

# 基于处方挖掘与药效团模型的新型冠状病毒 RdRp 抑制成分筛选

李婧<sup>1,2</sup>, 韦缤琪<sup>1</sup>, 李可馨<sup>1</sup>, 苏学燕<sup>1,3</sup>, 张志峰<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>西南民族大学药学院; <sup>2</sup>四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041;

<sup>3</sup>四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 成都 610225

**摘要:**本研究采用药效团模型对作用于新型冠状病毒(SARS-CoV-2)RdRp 靶点的常用中药成分进行筛选, 寻找潜在活性成分。对临床常用抗新冠肺炎中药处方进行全面挖掘及筛选, 分析统计常用药材及使用频数, 利用中药系统药理学分析平台(TCMSP)及文献挖掘的方式筛选“抗新冠候选活性成分”, 以已报道的具有RdRp 酶抑制活性的化合物作为训练集, 建立基于RdRp 配体的 HipHop 药效团模型, 将候选成分与药效团进行匹配, 采用分子对接技术对匹配到 FitValue 较高的化合物与 SARS-CoV-2 病毒 RdRp 蛋白进行对接并评估其相互作用。共搜集到临床常用中药处方 31 个, 包含药材 92 种。通过 TCMSP 及文献挖掘得到药材中 1 384 种候选活性成分。通过测试集验证的最优药效团 02 具有 1 个氢键供体及 2 个氢键受体, 与候选成分匹配得到 104 种潜在 RdRp 抑制活性成分。选取 FitValue 较高且结合自由能较低的前 30 种化合物进行分析, 发现 liquiritin apioside、iridin、liquiritin、forsythiaside、procyanidin B-5, 3'-O-gallate 及 saikosaponin C 等成分具有较高的 FitValue, 可作为 RdRp 抑制的潜在活性成分。通过分类分析发现黄酮类结构可能是抑制 RdRp 的潜在活性基团。本研究通过构建药效团模型对常用抗新冠中药处方中抑制 SARS-CoV-2 RdRp 潜在活性成分进行了虚拟筛选, 希望对抗 SARS-CoV-2 活性成分筛选提供参考思路。

**关键词:**新型冠状病毒疾病; SARS-CoV-2; RdRp 抑制剂; 中药处方; 药效团; 分子对接

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)12-1981-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.12.001

## Screening of RdRp inhibitors against SARS-CoV-2 based on prescription mining and pharmacophore

LI Jing<sup>1,2</sup>, WEI Bin-qi<sup>1</sup>, LI Ke-xin<sup>1</sup>, SU Xue-yan<sup>1,3</sup>, ZHANG Zhi-feng<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Southwest Minzu University; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

<sup>3</sup>Sichuan Provincial Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology Engineering Laboratory, Chengdu 610225, China

**Abstract:** In order to screen the potential RdRp inhibitors against SARS-CoV-2 based on prescription mining and pharmacophore. A comprehensive mining and screening of commonly used prescriptions was conducted and the use frequency of Chinese herbal medicines was calculated. The active components were screened by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP) and literature mining. RdRp ligand-based pharmacophore model was set up by collecting published literature. The constituents from candidate active ingredients were screened for the potential RdRp inhibitors through matching with the best pharmacophore model. Molecular docking was used to evaluate the interactions between potential active compounds and SARS-CoV-2 RdRp protein. A total of 31 prescriptions including 92 kinds of herbs were collected. One thousand three hundred and eighty-four compounds were collected by TCMSP and literature mining. The optimized pharmacophore model, which was validated by test set, contained one hydrogen bond donor and two hydrogen bond acceptor. One hundred and four potential RdRp inhibitory constituents from candidate active ingredients were matched with the optimized pharmacophore model. The top 30 compounds with higher FitValue and lower binding free energy were selected for the analysis. Liquiritin ap-

收稿日期: 2020-08-12 接受日期: 2020-10-19

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1712501); 四川省科技厅应用基础项目(2020YJ0277); 西南民族大学大学生创新创业训练计划(S202010656130)

\*通信作者 Tel: 86-013882291149; E-mail: zhangzhf99@gmail.com

ioside, iridin, liquiritin, forsythiaside, procyanidin B-5, 3'-O-gallate, and saikosaponin C showed higher FitValue and lower binding energy, which were considered as potential active compounds. Flavonoids may be the potential active structure of RdRp inhibitors. A pharmacophore model was constructed to screen the potential RdRp inhibitors from commonly used prescriptions, in order to provide some ideas for screening the active components against SARS-CoV-2.

**Key words:** novel coronavirus pneumonia; SARS-CoV-2; RdRp inhibitors; prescription of traditional Chinese Medicine; pharmacophore; molecular docking

2019 年 12 月,一种新型冠状病毒疾病在武汉市暴发,截止到 2020 年 10 月 21 日,全世界已累计有 4 000 多万人被感染,死亡 110 万余人,给全世界人民的生命和健康构成巨大威胁,目前已被世界卫生组织(WHO)评估认定为进入全球大流行状态。2020 年 2 月 11 日,WHO 将该疾病命名为新型冠状病毒疾病(COVID-19),是一种由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的急性感染性肺炎<sup>[1]</sup>,患者初始症状多为呼吸道症状、发热、咳嗽、气促和呼吸困难等,重症患者可导致肺炎、严重急性呼吸综合征、肾衰竭,甚至死亡<sup>[2]</sup>。2020 年 3 月 4 日,国家卫健委发布了《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》<sup>[3]</sup>,治疗主要采用  $\alpha$ -干扰素、洛匹那韦/利托那韦、利巴韦林、磷酸氯喹、阿比多尔等抗病毒药物治疗,同时推荐采用连花清瘟胶囊、清肺排毒汤等中药联合治疗。然而,目前针对 SARS-CoV-2 感染尚无特效药物,因此,研究针对抗 COVID-19 疗效显著的新治疗方法和药物十分迫切。

COVID-19 具有强烈的传染性和流行性,以“湿、热、毒、瘀”为主要特征,治疗原则为早治疗、早诊断,重祛邪,防传变<sup>[4]</sup>。根据《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》推荐中药包括:清肺排毒汤、藿香正气胶囊、金花清感颗粒、连花清瘟胶囊、疏风解毒胶囊、喜炎平注射液以及多种中药复方<sup>[3]</sup>。在临床实践中,各大医院根据其临床经验及病人的情况采用中西药结合进行个性化治疗,也总结出一系列具有较好临床疗效的中药处方。这些复方的疗效经过了临床检验,在我国抗 COVID-19 的过程中发挥了独特的作用,为寻找抗新冠活性成分提供了丰富的物质和理论基础。

SARS-CoV-2 是一种 RNA 病毒,病毒自身编码的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp),在病毒的 RNA 复制过程中起到关键作用。因此 RdRp 抑制剂可作为抗 RNA 病毒的广谱抗病毒药物<sup>[5]</sup>,目前疗效明确的新冠 RdRp 抑制剂包括瑞德西韦、利巴韦林及法匹拉韦<sup>[6]</sup>等。近期“清华大学-上海科技大学抗新冠病毒联合攻关

团队”在全世界率先成功解析新型冠状病毒“RdRp-nsp7-nsp8 复合物”近原子分辨率的三维空间结构,揭示了该病毒遗传物质转录复制机器核心“引擎”的结构特征,为开发针对新冠肺炎的药物奠定了重要基础。

药效团模型是一种基于配体的药物设计工具,从已知活性化合物的结构出发寻找共有的药效特征信息,从而指导新化合物的理性设计或虚拟筛选<sup>[7]</sup>。近年来,药效团模型被广泛应用于中药活性成分的筛选<sup>[8]</sup>。本文收集了目前几种疗效确切的 RdRp 小分子抑制剂作为训练集,利用 HipHop 方法建立三维药效团模型。将产生的药效团与常用抗新冠处方药材中活性成分进行匹配,预测“抗新冠候选活性成分”中具有潜在新冠病毒 RdRp 抑制作用的成分及其与该靶标的结合模式,并且建立一种快速高效的新冠病毒 RdRp 抑制剂筛查模型,为后续实验研究及临床应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 常用中药处方挖掘及药材候选活性成分数据库建立

根据《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》以及全国各地新型冠状病毒处方全面搜集抗新冠中药处方,根据研究报道筛选临床疗效较好的处方作为候选处方。根据对处方中的药材进行搜集及用药频次统计,以高频药材作为重点研究对象,建立候选药材数据库。通过中药系统药理学分析平台数据库(TCMSP)搜集候选药材数据库中每种药材的主要化学成分。以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ ,类药性(drug-like, DL)  $\geq 0.18$  为参考评估候选化合物。此外,在 CNKI 及 PubMed 数据库中查候选药材相关文献,搜集每种药材主要活性成分,与在 TCMSP 数据库筛选到的活性物质进行整合及确证,建立“抗新冠候选活性成分数据库”,并在 TCMSP 数据库及 PubChem 数据库下载化合物 3D 结构,确认结构无误后保存。

## 1.2 药效团的构建及验证

### 1.2.1 训练集化合物的选取及 HipHop 药效团模型建立

Discovery Studio 软件中 Pharmacophore 项下 Common Feature Pharmacophore Generation 模块可用于发现一系列配体小分子化合物共有的化学特征,根据这些共同特性结构比对叠合自动生成药效团模型<sup>[9]</sup>。参照 Liu 等<sup>[10]</sup>的药效团构建方法,本研究使用 Discovery Studio 2016 软件构建基于小分子配体的 HipHop 药效团模型。根据文献报道选取 6 个具有 RdRp 抑制活性的小分子化合物作为训练集<sup>[5,6,11,12]</sup>,训练集化合物结构及 RdRp 抑制活性( $EC_{50}$ )见图 1,其中 rbavirin、remdesivir、favipiravir 及 penciclovir 的  $EC_{50}$  值为对 SARS-CoV-2 抑制活性, Galidesivir 的  $EC_{50}$  值为对 SARS 病毒(SARS-CoV)抑制活性, sofosbuvir 的  $EC_{50}$  值为对丙型肝炎病毒

(HCV)的抑制活性。基于训练集中小分子的共同特征结构比对叠合自动生成药效团模型。将训练集中 SARS-CoV-2 RdRp 抑制活性最高的化合物瑞德西韦(remdesivir,  $EC_{50} = 0.77 \mu\text{M}$ )Principal 值预设为 2,作为建立药效团的建模时主要需参考配体的构象,其他 5 个化合物 Principal 值预设为 1,作为建立药效团的建模时次要需参考配体的构象。所有化合物 MaxOmitFeat 值设为 1,表示建模结果可以有一个特征元素与之不匹配。在 HipHop 模块输入参数时选择氢键受体(hydrogen bond acceptor, A)、氢键供体(hydrogenbond donor, D)、疏水基团(hydrophobic region, H)、正电中心(positive ionizable, PI)、芳环(ringaromatic, R)等 5 项作为药效团的特征元素,每个药效元素的范围设定为 0~5,药效团模型设定为采用 Best 模式进行叠合,经过运算后得出 10 个得分最高的药效团模型作为候选模型。

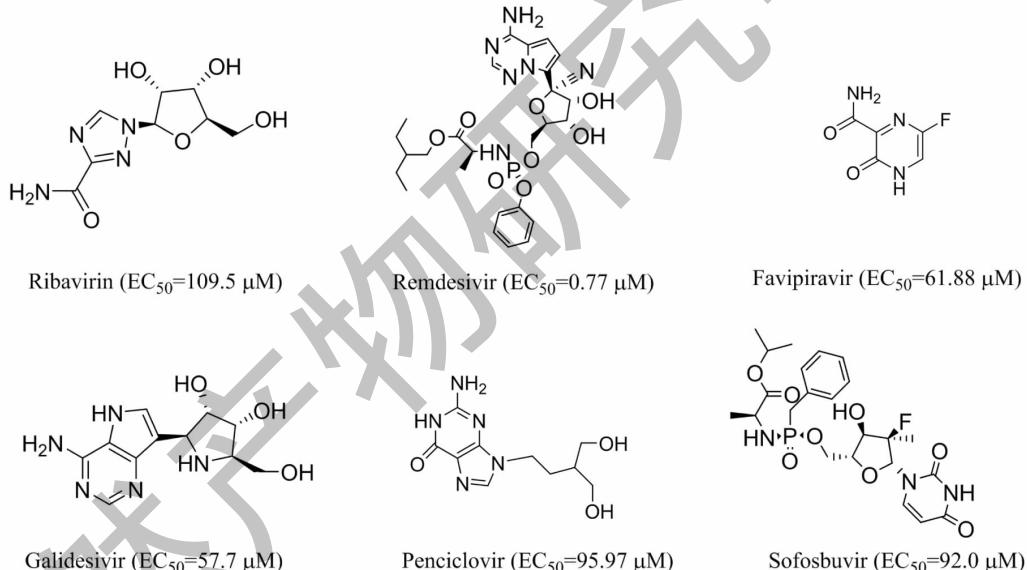


图 1 训练集化合物的结构与  $EC_{50}$

Fig. 1 Chemical structures and  $EC_{50}$  of training set compounds

### 1.2.2 药效团模型的评价验证

选取具有 RdRp 抑制活性的 6 种化合物和 30 种未见 RdRp 抑制活性报道的化合物组成测试集。用测试集化合物对药效团模型的性能进行评价,采用 Discovery Studio 中 Pharmacophore 项下的 Ligand Profiler 模块,选择 Best 模式进行评价,选取在评分值尽可能高的情况下与活性化合物匹配度高及与非活性化合物匹配度较低的药效团作为优选药效团模型。

### 1.2.3 基于药效团模型 SARS-CoV-2 RdRp 抑制活性成分虚拟筛选

得到优选药效团后,将“1.1”项中得到的“抗新冠候选活性成分数据库”中活性成分结构与优选药效团采用 Discovery Studio 进行匹配并分析结果。模式为 Best Search, MaxOmitFeat 值设为 0,其余为默认参数。选取匹配值(FitValue)较高的化合物作为潜在活性化合物。

### 1.3 潜在活性化合物的分子对接验证

将“1.2.3”中得到的潜在活性化合物小分子化合物3D坐标文件，在pymol中检查空间结构无误后，利用openbabel转换为pdb格式。将结构文件载入autodocktool 1.5.6程序，添加原子电荷，分配原子类型，所有柔性键均默认可旋转。保存为pdbqt格式，作为对接配体。本研究靶蛋白“SARS-CoV-2病毒RdRp-nsp7-nsp8复合物”蛋白结构由上海科技大学饶子和院士团队提供。采用AutoDock Tools1.5.6软件删除RdRp蛋白中水分子，分离配体和受体，添加非极性氢，计算Gasteiger电荷，保存为pd-bqt文件。根据研究报道的remdesivir与SARS-CoV-2病毒RdRp蛋白结合位点设置RdRp蛋白对接的Gridbox坐标及大小<sup>[13]</sup>。以SARS-CoV-2病毒RdRp蛋白作为受体，以潜在活性化合物为配体，采用AutoDock Vina进行分子对接，根据对接结果初步评价小分子配体与受体的结合情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 根据常用中药处方建立“抗新冠候选活性成分数据库”

根据《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》及全国各地新型冠状病毒常用处方筛选到31个中药处方作为候选处方。分析处方药材并进行药材使用频数统计，使用频数≥5的药材作为高频使用药材。共搜集到候选药材92种，其中高频使用药材21种，包括甘草、藿香、黄芩、麻黄、石膏、连翘、厚朴、黄芪、杏仁、白术、半夏、金银花、柴胡、苍术、茯苓、陈皮、生姜、草果、葶苈子、栀子及槟榔。以高频使用药材为重点搜集对象，通过TCMSP数据库以OB≥30%，DL≥0.18为标准筛选得到的候选活性成分与文献收集的主要成分及抗病毒活性成分相整合，共得到1384个候选成分，建立“抗新冠候选活性成分数据库”。候选活性成分筛选流程图见图2。

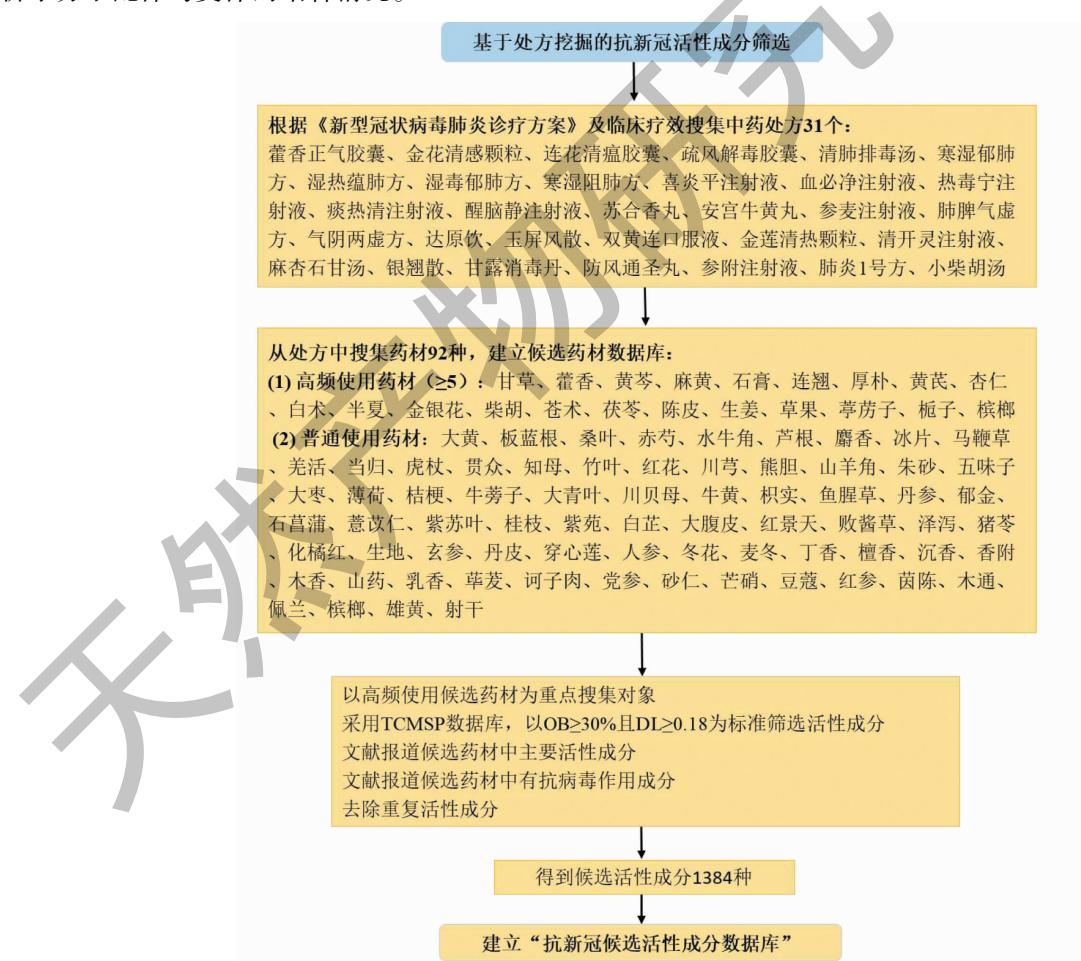


图2 抗新冠候选活性成分筛选流程图

Fig. 2 Screening flow chart of the candidate active ingredients against COVID-19

## 2.2 HipHop 药效团模型建立及验证

以训练集 6 个活性化合物采用 HipHop 方法共产生 10 个药效团模型,结果参数见表 1。评分值参考了训练集分子与药效团模型的匹配度,第 01、02、03、07、08、09 号药效团药效特征为 DAA,第 04、05、06、10 号药效团药效特征为 DDA,6 个化合物有 5 个与所有药效团完全匹配,1 个部分匹配。生成的 10 个药效团评分都超过了 40 分,说明测试集所选的分子共同特征较为明显,排前几位的药效团评分较为接近,因此结合图 3 中几种药效团打分情况,02 药效团打分(Rank)最高,故选择药效团 02 作为优选药效团模型进行后续研究。优选药效团模型如图 4A,由图可见,优选药效团 02 主要由 1 个氢键供体(HBD)和 2 个氢键受体(HBA)和构成。而整个模型的氢键供体与远端的氢键配体距离为 17.698 Å,对所匹配的小分子配体的尺寸有一定的限制作用。活性最强的化合物 remdesivir 与优选药效团的 FitValue 为 3.0,与药效团叠合效果见图 4B。

sivir、1004-galidesivir、1005-penciclovir、1006-sofosbuvir),其他 5 个化合物为非活性化合物。药效团 02 对于测试集中活性化合物的响应度较高,而对于非活性化合物的响应值较低,符合本研究对于药效团的要求,结合图 3 中几种药效团打分情况,02 药效团打分(Rank)最高,故选择药效团 02 作为优选药效团模型进行后续研究。优选药效团模型如图 4A,由图可见,优选药效团 02 主要由 1 个氢键供体(HBD)和 2 个氢键受体(HBA)和构成。而整个模型的氢键供体与远端的氢键配体距离为 17.698 Å,对所匹配的小分子配体的尺寸有一定的限制作用。活性最强的化合物 remdesivir 与优选药效团的 FitValue 为 3.0,与药效团叠合效果见图 4B。

表 1 10 个基于分子共同特征的药效团的结果参数

Table 1 The parameters of ten common features of pharmacophore

模型编号 Model number	特征 Feature	打分 Rank	完全匹配 Direct Hit	部分匹配 Partial Hit	匹配数 Max Fit
01	DAA	42.716	111110	1	3
02	DAA	42.716	111110	1	3
03	DAA	42.413	111110	1	3
04	DDA	42.056	111110	1	3
05	DDA	42.044	111110	1	3
06	DDA	42.044	111110	1	3
07	DAA	41.977	111110	1	3
08	DAA	41.977	111110	1	3
09	DAA	41.691	111110	1	3
10	DDA	41.655	111110	1	3

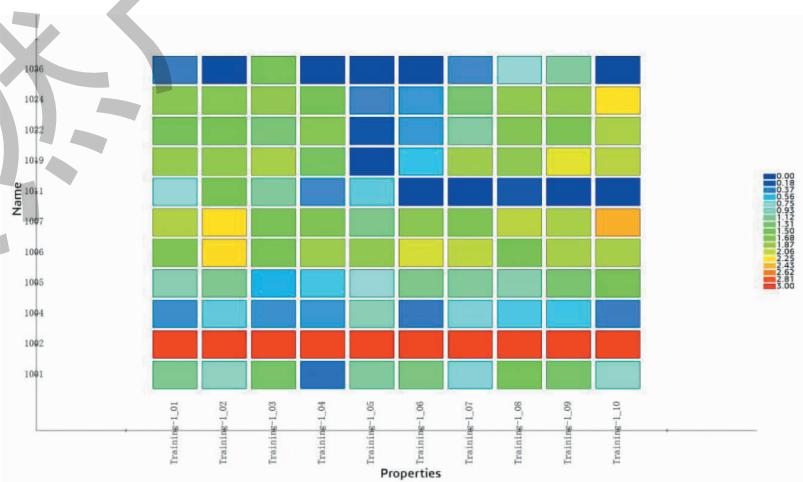


图 3 10 个生成的药效团对测试集分子的验证热图

Fig. 3 Heat map of 10 generated pharmacophore models evaluated by test set  
注:1001-Ribavirin;1002-Remdesivir;1004-Galidesivir;1005-Penciclovir;1006-Sofosbuvir。

表 2 候选活性成分中 FitValue 排名前 30 且结合自由能低于 remdesivir 的主要活性成分信息

Table 2 Basic information of the potential active ingredients in candidate active ingredients ranking according to FitValue (top 30) and binding free energy (< remdesivir)

分子 ID Mol ID	排名 Rank	化合物 Compound	匹配值 FitValue	结合自由能 Binding free energy (kcal/mol)	结构种类 Structure
MOL004953	1	Liquiritin apioside	2.850 63	- 8.6	黄酮
MOL012934	2	Iridin	2.839 91	- 8.2	黄酮
MOL004903	3	Liquiritin	2.834 59	- 7.4	黄酮
MOL003331	4	Forsythiaside	2.783 80	- 8.3	苯丙素
MOL002260	5	Procyanidin B-5,3'-O-gallate	2.778 06	- 9.1	黄酮
MOL004701	6	Saikosaponin C	2.775 67	- 9.3	五环三萜
MOL013383	7	Neohesperidin	2.774 77	- 8.3	黄酮
MOL000009	8	Cynaroside	2.773 17	- 7.9	黄酮
MOL003051	9	Veronicastraside	2.765 33	- 8.7	黄酮
MOL013289	10	Polydatin	2.726 65	- 7.8	其他
MOL004703	11	Saikosaponin E	2.725 95	- 8.9	五环三萜
MOL004637	12	Saikosaponin D	2.707 51	- 7.9	五环三萜
MOL005812	13	Naringin	2.682 90	- 7.9	黄酮
MOL001726	14	Pinoresinol-4-O-beta-D-apiosyl-beta-D-glucopyranoside	2.676 78	- 7.9	其他
MOL000004	15	Procyanidin B1	2.659 57	- 8.0	黄酮
MOL004636	16	Saikosaponin B	2.644 99	- 8.1	五环三萜
MOL007930	17	Hesperidin	2.638 23	- 8.8	黄酮
MOL000409	18	Astragaloside IV	2.632 31	- 8.4	其他
MOL003009	19	Ochnaflavone	2.619 31	- 9.2	黄酮
MOL004940	20	Neoliquiritin	2.610 43	- 7.5	黄酮
MOL001407	21	Crocin 2	2.603 05	- 8.0	其他
MOL000439	22	Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	2.601 78	- 7.9	黄酮
MOL004860	23	licorice glycoside E	2.591 99	- 7.5	黄酮
MOL000393	24	Soyasaponin I	2.581 41	- 8.8	五环三萜
MOL004635	25	Saikosaponin A	2.575 52	- 8.4	五环三萜
MOL006131	26	8-Gingerol	2.560 90	- 9.3	其他
MOL006501	27	Isochlorogenic acid B	2.542 04	- 7.3	苯丙素
MOL002322	28	Isovitexin	2.472 24	- 7.7	黄酮
MOL000415	29	Rutin	2.436 39	- 7.8	黄酮
MOL003118	30	Isochlorogenic acid C	2.412 99	- 7.4	苯丙素

### 2.3 优选药效团对“抗新冠活性成分数据库”中 SARS-CoV-2 RdRp 潜在抑制成分的虚拟筛选

用“2.1”中优选的 RdRp 抑制剂药效团模型对“1.1”中得到的“抗新冠活性成分数据库”中 1 384 种成分进行虚拟筛选, 命中 104 个化合物, 选取其 FitValue 排名前 30 的化合物 (FitValue > 2.3) 作为

新型冠状病毒 RdRp 潜在抑制活性成分进行后续研究, 潜在活性化合物信息见表 2, 表中为 FitValue 排名前 30 且与 RdRp 结合自由能低于 remdesivir (< - 7.2 kcal/mol) 的重要潜在活性化合物。药效团匹配到的 FitValue 最高的 6 种潜在活性化合物见图 5, 由图可见, 从图中可以看出 6 种化合物药效团的

3个特征元素都能很好地匹配,主要为酚羟基对应

氢键供体,羟基或羰基对应氢键受体。

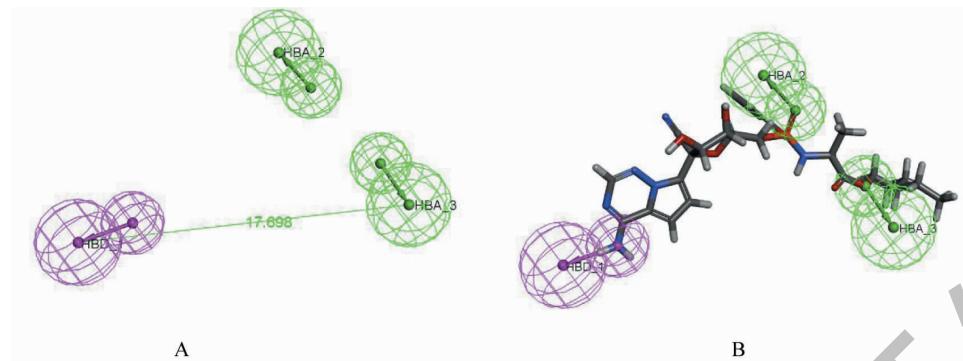


图 4 HipHop 产生的最优药效团模型 (A) 及其与 remdesivir 叠合结果 (B)

Fig. 4 The optimized pharmacophore model (A) and mapping of compound remdesivir on it (B)

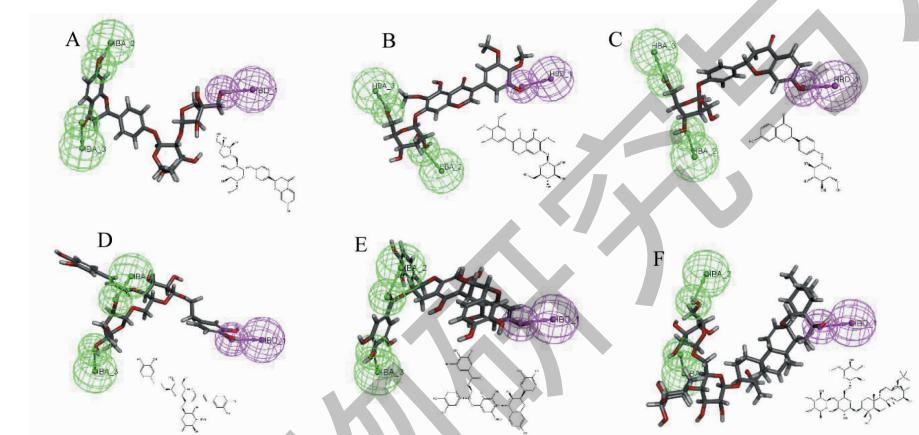


图 5 药效团 02 匹配到的候选成分中 FitValue 最高的 6 种潜在活性化合物

Fig. 5 The matching pattern diagram between pharmacophore model 02

and top 6 potential active constituents from candidate ingredients

注: A. Liquiritin apioside; B. Iridin; C. Liquiritin; D. Forsythiaside; E. Procyanidin B-5,3'-O-gallate; F. Saikosaponin C。

## 2.4 RdRp 抑制作用潜在活性成分分子对接验证

以“2.2”中得到的“抗新冠候选成分数据库”中 RdRp 抑制作用潜在活性成分为配体,以 SARS-CoV-2 病毒 RdRp 蛋白为受体,根据研究报道<sup>[13]</sup>的 remdesivir 与 SARS-CoV-2 病毒 RdRp 蛋白结合位点设置 RdRp 蛋白对接的 Gridbox 坐标及大小,配体设置为柔性,受体刚性,采用 AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接。选取打分最高(affinity 数值最低)的构象作为对接构象,利用 pymol 对对接构象进行可视化分析。每种活性成分对接结果几种结合构象中,选取结合能较低且构象较好的结果作为分子对接结果。分子对接结合自由能越小说明受体配体之间亲和力越大,我们以 remdesivir 与 RdRp 的结合自由能(-7.2 kcal/mol)作为参考来判定待测化合物的亲合力。候选成分中 RdRp 抑制作用潜在活性成分

对接结果见表 2(结合自由能低于 remdesivir)。FitValue 最高的 6 种潜在活性化合物与 SARS-CoV-2 病毒 RdRp 蛋白分子对接图如图 6。根据研究报道<sup>[13]</sup>,SARS-CoV-2 病毒 RdRp 蛋白与 remdesivir 结合的活性口袋位于 RdRp 复合物蛋白中心的空腔,潜在结合位点包括 545、555、682、623、687、691、759、760、761 等。由图 6 可见,以上 6 种化合物能与报道的 SARS-CoV-2 病毒 RdRp 蛋白中心活性口袋结合,并与以上关键结合位点中的多个发生了相互作用。图中 liquiritin apioside 及 iridin 均在 LYS-621 位点产生氢键作用;liquiritin apioside 及 procyanidin B-5,3'-O-gallate 均在 ASP-760 位点产生氢键作用;Iridin 及 procyanidin B-5,3'-O-gallate 均在 ASP-761 位点产生氢键作用;liquiritin apioside 及 forsythiaside 均在 ASP-164 位点产生氢键作用;liquiritin apioside

及 Iridin 均在 GLU-811 及 TRP-800 位点产生氢键作用; iridin 及 procyanidin B-5,3'-O-gallate 均在 LYS-798 位点产生氢键作用; iridin、procyanidin B-5,3'-O-gallate 及 saikosaponin C 均在 TYR-619 位点产生氢键作用。

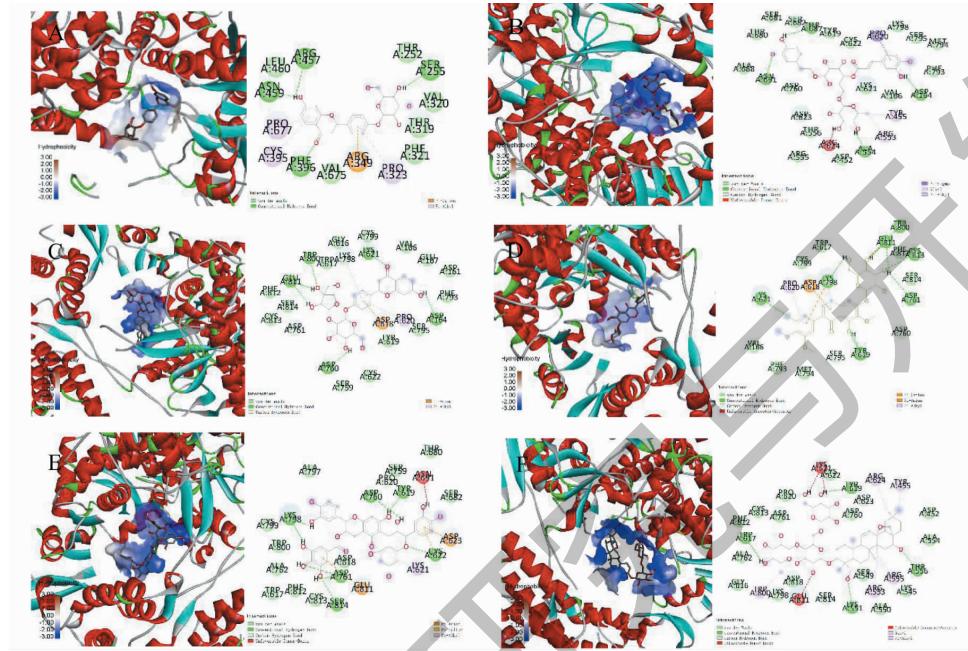


图 6 SARS-CoV-2 病毒 RdRp 蛋白与候选成分中 FitValue 最高的 6 种潜在活性化合物分子对接模式

Fig. 6 Molecular docking diagram of SARS-CoV-2 RdRp and top 6 potential active constituents from candidate ingredients

注: A. Liquiritin apioside; B. Iridin; C. Liquiritin; D. Forsythiaside; E. Procyanidin B-5,3'-O-gallate; F. Saikosaponin C。

## 2.5 基于筛选结果的潜在活性结构分析

我们将表 2 中 FitValue 排名前 30 且结合自由能低于 remdesivir (-7.2 kcal/mol) 的化合物进行分类,发现其中 53% 的化合物骨架类型为黄酮类,主要为黄酮、二氢黄酮、双黄酮、黄酮醇类。提示黄酮类化合物可能具有潜在 SARS-CoV-2 RdRp 抑制活性。RdRp 抑制剂主要有两类,即核苷/核苷酸类似物(NI)和非核苷抑制剂( NNI )。NI 能成为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的底物,可参入到 RNA 链中抑制病毒。NNIs 与 RdRp 变构位点之一结合,这种结合改变酶的 3D 构象,从而在起始步骤破坏聚合酶活性<sup>[11,12]</sup>。有研究表明,多种黄酮类化合物对 HCV 病毒的 RdRp 具有抑制活性<sup>[13]</sup>。该研究发现黄酮醇、黄酮、二氢黄酮及其苷类对 HCV 病毒的 RdRp 具有不同程度的抑制活性,与本研究筛选到的黄酮类化合物结构上具有一定的相似性。

此外,该研究以槲皮素为例进行了多项实验,发现槲皮素能在病毒 RNA 模板通道的入口处与病毒

此外以上多个化合物与 PRO-620 发生 Pi-Alkyl 相互作用,与 ASP-618 发生 Pi-Cation 相互作用。以上这些位点可能是活性成分与 RdRp 蛋白作用的潜在位点。

结合,通过非核苷抑制作用抑制 RNA 与酶的结合发挥 RdRp 抑制作用,可能是一种与高泛基因组活性和高抗性屏障有关的新作用机制。该研究也为黄酮类物质的化学改良和大规模基于结构的抗病毒药物分子筛选提供了参考。还有研究表明,黄酮类物质水飞蓟素对 HCV 病毒 RdRp 有抑制作用,水飞蓟素可能不是通过阻断 HCV 细胞系与细胞的结合,而是抑制了病毒假颗粒(pp)的进入,从而抑制了 HCVpp 与脂质体的融合发挥抑制病毒作用<sup>[14]</sup>。还有研究表明双黄酮类化合物对登革病毒聚合酶 DENV-NS5 RdRp 具有抑制作用<sup>[15]</sup>,本研究筛选到 procyanidin B1 与 procyanidin B-5,3'-O-gallate 为双黄酮类成分,且与 RdRp 结合自由能均 < -8 kcal/mol,提示这两种化合物与 RdRp 可能具有潜在作用。以上研究为本研究结果提供了相关实验证据,然而黄酮类化合物对于 SARS-CoV-2 RdRp 是否有抑制作用尚需后期实验证实。

从对接的结果可以看出,由于黄酮类结构含有

多个富电子的氧原子,易于与 RdRp 靶点残基中的供电子基团形成氢键,故黄酮类结构作为潜在的抗 RdRp 活性化合物的骨架是合理的。我们把 FitValue 排名靠前且结合自由能低于 remdesivir 的 30 个黄酮类化合物作为重要黄酮类活性成分进行分析,与 RdRp 蛋白残基互作图见图 7。在黄酮活性化合物中,氢键多在黄酮骨架上 A 环的 C-7 位(lliquiritin apioside、liquiritin、procyanidin B-5,3'-O-gallate、ru-

tin、isovitexin、ochnaflavone、Procyanoindin B1 及 licorice glycoside E)及 C 环的 C-3 位( iridin、procyanidin B-5,3'-O-gallate、hesperidin、neohesperidin、procyanidin B1、ochnaflavone 及 isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole)或 C-4 位(cynaroside、veronicastroside、neoliquiritin 及 procyanidin B1)上产生,由此推测上述位置的取代基可能对化合物的活性有一定影响。



图 7 潜在活性成分中重要黄酮类成分与 RdRp 蛋白残基互作图

Fig. 7 Interaction of protein residues between RdRp and the important flavonoids in potential active ingredient

注:A. Liquiritin apioside; B. Iridin; C. Liquiritin; D. Procyanidin B-5,3'-O-gallate; E. Neohesperidin; F. Cynaroside; G. Veronicastroside; H. Naringin; I. Procyanidin B1; J. Hesperidin; K. Ochnaflavone; L. Neoliquiritin; M. Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole; N. Licorice glycoside E; O. Isovitekin; P.

Rutin。

### 3 讨论

COVID-19 属于“瘟疫”范畴,以“湿、热、毒、瘀”为主要特征,并与运气、地理、气候和人群的易感性

相关,其病位在膜原,涉及三焦、肺、脾、胃,采用清热除湿解表药在新冠肺炎的防治中有重要的作用<sup>[16]</sup>。本研究对于临床常用的 31 个抗新冠常用中药处方

的组成药物进行频次统计,其中使用频次 $\geq 5$ 的有21味中药(图1)。使用频次较高的药材大致归纳为:补气健脾药、清热药、解表药、祛湿药。补气健脾药(黄芪、甘草、白术、厚朴、杏仁);清热药(金银花、甘草、连翘、麻黄、黄芩、石膏、葶苈子、栀子);解表药(金银花、连翘、藿香、麻黄、柴胡、生姜);祛湿药(白术、藿香、陈皮、苍术、黄芩、茯苓、厚朴、半夏、草果、槟榔)等。

SARS-CoV-2 属于 $\beta$ 属的新型冠状病毒,SARS-CoV-2 可通过刺突糖蛋白(S蛋白)的S1 亚基上的受体结合域(RBD)与宿主细胞表面的血管紧张素转化酶2(ACE2)之间的结合,通过内吞作用进入宿主细胞<sup>[17]</sup>。SARS-CoV-2 病毒进入细胞后,核衣壳与病毒自身的正义链 RNA 释放到细胞质中,由木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLpro)和主蛋白酶(3CLpro)参与裂解,最终产生包括螺旋酶(Helicase)和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)在内的非结构蛋白,参与病毒转录、复制过程<sup>[18]</sup>。病毒自身编码的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)在 SARS-CoV-2 病毒的 RNA 复制过程中起到关键作用,RdRp 也是目前针对 SARS-CoV-2 作用明确且研究较多的靶点。本研究探索从常用抗新冠中药材中寻找 RdRp 抑制剂,也为更好的阐明中药抗新冠作用机制提供参考。本研究根据 TCMSP 数据库及文献挖掘搜集了常用抗新冠药材中 1384 种候选活性成分,根据已报道的具有 RdRp 抑制活性的 6 种化合物构建了药效团模型并进行了验证,选取最优药效团模型与“抗新冠候选活性成分”进行了虚拟筛选,在匹配得到的化合物中选取 FitValue 较高的化合物作为潜在 RdRp 抑制活性成分,本研究发现 liquiritin apioside、iridin、liquiritin、forsythiaside、procyanidin B-5,3'-O-gallate、saikosaponin C 等成分具有较高的 FitValue,可作为 RdRp 抑制的潜在活性成分。通过分类分析发现筛选产物中有较多黄酮类成分,与文献报道的黄酮类化合物抑制病毒 RdRp 作用有一定相似性,提示黄酮骨架可能具有抑制 SARS-CoV-2 RdRp 的活性。我们还筛选到一些五环三萜类成分,主要是 saikosaponin,有研究报道 saikosaponins A、C、B、D 具有抗流感、HBV、HCV 等病毒活性<sup>[19-21]</sup>。研究还发现一些有苯丙素类具有 RdRp 潜在抑制活性,主要包括 forsythiaside(连翘苷)及绿原酸类似物,有研究报道连翘苷 A 可通过抑制病毒复制控制甲型流感病毒感染<sup>[22]</sup>;连翘苷 A 还可通过影响小鼠肺免疫细胞中

RLRs 信号通路,减轻流感病毒 FM1 株在小鼠肺中引起的炎症反应<sup>[23]</sup>。Isochlorogenic acid A 及 chlorogenic acid 具有抗流感病毒、HBV 等病毒活性<sup>[24,25]</sup>。然而五环三萜及苯丙素类成分是否对病毒 RdRp 具有抑制活性尚未见报道,需进一步试验研究证实。本研究采用 remdesivir 作为重要模板进行活性基团模型构建,有研究报道 remdesivir 三磷酸化后的形式为其活性形式<sup>[13]</sup>,但考虑到 remdesivir 三磷酸化物的不稳定性,因此研究采用了 remdesivir 原型作为药效团模型。

综上,本研究通过对抗新冠常用中药处方挖掘及数据库搜集,建立了“抗新冠候选活性成分数据库”,基于已报道的具有 RdRp 抑制活性的化合物构建了 HipHop 药效团模型并对候选成分进行匹配,对 FitValue 排名并进行分子对接验证,选取 FitValue 较高且结合自由低于对照药物 remdesivir 的前 30 种化合物进行分析,得到具有 RdRp 潜在抑制活性的化合物及活性结构。本研究结果为抗 SARS-CoV-2 活性成分筛选提供了新思路及参考。

## 参考文献

- 1 Rubin EJ, Baden LR, Morrissey S, et al. Medical Journals and the 2019-nCoV Outbreak [J]. N Engl J Med, 2020, 382 (9):866.
- 2 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.
- 3 General Office of National Health Commission of the People's Republic of China, Office of National Administration of Traditional Chinese Medicine. Diagnosis and treatment of corona virus disease-19 (7th trial edition) [J]. China Med(中国医药), 2020, 15:801-805.
- 4 Ren W, Su J, Liu Y, et al. Analysis on diagnosis and treatment scheme of traditional Chinese medicine in treatment of COVID-19 in Chinese provinces and regions [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51:1139-1146.
- 5 Morse JS, Lalonde T, Xu SQ, et al. Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV [J]. Chem-biochem, 2020, 21:730-738.
- 6 Li G, De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus(2019-nCoV) [J]. Nat Rev Drug Discov, 2020; 19(3):149-150.
- 7 Seidel T, Schuetz DA, Garon A, et al. The pharmacophore concept and its applications in computer-aided drug design

- [J]. *Prog Chem Org Nat Prod*, 2019;110:99-141.
- 8 Gao Q, Wang Y, Hou J, et al. Multiple receptor-ligand based pharmacophore modeling and molecular docking to screen the selective inhibitors of matrix metalloproteinase-9 from natural products[J]. *J Comput Aid Mol Des*, 2017, 31:625-641.
- 9 Wang HY, Cao ZX, Li LL, et al. Pharmacophore modeling and virtual screening for designing potential PLK1 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(18):4972.
- 10 Liu G, Zhao Z, Xie J, et al. Virtual screen of effective AChE inhibitory constituents from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma based on pharmacophore and molecular docking[J]. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45:2431-2438.
- 11 Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro*[J]. *Cell Res*, 2020, 30:269-271.
- 12 Warren TK, Wells J, Panchal RG, et al. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430[J]. *Nature*, 2014, 508:402-405.
- 13 Yin W, Mao C, Luan X, et al. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir[J]. *Science*, 2020, 368:1499-1504.
- 14 Wagoner J, Negash A, Kane OJ, et al. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle [J]. *Hepatology*, 2010, 51:1912-1921.
- 15 Coulerie P, Nour M, Maciuk A, et al. Structure-activity relationship study of biflavonoids on the Dengue virus polymerase DENV-NS5 RdRp[J]. *Planta Med*, 2013, 79:1313-1318.
- 16 Xu T, He C, Yang K. Network pharmacology-based study on material basis and mechanism of Qingfei Paidu Decoction against COVID-19. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2020, 32:901-908.
- 17 Dong N, Yang X, Ye L, et al. Genomic and protein structure
- modelling analysis depicts the origin and infectivity of 2019-nCoV, a new coronavirus which caused a pneumonia outbreak in Wuhan, China [J]. *BioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.20.913368>.
- 18 Richardson P, Griffin I, Tucker C, et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223):e30-e31.
- 19 Lee WP, Lan KL, Liao SX, et al. Antiviral effect of saikogenin B2 in combination with daclatasvir on NS5A resistance-associated substitutions of hepatitis C virus[J]. *J Chin Med Assoc*, 2019, 82:368-374.
- 20 Chen J, Duan M, Zhao Y, et al. Saikogenin A inhibits influenza A virus replication and lung immunopathology [J]. *Oncotarget*, 2015, 6:42541-42556.
- 21 Pan Y, Ke Z, Ye H, et al. Saikogenin C exerts anti-HBV effects by attenuating HNF1 $\alpha$  and HNF4 $\alpha$  expression to suppress HBV pgRNA synthesis [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68:1025-1034.
- 22 Deng L, Pang P, Zheng K, et al. Forsythoside A controls influenza A virus infection and improves the prognosis by inhibiting virus replication in mice [J]. *Molecules*, 2016, 21:524-533.
- 23 Zheng X, Fu Y, Shi SS, et al. Effect of forsythiaside A on the RLRs signaling pathway in the lungs of mice infected with the influenza A virus FM1 strain[J]. *Molecules*, 2019, 24:4219-4234.
- 24 Ding Y, Cao Z, Cao L, et al. Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A(H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:45723.
- 25 Cao Z, Ding Y, Cao L, et al. Isochlorogenic acid C prevents enterovirus 71 infection via modulating redox homeostasis of glutathione[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(1):190-194.

(上接第 2100 页)

- 15 Feng WS, Chen X, Zhen XK, et al. Study on chemical constituents of *Lonicerae Japonicae Flos*[J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2011, 46:338-340.
- 16 Ma YC, Zhang M, Xu WT, et al. Chemical constituents from *Callicarpa nudiflora* and their cytotoxic activities[J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2014, 39:3094-3101.
- 17 Yin AW, Tian R, Li TF. Studies on the chemical constituents

- of the stem of *Cinnamomum camphora*[J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2014, 26:876-878.
- 18 Li YP, Zhen CK, He HP. Chemical constituents from the acrinal parts of *Desmodium triflorum*[J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2019, 42:87-90.
- 19 Chao J, Wood JG, Gonzalez NC. Alveolar hypoxia, alveolar macrophages, and systemic inflammation [J]. *Respir Res*, 2009, 10:54.