

化湿败毒方治疗新型冠状病毒肺炎的药理学机制探讨和网络药理学研究

赖庆来,梁爱武*,何妙仪,黄小玉,吴伟泳

广西中医药大学附属瑞康医院,南宁 530011

摘要:本文旨在探讨化湿败毒方治疗 COVID-19 的现代药理学研究并运用网络药理学方法预测化湿败毒方治疗 COVID-19 的作用机制。通过查阅文献及临床报道,总结化湿败毒方治疗 COVID-19 现代药理学研究。通过 TCMSD 数据库获取化湿败毒方的主要活性化合物及对应靶点并利用 GeneCards 数据库获取 COVID-19 的疾病靶点。使用 STRING 数据库构建蛋白互作网络并对核心靶点进行 GO 富集和 KEGG 通路分析,利用 Cytoscape3.7.0 软件构建化合物-靶标网络。最后把主要核心化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶及 ACE2 受体进行分子对接。现代药理学研究表明,化湿败毒方有抗炎、抗病毒和调节免疫作用。结果筛选到 261 个中药靶点,251 个疾病相关靶点,药物和疾病靶点取交集得到关键靶点 49 个。GO 富集包括 1 547 条生物过程、29 条细胞组分以及 86 项分子功能,KEGG 通路富集得 156 条通路与 COVID-19 相关($P < 0.05$),涉及卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒感染、人巨细胞病毒感染、甲型流感、IL-17 通路、TNF 通路、AGE-RAGE 通路等相关通路。预测出主要的核心化合物有槲皮素、木犀草素、山奈酚、汉黄芩素、柚皮素、 β -谷甾醇、黄芩素等,在整个网络中发挥着关键作用。分子对接结果显示槲皮素、木犀草素、山奈酚与 3CL 水解酶和 ACE2 均有较好的结合。本研究较为全面揭示了化湿败毒方治疗 COVID-19“多成分、多靶点、多通路”的特点,为深入探讨化湿败毒方治疗 COVID-19 的作用机制提供参考依据。

关键词:化湿败毒方;新型冠状病毒肺炎;现代药理学;网络药理学;作用机制

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)6-0909-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.6.002

Pharmacological mechanism and network pharmacology research of Huashibaidu formula in treating COVID-19

LAI Qing-lai, LIANG Ai-wu*, HE Miao-yi, HUANG Xiao-yu, WU Wei-yong

Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of traditional Chinese Medicine, Nanning 530011, China

Abstract: This article aims to explore the modern pharmacological study of Huashibaidu formula in treating COVID-19 and apply the network pharmacology method to predict the mechanism of Huashibaidu formula in treating COVID-19. In order to summarize the modern pharmacological study of Huashibaidu formula in the treatment of COVID-19, the literature and clinical reports were consulted. In order to obtain the main active compounds and corresponding targets of Huashibaidu formula, the TCMSD database was applied. The Gene Cards database was used to obtain the disease targets of COVID-19. The STRING database was used to construct protein interaction networks and the core targets were subjected to GO enrichment and KEGG pathway analysis. Cytoscape3.7.0 software was used to construct compound-target networks. The core compound was molecularly docked with SARS-CoV-2 3CL hydrolase and ACE2 receptor. The modern pharmacological studies have shown that Huashibaidu formula have the effect of anti-inflammatory, anti-viral and immune-modulating. 261 traditional Chinese medicine targets, 251 disease-related targets and 49 key targets were obtained by the intersection of drugs and disease targets. GO enrichment includes 1 547 biological processes, 29 cellular components and 86 molecular functions. KEGG pathway enrichment resulted in 156 pathways related to COVID-19 ($P < 0.05$), involving Kaposi's sarcoma-associated herpes virus infection, human

cytomegalovirus infection, influenza A, IL-17 pathway, TNF pathway, AGE-RAGE pathway and other pathways. It is predicted that the main core compounds are quercetin, luteolin, kaempferol, begonin, naringenin, β -sitosterol, baicalein, etc., which play a key role in the entire network. The results of molecular docking showed that quercetin, luteolin, kaempferol had a good combination with 3CL hydrolase and ACE2. This study reveals the characteristics of "Huashibaidu formula" in treating COVID-19 "multi-component, multi-target, multi-channel", which provide a reference for in-depth discussion of the mechanism of action of Huashibaidu Decoction in the treatment of COVID-19.

Key words: Huashibaidu formula; COVID-19; pharmacology; network pharmacology; mechanism

2019年底湖北省武汉市出现新型冠状病毒肺炎(简称新冠肺炎)的疫情,此次疫情比较严重,传染性极强,传染源主要为新型冠状病毒感染患者和无症状感染者。2020年1月31日,世界卫生组织正式将其命名为COVID-19^[1]。国家卫生管理部门采取重要措施,发布了COVID-19相关方诊疗方案,要求发挥中医中药治疗和预防作用,并且加强中医和西医相互联合治疗作用,共同发挥各自优势,使此次医疗救治取得最好效果。从医学角度分析,此次COVID-19病位主要在肺脾,病机特点主要以“湿、热、毒”相关,根据病情特点提出分期辩证论治^[2]。而中医临床具有辨证论治的特色优势,能够因人制宜采取不同的治疗措施。

化湿败毒方是国家卫生健康委员会和国家中医药管理局联合发布的《新冠肺炎诊疗方案(试行第七版)》治疗推荐方,用于COVID-19辨证为疫毒闭肺证的治疗。该证临床主要表现为发热、咳嗽、痰黄或痰中带血、气喘、乏力、口干苦、恶食欲差、大便不畅,小便短赤,舌红、苔黄腻、脉滑数。化湿败毒方在临床中运用效果明显,目前此方已由黄璐琦院士为领队的第一批国家援鄂抗疫中医医疗队(中国中医科学院)研制成化湿败毒颗粒。2020年3月18日,化湿败毒颗粒获临床试验批件。化湿败毒方传承了中医理论的精华,由麻杏石甘汤、藿香正气散、宣白承气汤、葶苈大枣泻肺汤多个经典名方加减而来。但化湿败毒方对COVID-19的作用机制尚未能明确阐明,对化湿败毒方的有效应用带来了局限。本研究对化湿败毒方治疗COVID-19的现代药理学机制进行探讨,然后运用网络药理学方法预测化湿败毒方治疗COVID-19的作用机制研究,并借助分子对接技术进行验证,旨在为中医药治疗COVID-19的研究提供进一步科学依据。

1 材料与方法

1.1 化湿败毒方现代药理学机制研究

查阅文献以及临床报道,总结化湿败毒方治疗COVID-19药理学研究。

1.2 有效成分的收集及潜在靶点的预测

以化湿败毒方中单味中药标准名称为检索词,在TCMSP(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)数据库检索化湿败毒方的全部化学成分,根据药代动力学(ADME):口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$,类药性(DL) ≥ 0.18 进行筛选^[3],得到化湿败毒方有效成分和相应的靶标蛋白。COVID-19靶点的预测,以“Novel Coronavirus Pneumonia”为关键词,检索GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库,选择物种为“Homo sapiens”,检索出与COVID-19相关的基因。

1.3 化湿败毒方治疗COVID-19潜在作用靶点预测

通过R语言3.6.2程序取交集将药物预测的靶点与疾病的靶点进行映射,获得“化湿败毒方”治疗COVID-19的潜在作用靶点,并绘制韦恩图。

1.4 交集靶标的蛋白网络互作(PPI)构建

为明确潜在作用靶点之间的相互作用关系,将得到的共同靶点导入STRING(<https://string-db.org/>)网络平台数据库,物种仅限于“智人”,置信度 >0.9 为条件进行筛选,获得蛋白互作关系。通过Cytoscape3.7.0软件构建并可视化PPI交互网络,根据PPI中节点的平均“degree”值为最低标准筛选核心蛋白。

1.5 基因富集分析

为了深入了解化湿败毒方治疗COVID-19的生物过程及通路信息,利用R语言3.6.2程序基于“bioconductor”数据包提取信息,对靶点进行GO(geneontology)生物学过程富集分析和KEGG(KEGG pathway analysis)通路富集分析,筛选条件设定阈值 $P < 0.05$,得到靶点蛋白在基因功能和信号通路中的作用。

1.6 构建化合物-靶点网络图

将收集的药物,活性成分及收集的交叉靶点,利用Cytoscape3.7.0软件绘制“构建化合物-靶点网络图”。

1.7 成分-靶点分子对接

从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 SARS-CoV-2 3CL 水解酶 (PDB ID: 6LU7) 和血管紧张素转化酶 II (ACE2) (PDB ID: 1R42) 的 3D 结构 PDB 格式文件, 利用 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库下载化湿败毒方排名前三活性成分的 3D 结构, 使用 Autodock-4.2 软件进行。将蛋白导入, 并对其加氢、加电荷等处理, 然后将受体和配体进行分子对接, 最后利用 PyMOL 对结果进行分析及可视化。

2 结果

2.1 化湿败毒方现代药理学研究

虽然新冠肺炎的发生机制尚不明确, 但病毒感染及感染后的炎症过程是明确的, 因此, 抗炎与抗病毒是治疗的关键, 化湿败毒方由麻杏石甘汤、藿朴夏苓汤、宣白承气汤、葶苈大枣泻肺汤多个经典名方加减而来, 这些方剂大部分均有抗炎及抗病毒作用。

2.1.1 抗炎作用

相关研究研究表明, 麻杏石甘汤可以减轻肺部炎症, 主要通过提高机体的免疫能力, 调节细胞因子的表达和分泌相关方面, 可以明显改善流感病毒性肺炎小鼠的一般状况^[4]。化湿败毒方中藿朴夏苓汤, 在抗炎、调节免疫具有重要作用, 研究表明, 藿朴夏苓汤具有抑制炎症作用, 能降低 TNF- α 、IL-6 等炎症细胞因子的含量, 抑制 NF- κ B 炎症通路的表达^[5]。化湿败毒方中宣白承气汤有抗炎作用, 可以改善重症肺炎患者的白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 水平, 从而提高免疫功能, 增强抗病能力^[6]。葶苈大枣泻肺汤可通过提高机体的免疫功能, 减轻血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8) 水平的影响, 从而减轻从而减轻肺部炎症^[7]。这些研究为化湿败毒方抗病毒作用

提供了依据。

2.1.2 抗病毒作用

化湿败毒方中麻杏石甘汤具有抗炎, 抗病毒和调节免疫功能等方面作用, 麻杏石甘汤发挥抗病毒作用主要表现在能够下调流感病毒感染的巨噬细胞 IFN- α 、IFN- β 分泌水平和蛋白表达水平^[8]。网络药理学研究表明, 麻杏石甘汤里面不同的化学成分, 作用在靶标蛋白上, 形成一个分子网络, 对病毒入侵、病毒复制及继发炎症因子造成多器官损伤起作用, 同时对侵袭过程进行截断, 以调控宿主免疫进行抗感染^[9]。现代药理研究发现, 藿朴夏苓汤中藿香, 其主要活性成分有广藿香醇、广藿香酮, 均具有显著的抗炎、抗病毒作用, 能很好抑制病毒的活性^[10]。网络药理学研究表明, 藿朴夏苓汤通过菲酮、黄芩苷、酸枣仁皂苷等主要活性化合物, 具有潜在的抗 SARS-CoV-2 作用, 可能通过阻断 SARS-CoV-2 病毒蛋白合成, 起到抗病毒治疗作用^[11]。

现代药理学研究也证实了该方中的多个构成方剂具有抗炎、抗病毒、调节免疫的功能, 是目前公认的治疗新冠肺炎疗效确切的中药方剂, 这些研究为化湿败毒方抗病毒作用提供了依据。

2.2 化湿败毒方在治疗 COVID-19 有效成分及其靶点筛选结果

通过检索 TCMSP 数据库最终筛选收集到化湿败毒方药物中 13 味药 (石膏未收集在数据库内), 共有 269 个有效活性成分纳入本次研究, 其中麻黄 23 个、苦杏仁 19 个、广藿香 11 个、厚朴 2 个、苍术 9 个、草果 8 个、半夏 13 个、茯苓 15 个、大黄 16 个、黄芪 20 个、葶苈子 12 个、赤芍 29 个、甘草 92 个, 部分关键活性化合物见表 1。对这些药物靶点预测, 去重后提取到靶点基因 261 个。

表 1 化湿败毒方部分活性化合物基本信息

Table 1 Part of active ingredients of Huashibaidu formula

材料 Herb	分子号 MOL ID	活性成分 Molecule name	口服生物利用度 OB (%)	类药性 DL
麻黄 Ephedra	MOL010788	Leucopelargonidin	57.97	0.24
	MOL002823	Herbacetin	36.07	0.27
	MOL000422	Kaempferol	41.88	0.24
	MOL000098	Quercetin	46.43	0.28
	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
	MOL001755	24-Ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76

续表1(Continued Tab. 1)

材料 Herb	分子号 MOL ID	活性成分 Molecule name	口服生物利用度 OB (%)	类药性 DL
杏仁 Almond	MOL005190	Eriodictyol	71.79	0.24
	MOL004328	Naringenin	59.29	0.21
	MOL010921	Estrone	53.56	0.32
	MOL010922	Diisooctyl succinate	31.62	0.23
	MOL002211	11,14-Eicosadienoic acid	39.99	0.20
	MOL002311	Glycyrol	90.78	0.67
	MOL004841	Licochalcone B	76.76	0.19
	MOL005017	Phaseol	78.77	0.58
藿香 <i>Agastache rugosa</i>	MOL007207	Machiline	79.64	0.24
	MOL012922	l-SPD	87.35	0.54
	MOL002879	Diop	43.59	0.39
	MOL005890	Pachypodol	75.06	0.40
	MOL005911	5-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanon	51.54	0.27
	MOL005916	Irisolidone	37.78	0.30
厚朴 Magnolia	MOL005918	Phenanthrone	38.70	0.33
	MOL005921	Quercetin7-O-β-D-glucoside	49.57	0.27
	MOL005970	Eucalyptol	60.62	0.32
	MOL005980	Neohesperidin	57.44	0.27
苍术 <i>Atractylodes lancea</i>	MOL000173	Wogonin	30.68	0.23
	MOL000184	Nsc63551	39.25	0.76
	MOL000186	Stigmasterol 3-O-beta-D-glucopyranoside_qt	43.83	0.76
	MOL000188	3β-acetoxyatracylone	40.57	0.22
	MOL000085	Beta-daucoesterol_qt	36.91	0.75
	MOL000088	Beta-sitosterol 3-O-glucoside_qt	36.91	0.75
	MOL000092	Daucoesterin_qt	36.91	0.76
	MOL000094	Daucoesterol_qt	36.91	0.76
草果 Tsaoko	MOL000073	Ent-Epicatechin	48.96	0.24
	MOL000074	(4E,6E)-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)hepta-4,6-dien-3-one	67.92	0.24
	MOL000085	Beta-daucoesterol_qt	36.91	0.75
	MOL000088	Beta-sitosterol 3-O-glucoside_qt	36.91	0.75
	MOL000096	(-) -Catechin	49.68	0.24
	MOL000098	Quercetin	46.43	0.28
	MOL001755	24-Ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76
半夏 Pinellia	MOL002670	Cavidine	35.64	0.81
	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
	MOL006936	10,13-Eicosadienoic	39.99	0.20
	MOL006937	12,13-Epoxy-9-hydroxynonadeca-7,10-dienoic	42.15	0.24
茯苓 <i>Poria cocos</i>	MOL000275	Trametenolic acid	38.71	0.80
	MOL000276	7,9(11)-Dehydropachymic acid	35.11	0.81

续表1(Continued Tab. 1)

材料 Herb	分子号 MOL ID	活性成分 Molecule name	口服生物利用度 OB (%)	类药性 DL
大黄 Rhubarb	MOL000282	Ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	43.51	0.72
	MOL000283	Ergosterol peroxide	40.36	0.81
	MOL000290	Poricoic acid A	30.61	0.76
	MOL000296	Hederagenin	36.91	0.75
	MOL000300	Dehydroeburicoic acid	44.17	0.83
	MOL002235	Eupatin	50.80	0.41
	MOL002251	Mutatochrome	48.64	0.61
	MOL002259	Physciondiglucoside	41.65	0.63
	MOL002260	Procyanidin B-5,3'-O-gallate	31.99	0.32
	MOL002281	Toralactone	46.46	0.24
黄芪 Astragalus	MOL002280	Torachrysone-8-O-beta-D-(6'-oxayl)-glucoside	43.02	0.74
	MOL002293	Sennoside D_qt	61.06	0.61
	MOL002303	Palmidin A	32.45	0.65
	MOL000471	Aloe-emodin	83.38	0.24
	MOL000211	Mairin	55.38	0.78
	MOL000239	Jaranol	50.83	0.29
	MOL000296	Hederagenin	36.91	0.75
	MOL000354	Isorhamnetin	49.60	0.31
	MOL000371	3,9-Di-O-methylinsolin	53.74	0.48
	MOL000378	7-O-Methylisomucronulatol	74.69	0.30
葶苈子 Lepidium seed	MOL000392	Formononetin	69.67	0.21
	MOL000398	Isoflavanone	109.99	0.30
	MOL000422	Kaempferol	41.88	0.24
	MOL000439	Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	49.28	0.62
	MOL000098	Quercetin	46.43	0.28
	MOL002211	11,14-Eicosadienoic acid	39.99	0.20
	MOL000296	Hederagenin	36.91	0.75
	MOL000358	Beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL003908	Cynotoxin	99.94	0.78
	MOL001918	Paeoniflorgenone	87.59	0.37
赤芍 Red Peony	MOL001925	Paeoniflorin_qt	68.18	0.40
	MOL000358	Beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL004355	Spinasterol	42.98	0.76
	MOL000492	(+)-Catechin	54.83	0.24
	MOL006992	(2R,3R)-4-methoxyl-distylin	59.98	0.30
	MOL007003	Benzoyl paeoniflorin	31.14	0.54
	MOL007004	Albiflorin	30.25	0.77
	MOL007014	8-Debenzoylpaeonidanin	31.74	0.45
	MOL007022	EvofolinB	64.74	0.22

续表 1(Continued Tab. 1)

材料 Herb	分子号 MOL ID	活性成分 Molecule name	口服生物利用度 OB (%)	类药性 DL
甘草 Licorice	MOL007025	Isobenzoylpaeoniflorin	31.14	0.54
	MOL002883	Ethyl oleate (NF)	32.40	0.19
	MOL005043	Campestan-5-en-3beta-ol	37.58	0.71
	MOL005012	Licoagroisoflavone	57.28	0.49
	MOL004948	Isoglycyrol	72.67	0.59
	MOL000098	Quercetin	46.43	0.28

2.3 COVID-19 潜在靶点的预测

通过检索 GeneCards 数据库, 得到 COVID-19 相关靶标有 251 个。将化湿败毒方和 COVID-19 潜在

靶点进行映射取交集共得到 49 个交叉靶点,即化湿败毒方治疗 COVID-19 潜在作用靶点(见图 1)。

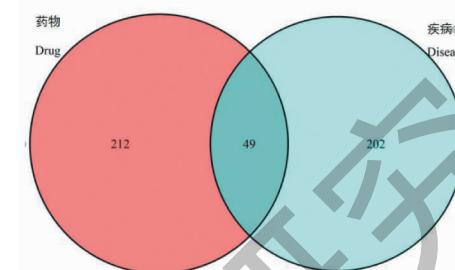


图1 化湿败毒方与COVID-19 鞣点的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram analysis of Huashibaidu formula and COVID-19

2.4 PPI 网络与核心靶点

化湿败毒方 PPI 网络图(图 2)。图中共涉及 49 节点、576 条边, 其中节点越大度值越大, 边的粗细反应连接评分, 边越粗评分越高, 关系越密切, 颜色由蓝变黄程度与度值和介值均呈正相关。靶蛋白平均节点度值为 12.25, 超过平均度值的靶蛋白有 20 个, 对排名前 30 的靶点蛋白进行统计并绘制条

形图(图3)。结果显示IL6、MAPK8、MAPK1、IL1B、RELA、CASP3等靶蛋白可能是化湿败毒方防治COVID-19疾病的潜在关键靶点。

2.5 GO 生物功能注释及 KEGG 通路富集

利用 R 语言 3.6.2 程序基于 bioconductor 等数据包提取信息, 设定阈值 $P < 0.05$, GO 富集分析包括 1547 条生物过程 (biological process, BP)、29 条

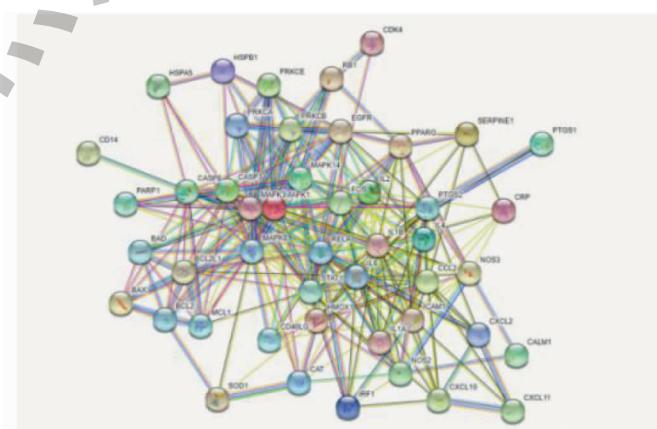


图 2 化湿败毒方作用 COVID-19 交集靶点的 PPI 网络

Fig. 2 Protein-protein interaction network of Huashibaidu formula

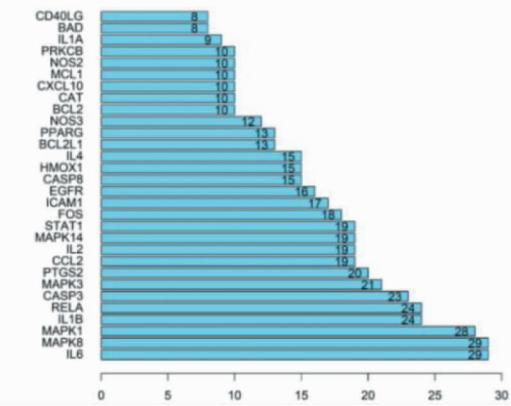


图3 化湿败毒方作用 COVID-19 关键核心靶蛋白

Fig. 3 Key targets of Huashibaidu formula

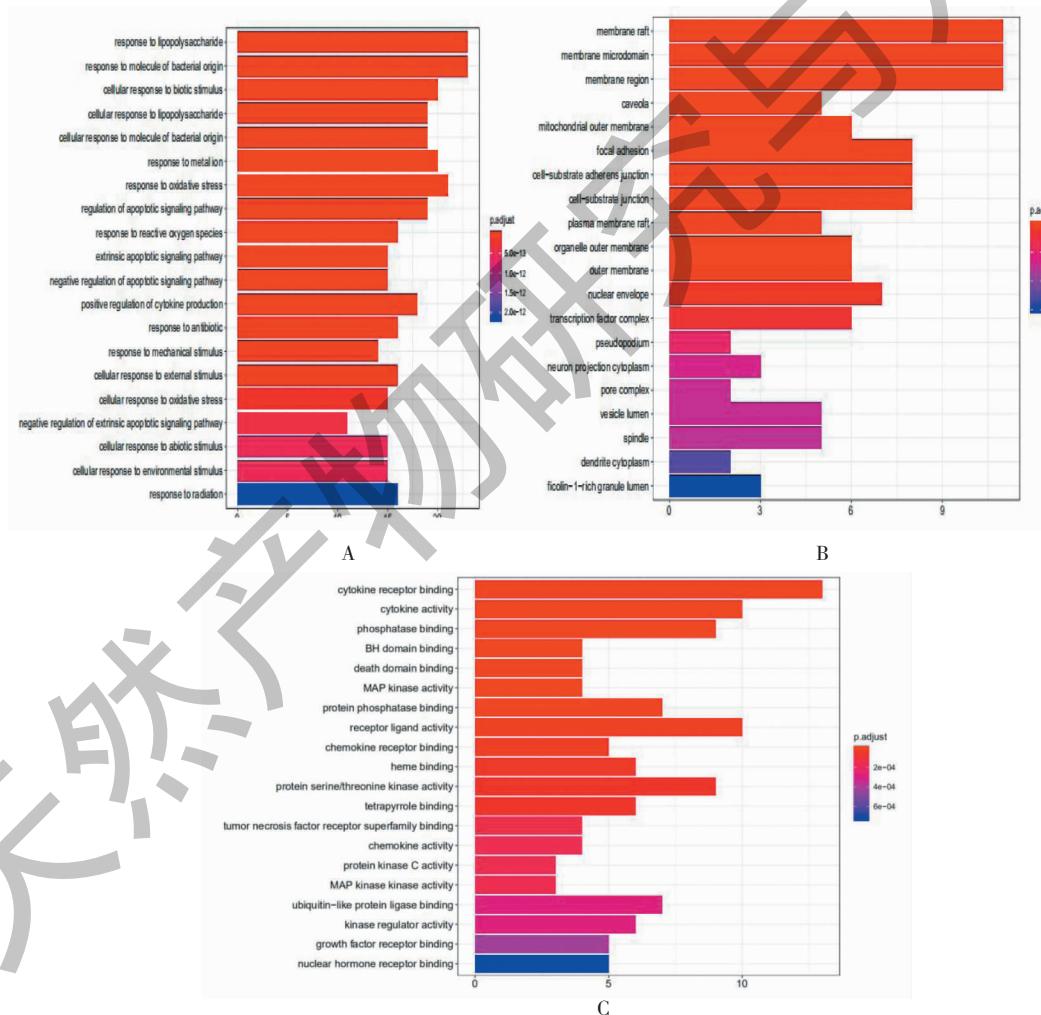


图4 核心靶点的 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of core targets

细胞组分(cellular component, CC)以及 86 项分子功能(molecular function, MF)。对排名前 20 的 GO 富

集分析,如图 4(A-C)所示。

BP 分析(图 4A)可以看出,这些靶点主要涉及

对脂多糖的反应、细胞对细菌来源分子的反应,细胞对生物刺激的反应,氧化应激反应等生物过程。

CC 分析(图 4B)可以看出,靶点主要涉及膜筏、膜微结构域、膜区、粘着斑等细胞组分。

MF 分析(图 4C)中可以看出,靶点主要涉及细胞因子受体结合、细胞因子活性、磷酸酶结合,BH 结构域结合、死亡域、磷酸酶结合等分子功能。

根据设定阈值 $P < 0.05$ 为筛选条件,KEGG 通

路富集筛选得到 156 条信号通路,以富集基因数目进行排序,排名前 20 的通路(如图 5)所示,主要富集在卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒感染、人巨细胞病毒感染、甲型流感、IL-17 通路、TNF 通路、AGE-RAGE 通路等,这些通路发挥抗病毒、抗炎、免疫调节等作用,说明化湿败毒方主要活性成分的作用靶点分布在不同的代谢通路,多成分、多靶点相互调节是治疗 COVID-19 的可能机制。

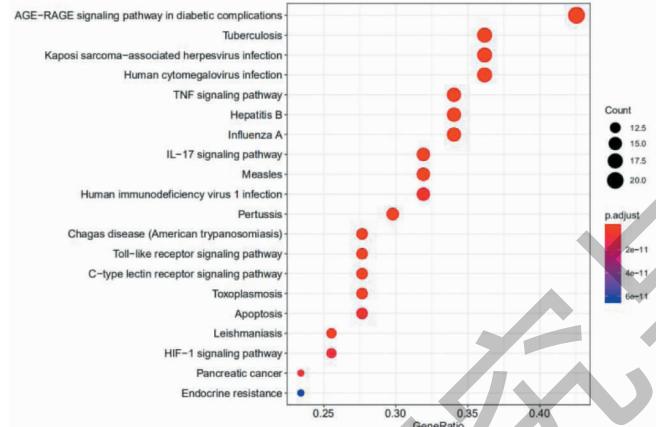


图 5 核心靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of core targets

2.6 化合物-靶点网络图

将收集的药物的活性成分及收集的交叉靶点,利用 Cytoscape3.7.0 软件绘制“化合物-靶点”网络

图。如(图 7)所示,长方形代表化湿败毒方预测靶点活性成分,椭圆形代表活性成分,节点之间的边表示成分与靶点之间的相互作用关系。根据网络拓扑

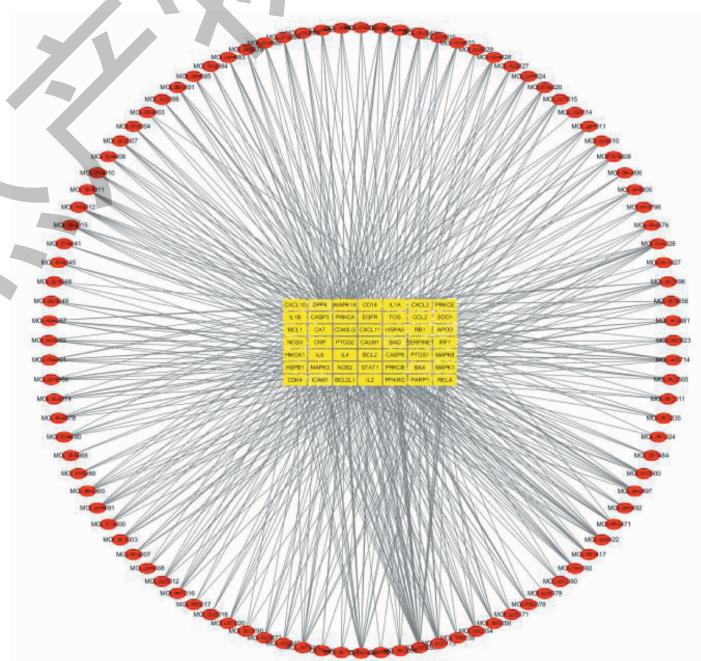


图 6 化合物-靶点网络图

Fig. 6 Component-target network of Huashibaidu formula

分析结果,以节点度值的平均数作为筛选标准,同时参考其中心度值,对化学成分和靶点进行排序,其中排名较前主要核心化合物为:槲皮素、木犀草素、山奈酚、汉黄芩素、柚皮素、 β -谷甾醇、黄芩素等,靶点排名较前主要有 IL6、MAPK8、MAPK1、IL1B、RELA、CASP3 等靶点。

2.7 化湿败毒方有效成分作用于 COVID-19 3CL 水解酶及 ACE2 的分子对接结果

一般配体与受体结合的构象稳定时能量越低,发生的作用可能性大,一般以结合能(binding ener-

gy) ≤ -5.0 kJ/mol 为筛选标准,本文将网络拓扑分析所得度值排名前三的核心化合物(因石膏未收集在 TCMSP 数据库,此处将石膏有效成分碳酸钙纳入分子对接进行筛选)与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶及 ACE2 受体进行分子对接,对接结果显示(表 2),提示排名前三核心化合物与受体结合活性较高,对接情况(图 8)所示。并与目前临床使用的抗病毒药物洛匹那韦、瑞德西韦比较,其结合能未见显著差异。由此可见这些核心化合物与受体蛋白形成构象能量低,结构稳定,结合活性较高。

表 2 化湿败毒方活性成分与 3CL 水解酶和 ACE2 的对接结果

Table 2 Molecular docking of 3CL hydrolase and ACE2 with active components in Huashibaidu formula

化合物 Composition	分子式 Molecular formula	分子质量 Molecular mass(g/mol)	结合能 Affinity (kcal/mol)	
			3CL 水解酶 3CL hydrolase	血管紧张素转化酶 II ACE2
槲皮素 Quercetin	C15H10O7	302.25	6.57	8.21
木犀草 Luteolin	C15H10O6	286.24	6.94	7.82
山奈酚 Kaempferol	C15H10O6	286.25	7.25	8.52
碳酸钙 CaCO ₃	CaH4O6S	100.09	3.68	3.62
洛匹那韦 Lopinavir	C37H48N4O5	628.8	5.85	8.25
瑞德西韦 Remdesivir	C27H35N6O8P	602.58	6.78	7.56

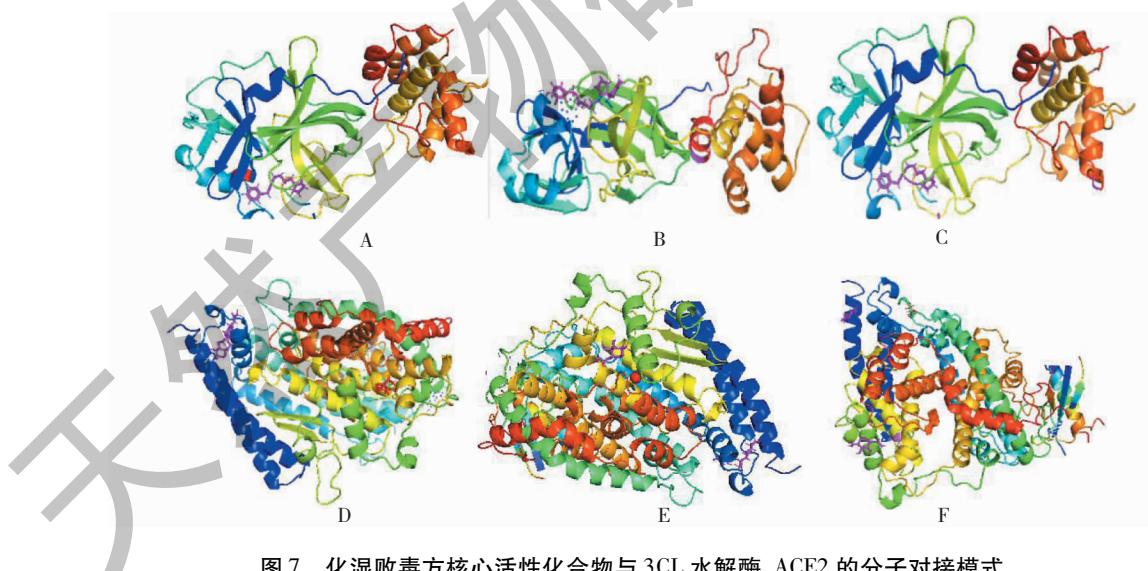


图 7 化湿败毒方核心活性化合物与 3CL 水解酶、ACE2 的分子对接模式

Fig. 7 Molecular docking diagram of 3CL and ACE2 with core compounds of Huashibaidu formula

注:A:槲皮素与 3CL 水解酶;B:木犀草素与 3CL 水解酶;C:山奈酚与 3CL 水解酶;D:槲皮素与 ACE2;E:木犀草素与 ACE2;F:山奈酚与 ACE2。Note: A: Quercetin-3CL hydrolase; B: Luteolin-3CL hydrolase; C: kaempferol-3CL hydrolase; D: Quercetin-ACE2; E: Luteolin-ACE2; F: kaempferol-ACE2.

3 讨论

COVID-19 为感受“疫疠”之邪而发生的一种急

性传染病,目前根据全国疫情流行情况,结合临床症状分析可将 COVID-19 归属于中医“疫病”范畴^[2]。

目前临床 COVID-19 可分为轻型、普通型、重型、危重型四个分型,其中重型 COVID-19 的治疗非常关键,是疾病好转或者加重的分岭点,如果不能及时有效治疗可能发展为危重型,甚至出现死亡。重型 COVID-19 推荐使用化湿败毒方治疗,此方具有攻补兼施,扶正祛邪作用,发挥中医扶正与祛邪治疗的特点,有效缓解病情,最终达到治愈疾病的目标^[19]。中医药在治疗传染病中有较好的预防和治疗作用,中医药以其独特的疗效起到重要作用,引起关注和肯定。在此次疫情防治工作中,中医药显示了独特的优势。

本研究采用网络药理学的方法筛选出化湿败毒方核心化合物主要有槲皮素、木犀草素、山奈酚、汉黄芩素、柚皮素、 β -谷甾醇、黄芩素等。其中槲皮素度值最大,靶点数最多,说明其作用可能最显著。槲皮素主要作用有消炎、抗病毒和免疫调节等药理学作用,其作用机理主要阻止病毒受体复合物不能进入细胞,从而导致病毒死亡^[12]。木犀草素具有抗病毒、消炎、抗氧化等相关方面作用,相关动物研究实验表明,木犀草素可减少肿瘤坏死因子 α 的释放,同时还有抑制肺组织间的炎症作用^[13]。研究发现,山奈酚能通过降低 MAPK、NF- κ B 等通路的活性来抑制 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的相关炎症因子表达水平,起到抗炎作用^[14]。汉黄芩素可抑制体内补体系统的过度激活,改善病毒导致急性肺部损伤的作用^[15]。柚皮素作用功能多,具有抗炎、抗病毒、抗氧化、抗纤维化、免疫调节等多种药理活性^[16]。 β -谷甾醇和黄芩素均具有抗炎、抗病毒、抗氧化、免疫等药理作用^[17,18]。综上化湿败毒方的主要化合物基本都具有抗病毒、抗炎、调节免疫力的作用。

为了进一步进行分子对接以寻求化湿败毒方治疗 COVID-19 的物质基础,将排名前三的核心化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶及 ACE2 受体进行分子对接。而研究发现,SARS-CoV-2 是一种 RNA 冠状病毒,其通过 3CL 水解酶,将病毒复制酶多聚蛋白转化成功能蛋白^[19],而 SARS-CoV-2 进入宿主细胞主要依靠血管紧张素转换酶 2(ACE2)受体^[20],因此,通过抑制 SARS-CoV-2 3CL 水解酶及 ACE2 受体有着重要的意义。从对接结合能和对接模式来看筛选的槲皮素、木犀草素、山奈酚化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 均有较好的结合,可能是化湿败毒方防治 COVID-19 主要物质基础。此外,槲皮素、木犀草素、山奈酚结合能与阳性对照药

洛匹那韦、瑞德西韦、利托那韦均较接近,进一步证明化湿败毒方活性成分与 3CL 水解酶及 ACE2 受体具有良好结合活性。

为了探讨化湿败毒方治疗 COVID-19 分子机制,预测出的关键靶点有 IL6、MAPK8、MAPK1、IL1B、RELA 等。研究表明,IL6、IL1B 在 RT-PCR 和 Western blotting 法检测中,H1N1 感染组中 IL6I、L1B 表现上调^[21]。MAPK8 和 MAPK1 是丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族成员之一,它们在包括氧化应激、病毒感染等相关内环境应激下被激活^[22]。RELA 是 NF- κ B 的家族成员之一,RELA 在中性粒细胞的凋亡中发挥着重要的作用^[23]。所以化湿败毒方可能调控这些细胞炎性因子以及相关趋化因子的活性,进而影响炎性反应。

从 GO 生物过程富集结果显示化湿败毒方治疗 COVID-19,主要涉及炎症应答、氧化还原过程、免疫应答等生物过程,这些生物过程在化湿败毒方治疗 COVID-19 中起到了关键作用。KEGG 通路富集主要涉及富集在卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒感染、人巨细胞病毒感染、甲型流感、IL-17 通路、TNF 通路、AGE-RAGE 通路等,其中卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒感染、人巨细胞病毒感染、甲型流感等通路与 COVID-19 感染源相似,即病毒感染。而肿瘤坏死因子信号通路、白介素-17 信号通路均是炎症反应中其重要作用的通路^[24]。以上结果提示化湿败毒方可能通过抗病毒、抗炎、免疫调节等途径起到治疗 COVID-19 的作用。

综上所述,本研究基于现代药理学机制进行探讨,然后运用网络药理学方法预测化湿败毒方治疗 COVID-19 的作用机制研究,并借助分子对接技术进行靶点验证,揭示了化湿败毒方治疗 COVID-19“多成分、多靶点、多通路”的特点,但是由于网络分析具有一定的局限性,对现阶段对本病发生、进展等机制机理的尚不清楚,仍然需要通过进一步的实验证。

参考文献

- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. Lancet, 2020, 395:497-506.
- Yang Y, Gao PY, Huang QS, et al. To explore the prevention and treatment of COVID-19 based on “Yidujiashi” theory

- [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med(中医药理与临床)*, 2020,36(1):1-6.
- 3 Ru JL, Li P, Wang JN, et al. TCMSP:a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminformatics*,2014,6(1):13.
- 4 Li L, Wu JM, Ouyang JJ, et al. Study on screening and mechanism of effective Chinese medicine for influenza virus pneumonia[J]. *Chin J Immunol(中国免疫学杂志)*,2018, 34:1168-1173.
- 5 Zhong YH, Zhang GH, Lin Z, et al. The effect and mechanism of huopo xialing tang in diabetic nephropathy rats[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理)*,2017,28:622-627.
- 6 Gao Y. Observation of curative effect of xuanbai chengqi decoction in treating severe pneumonia due to phlegm-heat syndrome[J]. *China Pract Med(中国实用医药)*, 2020, 15 (7):184-186.
- 7 Duan X, Zhou C. Effect of tingli dazao xiefei decoction on serum levels of TNF- α , IL-6, IL-8 in patients with pulmonary contusion[J]. *Modern J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志)*,2016,25:1034-1036.
- 8 Zhang SY, He GL, Lu FG, et al. Mechanism research of anti influenza virus of ephedra decocted earlier maxing shigan decoction from the expression level of IFN- α/β protein mediated by TLR7/8[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志)*,2019,34:1188-1193.
- 9 Bai C, Liu TG, Xu JN, et al. Comparison of the mechanism of yinqiao powder combined with modified sangju decoction, modified maxing shigan decoction and antiviral western medicine based on network pharmacology:taking the mild influenza in early winter of 2018 as an example[J]. *J Tradit Chin Med(中医杂志)*,2019,60:928-934.
- 10 Peng SZ, Li G, Qin Z, et al. Effect of different extract parts of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth on *in vivo* anti-influenza virus[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2011,22:2578-2579.
- 11 Fan MY, Liu J, Sun R. Analysis on material basis and efficacy network of huopo xialing decoction in treating damp pathogen stagnation of lung syndrome of early COVID-19[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*,2020,51:2297-2306.
- 12 Ma N, Li YJ, Fan JP, et al. Research progress on pharmacological action of quercetin[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报)*,2018,20(8):221-224.
- 13 Kotanidou A, Xagorari A, Bagli E. Luteolin reduces lipopolysaccharide-induced lethal toxicity and expression of proinflammatory molecules in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2002,165:818-823.
- 14 Dong X, Fu J, Yin X, et al. Emodin:a review of its pharmacology toxicity and pharmacokinetics [J]. *Phytother Res*, 2016,30:1207-1218.
- 15 Wu Y, Jing YZ, Zhang S, et al. Effect and mechanism of wogonin on NF- κ B nuclear translocation and expression in NR8383 cells infected by influenza virus[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*,2012, 18 (18): 161-165.
- 16 Meng SS, Lv FF, Hu XG, et al. Inhibition of naringenin on mucous hypersecretion of A549 cell induced by A2 strain of respiratory syncytial virus[J]. *J Wenzhou Med Univ(温州医科大学学报)*,2015,45:631-615.
- 17 Xiao ZB, Jia HX, Liu XL. Research status of β -sitosterol pharmacological activity[J]. *World Latest Med Inform(世界最新医学信息文摘)*,2015,15(8):66-68.
- 18 Yang J, Li RC. Inhibitory mechanism of baicalin on H5N1 influenza virus[J]. *Nat Prod Res(天然产物研究与开发)*,2016,28:266-270.
- 19 Liu CX, Yi XL, Wang YL, et al. Understanding coronavirus (SARS-CoV-2) and thinking about strategy of antiviral drug development[J]. *Drug Eval Res(药物评价研究)*,2020, 43:361-371.
- 20 Batlle D, Wysocki J, Satchell K. Soluble angiotensin-converting enzyme 2:a potential approach for coronavirus infection therapy. *Clinical Science*,2020,134:543-545.
- 21 Ge SJ, Liu XT, Zhang Y, et al. Investigation of extraorgan intervention of combination of shufeng-xuanfei formula and Jiebiaoqingli formula on the secretory action of influenza viruses H1N1-induced inflammatory cytokines[J]. *Hebei Med J (河北中医)*,2015,37:863-866.
- 22 Panteva M, Korkaya H, Jameel S. Hepatitis viruses and the MAPK pathway:is this a survival strategy? [J]. *Virus Res*, 2003,92(2):131-140.
- 23 Huang J, Zhu LM, Zhu YQ. The relationship between KLF2/ RelA imbalance and neutrophil apoptosis in asthmatic patients[J]. *Chin J Respir Crit Care Med(中国呼吸与危重症监护杂志)*,2018,17(1) :1-5.
- 24 Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis[J]. *Semin Immunopathol*,2017,39:365-383.