

基于网络药理学和分子对接探究金花清感颗粒治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制

彭文潘¹,徐泳¹,韩迪¹,冯凡超¹,顾诚¹,王志超¹,周贤梅^{1*},吕红^{2*}

¹南京中医药大学附属医院,南京 210029; ²太仓市中医院呼吸科,太仓 215400

摘要:采用网络药理学和分子对接方法探究金花清感颗粒(Jinhua Qinggan Granules)治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在作用靶点和机制。利用TCMSP、SwissTargetPrediction、SEA和TCMID数据库筛选金花清感颗粒的活性成分及其靶点;通过OMIM和GeneCards Suite数据库平台筛选COVID-19相关靶点;使用STRING在线分析平台构建靶蛋白相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络并进行拓扑学分析;最后使用DAVID平台对核心靶点进行GO和KEGG富集分析;将度值排名前十的化合物与血管紧张素转化酶II(ACE2)、病毒关键S蛋白(Spike protein)、TM-PRSS2蛋白、SARS-CoV-2-3CL水解酶(Mpro)、RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase,RdRp)进行分子对接验证。共获得228个有效成分,以及对应的720个潜在作用靶点;获得疾病相关靶点253个,并将其映射到药物潜在靶点中,获得79个共有靶点;PPI图中,经过拓扑学分析筛选获得18个核心靶点;GO和KEGG富集分析中共获得35条存在显著差异的信号通路以及274个生物学条目;分子对接提示,金花清感方中化合物与病毒关键蛋白具有较高的结合能。该研究初步揭示了金花清感颗粒多途径,多靶点治疗新冠肺炎的潜在作用机制,为该方剂的临床运用和深入研究提供科学依据。

关键词:网络药理学;分子对接;新型冠状病毒肺炎;金花清感颗粒;作用机制

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)12-1992-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.12.002

Mechanism of Jinhua Qinggan Granules on COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking

PENG Wen-pan¹, XU Yong¹, HAN Di¹, FENG Fan-chao¹,
GU Cheng¹, WANG Zhi-chao¹, ZHOU Xian-mei^{1*}, LYU Hong^{2*}

¹Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

²Department of Respiratory Medicine, Chinese Medicine Hospital in Taicang, Taicang 215400, China

Abstract: This study aims to use network pharmacology and molecular docking methods to explore the potential targets and mechanisms of Jinhua Qinggan Granules in the treatment of COVID-19. TCMSP, SwissTargetPrediction, SEA and TCMID were used to screen the active components and targets of Jinhua Qinggan Granules; OMIM and GeneCards Suite database platforms were used to screen the COVID-19 related targets; The protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING online analysis platform and topology analysis was carried out. Finally, the DAVID platform was used to carry out GO and KEGG enrichment analysis on the core targets. The binding energy of the top 10 compounds with ACE2, Spike protein, Mpro, RdRp, TMPRSS2 was verified by molecular docking. A total of 228 active components and corresponding 720 potential targets were obtained; 253 disease-related targets were mapped to potential drug targets, and 79 common targets were obtained. In PPI diagram, 18 core targets were selected through topology analysis. In the GO and KEGG enrichment analysis, a total of 35 signal pathways and 274 biological items with significant differences were obtained. The molecular docking indicated that the compound in Jinhua Qinggan Granules had high binding energy with the key protein of virus. This study initially revealed Jin-

hua Qinggan Granules in multiple pathways and targets for the treatment of COVID-19, and provided scientific evidence for its clinical application and intensive study.

Key words: network pharmacology; molecular docking; COVID-19; Jinhua Qinggan Granules; mechanism

2019年底,中国湖北省发生了不明原因引起的病毒性肺炎,经研究鉴定是由一种新型冠状病毒所致。随即世界卫生组织(World Health Organization, WHO)将该病命名为“2019冠状病毒疾病^[1](coronavirus disease 2019, COVID-19)”;国际病毒分类委员会(The International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)将该病毒命名为“严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2型^[2](severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)”,可见它是SARS冠状病毒的近亲^[3]。临幊上COVID-19可分为轻型、普通型、重型、危重型^[4]。轻型症状轻微,普通型主要表现为发热、乏力、干咳等,重者可出现气促、呼吸困难和静息状态指氧饱和度下降^[5],危重型主要表现为ARDS、脓毒症以及休克等,甚至危及生命。截至目前,针对COVID-19,仍无特异性治疗药物。抗击疫幊关键时期,中医药彰显了防治COVID-19的优势,并且能够与西医治疗互补,提高治疗效果。在我国COVID-19确诊病例中,中医药使用覆盖率达91.5%,中医药总有效率达90%以上。

作为指南推荐使用的金花清感颗粒由金银花、连翘、石膏、蜜麻黄、炒苦杏仁、黄芩、浙贝母、知母、牛蒡子、青蒿、薄荷、甘草十二味中药组成。该方由麻杏石甘汤和银翘散加减化裁而来,前者是张仲景《伤寒论》用于治疗“汗出而喘、无大热”的经典方,组方包含麻黄、苦杏仁、石膏和甘草;后者是吴鞠通《温病条辨》用于治疗“但热不恶寒而渴者”的经典方,组方包含连翘、金银花、桔梗、薄荷、竹叶、鲜芦根、甘草、荆芥穗、淡豆豉和牛蒡子。金花清感颗粒十二味中药组方合理、配伍科学、寒热并用,功效为“疏风宣肺、清热解毒”,主治风热感冒或肺热感冒,以及流感。段璨等人最新临床研究发现,在123例COVID-19患者中金花清感颗粒联合常规治疗相对单纯常规治疗,患者的发热、咳嗽、乏力、咳痰临床症状均有明显的缓解^[6]。

网络药理学为多学科融合而成的新兴产物,运用计算机模拟、数据分析、多种数据库检索等方法,通过多重网络数据库检索分析阐明药物的物质基础及其治疗相关疾病作用机制。英国邓迪大学Andrew L. Hopkins教授2007年首次提出了网络药理

学的概念,从整体角度系统地探索药物与疾病间的关联性,同年李梢提出基于生物网络调控的方剂研究模式与实践^[7],2013年李梢完善了中药网络药理学的理论、方法与应用^[8]。为药物作用机制探究提供新的策略和方向,也为多成分、多靶点、多疾病的复杂中药作用机制研究提供了新的思路。该方法汇集了系统生物学、计算生物学以及网络拓扑学的知识,从整体角度阐释了药物和疾病之间的关系,这恰好与中医的整体观不谋而合。本研究拟通过网络药理学技术探讨金花清感颗粒中潜在物质基础,及其治疗COVID-19的可能作用机制,同时也为COVID-19的治疗和金花清感颗粒的深入研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 数据库

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://tcmsp.w.com/tcm-sp.php>);中药综合数据库(Traditional Chinese Medicines Integrated Database, TCMID, <http://119.3.41.228:8000/tcmid/>);Similarity ensemble approach数据库(<http://sea.bkslab.org>, SEA);SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>);UniProt数据库(Universal Protein, <http://www.uniprot.org/>);生物信息学资源数据库(DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>);STRING数据库(<https://string-db.org>);人类孟德尔遗传数据库(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM);GeneCards数据库平台(<http://www.genecards.org>)。

1.2 获取药物活性成分和潜在靶点

分别以“金银花”、“石膏”、“麻黄”、“苦杏仁”、“黄芩”、“连翘”、“浙贝母”、“知母”、“牛蒡子”、“青蒿”、“薄荷”、“甘草”为关键词,通过TCMSP数据库检索各中药的活性成份,借助人体ADME/Tox预测,整合器官水平的PBPK模型计算活性成分的口服生物利用度(OB)和类药性(DL),以OB≥30%,DL≥0.18%作为活性成分的筛选条件。将筛选的化合物导入PubChem获取对应的SMILES文件,并输入到SEA和SwissTargetPrediction数据库,综合TCMSP、SEA和SwissTargetPrediction数据库筛选结果,获取上述中药活性成分对应的潜在作用靶点。

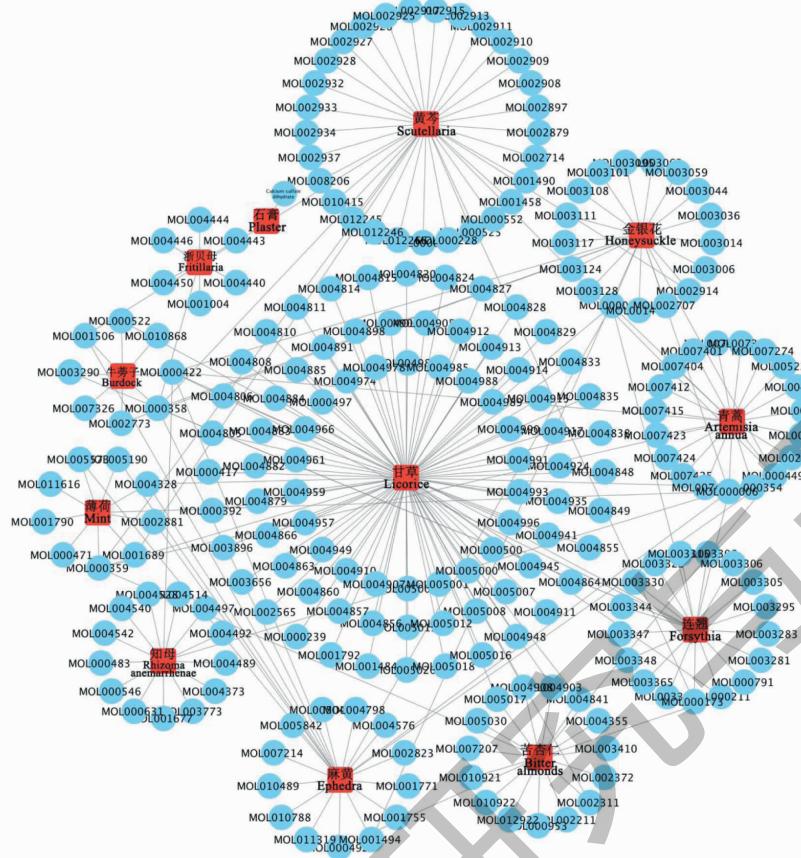


图 1 金花清感颗粒所含活性成分信息

Fig. 1 Information of active ingredients of Jinhua Qinggan Granules

1.3 COVID-19 相关靶点获取

分别在 OMIM 和 GeneCards Suite 数据库中,以“COVID-19”为检索词,将两个数据库结果合并,去除重复,获取 COVID-19 相关的潜在靶点。

1.4 获取疾病和药物相交靶点

使用 R 语言(Version3.6.1) VennDiagram 数据包,将金花清感颗粒潜在作用靶点映射到 COVID-19 相关靶点中,并制作韦恩图。将两者交集作为金花清感颗粒治疗 COVID-19 的潜在作用靶点。

1.5 构建网络图

通过运行脚本将上述信息生成三个文件，分别是节点之间的连线网络文件、节点分类文件、1.4 中获得相交靶点对应的化合物文件。将上述三个文件导入 Cytoscape 软件制作“活性成分-靶点”网络图，并对其进行拓扑学分析。

1.6 获取 PPI 图

将 1.4 中获得的基因信息输入到 STRING 数据库, 种属选择 “Homo sapiens”, 获取 “蛋白-蛋白” 相互作用网络图, 置信度设置为 0.9。并将文件 “string_interactions.tsv” 导入 cytoscape 软件进行拓扑学分析。

析,通过介值中心度(betweenness centrality)和度值(degree)筛选核心靶点。

1.7 GO 和 KEGG 富集分析

为了对靶基因的功能进行描述和注释,以及探究其作用的信号通路。通过 DAVID 数据库将 1.5 中筛选出来的核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,选择物种“Homo sapiens”。GO 富集分析包括分析生物学功能(molecular function, MF)、生物学过程(biological process, BP)、细胞学组分(cellular components, CC)三个部。进行 KEGG 富集分析,筛选出金花清感颗粒治疗新冠肺炎的潜在作用信号通路。GO 和 KEGG 富集分析均以校正 P 值(FDR) < 0.05 作为筛选条件。

1.8 分子对接

从 pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载化合物 SDF 结构, 调用 OpenBabel2.4.1 转化为 mol2 格式, 并使用 AutodockTools1.5.6 打开配体小分子, 并加氢、加电荷、检测配体的 root、进行可旋转键的搜寻与定义, 并保存为 pdbqt 文件。ACE2、Spike protein、Mpro、RdRp 蛋白三维结

构由 2019-nCoV 药物靶标结构信息共享平台提供 (<http://ncovtarget.ncbi.nlm.nih.gov/web/mg/hm>) ;TMPRSS6 蛋白三维结构从 RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org) 下载获得, 在 AutodockTools1.5.6 中打开, 通过添加氢原子、计算 Gasteiger 电荷、合并非极性氢后, 将其定义为受体并保存成 pdbqt 文件。采用 Autodock vina 1.1.2 进行半柔性对接, 选取 affinity 最佳构象, 作为最终的对接构象。

2 结果

2.1 金花清感颗粒活性成分和潜在靶点

通过 TCMSP 检索金银花、石膏、麻黄、苦杏仁、黄芩、连翘、浙贝母、知母、牛蒡子、青蒿、薄荷、甘草

中符合条件化合物共有 227 个。其中 23 个来自金银花, 23 个来自麻黄, 19 个来自苦杏仁, 36 个来自黄芩, 23 个来自连翘, 7 个来自浙贝母, 15 个来自知母, 8 个来自牛蒡子, 22 个来自青蒿, 10 个来自薄荷, 92 个来自甘草; 通过 PubChem 获得石膏的活性成分 1 个(图 1)。26 个化合物所分布的药物不止一种, 如山奈酚分布于牛蒡子、麻黄、知母、金银花、青蒿、连翘、甘草 7 味中药中, 豆甾醇分布于苦杏仁、黄芩、麻黄、青蒿、知母、金银花 6 味中药中, β -谷甾醇分布于牛蒡子、黄芩、麻黄、金银花、连翘、浙贝母 6 味中药中(表 1)。12 味中药共获得 720 个潜在靶点。

表 1 重复化合物信息

Table 1 Information of duplicate compound

分子 ID Molecular ID	化合物 Compound	度值 Degree	分布中药 Contained in Chinese medicine
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	7	牛蒡子、麻黄、知母、金银花、青蒿、连翘、甘草
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	6	苦杏仁、黄芩、麻黄、青蒿、知母、金银花
MOL000358	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	6	牛蒡子、黄芩、麻黄、金银花、连翘、浙贝母
MOL000359	谷甾醇 Sitosterol	5	黄芩、薄荷、苦杏仁、甘草、青蒿
MOL000098	槲皮素 Quercetin	5	麻黄、连翘、青蒿、金银花、甘草
MOL000006	木犀草素 Luteolin	5	金银花、麻黄、薄荷、青蒿、连翘
MOL000211	丁子香酚 Mairin	3	连翘、苦杏仁、甘草
MOL004328	柚皮苷 Naringenin	3	甘草、薄荷、麻黄
MOL001506	角鲨烯 Supraene	3	黄芩、牛蒡子、麻黄
MOL002311	甘草酚 Glycyrol	2	甘草、苦杏仁
MOL005017	菜豆酚 Phaseol	2	甘草、苦杏仁
MOL004841	甘草查尔酮 B Licochalcone B	2	甘草、苦杏仁
MOL004903	甘草甙 Liquiritin	2	甘草、苦杏仁
MOL004908	光甘草定 Glabridin	2	甘草、苦杏仁
MOL005573	莞花素 Genkwanin	2	薄荷、麻黄
MOL005190	圣草酚 Eriodictyol	2	薄荷、麻黄
MOL002881	香叶木素 Diosmetin	2	薄荷、麻黄
MOL000492	(+)-儿茶素 (+)-Catechin	2	麻黄、苦杏仁
MOL000173	汉黄芩素 Wogonin	2	连翘、黄芩
MOL001689	金合欢素 Acacetin	2	黄芩、薄荷
MOL000354	异鼠李素 Iisorhamnetin	2	青蒿、甘草
MOL003290	甲基牛蒡苷元 Methylarctigenin	2	牛蒡子、连翘
MOL000522	牛蒡子苷 Arctiin	2	牛蒡子、连翘
MOL002773	β -胡萝卜素 Beta-carotene	2	牛蒡子、金银花
MOL002914	羟肌醇 Eriodictiol	2	金银花、黄芩
MOL001494	甘露醇 Mandenol	2	金银花、麻黄

2.2 金花清感颗粒新冠肺炎相交靶点

共获得疾病相关靶点 253 个,其中 Genecard 数据库 251 个,OMIM 数据库 2 个。将疾病相关靶点映射到药物潜在靶点中,共获得 79 个公共靶点(图 2),靶点详细信息见表 2。

2.3 “活性成分-靶点”网络图

网络图(图 3)中可见共 250 个节点,包括活性成份 169 个、靶点 79 个、疾病和药物节点各一个;共

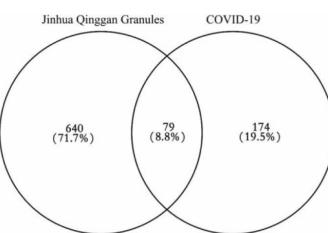


图 2 药物和疾病靶点交集

Fig. 2 The intersection of drug and disease targets

表 2 共有靶点信息

Table 2 The information of shared targets

基因 Gene name	相关性评分 Relevance score	基因 ID Uniprot ID	基因 Gene name	相关性评分 Relevance score	基因 ID Uniprot ID
PTGS1	3.24	P23219	PARP1	5.91	P09874
PTGS2	7.24	P35354	CXCL11	3.13	O14625
DPP4	7.64	P27487	CXCL2	9.61	P19875
BCL2	6.96	P10415	CRP	25.76	P02741
CASP3	10.88	P42574	CXCL10	15.3	P02778
CASP8	5.65	Q14790	IRF1	3.35	P10914
HMOX1	6.28	P09601	APOD	1.66	P05090
ALB	10.68	P02768	CAT	6.43	P04040
MAPK14	7.77	Q16539	MAPK3	9.37	P27361
BAX	6.53	Q07812	BAD	5.04	Q92934
PRKCA	3.65	P17252	VCP	4.15	P55072
TGFB1	14.98	P01137	PLA2G4A	3.81	P47712
RELA	5.89	Q04206	PRKCE	2.39	Q02156
TNF	33.08	P01375	PIK3CB	2.55	P42338
MAPK8	9.08	P45983	PIK3CG	4.02	P48736
STAT1	22.73	P42224	PIK3CA	7.27	P42336
PPARG	11.93	P37231	PIK3CD	2.37	O00329
ICAM1	9.22	P05362	CDK4	6.64	P11802
EGFR	16.29	P00533	MAPKAPK2	48	P49137
BCL2L1	3.4	Q07817	PIK3R1	8.57	P27986
MAPK1	11.09	P28482	NOS2	5.85	P35228
IL10	30.33	P22301	JAK1	2.69	P23458
RB1	4.41	P06400	LCK	2.29	P06239
IL6	31.28	P05231	TTR	9.04	P02766
TP53	19	P04637	CALM1	1.61	P0DP23
MCL1	4.77	Q07820	CTSL	8.52	P07711
IL2	17.68	P60568	CTSB	5.72	P07858
IFNG	27.48	P01579	TBK1	2.64	Q9UHD2
IL4	10.12	P05112	GAPDH	5.81	P04406

续表2(Continued Tab. 2)

基因 Gene name	相关性评分 Relevance score	基因 ID Uniprot ID	基因 Gene name	相关性评分 Relevance score	基因 ID Uniprot ID
CD40LG	30.56	P29965	G6PD	6.06	P11413
FOS	4.01	P01100	CCR1	4.3	P32246
SOD1	6.25	P00441	F11	2.63	P03951
IL1B	13.78	P01584	ERN1	2.37	075460
CCL2	18.13	P13500	ADAM17	4.4	P78536
CXCL8	31.05	P10145	NFKB1	7.61	P19838
PRKCB	1.64	P05771	F10	3.22	P00742
HSPB1	4.33	P04792	HPGDS	1.61	060760
SERPINE1	7.43	P05121	CASP6	4.7	P55212
IL1A	5.93	P01583	CD81	3.35	P60033
P12821			ACE		9.6

974 条相互作用的线。网络密度为 0.031, 网络异质性为 2.314。对网络图进行拓扑学分析, 其中节点连线的多少代表节点度值的高低, 介值中心度大小代表节点在治疗该疾病的核心度, 两者是描述节点

的重要指标。在活性成分节点中介值中心度和度值均大于均值的有 27 个; 在靶点的节点中介值中心度和度值均大于均值的有 4 个节点(表 3)。

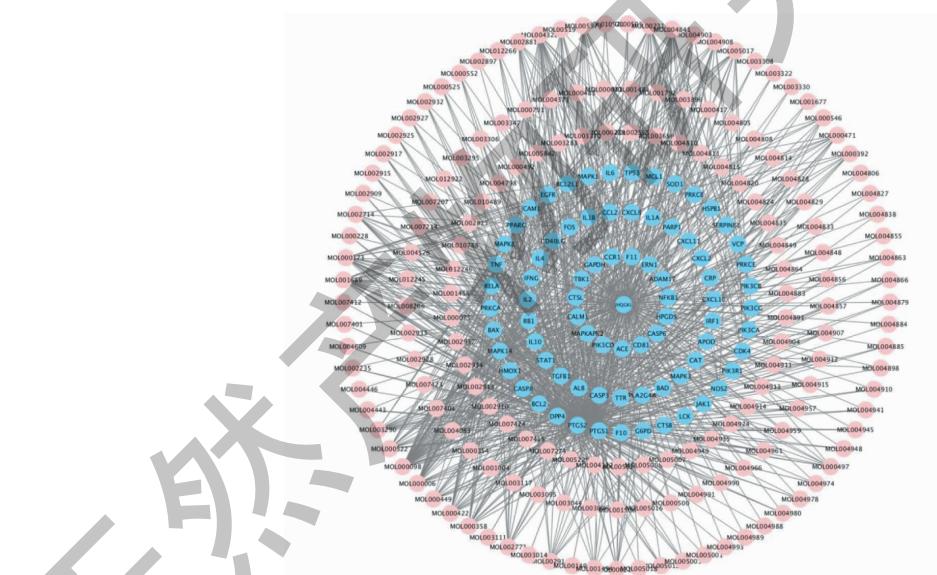


图 3 “活性成分-靶点”网络图

Fig. 3 "Ingredient-Target" network diagram

注:粉红色节点为活性成分;蓝色节点为靶点。Note: The pink node represents the active ingredient; The blue node represents the target.

表 3 网络图中核心节点

Table 3 Core nodes in the network diagram

序号 No.	节点名称 Node name	介值中心度 Betweenness centrality	度值 Degree	序号 No.	节点名称 Node name	介值中心度 Betweenness centrality	度值 Degree
1	MOL000211	0.012	11	17	MOL001689	0.011	19
2	MOL000497	0.0029	8	18	MOL003290	0.011	16

续表3(Continued Tab. 3)

序号 No.	节点名称 Node name	介值中心度 Betweenness centrality	度值 Degree	序号 No.	节点名称 Node name	介值中心度 Betweenness centrality	度值 Degree
3	MOL000392	0.0025	7	19	MOL000522	0.017	17
4	MOL000471	0.0057	10	20	MOL000098	0.069	46
5	MOL000546	0.0043	7	21	MOL000006	0.023	27
6	MOL005017	0.0062	12	22	MOL000449	0.0098	12
7	MOL004908	0.0090	13	23	MOL000422	0.011	19
8	MOL004903	0.0093	14	24	MOL000358	0.016	18
9	MOL004841	0.020	20	25	MOL002773	0.0068	13
10	MOL002311	0.010	15	26	MOL002914	0.0041	10
11	MOL005573	0.0039	11	27	MOL001494	0.0023	8
12	MOL005190	0.0050	11	28	MAPK14	0.042	63
13	MOL004328	0.019	22	29	DPP4	0.054	72
14	MOL002881	0.0029	10	30	PTGS2	0.30	170
15	MOL002714	0.0071	11	31	PTGS1	0.12	110
16	MOL000173	0.015	22	32			

2.4 PPI 图

将 79 个靶点信息导入 STRING 数据库进行分析,物种选择“Homo sapiens”,最低置信度设置为 0.9,共保留了 74 个节点。将生成的文件“string_in-

teractions.tsv”导入 cytoscape 软件生成 PPI 图,通过拓扑学分析筛选出节点度值和介值中心度大于均值的靶点,并将筛选出的 18 个核心靶点用作后续的富集分析(图 4)。

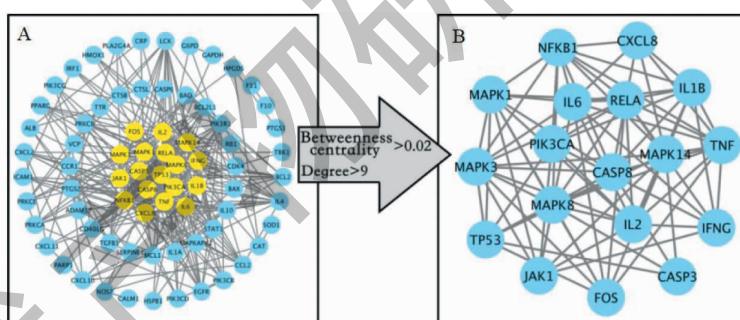


图 4 PPI 图节点拓扑筛选过程

Fig. 4 Topology selection process of target node

注:A:74 个节点,333 条连接线;B:18 个节点,84 条连接线。Note: A: 74 nodes, 333 connecting lines; B: 18 nodes, 84 connecting lines.

2.5 GO 和 KEGG 富集分析

将 2.4 中获取的核心靶点信息输入 DAVID 分析平台,物种选择“Homo sapiens”,进行在线 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析共获得 936 个条目,FDR 小于 0.05 的共有 274 个条目;其中 BP 共 260 条,CC 共 5 条,MF 共 9 条(图 5,图中 BP 取 FDR 最小的前 20 条)。涉及细胞增殖、凋亡和程序性死亡的调控、以及免疫应答和白细胞分化。KEGG 富集分析中,FDR 小于 0.05 的共有 35 个条目(图 6)。其中的 Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通

路、MAPK 信号通路、T 细胞受体信号通路和病毒感染关系密切,而 FDR 最小的是 Toll 样受体信号通路(图 7)。

2.6 分子对接

筛选“2.3”中度值排名前 10 的化合物分别与 SARS-CoV-2 关键蛋白进行分子对接验证,由图 8 可知,与 Mpro 对接效能最高的化合物是 quercetin (MOL000098),效能值为 -7.4 kcal/mol;与 ACE2 和 RdRp 蛋白结合效能最高的均是 arctiin (MOL000522),效能值分别为 -9.6 kcal/mol 和 -9.7

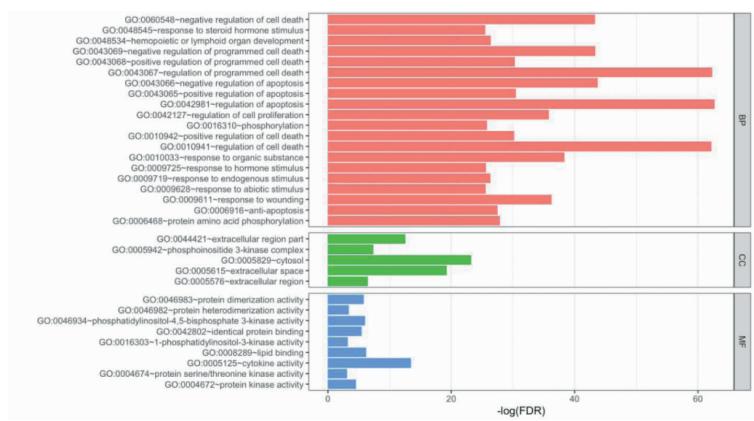


图 5 GO 富集分析结果

Fig. 5 The results of GO enrichment analysis

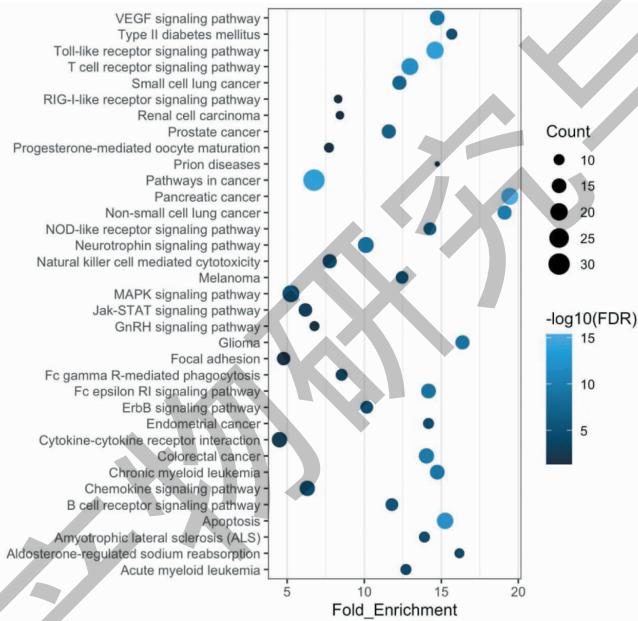


图 6 KEGG 富集分析结果

Fig. 6 The results of KEGG enrichment analysis

kcal/mol;与 Spike 蛋白结合效能最高的化合物是 luteolin (MOL000006), 效能值为 -6.7 kcal/mol;与 TMPRSS6 蛋白结合效能最高的是 beta-sitosterol, 效能值为 -7.2 kcal/mol。图 9 列出了上述结合模式图。

3 讨论

国际权威医学期刊《内科学年鉴》曾刊登了由王辰院士领衔、11家医院共同完成的关于奥司他韦和传统中药汤剂金花清感颗粒治疗甲型 H1N1 流感的多中心临床研究^[9]。证实金花清感颗粒可以缩短流感病毒引起的发热时间和改善症状,从高级别的循证医学层面证实了该方的有效性,并获得中药

抗甲流国家科技进步一等奖。与甲流同属流感病毒的 SARS-CoV-2 引起的 COVID-19,其典型临床表现主要以发热、乏力、干咳为主,少数伴有鼻塞、流涕、咽痛和腹泻,重症患者多在一周以后出现呼吸困难和低氧血症,甚至危及生命。目前,针对 COVID-19 尚无有效治疗药物,COVID-19 属于中医瘟疫病范畴,中医治疗瘟疫病不是单纯与病毒对抗,而是注重驱邪与扶正并重,攻补兼施,使邪有出路,正气得复。

通过对金花清感颗粒治疗 COVID-19 的网络药理学分析可知,该方的核心化合物是甘草查尔酮 A、芒柄花黄素、芦荟大黄素、薯蓣皂苷元、荷包牡丹碱、紫杉碱、柚皮苷、木蝴蝶素 A、黄芩甙、汉黄芩素、金

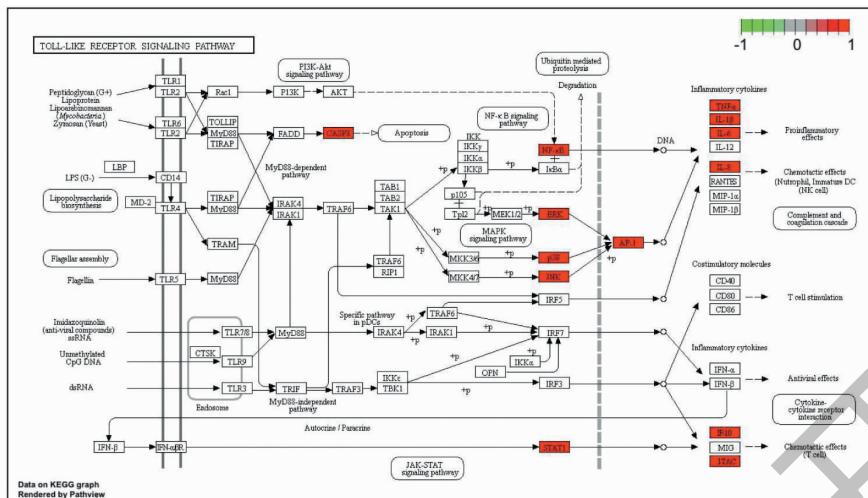


图 7 Toll 样受体信号通路

Fig. 7 Toll-like receptor signaling pathway

注:图中红色节点为金花清感颗粒的潜在作用靶点。Note: The red nodes in the figure indicate the potential targets of Jinhua Qinggan Granules.

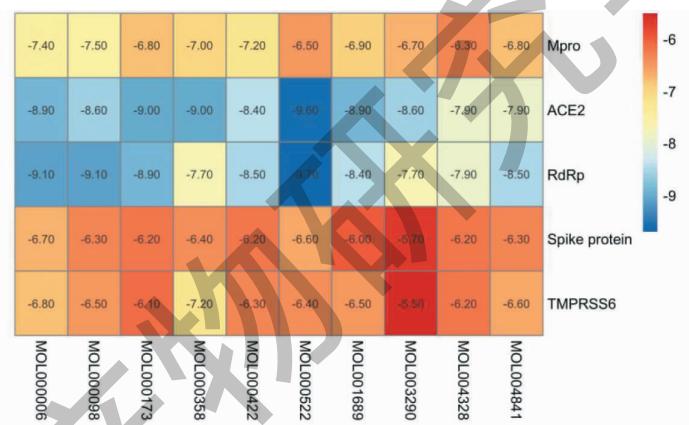


图 8 分子对接效能热图

Fig. 8 The heat map of molecular docking efficiency

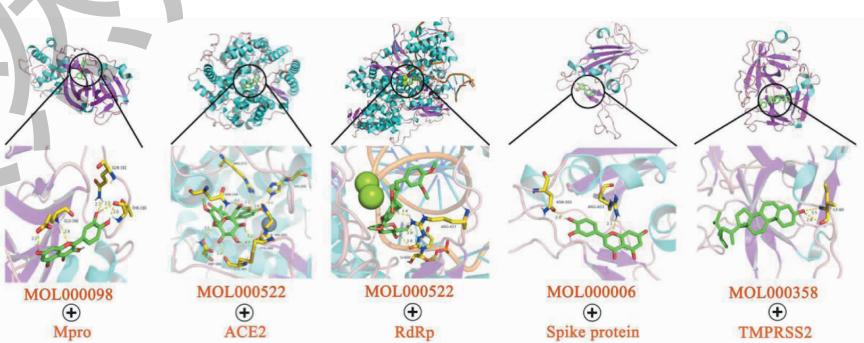


图 9 与病毒关键蛋白对接效能最高的模式图

Fig. 9 Pattern of the most efficient docking with the key protein of the virus

合欢素、异鼠李素、槲皮素、木犀草素、山奈酚、 β -谷甾醇和 β -胡萝卜素,这 17 个化合物中 53% 同时存

在 2 味或者多味中药中。在 KEGG 富集分析结果中,Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路、

MAPK 信号通路、T 细胞受体信号通路和病毒感染以及感染后的免疫关系密切。巨噬细胞对微生物的识别是由细胞膜表面的受体介导的,被称为模式识别受体 (PRR),包括各种类型的 Toll 样受体 (TLR)^[10]。病毒感染后,TLR 募集下游衔接子分子,激活细胞内信号传导级联反应^[11],上调了基因转录以产生促炎分子。在炎症反应中,花生四烯酸可通过 PTGS2 途径代谢为前列腺素 (PG)^[12]。PG 在炎症过程中可使血管扩张、血管通透性升高而导致组织器官水肿;促进微静脉、毛细血管释放淋巴因子;另外 PG 还具有致热作用,这也是大部分感染性疾病出现发热的原因,故金花清感颗粒能够缩短发热时间可能是通过 PTGS2 起作用的。研究表明,PTGS2 与各种炎性毛细血管后微静脉的通透性、白细胞的趋化作用、T 淋巴细胞产生及疾病的发生、发展有关^[13]。NOD 样受体 (NLR) 家族成员 NLRC5 在各种类型的感染中调节主要组织相容性复合体 I 类 (MHC-1),Christopher R Lupfer 在动物实验发现 NLRC5 在抑制流感病毒复制,促进病毒清除方面起到了重要作用^[14]。同时有学者发现小鼠中 NLRP5, ASC 或 Caspase-1 的遗传缺陷会导致支气管肺泡灌洗液 (BALF) 和血清中 IL-1 β 和 IL-18 的浓度降低,减少白细胞向肺部的浸润并增加病毒滴度^[15]。早在 2017 年已有研究表明,山奈酚通过灭活 TLR-髓样分化因子 88 (MyD88) 介导的 NF- κ B 和 MAPK 信号通路消除 H9N2 猪流感病毒引起的急性肺损伤^[16],其中明确指出,山奈酚显著抑制 TLR4、MyD88、I κ B α 和核因子- κ B (NF- κ B) p65 亚基的磷酸化、MAPK 的结合活性和磷酸化水平,综上可知,金花清感颗粒通过多途径多靶点的方式达到抗 COVID-19 目的,这与中医的整体观不谋而合。

Spike 蛋白含有两个亚基 S1 和 S2,其中 S1 主要包含有受体结合区 (RBD),负责识别细胞的受体,使让病毒与细胞相连^[17]。Stefan Pöhlmann 教授研究发现在 COVID-19 中 ACE2 可以促进 SARS-CoV-2 进入宿主细胞^[18],同时细胞丝氨酸蛋白酶 TMPRSS2 和内体组织蛋白酶 CatB/L 能够协同激活 SARS-CoV-2-S 侵入细胞,而蛋白酶 TMPRSS2 的作用更为关键。RdRp(也称为 nsp12)能够催化病毒 RNA 的合成,是冠状病毒复制/转录机制的关键组成部分,以 RNA 聚合酶为核心,病毒会利用其它辅助因子(如 nsp7、nsp8 等)进行自我复制^[19]。Mpro 是一种高度保守的、在冠状病毒复制过程中必不可少的

蛋白酶,是开发广谱抗病毒药物的一个有希望的靶点^[20]。上述五个关键蛋白涉及了病毒与靶细胞的结合、侵入靶细胞、病毒 RNA 的复制和病毒封装,通过分子对接的验证,发现金花清感颗粒对 SARS-CoV-2 从感染到致病的所有关键环节靶点都有较高的结合能,从侧面印证了该方的有效性。

COVID-19 疫情给全球的经济带来了一定的影响,也给全世界的疫情防控工作带来了巨大的挑战和压力。在医务工作者的共同努力下,我国疫情已得到明显控制。目前,研发可用于抗 COVID-19 药物已经成为广大医药科研工作者的重要任务。国内外多家科研机构开展药物研发主要分为两个方向。第一,疫苗研发;第二,特效药物,主要为中和抗体的研发。虽已有近百项与 COVID-19 相关的临床试验在国家临床试验注册中心注册,但截至目前,仍未有特效治疗药物,同时疫苗的研发又有其滞后性。因此本研究将重点转向指南推荐使用且已被列为非处方药的金花清感颗粒,在王辰院士研究结果的基础上,利用网络药理学技术对金花清感颗粒治疗 COVID-19 的潜在物质基础进行了初步研究,发现金花清感颗粒主要通过 Toll 样受体信号通路等,作用于 PTGS2、TNF- α 、NF- κ B、IL-6 和 CASP8 等多途径,多靶点的方式发挥抗 COVID-19 作用,为金花清感颗粒的深入研究和防治 COVID-19 的药物筛选奠定了基础。

中医药对于 COVID-19 的治疗起到了重要作用,在湖北确诊病例救治中,传统中医药参与度在 70% 以上,全国其他地区更是高达 90% 以上。本研究主要是通过查阅已有药材成分从而进行相关分析,并筛选出了差异性最大的几条信号通路。但是本研究仅通过现有数据库和相关软件筛选金花清感颗粒的有效成分和靶点,未考虑药物产地、炮制、中药剂量等因素,故本研究存在一定的局限性,本研究的结果尚待进一步基础实验证。

参考文献

- Zhang SQ, An S, Li MF, et al. Current status of epidemiology and research on COVID-19 [J]. Chin J Virol (病毒学报), 2020, 36:694-702.
- Hallowell BD, Carlson CM, Jacobs JR, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 prevalence, seroprevalence, and exposure among evacuees from Wuhan, China, 2020 [J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26:1998-2004.
- Kandeel M, Ibrahim A, Fayed M, et al. From SARS and

- MERS CoVs to SARS-CoV-2: moving toward more biased codon usage in viral structural and nonstructural genes [J]. *J Med Virol*, 2020, 92:660-666.
- 4 Tang W, Cao Z, Han M, et al. Hydroxychloroquine in patients with mainly mild to moderate coronavirus disease 2019: open label, randomised controlled trial [J]. *BMJ*, 2020, 369: m1849.
- 5 Xu TF, He CG, Yang K. Network pharmacology-based study on material basis and mechanism of Qingfei Paidu Decoction against COVID-19 [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2020, 32:901-908.
- 6 Duan C, Xia WG, Zheng CJ, et al. Clinical observation of Jinhua Qinggan Granules combined with conventional western medicine therapy in treating mild cases of coronavirus disease 2019 [J]. *J Tradit Chin Med(中医杂志)*, 2020, 61: 1473-1477.
- 7 LI S. Framework and practice of network-based studies for Chinese herbal formula [J]. *J Chin Integr Med(中西医结合学报)*, 2007, 5:489-493.
- 8 Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2):110-120.
- 9 Wang C, Cao B, Liu QQ, et al. Oseltamivir compared with the Chinese traditional therapy maxingshigan-yinqiaosan in the treatment of H1N1 influenza: a randomized trial [J]. *Ann Intern Med*, 2011, 155:217-225.
- 10 Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response [J]. *Nature*, 2006, 442 (7098):39-44.
- 11 Sasai M, Yamamoto M. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by Toll-like receptors [J]. *Int Rev Immunol*, 2013, 32(2):116-133.
- 12 Sheldrick ELR, Derecka K, Marshall E, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptors and the control of levels of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 by arachidonic acid in the bovine uterus [J]. *Biochem J*, 2007, 406(1):175-183.
- 13 Kapoor M, Shaw O, Appleton I. Possible anti-inflammatory role of COX-2-derived prostaglandins: implications for inflammation research [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2005, 6: 461-466.
- 14 Lupfer CR, Stokes KL, Kuriakose T, et al. Deficiency of the NOD-Like receptor NLRC5 results in decreased CD8(+) T cell function and impaired viral clearance [J]. *J Virol*, 2017, 91(17):e00377-17.
- 15 Thomas PG, Dash P, Aldridge JRJ, et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1 [J]. *Immunity*, 2009, 30:566-575.
- 16 Zhang R, Ai X, Duan Y, et al. Kaempferol ameliorates H9N2 swine influenza virus-induced acute lung injury by inactivation of TLR4/MyD88-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89:660-672.
- 17 Supekar VM, Bruckmann C, Ingallinella P, et al. Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:17958-17963.
- 18 Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181:271-280.
- 19 Chan JFW, Yip CCY, To KK, et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific [J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(5):e00310-20.
- 20 Liu C, Zhou Q, Li Y, et al. Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and related human coronavirus diseases [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6:315-331.

(上接第 2147 页)

- 40 Wang YY. Anticancer mechanism of riccardin D and its derivative and the discovery of rhamnose receptor [D]. Jinan: Shandong University(山东大学), 2013.
- 41 Wang Y, et al. In situ RBL receptor visualization and its mediated anticancer activity for solasodine rhamnosides [J]. *Chem Bio Chem*, 2011, 12:2418-2420.
- 42 Roddick JG. Complex formation between solanaceous steroid-al glycoalkaloids and free sterols *in vitro* [J]. *Phytochemistry*, 1979, 18:1467-1470.
- 43 Record M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiolgies [J]. *Biochim Biophys Acta* 2014;1841(1):108-120.