>TNF</i>	<i>IL-6</i>	<i>VEGFA</i>	<i>PTGS2</i>	<i>IL-1β</i>	<i>CARDS TX</i>	<i>ANXA2</i>
MOL000098	槲皮素	藿香、豆蔻、茵陈、连翘	-4.72	-4.068	-4.276	-7.7	-5.741	-5.602	-5.348*
MOL000358	谷固醇	茵陈、浙贝、木通	-4.669	-2.433	-	-	-4.033	-3.463	-1.812
MOL000006	木犀草素	豆蔻、薄荷、连翘	-4.945	-4.003	-4.898*	-7.551	-5.892	-5.601	-4.659
MOL000422	山柰酚	连翘、石菖蒲	-4.829	-4.01	-3.645	-7.248	-6.065	-7.207*	-4.665
MOL000449	豆甾醇	射干、木通	-4.612	-2.889	-	-	-3.431	-3.468	-2.333
MOL005573	芫花素	藿香、茵陈、薄荷	-4.982	-3.671	-4.226	-8.182	-6.081*	-6.162	-4.004
MOL000354	异鼠李素	茵陈、射干	-4.729	-4.087	-2.398	-7.377	-5.554	-4.955	-4.712
MOL000228	山姜素	豆蔻、黄芩	-5.245*	-4.444	-	-8.92	-5.041	-5.198	-
MOL000173	汉黄芩素	黄芩、连翘	-4.967	-4.573*	-3.39	-8.928*	-5.105	-6.176	-4.21
MOL001689	金合欢素	黄芩、薄荷	-5.02	-4.272	-	-7.474	-4.26	-4.955	-

注:结合自由能越小,化合物越容易与靶蛋白结合;*表示对应化合物与靶点的结合能是所有化合物与靶蛋白结合能最低的一项。

Note: Lower the binding free energy, the easier the compound bound to the target protein; * meant the binding energy of the corresponding compound to the target was the lowest binding energy of all the compounds to the target protein.

本研究通过药物成分靶点分析预测出甘露消毒丹中槲皮素、 β -谷固醇、木犀草素、山柰酚、甾甾醇、芫花素、异鼠李素、山姜素、汉黄芩素、刺槐素等为度值较高的成分,与此类研究^[19-20]相吻合。此类物质多为黄酮类化合物,有抗病毒、抑菌、抗炎、抗氧化等多种作用^[21]。其中,槲皮素是一种在植物中分布广泛的类黄酮,其有抗氧化^[22]、抗炎^[23]、抗多种病毒^[24-25]、调节免疫^[26]的作用。有研究表明^[27],槲皮素能够通过下调 cleaved caspase-3 和 Bax,上调抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平,抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应和细胞凋亡。临床发现重症 MPP 后期形成肺部纤维化,槲皮素^[28]可通过调节 Fas/FasL 系统影响成纤维细胞凋亡与增殖、影响 MMPs/TIMP 体系抗肺纤维化。汉黄芩素^[29]可通过上调 Nrf2 mRNA 的表达并促进巨噬细胞胞浆内 Nrf2 的核转位,上调胞内抗氧化酶 mRNA 的转录,增加超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性,从而抑制氧化应激来减轻炎症反应。在针对病原体方面,可通过结合病毒衣壳蛋白^[30]、结合病原体释放的毒性因子等起到减轻细胞损伤、抑制凋亡的作用^[31]。木犀草素也具有抗病毒、抑菌特性^[32-33],可通过调节 Nrf2/MAPK 信号通路,增强 HO-1 介导的抗氧化潜能^[34]。通过抑制细胞外基质重塑和血管生成相关因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达抑制肿瘤细胞生长^[35]。

通过药物疾病网络互作关系发现甘露消毒丹治疗 MPP 的核心靶点主要为 TNF、IL-6、VEGFA、PTGS2、IL-1 β 、CCL2、JUN、TP53、MAPK1、MAPK8,大多与炎症反应相关。其中 IL-6 是急性期炎症反应的强诱导剂,有助于感染和组织损伤时的防御反应,但过量的 IL-6 参与疾病的病理过程。研究^[36-37]表明 IL-6、TNF- α 是难治性肺炎支原体肺炎 (refractory mycoplasma pneumoniae pneumonia, RMPP) 的重要预测因子和标志物。VEGFA 是 PDGF/VEGF 生长因子家族的成员,有诱导内皮细胞增殖、促进细胞迁移、抑制细胞凋亡、增加血管通透性的作用。与炎症状态下肺血管通透性增高^[38],急性肺损伤加重^[39],及 MP 感染导致肺纤维化有关^[40]。PTGS2 是环氧化酶的一种类型,可被组织炎症诱导产生,与 MPP 炎症损伤相关,MPP 的膜脂蛋白可通过结合在人巨噬细胞的 TLR2/1、TLR2/6 诱导 MAPK 和 PTGS2 表达,产生前列腺

素 PGD2 和 PGE2,以及血栓素 B2,介导肺部炎症损伤,这一过程可被抗 TLR2 抗体抑制^[41]。CCL 趋化因子的主要作用是诱导细胞定向迁移,中药复方可影响小鼠肺部菌群及趋化因子 CCL 表达而防治肺部感染^[42]。MAPK1、MAPK8 属于 MAPK 家族,广泛参与肺部感染、炎症损伤、血管内皮增生、缺氧等多种生物过程^[43]。因此可以推测甘露消毒丹可能通过阻断病原抗体结合、干扰炎症反应、抗氧化和调节免疫通路起到治疗 MPP 作用,在避免其转为重症肺炎方面有一定意义。

GO 生物过程功能富集结果显示,甘露消毒丹治疗 MPP 的生物过程主要集中于细胞对细菌来源物质的反应、炎症反应、受体配体活动、体液免疫应答等方面。富集的 KEGG 通路中,与炎症关系密切的通路包括 TNF、IL-17、凝集素受体等信号通路,而 NF- κ B/MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路在细胞分化、病毒感染、寄生虫相关疾病通路中均有所涵盖。液体剪切应力和动脉粥样硬化通路富集在首位的原因考虑与其涵盖氧化-抗氧化生物过程、炎症通路有关(图 6),这些在 MPP 病理过程中占重要位置。AGE-RAGE^[44]通路可能与难治性肺炎支原体肺炎的肺纤维化形成等病理机制相关。

2005 年发现了 591-aa 蛋白 (CARDS TX),其具有单-ADP 核糖体转移酶 (mART) 和空泡活性^[45],可以与肺表面活性蛋白 A (surfactant protein-A, SP-A) 及 ANXA2 受体结合,导致细胞空泡化。除此之外, CARDS TX 还可与细胞质膜上的磷脂酰胆碱和鞘磷脂特异性结合,且将其与细胞表面结合和内化活性定位于 CARDS TX 的 C 末端三叶结构域内^[46]。mART 区域和具有催化活性的谷氨酸残端被部分氨基酸界面掩盖,但其极性接触部位易被破坏,可能导致活性位点暴露。另有研究表明^[47],被截断的 ANXA2 蛋白部分都可与 CARDS TX 结合,在与 SP-A 的结合能力比较中占优势,其丰度可调节毒素靶向定位的能力。基于此,本研究应用相关软件预测了小分子与此 2 种蛋白的对接情况,结果提示其之间均能够以较小的能量发生对接,且预测 CARDS TX 存在多个位点口袋,药物小分子有可能通过改变其构象或竞争性结合活性部位,使毒素失活,从而阻止其结合细胞及内化。药物成分与 ANXA2 的多部位结合也有助于竞争性抑制 CARDS TX 的受体结合过程。从分子层面

说明了甘露消毒丹的合理组方,对抗 MP 的药物研发具有一定的指导意义。

综上所述,甘露消毒丹在治疗 MPP 过程中可能通过多靶点、多通路起到抗炎、调节免疫的作用,通过分子对接对 MP 致病的起始阶段研究发现,甘露消毒丹对抑制毒素-细胞作用方面有重要潜在作用。但本研究尚缺乏实验验证分析结果,后续将以实验验证分析理论的准确性和此类理论方法的可行性,为中医药治疗 MPP 提供相应的科学依据。

REFERENCES

- [1] GAO L W, YIN J, HU Y H, et al. The epidemiology of paediatric mycoplasma pneumoniae pneumonia in North China: 2006 to 2016[J]. *Epidemiol Infect*, 2019(147): e192. Doi: 10.1017/S0950268819000839.
- [2] LI X M, MA L T, SUN D, et al. Research on syndrome analysis and treatment of internal retention of damp-heat syndrome in pediatric pneumonia[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2018, 33(11): 5117-5121.
- [3] SUN D, LI X M, LU Y L, et al. Development regularity of TCM syndrome of mycoplasma pneumoniae pneumonia in children[J]. *J Pediatr Tradit Chin Med*(中医儿科杂志), 2019, 15(5): 94-96.
- [4] DU H Z, LI X M, JIN L, et al. Clinical research on the treatment of severe mycoplasma pneumonia(dampness and heatness syndromel) in children with Ganlu Xiaodu Dan[J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*(天津中医药), 2015, 32(8): 477-480.
- [5] QIAN F H. Clinical observation on 40 cases of mycoplasma pneumoniae pneumonia with accumulation of damp-heat in lung in children treated by integrating therapy of Chinese and Western medicine[J]. *J Pediatr Tradit Chin Med*(中医儿科杂志), 2018, 14(6): 35-38.
- [6] HUANG Q H, ZHOU F J, XU X, et al. Virtual screening of material basis of Corydalis Rhizoma for treating myocardial ischemia based on molecular docking technology[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2019, 50(10): 2355-2361.
- [7] LIU H M, MA R. Expert consensus on integrated traditional Chinese and western medicine in the diagnosis and treatment of mycoplasma pneumoniae in children(2017)[J]. *Chin J Pract Pediatr*(中国实用儿科杂志), 2017, 32(12): 881-885.
- [8] GAVRANICH J B, CHANG A B. Antibiotics for community acquired lower respiratory tract infections (LRTI) secondary to mycoplasma pneumoniae in children[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(3): CD004875.
- [9] PEREYRE S, GORET J, BÉBÉAR C. Mycoplasma pneumoniae: Current knowledge on macrolide resistance and treatment[J]. *Front Microbiol*, 2016(7): 974.
- [10] ZHAO Z Y, LI Y D, ZHOU L Y, et al. Prevention and treatment of COVID-19 using Traditional Chinese Medicine: A review[J]. *Phytomedicine*, 2021(85): 153308.
- [11] MA S G, CHEN F M, ZHENG X H, et al. Clinical effect observation on the modified Ganlu Xiaodu Dan in the treatment of children with hand, foot and mouth disease of damp-heat accumulation toxin syndrome[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*(南京中医药大学学报), 2018, 34(3): 262-264.
- [12] MO X A, JIANG K P, HUANG Q H, et al. Clinical observation of Ganlu Xiaodu Dan on curative effect and changes of FibroScan in patients with damp-heat syndrome of HBV associated with acute-on-chronic liver failure[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(16): 170-175.
- [13] ZHANG X, RAN Z L. Clinical observation on 30 cases of infectious mononucleosis in children with damp-heat syndrome treated by modified Ganlu Xiaodu Dan as adjuvant therapy[J]. *J Pediatrics TCM*(中医儿科杂志), 2020, 16(3): 64-68.
- [14] LIU G H, YANG H, WANG Z, et al. Effects of Ganlu Xiaodu micropilland its volatile oil on mucosal immunity in mice infected with influenza virus[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2019, 37(2): 340-343.
- [15] 毕倩宇, 张桂菊, 崔有利, 等. 甘露消毒丹对湿热证型病毒性肺炎小鼠模型的多靶点干预作用[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(8): 1840-1844.
- [16] AI B C, HE Y S, ZHAO G R, et al. A study on anti-EV71 effects of Ganlu Xiaodudan *in vitro*[J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*(中国中医药信息杂志), 2014, 21(11): 62-65.
- [17] ZOU J J, WU J M, HE Y S, et al. Effects of Ganlu Xiaodu pills and its residues on PSGL-1 and proinflammatory cytokines in cox A16 mouse model[J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*(中国中医药信息杂志), 2017, 24(12): 42-46.
- [18] 张志明, 刘叶, 林培政. 甘露消毒丹干预小鼠病毒性肝炎湿热证 Toll 受体通路的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(5): 1047-1049.
- [19] TAN F X, HUANG F, LI Y, et al. Mechanisms of Ganlu Xiaodu Dan on the treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2020, 36(5): 44-53.
- [20] KUANG Y H, CHEN X Q, ZHAO Q, et al. Mechanism of Ganlu Xiaodu Micro Pill against COVID-19 based on Network pharmacology and molecular docking method[J]. *J Hainan Med Univ*(海南医学院学报), 2020, 26(16): 1201-1208,1213.
- [21] ZHU Z T, WU H, SU W W, et al. Effects of total flavonoids from *Exocarpium Citri Grandis* on air pollution particle-induced pulmonary inflammation and oxidative stress in mice[J]. *J Food Sci*, 2019, 84(12): 3843-3849.
- [22] HUANG R S, ZHONG T, WU H. Quercetin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through suppression of inflammation and oxidative stress[J]. *Arch Med Sci*, 2015, 11(2): 427-432.
- [23] KARUPPAGOUNDER V, ARUMUGAM S, THANDAVARAYAN R A, et al. Molecular targets of quercetin with anti-inflammatory properties in atopic dermatitis[J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(4): 632-639.
- [24] YAO C G, XI C L, HU K H, et al. Inhibition of enterovirus 71 replication and viral 3C protease by quercetin[J]. *Virol J*, 2018,

- 15(1): 116.
- [25] GUIMARÃES G C, PIVA H R M, ARAÚJO G C, et al. Binding investigation between M2-1protein from hRSV and acetylated quercetin derivatives: ¹H NMR, fluorescence spectroscopy, and molecular docking[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018(111): 33-38.
 - [26] LI Y, YAO J, HAN C, et al. Quercetin, inflammation and immunity[J]. *Nutrients*, 2016, 8(3): 167.
 - [27] WANG Y Y, LI G T, WANG M S, et al. Quercetin attenuates spinal cord injury by inhibiting TLR4/NF-κB-mediated inflammatory response[J]. *Orthop J China(中国矫形外科杂志)*, 2020, 28(14): 1311-1316.
 - [28] LI K K, GE C L, ZHANG X C. Mechanism and research progress of quercetin on pulmonary fibrosis[J]. *J Liaoning Univ TCM(辽宁中医药大学学报)*, 2021, 23(2): 126-129.
 - [29] ZHOU S Y, YOU L M, ZHANG H L, et al. Wogonin-mediated inhibition of LPS and ATP-induced oxidative stress in mouse macrophages[J]. *Chin J Immunol(中国免疫学杂志)*, 2020, 36(3): 257-260, 266.
 - [30] PARVEZ M K, AL-DOSARI M S, ARBAB A H, et al. Bioassay-guided isolation of anti-hepatitis B virus flavonoid myricetin-3-O-rhamnoside along with quercetin from *Guiera senegalensis* leaves[J]. *Saudi Pharm J*. 2020, 28(5): 550-559.
 - [31] LV Q, ZHANG P, QUAN P S, et al. Quercetin, a pneumolysin inhibitor, protects mice against *Streptococcus pneumoniae* infection[J]. *Microb Pathog*, 2020(140): 103934.
 - [32] YAN H Y, MA L L, WANG H Q, et al. Luteolin decreases the yield of influenza A virus *in vitro* by interfering with the coat protein I complex expression[J]. *J Nat Med*, 2019, 73(3): 487-496.
 - [33] RIVERA M L C, HASSIMOTTO N M A, BUERIS V, et al. Effect of *Capsicum frutescens* extract, capsaicin, and luteolin on quorum sensing regulated phenotypes[J]. *J Food Sci*, 2019, 84(6): 1477-1486.
 - [34] SONG Y S, PARK C M. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside strengthen antioxidative potential through the modulation of Nrf2/MAPK mediated HO-1 signaling cascade in RAW 264.7 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014(65): 70-75.
 - [35] PING X F, CUI X M, CHEN W, et al. Inhibitory effect of luteolin on the growth, migration and vasculogenic mimicry formation of a melanoma cell line B16[J]. *Chin J Dermatol(中华皮肤科杂志)*, 2019, 52(6): 401-407.
 - [36] ZHANG Y, ZHOU Y, LI S, et al. The clinical characteristics and predictors of refractory mycoplasma pneumoniae pneumonia in children[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156465.
 - [37] LI G, FAN L P, WANG Y Q, et al. High co-expression of TNF-α and CARDS toxin is a good predictor for refractory mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. *Mol Med*, 2019, 25(1): 1-10.
 - [38] YU X, LIN Q, QIN X, et al. ACE2 antagonizes VEGFa to reduce vascular permeability during acute lung injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(3): 1055-1062.
 - [39] MEYER N J, DAYE Z J, RUSHEFSKI M, et al. SNP-set analysis replicates acute lung injury genetic risk factors[J]. *BMC Med Genet*, 2012(13): 52.
 - [40] MENG Y L, XU H X, WANG X X, et al. Effect of qinbai qingfei pills on β-catenin and α-SMA expressions in mycoplasma pneumonia mice[J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2019, 42(7): 1635-1639.
 - [41] KANDASAMY P, ZARINI S, CHAN E D, et al. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits mycoplasma pneumoniae-stimulated eicosanoid production from human and mouse macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(10): 7841-7853.
 - [42] WANG P, ZHAO C, LU F G, et al. Effect of influenza A virus infection on pulmonary flora and chemokines CCL5 and CXCL10 in mice and intervention of Maxing Shigan decoction[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2020, 51(21): 5523-5537.
 - [43] KIM E K, CHOI E J. Compromised MAPK signaling in human diseases: An update[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(6): 867-882.
 - [44] MACHAHUA C, MONTES-WORBOYS A, LLATJOS R, et al. Increased AGE-RAGE ratio in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respir Res*, 2016, 17(1): 144.
 - [45] KANNAN T R, BASEMAN J B. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of mycoplasma pneumoniae represents unique virulence determinant among bacterial pathogens[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(17): 6724-6729.
 - [46] SOMARAJAN S R, AL-ASADI F, RAMASAMY K, et al. Annexin A2 mediates mycoplasma pneumoniae community-acquired respiratory distress syndrome toxin binding to eukaryotic cells[J]. *mBio*, 2014, 5(4). Doi: 10.1128/mbio.01497-14.
 - [47] KRISHNAN M, KANNAN T R, BASEMAN J B. Mycoplasma pneumoniae CARDS toxin is internalized via clathrin-mediated endocytosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62706. Doi: 10.1371/journal.pone.0062706.

收稿日期: 2021-01-22

(本文责编: 沈倩)