

当归芍药散对新型冠状病毒肺炎的临床疗效及其作用机制的网络药理学研究

刘宇寒, 潘广涛, 尚罗锐, 周方园, 杨胜兰*

华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科, 武汉 430000

摘要:为探讨当归芍药散对新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的临床疗效及其作用机制,随机选取2020年1月20日~3月20日武汉协和医院收治的100例COVID-19患者作为研究对象,观察当归芍药散联合常规治疗前后患者的基本体征、主要症状、实验室指标、核酸转阴、CT影像学的变化情况,发现以上症状及指标均较前明显好转。同时运用网络药理学分析当归芍药散治疗COVID-19的潜在作用靶点,得到作用靶点18个,GO功能富集180条目,KEGG通路富集109条。结果提示当归芍药散可能通过多靶点、多通路发挥抗病毒、抗炎、抗氧化等作用,进而达到治疗COVID-19的效果。

关键词:网络药理学;当归芍药散;新型冠状病毒肺炎;机制

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)3-0490-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.3.017

Clinical efficacy of Danggui Shaoyao Powder in COVID-19 and network pharmacology study of its mechanism

LIU Yu-han, PAN Guang-tao, SHANG Luo-rui, ZHOU Fang-yuan, YANG Sheng-lan*

Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China

Abstract:To explore the clinical efficacy and mechanism of Danggui Shaoyao Powder in coronavirus disease 2019 (COVID-19), we collected and analyzed the clinical data containing basic signs, main symptoms, laboratory indicators, nucleic acid negative conversion, and CT imaging before and after Danggui Shaoyao Powder combined with conventional treatment of 100 COVID-19 patients admitted to Wuhan Union Hospital from January 20 to March 20, 2020. The results showed that the clinical symptoms and laboratory indicators of these patients were significantly better than before. At the same time, we analyzed the potential targets of Danggui Shaoyao Powder in the treatment of COVID-19 through network pharmacology. Then we found 18 targets, 180 items of GO function enrichment, and 109 items of KEGG pathway enrichment. The results suggested that Danggui Shaoyao Powder exerted its therapeutic effects in COVID-19 by modulating multiple targets and pathways, including anti-virus, anti-inflammation, and anti-oxidation.

Key words: network pharmacology; Danggui Shaoyao Powder; COVID-19; mechanism

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)是一种由新发现的冠状病毒(SARS-Cov-2)引起的急性传染病。该疾病具有传染性强、潜伏期长、始发症状多样化等特点,临床症状早期可表现为咳嗽、发热、乏力、纳差、腹泻等,随病情进展可出现呼吸困难、胸闷胸痛

等症,危重者可进展为急性呼吸窘迫综合征、多器官功能衰竭、凝血功能障碍等^[1]。截止2020年3月25日24时,我国累计报告确诊病例81285例,累计死亡病例3287例^[2]。目前尚无治疗新型冠状病毒肺炎的特效药物,但中医药具有整体观念、辨证论治的优势,可对不同患者制定个体化的中医治疗方案,在临床治疗中取得显著疗效。

当归芍药散出自《金匱要略》,由当归、芍药、川芎、白术、泽泻、茯苓六味中药组成,具有养血调肝,

收稿日期:2020-07-08 接受日期:2020-11-30

基金项目:湖北省重点研发计划(2020BCA065);国家自然科学基金(81673760,81874397)

*通信作者 Tel:86-27-87543437; E-mail: yangshenglan005@163.com

健脾利湿的功效。武汉协和医院是新冠肺炎重症患者救治定点医院,本研究团队在三因制宜原则及运气学说指导下,应用当归芍药散治疗 COVID-19 重症患者 100 例,取得满意疗效。

为进一步阐明当归芍药散对 COVID-19 的作用机制,本研究运用网络药理学研究方法,筛选当归芍药散的活性成分,运用 TCMSp、GeneCards 数据库检索当归芍药散及 COVID-19 的相关靶点,构建“药物-活性成分-疾病-靶点”的互作网络,并对其交集靶点进行生物信息学分析,为当归芍药散治疗 COVID-19 的分子机制提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究采取回顾性分析方法,使用随机数表法选取 2020 年 1 月 20 日到 2020 年 3 月 20 日在武汉协和医院住院的 100 名 COVID-19 患者作为研究对象。其中男 41 例(41%),女 59 例(59%),年龄 28~49 岁,平均 63.75 ± 13.23 岁;平均体温 38.30 ± 0.62 °C;心率 91.51 ± 16.73 次/min;呼吸 20.6 ± 2.47 次/min;氧饱和度 $92.9\% \pm 5.84\%$;既往病史中高血压 48 例(48%),糖尿病 34 例(34%),冠心病 29 例(29%),慢性肝病 10 例(10%)。

1.2 治疗方案

新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案中基础治疗方案结合当归芍药散,每日一剂,水煎 400 mL 分两到四次温服。

1.3 观察指标

观察治疗前及治疗后 10 天体温、心率、呼吸、氧饱和度的改善情况、主要症状的消失情况、核酸转阴率、CT 影像学好转率、实验室检查指标包括白细胞(WBC)计数、淋巴细胞计数(LYMPH)、C 反应蛋白(CRP)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)的变化水平。

1.4 统计方法

应用统计软件 SPSS Statistics 25 对数据进行统计分析。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用配对样本 *t* 检验;计数资料以频数/百分比表示,采用 χ^2 检验,卡方检验时若有理论数 $T < 1$ 或样本总量 $n < 40$,则用 Fisher 确切概率法。

1.5 当归芍药散中活性成分及其作用靶点信息的收集

将当归芍药散中涉及的中药(当归、芍药、川芎、白术、泽泻、茯苓),其中芍药根据原方义确定为白芍,分别输入中药系统药理学分析平台^[3](TCMSp, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>)进行检索,得到

所有中药活性成分及其作用靶点,按口服生物利用度(oral bioavailability, OB) > 30% 及类药性(drug-like, DL) > 0.18 进行筛选。利用 Universal Protein 数据库^[4](UniProt, <https://www.uniprot.org/>)检索各靶点对应的基因名称,利用 Perl 语言进行名称转换,得到药物靶点基因列表,以便后续分析。

1.6 COVID-19 疾病靶点的获取及当归芍药散治疗 COVID-19 的潜在作用靶点预测

利用 GeneCards 数据库^[5](<https://www.genecards.org/>),输入疾病名称“novel coronavirus pneumonia”,获得该疾病对应靶点信息。利用 Draw Venn Diagram 网站对疾病靶点与药物靶点分析,提取二者交集,为当归芍药散治疗 COVID-19 的潜在作用靶点。

1.7 当归芍药散活性成分-COVID-19-疾病靶点的相互作用网络

利用 STRING 网站^[6](<https://string-db.org/>),设定物种来源为“Homo sapiens”,输入之前分析得到的药物-疾病靶点交集,分析得到蛋白相互作用网络。用 Cytoscape3.6.1^[7]对共同靶点进行统计,并对结果进行可视化展示,对该网络图而言,颜色越深,节点越大,节点自由度越高,重要性越强。

1.8 当归芍药散活性成分-疾病靶点网络构建

将之前得到的药物及疾病对应的潜在作用靶点,药物的活性成分信息,分别导入 Cytoscape3.6.1 软件,绘制“药物-成分-疾病-靶点”网络图,

1.9 当归芍药散活性成分-疾病靶点的 GO 功能富集分析

运用 R 语言及其后台数据库“org. Hs. eg. db”获取此前得到的药物相关疾病的潜在作用靶点的基因 ID(entrezID),再运用 DAVID^[8](<https://david.ncicrf.gov/>)对潜在作用靶点进行 GO(Gene Ontology)功能富集分析,包括以下三方面内容:生物学过程富集分析(biological process, BP)、细胞组成富集分析(cellular component, CC)、分子功能富集分析(molecular function, MF),利用 R 语言对其进行可视化处理,设定 $pvalueCutoff = 0.05$, $qvalueCutoff = 0.05$,按显著性排序,将 GO 三部分各自前 10 条富集条目以柱状图展示。

1.10 当归芍药散活性成分-疾病靶点的 KEGG 通路富集分析

获取基因 ID 步骤同 GO 分析,运用 R 语言 clusterProfiler 程序包对得到的进行 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路富集分析,设定 $pvalueCutoff = 0.05$, $qvalueCutoff = 0.05$,按显著性

排序,将排名前 20 的富集条目以气泡图展示。

2 结果

2.1 COVID-19 患者基本体征及主要症状改善情况

治疗后 10 天,COVID-19 患者基本体征包括体

温、心率较治疗前明显下降($P < 0.05$),氧饱和度较前明显上升($P < 0.01$);且具有相关症状包括发热、咳嗽咳痰、咽干咽痛、乏力、胸闷气促的患者人数较治疗前明显减少($P < 0.01$)(见表 1~2)。

表 1 COVID-19 患者基本体征改善情况($\bar{x} \pm s, n = 100$)

Table 1 Improvement of basic signs of COVID-19 patients ($\bar{x} \pm s, n = 100$)

类别 Category	治疗前 Before treatment	治疗后 10 天 10 days after treatment
体温 Body temperature(°C)	37.81 ± 0.88	36.92 ± 0.35**
呼吸 Respiratory rate(times/min)	20.64 ± 2.48	20.18 ± 2.43
心率 Heart rate(times/min)	91.51 ± 16.81	86.57 ± 10.21*
氧饱和度 Oxygen saturation(%)	92.92 ± 5.86	97.99 ± 1.42**

注:与治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with before treatment,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

表 2 COVID-19 患者主要症状改善情况

Table 2 Improvement of main symptoms of COVID-19 patients

临床症状 Clinical symptom	治疗前 Before treatment (cases)	治疗后 10 天 10 days after treatment (cases)
发热 Fever	64	24**
咳嗽咳痰 Cough and sputum	86	30**
咽干咽痛 Sore throat	78	34**
乏力 Weak	61	21**
胸闷气促 Chest tightness and shortness of breath	81	37**

注:与治疗前比较,** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with before treatment,** $P < 0.01$.

2.2 COVID-19 患者实验室检查及核酸、CT 影像学改善情况

统计分析 100 例 COVID-19 患者的实验室检查结果发现,其治疗后 10 天的淋巴细胞计数较治疗前明显上升($P < 0.01$);白细胞数、LDH、CRP、AST 较治疗前明显下降($P < 0.05$);ALT 较治疗前无明显差异。实验室检查复常率均在 65% 以上,治疗后 10 天,患者的 CT 影像学好转率为 71%;核酸转阴率为 62%;见表 3 和 4。

2.3 当归芍药散中活性成分筛选结果

通过 TCMS 数据库检索当归芍药散的活性成分,按照 OB > 30% 及 DL > 0.18 的标准筛选得到活性成分共 51 个(表 5),其中当归 2 个,白芍 12 个,川芎 6 个,白术 7 个,茯苓 15 个,泽泻 9 个。继续使用 TCMS 检索 51 个活性成分的作用靶点共 227 个,利用 UniPort 数据库进行转换,获得对应的基因名共 227 个,去重后,剩 92 个(部分信息见表 6,全部信息见补充数据)。

表 3 COVID-19 患者 CT 影像好转、核酸转阴情况比较

Table 3 Comparison of CT image improvement and nucleic acid turning negative in COVID-19 patients

类别 Category	治疗前 Before treatment [cases (%)]	治疗后 10 天 10 days after treatment [cases (%)]
CT 影像好转 CT image improvement	0(0.00%)	71(71.00%)
核酸转阴 Nucleic acid turning negative	0(0.00%)	62(62.00%)

表4 COVID-19 患者实验室检查结果($\bar{x} \pm s, n = 100$)
Table 4 Laboratory test results of COVID-19 patients ($\bar{x} \pm s, n = 100$)

类别 Category	正常值范围 Normal range	治疗前 Before treatment	均值 Mean 治疗后 10 天 10 days after treatment	正常例数 Normal cases (%)
WBC($\times 10^9/L$)	3.5~9.5	6.48 \pm 2.89	5.73 \pm 1.88*	83(83.00%)
LYMPH($\times 10^9/L$)	0.8~3.5	1.15 \pm 0.58	1.64 \pm 1.03**	82(82.00%)
LDH(U/L)	120~250	286.51 \pm 127.51	184.63 \pm 48.49**	89(89.00%)
ALT(U/L)	9~50	42.72 \pm 55.81	37.29 \pm 22.47	83(83.00%)
AST(U/L)	15~40	34.19 \pm 21.06	27.14 \pm 14.28**	81(81.00%)
CRP(g/L)	0~5	37.03 \pm 38.13	6.89 \pm 13.53**	67(67.00%)

注:与治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with before treatment,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

表5 当归芍药散中部分活性成分的基本信息
Table 5 Basic information of some active ingredients in Danggui Shaoyao Powder

单味中药 Single Chinese medicine	编号 Number	活性成分 Active ingredient	口服生物利用度 OB(%)	类药性 DL
当归 Radix Angelicae Sinensis	MOL000358	β -谷甾醇 β -Sitosterol	36.91	0.75
	MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76
	MOL001910	11 α ,12 α -Epoxy-3 β -23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12 β -olide	64.77	0.38
白芍 Radix Paeoniae Al- ba	MOL001918	芍药苷元 Paeoniflorgenone	87.59	0.37
	MOL001919	(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-Dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione	43.56	0.53
	MOL001921	芍药新苷 Lactiflorin	49.12	0.8
	MOL001924	芍药苷 Paeoniflorin	53.87	0.79
	MOL001928	芍药内酯苷 Albiflorin	66.64	0.33
	MOL001930	苯甲酰芍药苷 Benzoyl paeoniflorin	31.27	0.75
	MOL000211	丁子香酚 Mairin	55.38	0.78
	MOL000359	谷甾醇 Sitosterol	36.91	0.75
	MOL000422	山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24
	MOL000492	儿茶素(+)-Catechin	54.83	0.24
川芎 Rhizoma Chuanx- iong	MOL001494	Mandenol	42	0.19
	MOL002135	杨梅酮 Myricanone	40.6	0.51
	MOL002140	川芎嗪 Perlolyrine	65.95	0.27
	MOL002151	洋川芎酮 Senkyunone	47.66	0.24
	MOL002157	芎藭呋内酯 Wallichilide	42.31	0.71
	MOL000433	阿魏酸 Ferulic Acid	68.96	0.71
	MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
	MOL000020	12-Senecioid-2E,8E,10E-atractylentriol	62.4	0.22
白术 Rhizoma Atractylo- dis Macrocephalae	MOL000021	14-Acetyl-12-senecioid-2E,8E,10E-atractylentriol	60.31	0.31
	MOL000022	14-Acetyl-12-senecioid-2E,8Z,10E-atractylentriol	63.37	0.3
	MOL000049	3 β -乙酰氧基苍术酮 3 β -Acetoxyatractylone	54.07	0.22

续表 5 (Continued Tab. 5)

单味中药 Single Chinese medicine	编号 Number	活性成分 Active ingredient	口服生物利用度 OB (%)	类药性 DL
茯苓 Poria	MOL000072	8β-乙氧基白术内酯Ⅲ 8β-Ethoxy atractylenolide Ⅲ	35.95	0.21
	MOL000028	α-香树脂醇 α-Amyrin	39.51	0.76
	MOL000273	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-Dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	30.93	0.81
	MOL000275	氢化松苓酸 Trametenolic acid	38.71	0.8
	MOL000276	7,9(11)-去氢茯苓酸 7,9(11)-Dehydropachymic acid	35.11	0.81
	MOL000279	Cerevisterol	37.96	0.77
	MOL000280	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-Dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	31.07	0.82
	MOL000282	Ergosta-7,22E-dien-3β-ol	43.51	0.72
	MOL000283	过氧麦角甾醇 Ergosterol peroxide	40.36	0.81
	MOL000285	(2R)-2-[(5R,10S,13R,14R,16R,17R)-16-Hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	38.26	0.82
	MOL000287	3β-Hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	38.7	0.81
	MOL000289	茯苓酸 Pachymic acid	33.63	0.81
	MOL000290	茯苓酸 A Poricoic acid A	30.61	0.76
	MOL000291	茯苓酸 B Poricoic acid B	30.52	0.75
MOL000292	茯苓酸 C Poricoic acid C	38.15	0.75	
泽泻 Rhizoma Alismatis	MOL000296	常春藤皂苷元 Hederagenin	36.91	0.75
	MOL000300	Dehydroeburicoic acid	44.17	0.83
	MOL000830	泽泻醇 B Alisol B	34.47	0.82
	MOL000831	泽泻醇 B 乙酸酯 Alisol B monoacetate	35.58	0.81
	MOL000832	23-乙酰泽泻醇 B Alisol, B, 23-acetate	32.52	0.82
	MOL000849	16β-甲氧基泽泻醇 B 单乙酸酯 16β-Methoxyalisol B monoacetate	32.43	0.77
	MOL000854	泽泻醇 C Alisol C	32.7	0.82
	MOL000856	泽泻醇 C 乙酸酯 Alisol C monoacetate	33.06	0.83
	MOL002464	1-亚油酸甘油单酯 1-Monolinolein	37.18	0.3
	MOL000862	[(1S,3R)-1-[(2R)-3,3-Dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5R,8S,9S,10S,11S,14R)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]butyl] acetate	35.58	0.81

表 6 当归芍药散活性成分的部分靶点信息

Table 6 Partial target information of active ingredients in Danggui Shaoyao Powder

序号 No.	靶点 Target	序号 No.	靶点 Target	序号 No.	靶点 Target	序号 No.	靶点 Target
01	CHRM4	06	SLC6A3	11	CYP1A2	16	NR1B3
02	CCNA2	07	SELE	12	RXRA	17	NR3C2
03	PLAU	08	LTA4H	13	ESR1	18	OPRM1
04	NCOA1	09	PGR	14	ALOX5	19	JUN
05	PRSS1	10	ADRB1	15	NSR	20	AKT1

2.4 当归芍药散活性成分-COVID-19 疾病靶点的预测

通过 GeneCards 数据库检索,发现 COVID-19 疾病相关靶点 259 个(部分信息见表 7,全部信息见补充数据)。利用 Draw Venn Diagram 网站,对当归芍

药散及 COVID-19 的相关靶点进行分析,得到共同靶点 18 个,对应的基因详细信息见表 8。当归芍药散活性成分与 COVID-19 疾病相关靶点结果由韦恩图展示,见图 1。

表 7 COVID-19 疾病相关的部分靶点信息

Table 7 Partial target information related to COVID-19 disease

序号 No.	靶点 Target	序号 No.	靶点 Target	序号 No.	靶点 Target	序号 No.	靶点 Target
01	TGFB1	06	TNF	11	SOCS3	16	CCR1
02	CARD9	07	CXCL2	12	MASP2	17	TRAF6
03	RNASE3	08	CHKB	13	STAT6	18	CCL11
04	ACE2	09	PIK3C2A	14	RAPGEF3	19	CANX
05	ALB	10	RUNX1	15	IRAK3	20	ITGA5

表 8 当归芍药散活性成分与 COVID-19 相关的靶点信息

Table 8 Target information related to COVID-19 and active ingredients of Danggui Shaoyao Powder

序号 No.	靶点 Target	序号 No.	靶点 Target	序号 No.	靶点 Target	序号 No.	靶点 Target
01	MAPK14	06	PPARG	11	PRKCA	16	PTGS1
02	CASP3	07	BAX	12	RELA	17	CD14
03	ICAM1	08	STAT1	13	BCL2	18	IL6
04	MAPK8	09	CASP8	14	PTGS2		
05	HMOX1	10	NOS2	15	CAT		

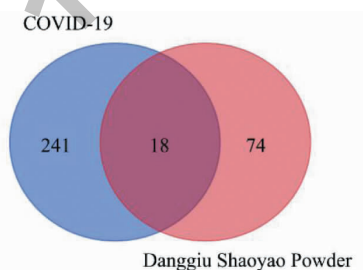


图 1 当归芍药散中活性成分作用靶点与 COVID-19 疾病靶点交集

Fig. 1 Intersection of the targets of active ingredients in Danggui Shaoyao Powder and COVID-19 disease targets

2.5 当归芍药散活性成分与 COVID-19 疾病靶点的互作网络分析

通过 STRING 网站,对此前分析得到的 18 个共同靶点进行分析,得到其蛋白相互作用网络(PPI),利用 Cytoscape3.6.1 对 STRING 分析得到的数据进行可视化分析(见图 2),对该网络图而言,颜色越深,节点越大,节点自由度越高,重要性越强。

2.6 当归芍药散复方-活性成分-COVID-19 疾病靶点网络的构建

将表 8 中的 18 个共同靶点及其对应的 14 个中药活性成分输入 Cytoscape3.6.1 中进行分析,构建当归芍药散治疗 COVID-19 的靶点网络图(见图 3),图中节点间的连线,代表二者间的关系,连线越多的中药活性成分或靶点,提示其可能为当归芍药

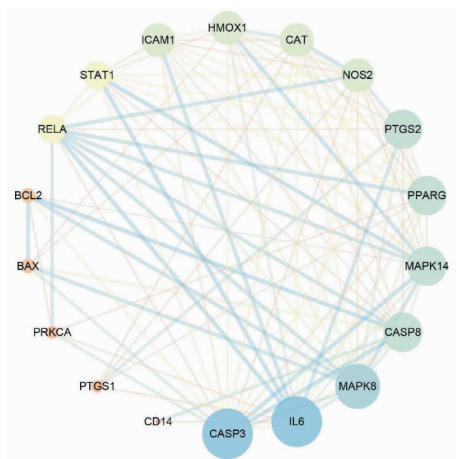


图 2 当归芍药散治疗 COVID-19 的作用靶点的 PPI 网络

Fig. 2 The PPI network of the target of Danggui Shaoyao Powder in the treatment of COVID-19

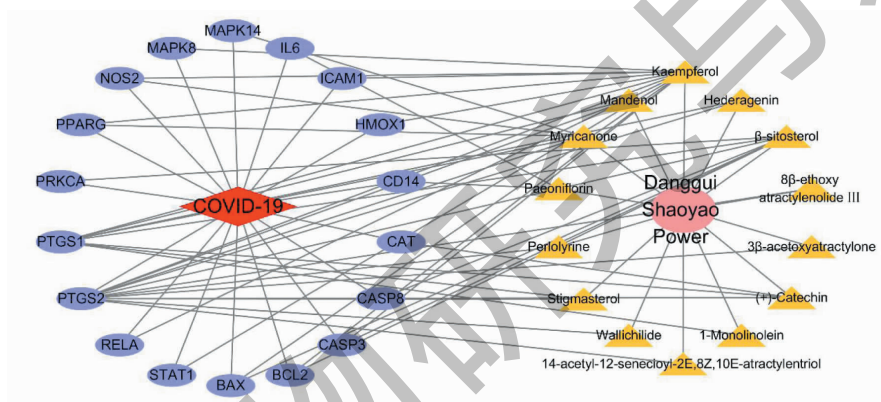


图 3 当归芍药散-活性成分-作用靶点-COVID-19 网络图

Fig. 3 Network diagram of Danggui Shaoyao Powder-active ingredients-target-COVID-19

散治疗 COVID-19 的关键成分或主要靶点。

2.7 当归芍药散活性成分-疾病靶点的 GO 生物功能富集分析

将表 8 中的 18 个共同靶点输入 DAVID 网站, 进行 GO 功能富集分析, 包括生物学过程 (BP)、细胞组成 (CC)、分子功能 (MF) 三方面, 共得到 180 个条目 ($P < 0.05$), 运用 R 语言对其显著性进行排序, 分别取 BP、CC、MF 排名前 10 个条目做可视化分析 (见图 4)。在生物过程中主要涉及对脂多糖的反应, 对氧化应激的反应, 对抗生素的反应等; 在细胞组分中主要涉及细胞膜, 线粒体, 微体等; 在分子功能中主要涉及血红素结合、蛋白磷酸酶结合、肿瘤坏死因子受体超家族结合等。图 4 中横坐标为 GO 功能富集条目名称, 纵坐标为富集于该条目的基因数量。以上数据提示, 当归芍药散治疗 COVID-19 的作用可能与上述生物功能密切相关。

2.8 当归芍药散活性成分-疾病靶点的 KEGG 通路富集分析

将表 8 中的 18 个共同靶点导入 R 语言, 利用 clusterProfiler 程序包进行 KEGG 通路富集分析, 共得到 109 个条目 ($P < 0.05$), 对其排名前 20 个条目做气泡图展示 (见图 5), 条目主要为: 结核病、AGE-RAGE 信号通路、乙型肝炎、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、Epstein-Barr 病毒感染、沙门氏菌感染、TNF 信号通路、弓形虫病、麻疹、甲型流感、人类免疫缺陷病毒 1 型感染、人巨细胞病毒感染、百日咳、IL-17 信号通路、Toll 样受体信号通路、C 型凝集素受体信号通路、小细胞肺癌、查加斯病 (美国锥虫病)、阿米巴病、凋亡通路。图 5 中纵坐标为富集通路名称, 横坐标为富集于该通路的基因个数所占比例。Count 代表富集于该通路的基因个数。以上数据提示, 当归芍药散治疗 COVID-19 的作用可能与上述信号通路密切相关。

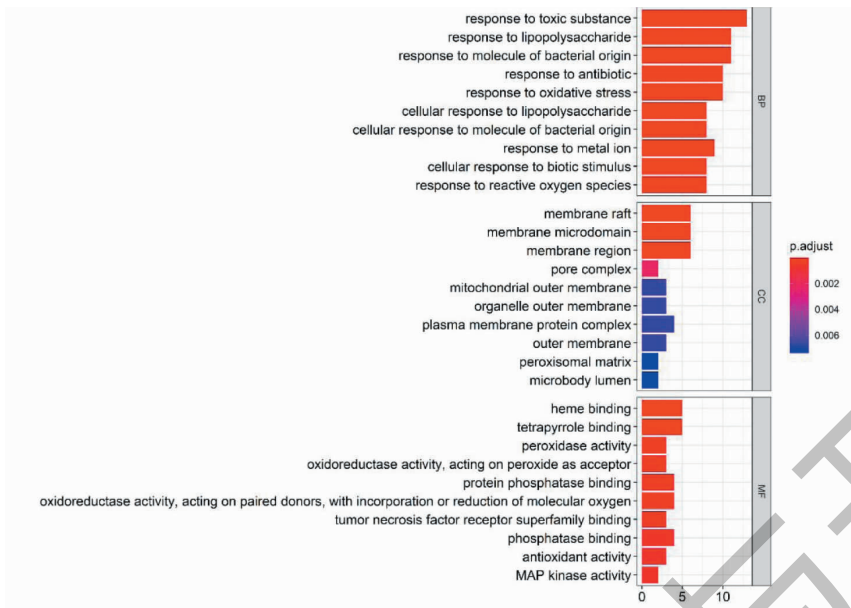


图 4 当归芍药散治疗 COVID-19 的作用靶点的 GO 功能富集结果

Fig. 4 GO functional enrichment results of action targets of Danggui Shaoyao Powder in the treatment of COVID-19

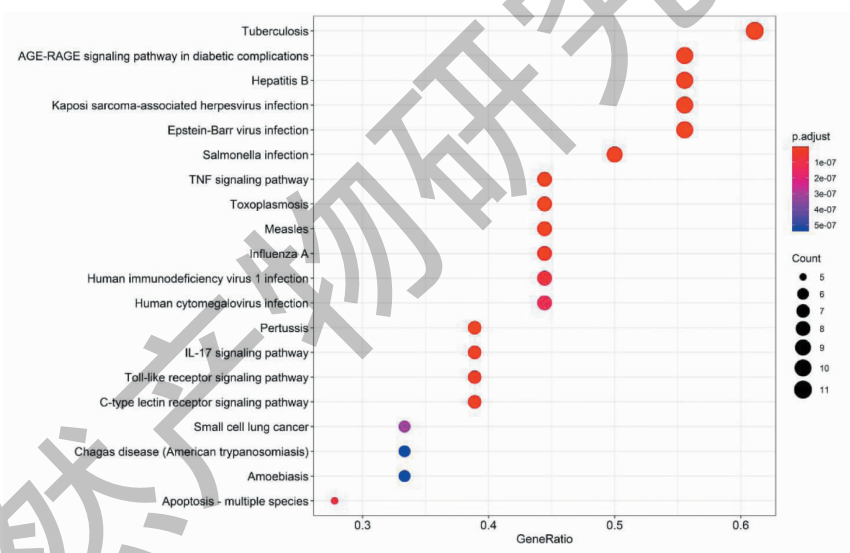


图 5 当归芍药散治疗 COVID-19 的作用靶点的 KEGG 通路富集结果

Fig. 5 KEGG pathway enrichment results of action targets of Danggui Shaoyao Powder in the treatment of COVID-19

4 讨论

COVID-19 属于祖国医学“疫病”范畴,其临床症状多样化,可出现多个不同脏腑的症状,中医诊疗过程中,应注重整体观念,结合实际时令运气,对患者进行辨证施治。2020 年中文括号庚子年)岁运为金运太过,燥金之年。《素问·气交变大论》言:“岁金太过,燥气流行,肝木受邪。”可知在此燥金之年,由于肺属金,故极易出现咳、痰、喘等肺系疾病。金克木,故亦可出现木脏疾病。治疗上应养阴润燥、

滋养肝血。新冠肺炎暴发于庚子年初之气,病位在肺,累及肝脾,在清热化湿解毒的基础上,务必要结合金运太过之年运气特点健脾气、养肝血、护阴液,尤其是对于新冠肺炎重症患者,由于病程较长,加之使用了大量耗气伤阴之品,元气大伤,治疗上尤其如此。当归芍药散方中当归、川芎、白芍养肝血、润肺燥;白术健运脾土,兼燥湿;茯苓泻肺之郁热;泽泻渗湿、泻肺气,全方具奏养、润、运、清之功。

本研究团队选用当归芍药散治疗 COVID-19 重

症患者 100 例,取得良好疗效。结果显示,治疗 10 天后,患者基本体征即体温、心率较治疗前明显下降,氧饱和度较前明显上升;主要症状具有发热、咳嗽、咽干咽痛、乏力、胸闷气促的患者人数较前明显减少。住院天数为 22.7 ± 7.97 天,核酸转阴率为 62%,CT 影像好转率为 71%,实验室检查复常率均在 65% 以上。以上结果表明当归芍药散对于临床治疗 COVID-19 患者具有良好疗效,因此,利用网络药理学进步探讨其对于 COVID-19 的潜在作用机制尤为重要。

本次网络药理学筛选出当归芍药散可能作用于 COVID-19 疾病的活性成分 14 个,包括芍药苷、山奈酚、 β -谷甾醇、杨梅酮、豆甾醇等。芍药苷可通过减轻炎症细胞浸润和改善肺微血管通透性来对脂多糖诱导的急性肺损伤起保护作用^[9]。山奈酚可有效抑制脂多糖引起的急性肺损伤中的细胞因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平,进而减轻气道炎症,减轻肺组织损伤^[10];其还可通过抑制炎症反、改善肝细胞凋亡,从而对 D-氨基半乳糖/脂多糖诱导的小鼠急性肝衰竭起保护作用^[11]。 β -谷甾醇可明显抑制病毒感染引起的炎症反应,进而减轻肺损伤,可用于预防或治疗甲流的抗病毒药物制备^[12]。杨梅酮可抑制 EB 病毒复制,进而减轻病毒感染^[13]。豆甾醇可通过抑制活性氧(ROS)增加而发挥抗氧化作用,其还可明显抑制 LPS 诱导的环氧合酶-2(COX-2)及前列腺素 E₂(PGE₂) 发挥抗炎作用^[14]。由上可见,当归芍药散中诸多化合物具有抗病毒、抗炎、抗氧化等作用。提示其对新型冠状病毒肺炎引发的肺损伤及肝损伤具有潜在的治疗作用。

GO 功能富集结果显示,BP 主要涉及对脂多糖的反应,对氧化应激的反应,对抗生素的反应等。脂多糖可通过激活 CASP11,诱导肺上皮细胞出现细胞焦亡,即细胞死亡同时释放大量炎症因子,进而引发急性肺损伤^[15]。在机体肺损伤过程中,过度的氧化介质会加重肺组织的损伤^[16]。过度使用抗生素可出现微生物群耗竭,进而引起肺损伤的加重,可表现为肺通透性增加,氧合指数增加,肺顺应性降低,肺匀浆中细胞因子/趋化因子水平升高^[17]。以上结果提示当归芍药散可能通过调节多种生物功能进而对 COVID-19 疾病起治疗作用。

KEGG 通路富集结果显示,当归芍药散治疗 COVID-19 疾病涉及的主要通路为结核病、AGE-RAGE 信号通路、乙型肝炎、卡波西肉瘤相关疱疹病

毒感染及 EB 病毒感染等。其中结核病通路上富集的靶点最多,分别为 CD14、CASP8、CASP3、Bax、Bcl-2、NF- κ B、IL-6、STAT、iNOS。结核病通路尤为复杂,涉及细胞凋亡、TLR、MAPK 等多条信号通路。TLR 及 MAPK 通路均为炎症反应过程中的重要通路,TLR 启动结合后,可激活 NF- κ B、p38 及 JNK,进而引发 IL-6、iNOS 等多种炎症介质大量释放,发生炎症级联反应,进而对机体组织造成损伤^[18]。肺损伤及肺纤维化中均可发生细胞凋亡,其中 Bcl-2 和 Bax 则是调控细胞凋亡的关键蛋白^[19]。同时,当归芍药散可能通过乙肝病毒、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、EB 病毒、IL-17 等通路等发挥抗病毒、抗炎等作用,体现其对于 COVID-19 疾病的治疗作用具有多靶点、多通路的特点。

综上所述,当归芍药散治疗 COVID-19 可能通过其有效活性成分芍药苷、山奈酚、 β -谷甾醇、杨梅酮、豆甾醇等作用于结核病、AGE-RAGE、乙型肝炎、IL-17 及 EB 病毒感染等信号通路发挥抗病毒、抗炎、抗氧化作用,进而改善 COVID-19 患者的临床症状。介于疫情期间医疗资源紧张,条件有限,本文中仅选取 100 例病例用于临床研究,样本量有限,统计结果只有一定的参考意义,且网络药理学本身具有一定的局限性,本研究分析获取的结果可能存在一定偏差,需今后在临床中进一步验证。

参考文献

- 1 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.
- 2 The Official Website of the National Health Commission of the People's Republic of China. The latest situation of the new coronavirus pneumonia as of 24:00 on March 25[EB/OL]. (2020-03-26). <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/202003/f01fc26a8a7b48debe194bd1277fdb3.shtml>.
- 3 Ru JL, Li P, Wang JN, et al. TCMSPP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminformatics, 2014, 6(1): 13.
- 4 The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D506-515.
- 5 Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analysis[J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54(1): 1.30. 1-14. 4.31.

- 6 Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-613.
- 7 Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13: 2498-2504.
- 8 Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- 9 Zhou, H, Bian, D, Jiao, X, et al. Paeoniflorin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by alleviating inflammatory cell infiltration and microvascular permeability[J]. *Inflamm Res*, 2019, 60: 981-990.
- 10 Ren J, Lu Y, Qian Y, et al. Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18: 2759-2776.
- 11 Song JY, Ren F, Zhang XY, et al. Protective effect of kaempferol on acute liver failure induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide in mice[J]. *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2017, 37: 569-574.
- 12 Yang ZF, Zhong NS, Li J, et al. Application of β -sitosterol in the preparation of drugs for the treatment or prevention of influenza A; CN105769877A[P]. 2016-07-20.
- 13 Ishida J, Kozuka M, Wang H, et al. Nagai, Antitumor-promoting effects of cyclic diarylheptanoids on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2000, 159: 135-140.
- 14 Wang S, Sun Y, Li CM, et al. An overview of the research progress of stigmasterol[J]. *Chin Pharm* (中国药业), 2019, 28(23): 96-98.
- 15 Cheng KT, Xiong S, Ye Z, et al. Caspase-11-mediated endothelial pyroptosis underlies endotoxemia-induced lung injury [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127: 4124-4135.
- 16 Ai WL, Dong LY, An W. Liver stimulating factor promotes apoptosis of hepatic stellate cells induced by hydrogen peroxide[J]. *Chin J Histochem Cytochem* (中国组织化学与细胞化学杂志), 2018, 27: 307-312.
- 17 Chambers E, Rounds S, Lu Q. Pulmonary endothelial cell apoptosis in emphysema and acute lung injury [J]. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2018, 228: 63-86.
- 18 Y Chen, S Guo, K Jiang, et al. Glycitin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting NF-kappaB and MAPKs pathway activation in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105749.
- 19 An FY, Yan CL, Liu YQ, et al. Xiefei Decoction regulates free radical metabolism in rats with pulmonary fibrosis by Bcl-2/Bax expression [J]. *J Basic Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2018, 24: 1695-1698.
- (上接第 401 页)
- 17 Rainio MJ, Margus A, Virtanen V, et al. Glyphosate-based herbicide has soil-mediated effects on potato glycoalkaloids and oxidative status of a potato pest [J]. *Chemosphere*, 2020, 258: 127254.
- 18 Chen WF, Lian KM, Liu JH, et al. Classification and discrimination of black tea taste characteristics based on black tea polyphenols [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31: 986-994.
- 19 Dai YQ, Lu YC, He LN, et al. Metabolic changes in the processing of Yunkang 10 sun-dried green tea based on metabolomics [J]. *Sci Agr Sin* (中国农业科学), 2020, 53: 357-370.
- 20 Li FQ, Wang F, Yang FQ, et al. Analysis of flavonoids in Chuan Citrus Reticulata Pericarpium and its aduterant using UHPLC-ESI-MS/MS [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 1324-1330.