

基于网络药理学和分子对接技术分析清肺排毒汤治疗 COVID-19 的机制

鄢海燕¹, 邹妍², 邹纯才¹

¹皖南医学院药学院, 安徽 芜湖 241002; ²云南大学化学科学与工程学院/药学院, 云南 昆明 650091

摘要:目的 基于网络药理学和分子对接技术分析清肺排毒汤治疗 COVID-19 的作用靶点、信号通路和生物学功能。方法 利用 TCSP、SwissTarget Prediction、CooLGeN、GeneCards、DAVID 等数据库, 分析清肺排毒汤中麻黄、半夏等 21 味药所含的活性成分及其靶点蛋白, 筛选与 COVID-19 疾病共有的靶点蛋白及其信号通路与生物学功能, 采用 Gephi 软件构建清肺排毒汤药味-活性成分-作用靶点-生物学功能网络图。结果 清肺排毒汤中麻黄、半夏、甘草、冬花、紫菀、枳实等 18 味药的 MOL000519、MOL000554、MOL004798、MOL004824、MOL010428、MOL013443 等 163 个活性成分通过调控 ACE、ACE2、AGTR1、FURIN、TNF、CASP3、CASP6、DPP4、MCL1、POLD1 等 10 个蛋白靶点激活肾素-血管紧张素系统信号通路和细胞凋亡信号通路, 发挥肾素-血管紧张素对血容量的调节、肾素-血管紧张素对全身动脉血压的调节等 42 种生物学功能治疗 COVID-19。初步分子对接结果显示, 核心活性成分 MOL000519(来自半夏)、MOL000554(来自冬花)、MOL004798(来自麻黄)、MOL004824(来自甘草)、MOL010428(来自紫菀)、MOL013443(来自枳实)等与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶有较好的亲和力, 可形成稳定构象, 具有较好结合活性(结合能 ≤ -5 kJ/mol)。结论 清肺排毒汤以多药味、多靶点、多信号通道和多生物学功能发挥治疗 COVID-19 作用, 该研究可为深入阐释清肺排毒汤治疗 COVID-19 的药理作用及机制提供参考。

关键词:网络药理学; 分子对接; 清肺排毒汤; COVID-19; 生物学功能

Mechanism of *Qingfei Paidu* decoction for treatment of COVID-19: analysis based on network pharmacology and molecular docking technology

YAN Haiyan¹, ZOU Yan², ZOU Chuncai¹

¹School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; ²School of Chemical Science and Technology/School of Pharmacy, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: Objective To explore the target, signaling pathways and their biological functions of *Qingfei Paidu* Decoction in the treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The active components and target proteins in 21 drugs such as *Ephedrae Herba* and *Pinelliae Rhizoma* in *Qingfei Paidu* decoction were analyzed, and the signaling pathways and biological functions of the target proteins common with COVID-19 were screened by using TCSP, Swiss Target Prediction, CooLGeN, GeneCards, DAVID and other databases. The network diagram of *Qingfei Paidu* decoction was constructed using Gephi software. **Results** We identified 163 active ingredients, including MOL004798, MOL000519, MOL004824, MOL000554, MOL010428, and MOL013443, from 18 drugs in *Qingfei Paidu* decoction (such as *Ephedrae Herba*, *Pinelliae Rhizoma*, *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma*, *Farfarae Flos*, *Asteris Radix Et Rhizoma* and *Aurantii Fructus Immaturus*). These ingredients activate renin-angiotensin system signaling pathway and apoptosis signaling pathway by regulating 10 protein targets (ACE, ACE2, AGTR1, FURIN, TNF, CASP3, CASP6, DPP4, MCL1 and POLD1) to execute 42 biological functions such as renin-angiotensin regulation of blood volume and systemic arterial blood pressure to treat COVID-19. The results of preliminary molecular docking showed that MOL000519 (from *Pinelliae Rhizoma*), MOL000554 (from *Farfarae Flos*), MOL004798 (from *Ephedrae Herba*), MOL004824 (from *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma*), MOL010428 (from *Asteris Radix Et Rhizoma*), and MOL013443 (from *Aurantii Fructus Immaturus*) had good affinity with SARS-CoV-2 3CL hydrolase to form complexes with stable conformations and high binding activity (binding energy ≤ -5 kJ/mol). **Conclusion** *Qingfei Paidu* decoction can treat COVID-19 through its multiple medicinal ingredients that have multiple targets and involve multiple signaling pathways for different biological functions. Our finding provides reference for further investigation into the pharmacological mechanism of *Qingfei Paidu* decoction in treating COVID-19.

Keywords: network pharmacology; molecular docking; *Qingfei Paidu* decoction; COVID-19; biological function

COVID-19 属于 β 属的冠状病毒, 其基因特征与 SARSr-Cov 和 MERSr-Cov 有明显区别。目前研究显

示与蝙蝠 SARS 样冠状病毒 (bat-SL-CoVZC45) 同源性达 85% 以上。人群普遍易感, 以发热、乏力、干咳为主要表现。虽然特定的疫苗和抗病毒药物是预防和治疗病毒感染的最有效方法, 但目前还没有针对 COVID-19 的有效治疗方法。药物再利用是一种从现有药物中发现药物的有效策略, 与新药物发现相比, 可以缩短时间, 降低成本^[1]。传统中药为实现这一目标提供了一种潜在

收稿日期: 2020-03-01

基金项目: 安徽省省级质量工程项目 (2018jyxm1273)

作者简介: 鄢海燕, 教授, E-mail: yhy0801@126.com; 邹妍, 在读硕士研究生, E-mail: whzhouyanyu@163.com。鄢海燕、邹妍共同为第一作者

通信作者: 邹纯才, 教授, 硕士生导师, E-mail: zouchc@163.com

的宝贵资源。中药治疗的应用主要以中药的种类(根据中药经典文献目录)和病人的症状或体征为指导。通常没有足够的信息来预先确定中药是否可以直接针对病毒病因^[2]。现有临床治疗结果显示,中医药在 COVID-19 的治疗中发挥了重要作用^[3-5]。中华人民共和国中医药管理局关于推荐在中西医结合救治 COVID-19 中使用“清肺排毒汤”的通知(国中医药办医政函[2020]22号)^[6],将“清肺排毒汤”推荐用于 COVID-19 的治疗,中华人民共和国卫生健康委员会和中华人民共和国中医药管理局关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)的通知(国卫办医函[2020]145号)中也将“清肺排毒汤”用于 COVID-19 临床治疗期(确诊病例)的治疗^[7]并取得了很好的临床疗效^[8-9]。

以系统生物学理论为基础的网络药理学,通过对生物系统的网络分析来选取特定信号节点,构建活性成分-蛋白靶点-信号通路之间的复杂网络来探讨药物的作用机制^[10-11]。通过网络药理学以“pneumonia”即“肺炎”为关键词检索肺炎相关靶点并进一步筛选与清肺排毒汤有效化合物靶点交集探讨清肺排毒汤的作用机制^[12]。有学者鉴于 ACE2 是 SARS-CoV-2 受体,ACE2 与 Spike 蛋白相互作用,可能也介导 COVID-19 感染肺 II 型肺泡细胞,通过 ACE2 的共表达基因筛选与清肺排毒汤的交集靶标^[13]。为更精准地通过网络药理学探讨清肺排毒汤治疗 COVID-19 作用机制,本文以“2019-nCoV”、“COVID-19”为疾病关键词,选取清肺排毒汤中麻黄、甘草等 21 味中药,对涉及到的 2795 种活性成分进行筛选,通过网络药理学方法进行清肺排毒汤抗 COVID-19 潜在作用靶点和信号通路及生物学过程的预测,根据构建的网络模型分析其对 COVID-19 疾病可能存在的药理作用及作用机制,为清肺排毒汤治疗 COVID-19 的深入研究提供参考和借鉴。

1 资料和方法

1.1 数据来源

1.1.1 处方来源与组成^[6] 处方来源:中华人民共和国中医药管理局关于推荐在中西医结合救治新型冠状病毒感染的肺炎中使用“清肺排毒汤”的通知(国中医药办医政函[2020]22号)。清肺排毒汤的处方组成:麻黄 9 g,炙甘草 6 g,杏仁 9 g,生石膏 15~30 g(先煎),桂枝 9 g,泽泻 9 g,猪苓 9 g,白术 9 g,茯苓 15 g,柴胡 16 g,黄芩 6 g,姜半夏 9 g,生姜 9 g,紫菀 9 g,冬花 9 g,射干 9 g,细辛 6 g,山药 12 g,枳实 6 g,陈皮 6 g,藿香 9 g。用法:传统中药饮片,水煎服。1 付/1 d,早晚 2 次(饭后 40 min),温服,3 付 1 个疗程。适用范围:适用于轻型、普通型、重型患者,在危重型患者救治中可结合患者实际情况合理使用。

1.1.2 活性成分来源 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)及《中国药典》(ChP)(2015 年版),分

别以清肺排毒汤中的 21 味药来检索活性成分,其中:炙甘草、杏仁、姜半夏、冬花、藿香分别按甘草、苦杏仁、半夏、款冬花、广藿香进行检索。选择符合口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 并合并各药味中相同的活性成分,绘制结构式并以 MDL SDfile (*.sdf)格式保存(检索日期:2020 年 2 月 10 日)。将这些活性成分的 MDL SDfile (*.sdf)格式结构式导入 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),检索符合 Probability ≥ 0.05 的活性成分靶点蛋白(检索日期:2020 年 2 月 21 日)。

1.1.3 候选靶标来源 利用 CoolGeN (<http://ci.smu.edu.cn/CoolGeN/Home.php>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)数据库,以“2019-nCoV”、“COVID-19”为关键词,收集疾病靶点蛋白(选择标示符为 All human genes),选择与活性成分相匹配的靶点蛋白。

1.2 靶点通路及生物学功能注释分析

将基因靶点复制至 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)的列表中,选择标示符为 official_gene_symbol,物种注释为 Homo sapiens,进行靶点蛋白的 GOTERM_BP_DIRECT、GOTERM_CC_DIRECT、GOTERM_MF_DIRECT 富集分析和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) _PATHWAY 通路注释分析。

1.3 活性成分-蛋白靶点-生物学功能网络分析和构建

根据预测结果,使用 Gephi0.9.2 软件将筛选出来的活性成分、蛋白靶点和生物学功能构建活性成分-蛋白靶点-生物学功能网络。

2 结果

2.1 清肺排毒汤各药味中活性成分

通过 TCMSP 及 ChP(2015 年版)共检索到清肺排毒汤各药味中所含活性成分 2795 个。符合口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 的活性成分有 368 个。合并各药味中相同的活性成分,共得到活性成分 309 个(表 1)。

2.2 靶点的预测

将表 1 中符合口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 的活性成分以 MDL SDfile (*.sdf)格式导入 Swiss Target Prediction 数据库,获得蛋白靶点信息 29 596 条,涉及 1428 个化学靶点蛋白。筛选符合 Probability ≥ 0.05 的活性成分靶点蛋白,获得蛋白靶点信息 19 994 条,涉及 1235 个化学靶点蛋白。利用 CoolGeN、GeneCards 数据库,以“2019-nCoV”、“COVID-19”为关键词,共收集疾病靶点蛋白(All human genes)31 个。筛选与活性成分相匹配的靶点蛋白有 10 个:血管紧张素转化酶(ACE)、血管紧张素转化酶 2(ACE2)、血管紧张素 II(AT1R/AGTR1)、弗林蛋白酶(FURIN)、肿瘤坏死因子(TNF)、胱天蛋白酶 3(CASP3)、胱天蛋白酶 6

表1 清肺排毒汤中各药味所含活性成分数量

Tab.1 Quantity of active components in each medicinal ingredient of *Qingfei Paidu* decoction

Traditional Chinese medicine in <i>Qingfei Paidu</i> decoction	Latin name (from ChP)	Number of active ingredients	Number of components complying with OB and DL rules
Ephedra	<i>Ephedrae herba</i>	363	14
Honey-fried licorice root	<i>Glycyrrhizae radix et rhiizoma</i>	280	91
Almond	<i>Armeniacaese semen amarum</i>	113	11
Gypsum	<i>Gypsum fibrosum</i>	1	0
Cassia twig	<i>Cinnamomi ramulus</i>	220	7
Rhizoma alismatis	<i>Alismatis rhizoma</i>	46	9
Grifola	<i>Polyporus</i>	31	11
Atractylis ovata	<i>Atractylodis macrocephalae rhizoma</i>	55	7
Tuckahoe	<i>Poria</i>	34	15
Chinese thorowax root	<i>Bupleuri radix</i>	349	17
Scutellaria baicalensis	<i>Scutellariae radix</i>	143	37
Rhizoma pinelliae	<i>Pinelliae rhizoma</i>	116	16
Ginger	<i>Zingiberis rhizoma recens</i>	265	6
Radix asteris	<i>Asteris radix et rhizoma</i>	91	19
Fuyuka	<i>Farfarae flos</i>	148	22
Belamcanda sinensis	<i>Belamcandae rhizoma</i>	56	17
Asarum	<i>Asari radix et rhizoma</i>	192	14
Chinese yam	<i>Dioscoreae rhizoma</i>	71	16
Fructus aurantii immaturus	<i>Aurantii fructus immaturus</i>	65	23
Citri reticulatae pericarpium	<i>Citri reticulatae pericarpium</i>	63	5
Agastache rugosa	<i>Pogostemonis herba</i>	94	11

(CASP6)、二肽基肽酶-4(DPP4)、髓样细胞白血病蛋白1(MCL1)、DNA聚合酶 δ 催化亚基基因(POLD1),涉及18味药、163个活性成分(本文活性成分均以Mol ID表示,具体成分名称可检索TCMSP数据库)。清肺排毒汤中主要药味、活性成分及与COVID-19相关的潜在靶点信息为:ACE靶点蛋白:MOL000519、MOL006956(半夏),MOL000490(柴胡),MOL000554、MOL010017(冬花),MOL000273、MOL000276、MOL000280、MOL000289(茯苓),MOL000211(甘草、杏仁),MOL004824、MOL004860、MOL004917(甘草),MOL002935(黄芩),MOL004798(麻黄),MOL013276、MOL013428、MOL013440(枳实);ACE2靶点蛋白:MOL013443(枳实),MOL010428(紫菀);AGTR1靶点蛋白:MOL000519、MOL006937(半夏),MOL013187(柴胡),MOL010027、MOL010038、MOL010060(冬花),MOL000273、MOL000276、MOL000280、MOL000285、MOL000289、MOL000290、MOL000291、MOL000300(茯苓),MOL000211、MOL002311、MOL004903(甘草、杏仁),MOL004810、MOL004812、MOL004820、MOL004838、MOL004855、MOL004856、MOL004857、MOL004864、MOL004882、

MOL004898、MOL004905、MOL004924、MOL004945、MOL004948、MOL004959、MOL004980、MOL005001、MOL005013(甘草),MOL002879(黄芩、藿香),MOL010415(黄芩),MOL001494(麻黄),MOL005465(山药),MOL003742(射干),MOL009053、MOL013276(枳实),MOL010428、MOL010478(紫菀);CASP3靶点蛋白:MOL006937、MOL006967(半夏),MOL000490、MOL004653、MOL013187(柴胡),MOL002776(柴胡、半夏),MOL000554、MOL010027、MOL010055、MOL010060(冬花),MOL000290(茯苓),MOL000500、MOL004808、MOL004812、MOL004882、MOL004891、MOL004905、MOL004917、MOL004924、MOL005007(甘草),MOL004903(甘草、杏仁),MOL001490、MOL002935(黄芩),MOL005922、MOL005923(藿香),MOL004798、MOL010489(麻黄),MOL000310、MOL000322、MOL005430(山药),MOL006129(生姜),MOL009849(细辛),MOL010922(杏仁),MOL013276、MOL013352、MOL013428、MOL013430、MOL013436、MOL013440、MOL013443(枳实),MOL010478(紫菀);CASP6靶点蛋白:

MOL006967(半夏), MOL000490、MOL013187(柴胡), MOL002776(柴胡、半夏), MOL000554(冬花), MOL004808(甘草), MOL004903(甘草、杏仁), MOL000228、MOL001490、MOL002935(黄芩), MOL004798、MOL010489(麻黄), MOL006129(生姜), MOL013276、MOL013428(枳实), MOL010478(紫菀); FURIN靶点蛋白: MOL006956、MOL006957(半夏); DPP4靶点蛋白: MOL006956、MOL006957、MOL006967(半夏), MOL000490、MOL004628、MOL004648(柴胡), MOL000291(茯苓), MOL004810、MOL004811、MOL004815、MOL004824、MOL004856、MOL004879、MOL004891、MOL004924、MOL004948、MOL005003(甘草), MOL004908(甘草、杏仁), MOL002879(黄芩、藿香), MOL005884(藿香), MOL004798(麻黄), MOL001559(山药), MOL003773(射干), MOL002501、MOL012141(细辛), MOL007207、MOL012922(杏仁), MOL000820(猪苓); MCL1靶点蛋白: MOL000519、MOL006944、MOL006967(半夏), MOL004598、MOL004609、MOL013187(柴胡), MOL010012、MOL010028、MOL010060(冬花), MOL000239、MOL000392、MOL000417、MOL000500、MOL003656、MOL003896、MOL004811、MOL004814、MOL004828、MOL004856、MOL004857、MOL004860、MOL004863、MOL004864、MOL004935、MOL004961、MOL004974、MOL005008、MOL005016、MOL005020(甘草), MOL000354(甘草、柴胡、射干、紫菀), MOL002311(甘草、杏仁), MOL000173、MOL000552、MOL001458、MOL001689、MOL002908、MOL002909、MOL002911、MOL002915、MOL002926、MOL002927、MOL002928、MOL002932、MOL002933、MOL002934、MOL008206、MOL012266(黄芩), MOL002879(黄芩、藿香), MOL005573、MOL005916、MOL005922(藿香), MOL002881(麻黄), MOL005465(山药), MOL000351、MOL001735、MOL003758、MOL003759、MOL003773(射干), MOL001558、MOL009849(细辛), MOL002372(杏仁), MOL005828(枳实、陈皮), MOL013277、MOL013279、MOL013430(枳实), MOL002563、MOL004096(紫菀); POLD1靶点蛋白: MOL002776(柴胡、半夏), MOL000554(冬花), MOL002935(黄芩); TNF靶点蛋白: MOL002776(柴胡、半夏), MOL004648(柴胡), MOL010006、MOL010007(冬花), OL000273、MOL000275、MOL000280、MOL000285、MOL000287、MOL000289、MOL000290、

MOL000291、MOL000292、MOL000300(茯苓), MOL000279(茯苓、猪苓), MOL000392、MOL000417、MOL004810、MOL004827、MOL004848、MOL004898、MOL004905、MOL004907、MOL004917、MOL004935、MOL004948、MOL004959、MOL005013、MOL005016(甘草), MOL002911、MOL002935(黄芩), MOL005923(藿香), MOL001755(麻黄、半夏), MOL005461、MOL005465(山药), MOL002322、MOL003757、MOL003758、MOL003759、MOL003773(射干), MOL000832(泽泻), MOL000796、MOL000797、MOL000816、MOL000822(猪苓), MOL010456(紫菀)。

2.3 靶点信号通路与 Gene Ontology(GO)分析

将清肺排毒汤中各药味活性成分与COVID-19共有的10个靶点蛋白导入DAVID数据库,进行靶点蛋白的GOTERM_BP_DIRECT、GOTERM_CC_DIRECT、GOTERM_MF_DIRECT富集分析和KEGG_PATHWAY通路注释分析。信号通路主要涉及肾素-血管紧张素系统(RAS)信号通路、细胞凋亡、肌萎缩侧索硬化症和肥厚性心肌病(HCM)信号通路。清肺排毒汤中的163个活性成分通过ACE、ACE2、AGTR1、FURIN、TNF、CASP3、CASP6、DPP4、MCL1、POLD1等靶点蛋白参与与COVID-19相关的生物过程、细胞组成和分子功能。生物过程主要与肾素-血管紧张素对血容量的调节、肾素-血管紧张素对全身动脉血压的调节、血管舒张调节、激素对全身动脉血压的调节作用、内分泌过程等有关,细胞组成主要与质膜、细胞外区、细胞表面等有关,分子功能主要与肽酶活性(作用于L-氨基酸肽)、肽酶活性、肽结合等有关(图1、2)。

2.4 活性成分-靶点蛋白-生物学功能网络的构建

使用Gephi 0.9.2软件构建药味-活性成分-靶点蛋白-生物学功能网络(图3)。清肺排毒汤中麻黄、半夏、甘草、冬花、紫菀、枳实等18味药的MOL000519、MOL000554、MOL004798、MOL004824、MOL010428、MOL013443等163种活性成分通过ACE、ACE2、AGTR1、FURIN、TNF、CASP3、CASP6、DPP4、MCL1、POLD1等靶点蛋白以多种生物学功能发挥治疗COVID-9作用。

2.5 清肺排毒汤中核心活性成分与 SARS-CoV-2 3CL水解酶晶体结构(PDB ID:6LU7)分子对接结果分析

SARS-CoV-2 3CL水解酶作为一种半胱氨酸水解酶,是冠状病毒的主要蛋白酶之一,在病毒的复制过程中起重要作用,因其基因具有高度的保守性,可作为药物设计的关键靶标,其三维高分辨率[0.21 nm(2.1 Å)]晶体结构(PDB ID:6LU7)由上海科技大学饶子和/杨海涛课题组测定^[14-16]。RAS信号通路是清肺排毒汤发挥治疗COVID-19的主要通路之一,该通路主要通

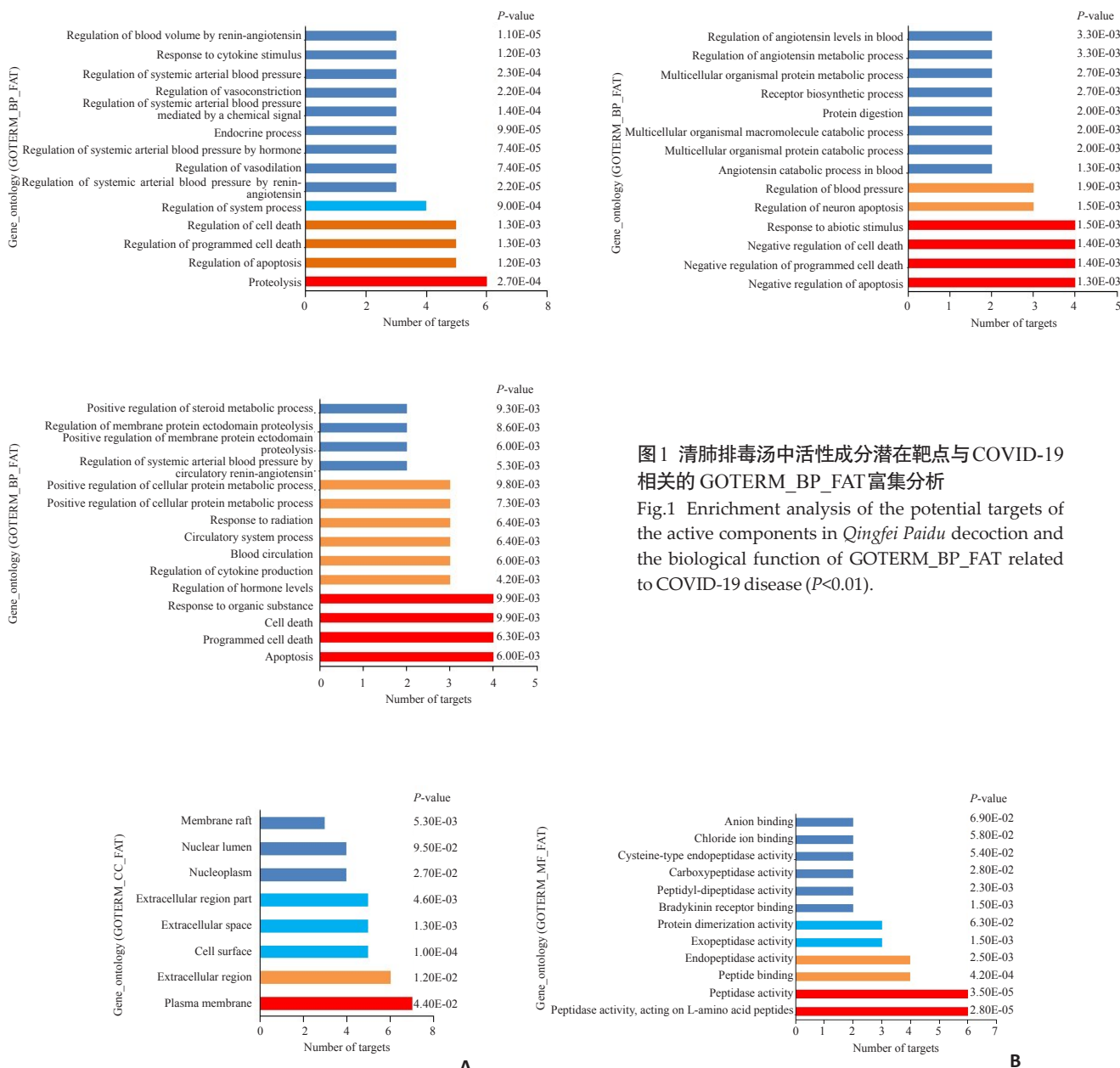


图1 清肺排毒汤中活性成分潜在靶点与 COVID-19 相关的 GOTERM_BP_FAT 富集分析
 Fig.1 Enrichment analysis of the potential targets of the active components in *Qingfei Paidu* decoction and the biological function of GOTERM_BP_FAT related to COVID-19 disease ($P < 0.01$).

图2 清肺排毒汤中活性成分潜在靶点与 COVID-19 相关的 GOTERM_CC_FAT(A) 和 GOTERM_MF_FAT(B) 富集分析
 Fig.2 Enrichment analysis of the potential target of active components in *Qingfei Paidu* decoction and the biological function of GOTERM_CC_FAT(A) and GOTERM_MF_FAT(B) related to COVID-19.

过激活 ACE、ACE2 靶点蛋白发挥作用。在清肺排毒汤中涉及到 ACE、ACE2 靶点蛋白的核心(代表性)活性成分有 MOL000519、MOL000554、MOL004798、MOL004824、MOL010428、MOL013443 等。为此,通过分子对接技术初步探讨核心活性成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶晶体结构(PDB ID:6LU7)的亲合力。配体与受体间低能量的稳定构象预示着二者间有较大的作用可能性。一般以结合能 ≤ -5 kJ/mol 作为筛选标准。本文以 SYBYL-X 2.1.1 对接软件进行分子对接,获得 Total Score 分值,换算成结合自由能(公式 $\Delta G_0 = -2.303 RT \times \text{TotalScore}$,其中 R 为分子的理想气体常数,T 为理想气体的热力学温度)^[17]。分子对接结果表明,MOL000519

(来自半夏)结合能为 -36.36 kJ/mol、MOL000554(来自冬花)结合能为 -41.56 kJ/mol、MOL004798(来自麻黄)结合能为 -29.80 kJ/mol、MOL004824(来自甘草)结合能为 -36.53 kJ/mol、MOL010428(来自紫菀)结合能为 -19.16 kJ/mol、MOL013443(来自枳实)结合能为 -11.67 kJ/mol。清肺排毒汤中核心活性成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的结合能均远小于 -5.0 kJ/mol (图 4)。

3 讨论

本研究借助 TCMSP、SwissTargetPrediction、CoolGen、GeneCards 等数据库,对清肺排毒汤中麻

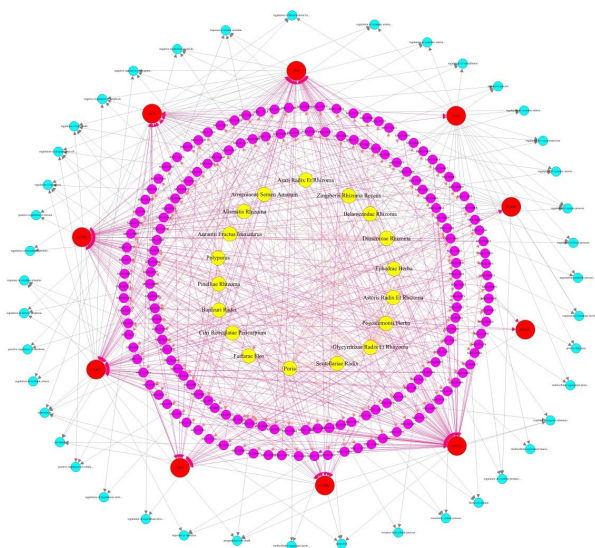


图3 清肺排毒汤中药味(●)-活性成分(●)-靶点蛋白(●)-生物学功能(●)网络图

Fig.3 Network diagram of medicinal ingredients (●)-active component (●)-target protein (●)-biological function (●) in Qingfei Paidu decoction.

黄、甘草等21味药及所涉及的活性成分进行网络药理学分析,发现了与COVID-19相关的蛋白靶点,并对蛋白靶点进行了KEGG通路注释分析和GO富集分析,采用Gephi软件将筛选出的清肺排毒汤中的18味药163个活性成分及10个蛋白靶点和42条生物学功能构建活性成分-蛋白靶点-生物学功能网络,发现清肺排毒汤具有多靶点、多种生物学功能的作用特点。

从KEGG富集分析结果可得知,清肺排毒汤用于COVID-9治疗主要涉及的信号通路有:RAS信号通路、细胞凋亡等信号通路。COVID-19与SARS-CoV具有79.5%的同源性,其受体都是ACE2^[18]。作为SARS-CoV-2细胞内受体的ACE2是SARS-CoV-2感染、入侵机体的关键分子^[19]。它在肺、心脏和肾脏中高度表达,主要定位在这些器官的大动脉、小动脉和小静脉内皮细胞上^[20-21]。与ACE2受体最为相关的信号通路为RAS系统。RAS系统既存在于循环系统中,也存在于血管壁、心脏、肺部、中枢、肾脏和肾上腺等组织内。SARS-CoV-2可下调ACE2的表达,使细胞因子(尤其促炎因子)表达升高,诱发炎症风暴,出现全身炎症反应,加重病情的发展^[22-23]。SARS-CoV-2感染还可能导致淋巴细胞凋亡^[24]。

国家卫生健康委员会印发的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第7版)》(国卫办医函[2020]184号)强调,COVID-19重症患者严重者可快速进展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和出凝血功能障碍及多器官功能衰竭^[7]。ARDS中的ACE/AGTR1具有促进ARDS炎症反应、肺细胞凋亡及肺纤维化的作用,而ACE2/Ang1-7能抑制ACE/

AGTR1的促进ARDS炎症反应等作用,并且ARDS存在肺组织局部RAS稳态失衡^[25]。TNF是炎症的中心细胞因子之一,能促进肺水肿的形成^[26]。李鑫等^[27]研究表明,COVID-19的S蛋白可能存在Furin蛋白酶切位点,从而导致COVID-19的感染机制不同于SARS等大部分Beta冠状病毒。鉴于清肺排毒汤良好的治疗COVID-19效果,结合网络药理学结果,由此推测,清肺排毒汤可能通过麻黄、半夏、甘草、冬花、紫菀、枳实等药味中的MOL000519、MOL000554、MOL004798、MOL004824、MOL010428、MOL013443等多种化学成分作用于ACE、ACE2、AGTR1、TNF、FURIN等靶点蛋白,利用RAS信号通路和细胞凋亡信号通路抑制炎症反应、细胞凋亡发挥治疗COVID-19作用。

《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第7版)》(国卫办医函[2020]184号)的病理改变项下,根据有限尸检及穿刺组织病理观察,发现肺门淋巴结淋巴细胞数量较少,可见坏死;心肌细胞可见变性、坏死等。COVID-19重症患者多在发病1周后出现呼吸困难和/或低氧血症,静息状态下,指氧饱和度 $\leq 93\%$ 即可确诊为重型。血氧饱和度持续降低,会引发脏器衰竭,受损的不仅有肺,还可能由于心肌能量物质匮乏,诱发线粒体结构和功能的失衡,使得线粒体依赖的细胞凋亡途径激活,引起心肌细胞变性坏死,这种由细胞线粒体的功能异常或损伤所致内源性凋亡途径也被称为线粒体途径^[27]。Caspase是一类与凋亡密切相关的蛋白水解酶家族^[28],活化的Caspase可水解底物,并通过级联放大诱发凋亡^[29]。CASP3、CASP6在细胞凋亡效应中起着关键作用,且CASP3可激活CASP6。当CASP3被激活后,作用于Bcl-2家族某些成员如Bad,进而引起宿主细胞内的结构蛋白及DNA稳定被破坏,引起细胞凋亡^[30]。结合网络药理学结果,清肺排毒汤中麻黄、甘草、黄芩等14药味中的MOL004798、MOL000500、MOL004798、MOL000228等42个成分可能通过细胞凋亡信号通路影响心肌细胞中CASP3、CASP6蛋白的表达,从而抑制心肌细胞凋亡,改善心肌细胞变性、坏死,发挥治疗COVID-19或干预COVID-19病变过程作用。

肾素-血管紧张素系统是人体内重要的体液调节系统,对心血管功能稳态、电解质和体液平衡的维持以及血容量、血管张力和血压调节方面具有重要作用。肾素作为蛋白水解酶,主要由肾近球细胞合成和分泌,可水解血中的血管紧张素原,使其成为10肽的且无生理活性的血管紧张素I,在ACE作用下转化成8肽的血管紧张素II或在ACE2作用下,生成血管紧张素I-9。AGTR1是已知最强的缩血管活性物质之一。血管紧张素作用于血管平滑肌,可使全身微动脉收缩,动脉压升高,刺激肾上腺皮质球状带分泌醛固酮,使水钠潴留,继

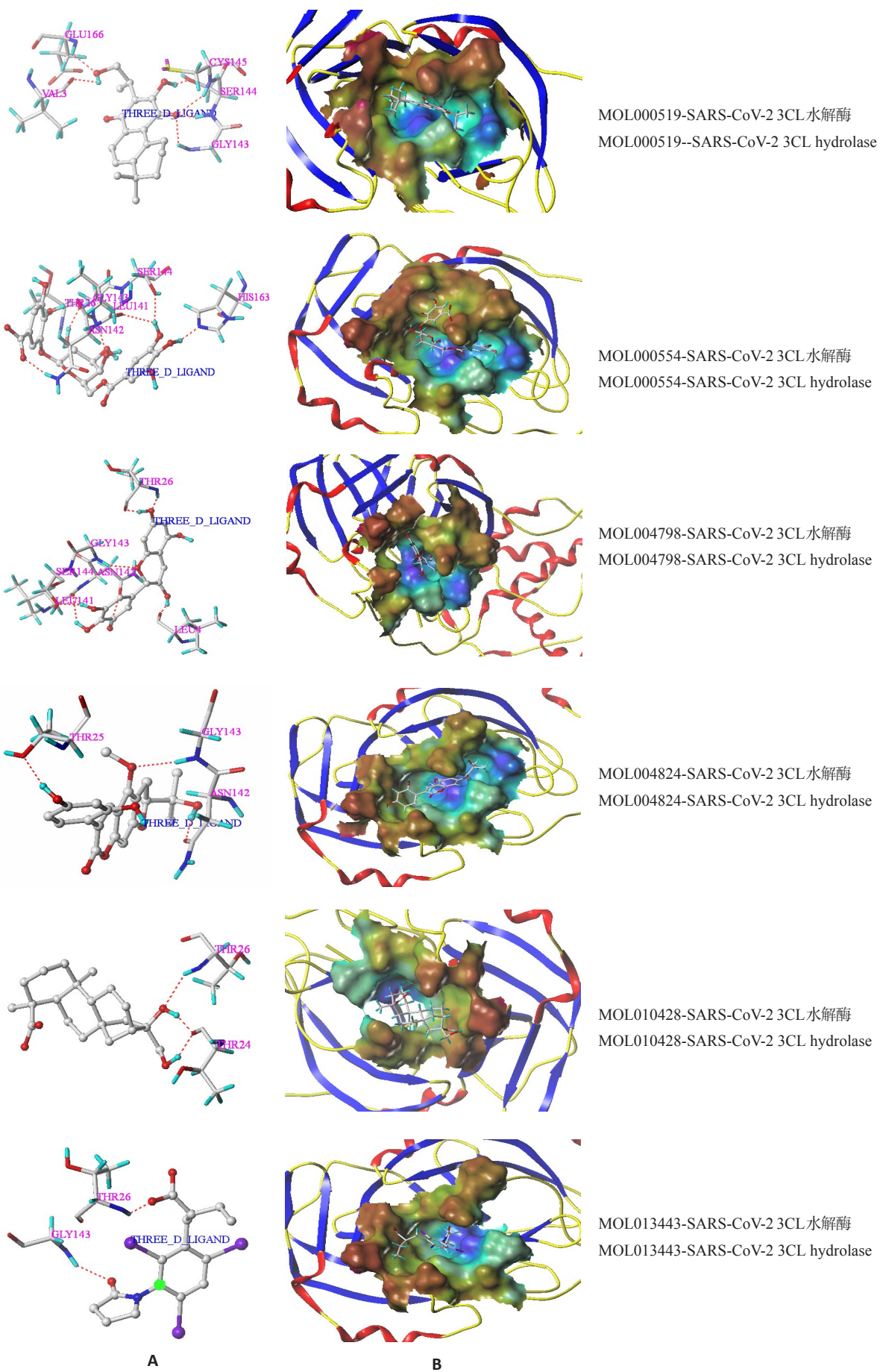


图4 核心活性成分与SARS-CoV-2 3CL水解酶二维(A)及三维(B)分子对接模式

Fig.4 Two-dimensional (A) and three-dimensional (B) docking models of the core active component and the SARS-CoV-2 3CL hydrolase.

而引起血容量增加,收缩血管,使血压升高。结合网络药理学结果可知,在生物学功能上,以 $P<0.0001$ 的GOTERM_BP_FAT为例,清肺排毒汤主要作用于AGTR1、ACE、ACE2等靶点蛋白通过肾素-血管紧张素对血容量的调节、肾素-血管紧张素对全身动脉血压的调节、血管舒张调节、激素对全身动脉血压的调节作用、内分泌过程等生物学功能发挥治疗COVID-19或干预COVID-19病变过程作用。

初步分子对接结果显示,麻黄、半夏、甘草、冬花、紫菀、枳实等药味中的MOL000519、MOL000554、MOL004798、MOL004824、MOL010428、MOL013443等核心活性成分与SARS-CoV-2 3CL水解酶的结合能均小于-5KJ/mol,结合活性较高,发生作用程度较大,来自麻黄、半夏、甘草、冬花、紫菀、枳实等药味中的核心活性成分可能为清肺排毒汤通过RAS信号通路治疗COVID-19的部分物质基础。

综上所述,在网络药理学技术和分子对接技术的指导下,以清肺排毒汤中的18味药163个活性成分与相关靶蛋白、信号通路、生物学功能的网状关联为基础,可为清肺排毒汤多成分、多靶点、多途径、多生物学功能治疗COVID-19的更广泛更深入研究提供参考。

参考文献:

- [1] Zhou YD, Hou Y, Shen JY, et al. Network-based drug repurposing for human coronavirus [J]. MedRxiv, 2020. DOI: 10.1101/2020.02.03.20020263.
- [2] Zhang DH, Wu KL, Zhang X, et al. In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus[J]. J Integr Med, 2020, 18(2): 152-8.
- [3] 邓燕君, 刘博文, 贺桢翔, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索藿香正气口服液预防新冠病毒肺炎(COVID-19)活性化合物研究[J]. 中草药, 2020, 51(5): 1113-22.
- [4] 姚运秀, 贺桢翔, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的抗病毒颗粒治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在物质基础研究[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1386-96.
- [5] 蒋鹏飞, 李书楠, 刘培, 等. 全国各地区新型冠状病毒肺炎中医防治方案分析[J/OL]. 中医学报, 2020: 1-20 [2020-04-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.R.20200302.1856.010.html>.
- [6] 国家中医药管理局. 关于推荐在中西医结合救治新型冠状病毒感染的肺炎中使用“清肺排毒汤”的通知[EB/OL]. [2020-02-07]. <http://yzs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-02-07/12876.html>.
- [7] 国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知[EB/OL]. [2020-03-04]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [8] 王饶琼, 杨思进, 谢春光, 等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎的临床疗效观察[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 13-8.
- [9] 路志正, 路喜善. “清肺排毒汤”彰显中医药抗疫疗效与自信[J/OL]. 中医杂志, 2020: 1-2 [2020-04-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200302.0930.002.html>.
- [10] 鄢海燕, 邹纯才. 瓜蒌中三萜及其苷类成分的网络药理学研究[J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(4): 288-94.
- [11] 邹纯才, 鄢海燕, 王莉丽, 等. 基于网络药理学分析瓜蒌阿司匹林配伍抗血小板聚集和抗血栓的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8): 1654-9.
- [12] 吴昊, 王佳琪, 杨雨薇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术初步探索“清肺排毒汤”抗新型冠状病毒肺炎作用机制[J]. 药学学报, 2020, 55(3): 374-83.
- [13] 赵静, 田赛赛, 杨健, 等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨[J]. 中草药, 2020, 51(4): 829-35.
- [14] Chen CN, Lin CP, Huang KK, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 C-like protease activity by theaflavin-3, 3'-digallate (TF3)[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2(2): 209-15.
- [15] 马青云, 刘辰, 杜海涛, 等. 基于高通量分子对接虚拟筛选 SARS-CoV-2 3CL 水解酶中药小分子抑制剂及抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的中药及其复方预测[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1397-405.
- [16] 宗阳, 丁美林, 贾可可, 等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究[J]. 中草药, 2020, 51(4): 836-44.
- [17] 樊启猛, 杨岩涛, 肖美凤, 等. 基于分子对接技术的补阳还五汤成分与缺血性卒中靶点的相互作用研究[J]. 中草药, 2019, 50(17): 4200-8.
- [18] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature, 2020, 579(7798): 270-3.
- [19] Yan RH, Zhang YY, Li YN, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2[J]. Science, 2020, 367(6485): 1444-8.
- [20] Crackower MA, Sarao RN, Oudit GY, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function[J]. Nature, 2002, 417(6891): 822-8.
- [21] Oudit GY, Crackower MA, Backx PH, et al. The role of ACE2 in cardiovascular physiology[J]. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13(3): 93-101.
- [22] 张岩, 唐德志, 舒冰, 等. 基于肾素-血管紧张素系统评析新冠病毒致多脏器损伤作用及中药干预作用[J/OL]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020: 1-7 [2020-04-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5699.R.20200216.1533.002.html>.
- [23] 宗阳, 丁美林, 马世堂, 等. 以血管紧张素转换酶 II (ACE2) 为受体挖掘治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)潜在中药及单体成分[J]. 中草药, 2020, 51(5): 1123-9.
- [24] Xiong Y, Liu Y, Cao L, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 761-70.
- [25] 林化, 李超乾. 肾素-血管紧张素系统在急性呼吸窘迫综合征发生发展中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(22): 100-3.
- [26] 罗琴, 何庆. TNF 凝集素样结构域: 高原肺水肿药物治疗新选择[J]. 心血管病学进展, 2019, 40(9): 1301-4.
- [27] 李鑫, 段广有, 张伟, 等. 2019 新型冠状病毒 S 蛋白可能存在 Furin 蛋白酶切位点[J/OL]. 生物信息学, 2020: 1-9 [2020-04-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1513.Q.20200224.1809.002.html>.
- [28] 梁俭, 骆杰炉, 蔡庆群, 等. 基于不同 Caspase 凋亡通路的玄参环烯醚萜总苷抑制心肌梗死模型大鼠心肌细胞凋亡的作用机制研究[J]. 中国药房, 2019, 30(6): 735-40.
- [29] 王晓君, 刘祥, 王开拓, 等. P38 Caspase-6 的结构与功能研究[C]. 第三届中国结构生物学学术讨论会论文摘要集, 2010: 81.
- [30] 刘晓婷, 张沂, 顾立刚, 等. 流感病毒 H1N1 感染 A549 细胞诱导凋亡及黄芩苷干预作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(7): 936-9.

(编辑:孙昌朋)