

# 基于网络药理学与分子对接探讨连花清瘟胶囊入血成分干预细胞因子风暴防治新型冠状病毒肺炎的作用机制

王海娟<sup>1</sup>, 韩玉洁<sup>1</sup>, 张晓雪<sup>1</sup>, 李文瑾<sup>1</sup>, 郭秋红<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>河北中医学院; <sup>2</sup>河北省中药组方制剂技术创新中心; <sup>3</sup>河北省高校中药组方制剂应用技术研发中心, 石家庄 050200

**摘要:**利用网络药理学与分子对接从细胞因子风暴角度分析连花清瘟胶囊入血成分干预新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的可能作用机制。通过文献挖掘确定连花清瘟胶囊入血成分,借助 TCMSp 和 BATMAN-TCM 数据库检索连花清瘟胶囊入血成分相关作用靶点;利用 GeneCards、OMIM 和 Drugbank 数据库筛选 COVID-19 与细胞因子风暴相关靶点;通过 String 数据库构建蛋白互作 PPI 网络;应用 DAVID 数据库进行 GO 分析和 KEGG 通路分析;使用 Cytoscape 3.8.0 软件构建网络图;通过 AutoDock 软件进行分子对接;此外,检索多器官组织损伤、免疫损伤和 SARS 相关靶点,并与细胞因子风暴取交集。共收集 17 个连花清瘟胶囊入血成分,获得相应靶点 237 个,与疾病相交靶点得到 47 个,筛选出 22 个核心靶点;GO 分析和 KEGG 通路分析分别获得 174 个和 83 个条目( $P < 0.01$ );分子对接结果显示 Emodin、Formononetin、Rutin、Gallic acid、Liquiritigenin 核心化合物与 AKT1、IL-6、TP53、JUN、TNF 核心靶点有良好的结合能力;连花清瘟胶囊入血成分与多器官组织损伤及免疫损伤相交靶点比例 1.6%~2.0%,与 SARS 相交靶点比例 4.3%。连花清瘟胶囊入血成分干预细胞因子风暴防治 COVID-19 通过多成分、多靶点、多通路协同发挥作用,其作用机制可能与清除抗原、调节免疫和保护组织器官有关。

**关键词:**连花清瘟胶囊;入血成分;新型冠状病毒肺炎;细胞因子风暴;网络药理学;分子对接

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)11-1957-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.11.019

## Study on the mechanism of Lianhua Qingwen capsule absorbed components in prevention and treatment of COVID-19 by intervening on cytokines storm based on network pharmacology and molecular docking

WANG Hai-juan<sup>1</sup>, HAN Yu-jie<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-xue<sup>1</sup>, LI Wen-jin<sup>1</sup>, GUO Qiu-hong<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Hebei University of Chinese Medicine; <sup>2</sup>Hebei Technology Innovation Center of TCM Formula Preparations;

<sup>3</sup>Hebei Higher Education Institute Applied Technology Research Center on TCM Formula Preparation, Shijiazhuang 050200, China

**Abstract:** To analyze the possible mechanism of the intervention of absorbed components of Lianhua Qingwen Capsule on COVID-19 from the perspective of cytokine storm based on network pharmacology and molecular docking. Through literature mining, the components of Lianhua Qingwen capsules into blood were determined, and the related action targets of the components were searched by TCMSp and BATMAN-TCM databases. The related targets of COVID-19 and cytokine storm were screened by GeneCards, OMIM and Drugbank databases. The protein interaction PPI network was constructed through String database. DAVID database was used for GO analysis and KEGG pathway analysis. Cytoscape 3.8.0 software was used to build the network diagram. Molecular docking was performed by AutoDock software. In addition, multiple organ tissue injury, immune injury and SARS related targets were retrieved and intersected with cytokine storm. A total of 17 absorbed components of Lianhua Qingwen Capsules were collected, 237 corresponding targets and 47 targets intersected with diseases obtained, and 22 core tar-

收稿日期:2020-12-08

接受日期:2021-08-31

基金项目:河北省科技厅重点研发计划民生科技专项(20277712D)

\* 通信作者 Tel:86-311-89926099; Email: qiuHong70105@163.com

gets screened out. GO analysis and KEGG pathway analysis presented 174 entries and 83 entries respectively ( $P < 0.01$ ). The molecular docking results showed that the compounds of Emodin, Formononetin, Rutin, Gallic acid, Liquiritigenin had good binding ability with the core target of AKT1, IL-6, TP53, JUN, TNF. The proportion of intersecting target of Lianhua Qingwen Capsule and multiple organ tissue injury and immune injury was 1.6%-2.0%, and the proportion of intersecting target and SARS was 4.3%. Absorbed components of Lianhua Qingwen Capsule could effectively prevent and treat COVID-19 by intervening cytokine storm through multi-component, multi-target and multi-pathway synergistic action, and its mechanism may be related to antigen-scavenging, immune-regulating and tissue and organ protection.

**Key words:** Lianhua Qingwen Capsule; absorbed components; COVID-19; cytokine storm; network pharmacology; molecular docking

新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 是由冠状病毒感染引起的, 以发热、乏力、干咳为主要临床特征, 部分患者在发病一周后迅速转为重症, 严重者可进一步发展为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和多器官功能衰竭 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 等状态。值得注意的是, 少数早期轻症患者, 后期突然加重, 导致多器官衰竭而死亡, 其主要原因是引发细胞因子风暴<sup>[1]</sup>。

细胞因子风暴 (cytokine storm) 又称炎症风暴和高细胞介质症 (hypercytokinemia), 主要由于免疫系统失调后多种细胞因子迅速大量释放, 导致肺组织广泛水肿, 引起急性肺损伤, 与 COVID-19 的不良预后密切相关, 是疾病进展的重要转折点, 最终可发展为 ARDS、MODS, 甚至死亡<sup>[2,3]</sup>。由此可见, 通过抗炎治疗可能是遏制细胞因子风暴防治 COVID-19 的一种有效方法。

莲花清瘟胶囊 (简称“莲花清瘟”) 作为呼吸系统传染病突发公共卫生事件代表中成药, 主要由银翘散和麻杏甘石汤化裁而来, 包括金银花、连翘、大黄等 13 味中药, 具有清瘟解毒, 宣肺泄热的功效。已有研究证实<sup>[4]</sup>, 莲花清瘟通过调节炎症细胞因子表达, 明显改善患者发热、咳嗽、咳痰、气促、乏力等相关症状, 使转重比率明显下降, 对治疗 COVID-19 具有十分重要的意义。本研究将以莲花清瘟入血成分为基础, 通过网络药理学与分子对接探讨干预细胞因子风暴防治 COVID-19 可能作用机制, 以期为临床应用提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 莲花清瘟入血成分靶点预测

通过查阅文献确定莲花清瘟入血成分<sup>[5]</sup>, 借助中药系统药理学分析平台 (TCMSP, <https://tcmbsp.com/tcmbsp.php>) 数据库检索莲花清瘟入血成分相关

靶点, 利用中药分子机制生物信息学分析工具 (BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 数据库对莲花清瘟入血成分相关靶点进行补充。通过 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库对靶点进行标准化处理, 将其转换成与之相对应的基因名称。

### 1.2 疾病靶点的筛选及韦恩图

利用 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库, OMIM (<https://www.omim.org/>) 以及 Drugbank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库以“Novel coronavirus pneumonia”“Cytokine storm”为关键词收集疾病相关蛋白基因, 删除重复靶基因, 作为 COVID-19 与细胞因子风暴疾病靶点, 并利用在线韦恩分析工具 Venny 2.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 映射筛选出莲花清瘟入血成分对 COVID-19 以及细胞因子风暴交集作用靶点。

### 1.3 “中药-成分-靶点-疾病”网络构建与分析

获取的莲花清瘟入血成分以及与疾病交集靶点导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 构建网络关系图, 并利用“Analyze Network”功能对其进行拓扑分析, 获取主要有效化合物。

### 1.4 构建蛋白相互作用 (PPI) 网络

将莲花清瘟入血成分靶点与疾病靶点相交部分导入 String 数据库进行检索, 把蛋白物种设置为“Homo sapiens”, 最低相互作用阈值为 0.4, 隐藏单独靶点, 其余参数不变, 获取蛋白相互作用数据文件, 将数据导入 Cytoscape 3.8.0 进行拓扑分析, 根据 degree 值制作 PPI 网络图, 并以 degree 值大于中位数筛选出核心靶点。

### 1.5 GO 富集和 KEGG 通路分析

选取莲花清瘟入血成分干预细胞因子风暴防治 COVID-19 靶点, 导入生物学信息注释数据库 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), 分析基因本体论 (GO) 富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG)

通路,物种与背景均设置为“Homo sapiens”(P < 0.01)进行操作,并按照 count 进行排序,筛选排名靠前的 GO 富集和 KEGG 通路,并通过 Origin 2019 软件工具,对富集分析结果进行可视化作图。

### 1.6 构建“靶点-通路”网络图

通过筛选得到的连花清瘟入血成分与疾病共同靶点,与 KEGG 信号通路一同导入 Cytoscape 3.8.0 软件,绘制网络图。

### 1.7 成分-靶点分子对接

基于“中药-成分-靶点-疾病”网络与 PPI 蛋白互作网络分析,根据 degree 值选取排名前 5 个成分与前 5 个靶基因进行分子对接。首先从 ZINC(<http://zinc.docking.org/>)数据库下载核心化合物相关 mol2 格式文件,通过 PDB(<https://www.rcsb.org/>)蛋白数据库下载含有原配体的 3D 结构 PDB 格式文件,应用 PyMol 软件删除蛋白水分子,并拆分蛋白与配体,利用 AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接验证,最后用 PyMol 对结果进行可视化处理并作图。

### 1.8 检索多器官组织损伤、免疫损伤和 SARS 相关靶点

通过 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、

OMIM(<https://www.omim.org/>)、TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>)数据库,以“SARS”“Liver injury”“Renal injury”“Lung injury”“Cardiovascular injury”“Immune injury”为检索词,收集多器官组织损伤、免疫损伤相关靶点,利用在线工具 Draw Venn Diagram 分析连花清瘟入血成分与多器官组织损伤、免疫损伤和 SARS 之间的交集靶点,制作韦恩图。并分别将其交集靶点导入 DAVID 数据库,进行 KEGG 通路分析,通过 Origin 对结果进行可视化处理。

## 2 结果

### 2.1 筛选连花清瘟入血成分靶点与疾病靶点并制作韦恩图

通过文献查阅确定连花清瘟 22 个入血成分,剔除无靶点的成分,一共 17 个连花清瘟入血活性成分(见表 1),借助 TC MSP 和 BATMAN-TCM 数据库共收集得到 237 个靶点。利用 GeneCards、OMIM 以及 Drugbank 数据库查找 COVID-19 及细胞因子风暴相关靶点,其中收集 COVID-19 靶点 451 个,细胞因子风暴靶点 303 个,筛除重复靶点得到 685 个。将连花清瘟入血成分靶点与疾病靶点导入 Venny 2.0 进行绘制韦恩图,如图 1 所示。

表 1 连花清瘟入血成分  
Table 1 Absorbed components of Lianhua Qingwen

序号 No.	MOL 标识 MOL ID	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	来源 Source
1	MOL003066	Neochlorogenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	354.31	金银花
2	MOL000655	Loganic acid	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	376.36	金银花
3	MOL003065	Cryptochlorogenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	354.31	金银花
4	MOL000650	Swersoside	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	358.34	金银花
5	MOL003022	Secoxyloganin	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	404.4	金银花
6	MOL004368	Hyperin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464.4	金银花、连翘
7	MOL000415	Rutin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610.5	金银花、麻黄、甘草、连翘
8	MOL004953	Liquiritin apioside	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	550.5	甘草
9	MOL004941	Liquiritigenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	256.25	甘草
10	MOL000392	Formononetin	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	268.26	甘草
11	MOL004876	Glycyrrhizic acid	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	822.9	甘草、苦杏仁
12	MOL001320	Amygdalin	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>11</sub>	457.4	苦杏仁
13	MOL003341	Salidroside	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	300.3	红景天、连翘
14	MOL000513	Gallic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170.12	大黄、红景天
15	MOL002244	Chrysophanol glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	416.4	大黄
16	MOL002268	Rhein	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	284.22	大黄
17	MOL000472	Emodin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.24	大黄、薄荷

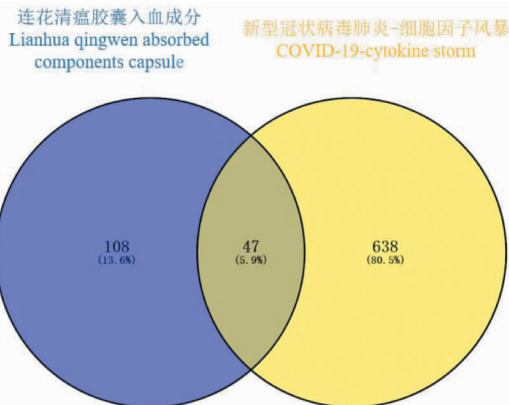


图1 成分与疾病靶点交集分布

Fig. 1 Intersection distribution of components and disease targets

## 2.2 “中药-成分-靶点-疾病”网络图与核心化合物

17 个入血成分和 47 个交集靶点导入 Cytoscape 软件构建“中药-成分-靶点-疾病”网络图,如图 2 所示,其中网络共有 74 个节点,176 条边,蓝色代表靶点,黄色代表成分,红色代表疾病与中药名称;利用内部“Analyze Network”功能,并根据 degree 值进行

分析,度值越高,说明其在网络中越重要。结果显示大黄素(emodin)、芒柄花黄素(formononetin)、芦丁(rutin)、没食子酸(gallic acid)、甘草素(liquiritigenin)成分在网络中排名较高,可能是连花清瘟入血成分干预细胞因子风暴防治 COVID-19 重要活性成分。

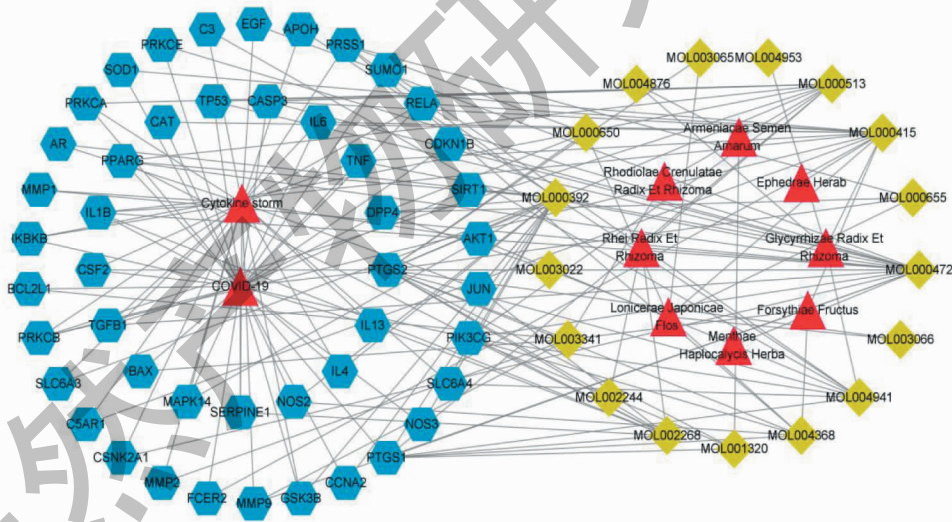


图2 “中药-成分-靶点-疾病”网络

Fig. 2 “Herbs-components-targets-disease” network

## 2.3 PPI 网络制作及筛选关键靶点

将 17 个入血成分靶点与疾病靶点相映射得到 47 个相交靶点,导入 String 数据库进行 PPI 网络分析,设置蛋白互作综合得分  $> 0.4$ ,隐藏单独靶点,其余参数不变,得到 PPI 网络信息,导入 Cytoscape 软件进行网络拓扑分析,根据 degree 值制作 PPI 网络图,如图 3 所示,其中节点表示每个蛋白,节点与节点之间的连线表示蛋白之间的相互作用关

系;以“degree  $>$  中位数(20)”筛选出核心靶点 22 个(见表 2),连花清瘟入血成分可能与核心靶点结合而发挥其药理作用。

## 2.4 GO 富集和 KEGG 通路分析

把得到的 47 共同靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 生物功能注释,获得 GO 条目 174 个( $P < 0.01$ ),分别包括生物过程(BP)129 个,细胞组成(CC)15 个,分子功能(MF)30 个,根据 count 值选

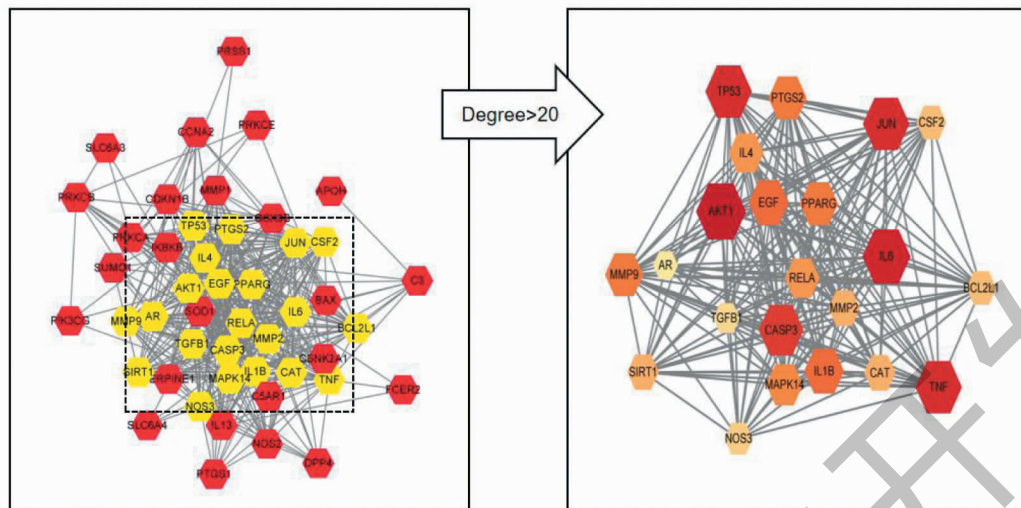


图 3 PPI 蛋白互作网络

Fig. 3 PPI protein interaction network

表 2 连花清瘟入血成分关键靶点信息

Table 2 Information on the key targets of absorbed components of Lianhua Qingwen

序号 No.	度值 Degree	靶点 Target	序号 No.	度值 Degree	靶点 Target
1	36	AKT1	12	28	MAPK14
2	35	IL6	13	27	IL4
3	34	TP53	14	27	RELA
4	34	JUN	15	25	SIRT1
5	34	TNF	16	25	MMP2
6	33	CASP3	17	25	CAT
7	30	IL1B	18	24	CSF2
8	30	EGF	19	24	BCL2L1
9	29	PPARG	20	23	NOS3
10	29	PTGS2	21	22	TGFB1
11	29	MMP9	22	21	AR

取各自排名前 10 个条目绘制柱状图,如图 4 所示,其中生物过程主要与炎症反应 (inflammatory response)、信号转导 (signal transduction)、免疫反应 (immune response) 等相关;细胞组成主要富集在细胞质 (cytoplasm)、核 (nucleus)、线粒体 (mitochondrion) 等;分子功能主要涉及在蛋白结合 (protein binding)、细胞因子活性 (cytokine activity)、蛋白激酶活性 (protein kinase activity) 等。KEGG 通路分析共富集于 83 个条目 ( $P < 0.01$ ),筛选排名靠前的 20 个条目进行可视化分析,绘制气泡图,如图 5 所示,主要涉及癌症通路 (pathways in cancer)、TNF 信号通

路 (TNF signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、NF- $\kappa$ B 信号通路 (NF- $\kappa$ B signaling pathway) 等。

### 2.5 构建“靶点-通路”网路图

47 个靶点,83 条 KEGG 通路导入 Cytoscape 软件构建“靶点-通路”网络图,如图 6 所示,其中网络共有 132 个节点,790 条边,利用内部的“Analyze Network”功能进行分析,在 47 个靶点中 PIK3CG、AKT1、RELA、TNF、IKKBK、JUN、IL6、TP53、PRKCA、

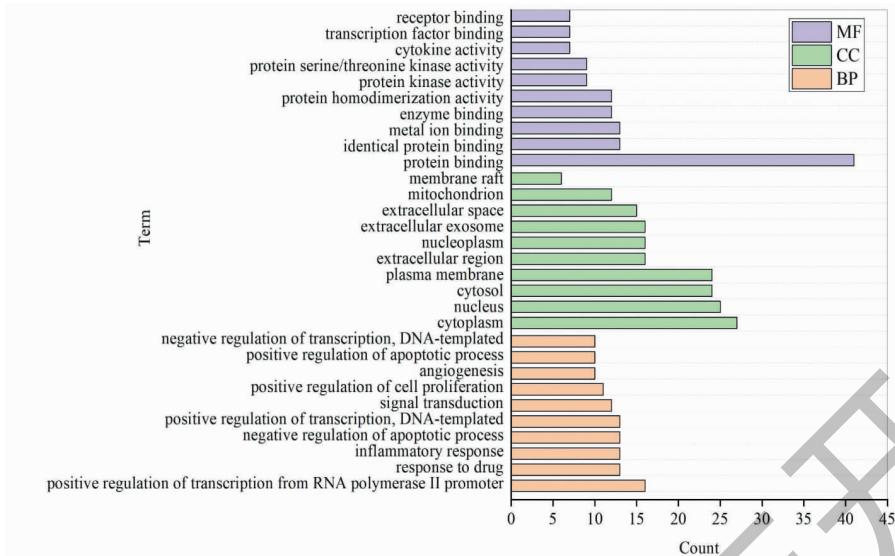


图4 GO 功能分析

Fig. 4 GO functional analysis

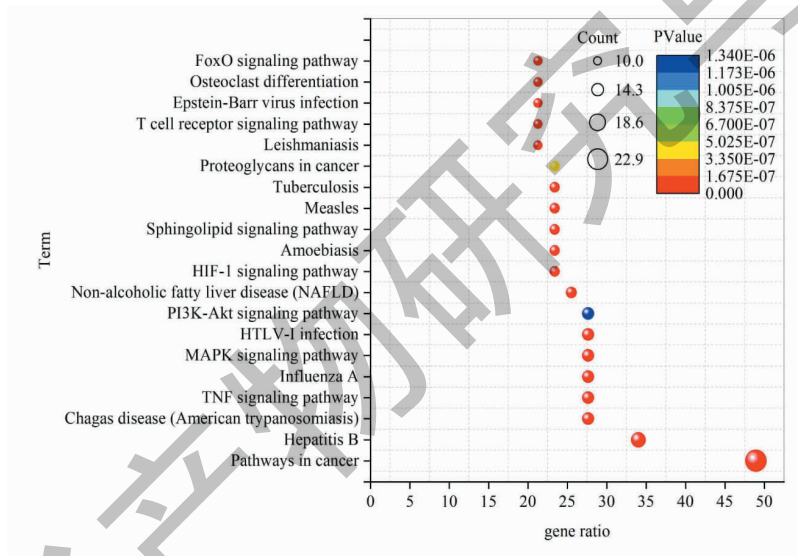


图5 KEGG 通路分析

Fig. 5 KEGG pathway analysis

MAPK14、PRKCB、IL1B、TGFB1、CASP3、GSK3B、EGF、CDKN1B、BAX、BCL2L1、CSF2、NOS2 共参与 10 条以上信号通路,为富集较多的基因,提示这些基因与连花清瘟入血成分作用机制高度相关。

## 2.6 分子对接验证结果分析

本研究将 emodin、formononetin、rutin、gallic acid、liquiritigenin 核心化合物与 AKT1、IL-6、TP53、JUN、TNF 核心靶点进行分子对接验证,结果表明化合物与靶点有良好的结合能力,其结合能越小表示结合活性越高,化合物越容易与靶点结合。结果见表 3 所示,核心化合物 emodin 分别与 AKT1、JUN、TNF、ACE2 结合能均小于 -8 kcal/mol; Liquiritigenin 与 TNF 结合能最低,其次为 emodin 与 JUN,表明

liquiritigenin、emodin 与 TNF、JUN 结合活性最强;而 emodin 通过结合位点 MET-111、ASN-114 形成氢键作用。分子对接情况如图 7 所示。

## 2.7 连花清瘟入血成分对多器官组织损伤、免疫损伤和 SARS 的作用

通过数据库检索“Liver injury”相关靶点 7 842 个,“Renal injury”靶点 6 685 个,“Lung injury”靶点 8 484 个,“Cardiovascular injury”靶点 6 513 个,“Immune injury”靶点 7 343 个,“SARS”靶点 1 688 个。为了进一步分析连花清瘟入血成分对多器官组织损伤以及免疫损伤是否有调控作用,把连花清瘟入血成分靶点与器官组织损伤、免疫损伤靶点之间取交集,并制作韦恩图,如图 8 所示,交集靶点个数与比

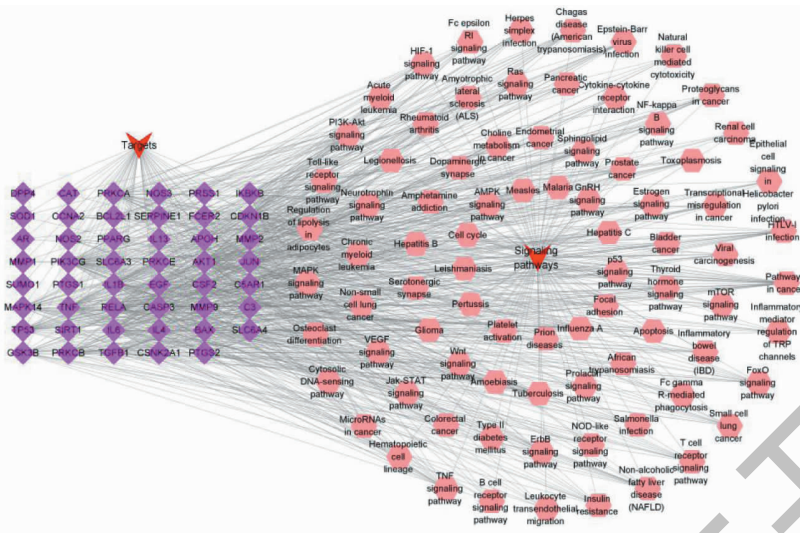


图6 “靶点-通路”网络

Fig.6 “Targets-pathways” network

表3 化合物与靶点分子对接结果

Table 3 Molecular docking results of compound and target

化合物 Compound	靶点 Target	结合能 Binding energy (keal/mol)	结合位点 Binding site
Emodin	AKT1	-8.5	TYR-335、HIS-297、ASN-296
Formononetin	AKT1	-7.5	TYR-335
Rutin	AKT1	-8.6	GLU-356、SER-225、ASN-265
Gallic acid	AKT1	-6.2	SER-225、TYR-335、ASN-296、HIS-297、TYR-335
Liquiritigenin	AKT1	-8.3	GLU-228、HIS-297、TYR-335
Emodin	IL6	-6.8	VAL-259
Formononetin	IL6	-6.5	SER-224
Rutin	IL6	-6.1	GLU-51、GLY-193、THR-188、GLN-187、GYS-102
Gallic acid	IL6	-4.8	LYS-252、MET-250、VAL-259
Liquiritigenin	IL6	-6.4	LYS-252、VAL-259
Emodin	TP53	-7.4	TYR-149、SER-148、GLY-150
Formononetin	TP53	-7.5	TYR-149、SER-148、ASP-77
Rutin	TP53	-6.4	ALA-118、GLY-119
Gallic acid	TP53	-5.5	SER-148、HIS-182、GLY-117
Liquiritigenin	TP53	-7	HIS-182、GLY-119
Emodin	JUN	-8.9	MET-111、ASN-114
Formononetin	JUN	-7.7	LYS-55
Rutin	JUN	-8	GLY-35、ASP-169、MET-111、ASP-112、ALA-113
Gallic acid	JUN	-5.2	ALA-113、MET-111
Liquiritigenin	JUN	-7	ILE-32、MET-111
Emodin	TNF	-8.4	GLN-258、ASP-325、SER-327、SER-333、TYR-75
Formononetin	TNF	-8.5	TYR-224、ASP-226、ARG-194、SER-333、PHE-53
Rutin	TNF	-7.3	SER-249、SER-327、DIS-214、TRP-334、ASP-325、ARG-194
Gallic acid	TNF	-6.5	ALA-227、TRP-334、TYR-75、ASP-228、SER-327、TYR-224、ARG-194
Liquiritigenin	TNF	-10	ARG-194、PHE-53、TRP-334、ALA-227

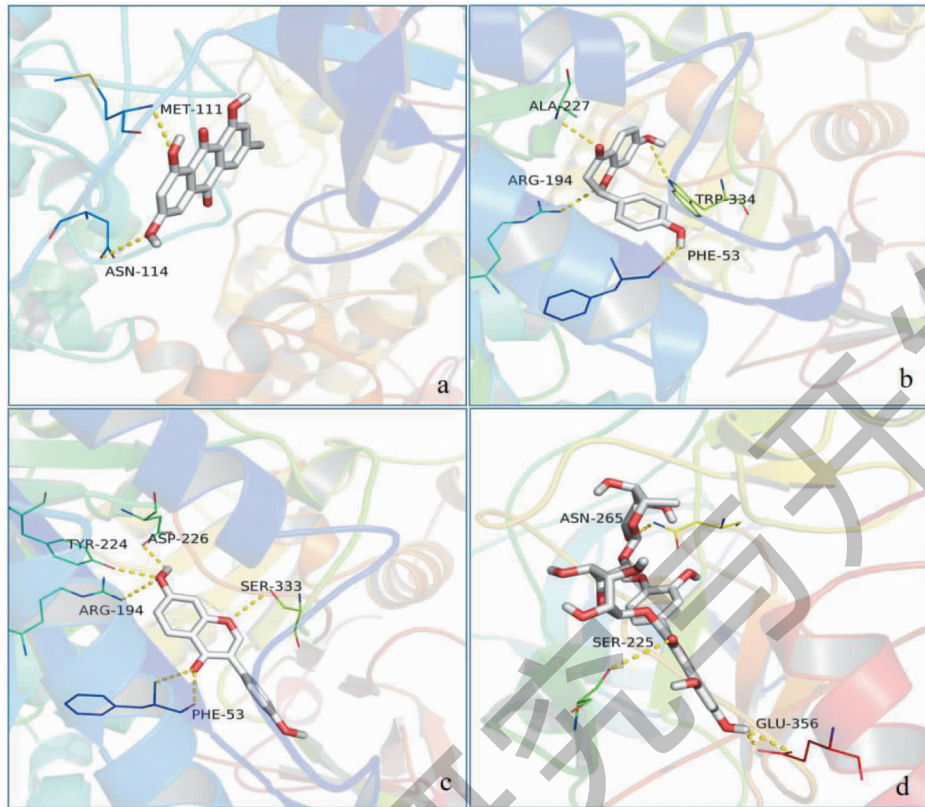


图7 化合物与靶点分子对接图

Fig. 7 Molecular docking diagram of compounds and target

注:a. 大黄素-JUN;b. 甘草素-TNF;c. 芒柄花黄素-TNF;d. 芦丁-AKT1。Note: a. Emodin-JUN;b. Liquiritigenin-TNF;c. Formononetin-TNF; d. Rutin-AKT1.

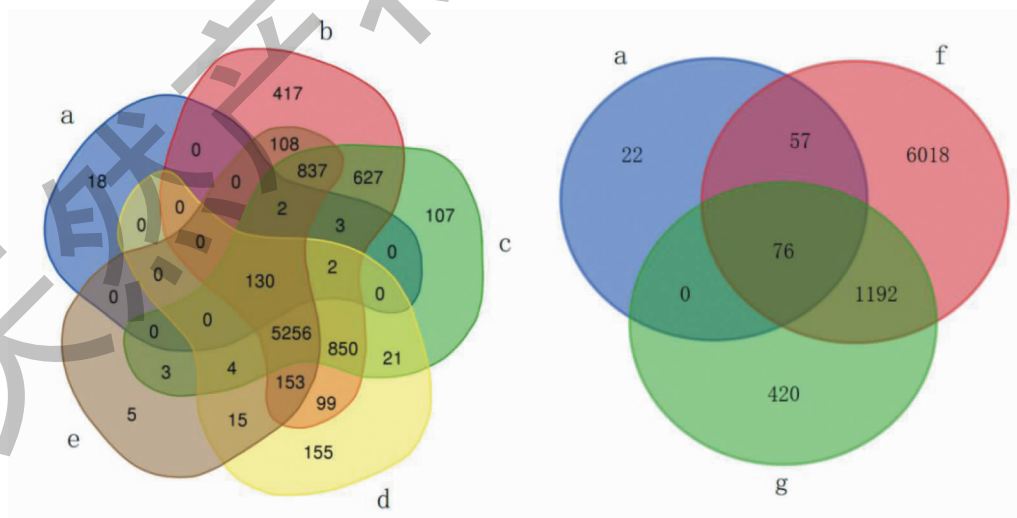


图8 连花清瘟入血成分与多器官组织损伤和免疫损伤、SARS 韦恩图

Fig. 8 Venn diagram of absorbed components of Lianhua Qingwen and multiple organ tissue injury, immune injury and SARS

注:a. 连花清瘟入血成分;b. 肺损伤;c. 肝损伤;d. 肾损伤;e. 心血管损伤;f. 免疫损伤;g. SARS。Note: a. absorbed components of Lianhua Qingwen;b. Lung injury;c. Liver injury;d. Renal injury;e. Cardiovascular injury;f. Immune injury;g. SARS.



例见表 4。

将莲花清瘟入血成分与 SARS 得到的 76 个交集靶点,多器官组织损伤 130 个交集靶点,免疫损伤 133 个交集靶点,分别导入 DAVID 数据库进行 KEGG 通路分析,并筛选各自排名靠前的 12 个条目进行绘制条形图,如图 9 所示,结果显示多器官组织

损伤、免疫损伤和 SARS 主要涉及癌症通路 (pathways in cancer)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway) 等。

表 4 莲花清瘟入血成分与多器官组织损伤、免疫损伤和 SARS 靶点信息

Table 4 Target information of absorbed components of Lianhua Qingwen and multiple organ tissue injury, immune injury and SARS

检索词 Search word	靶点数 Number of targets	与入血成分交集靶点数 Number of intersecting targets with absorbed components	与入血成分交集靶点比例 The proportion of intersecting target with absorbed components (%)
Liver injury	7842	137	1.7
Renal injury	6685	132	2
Lung injury	8484	137	1.6
Cardiovascular injury	6513	132	2
Immune injury	7343	133	1.8
SARS	1688	76	4.3

### 3 讨论

本研究通过查阅文献得出 17 个莲花清瘟有效入血成分,利用网络拓扑学分析得到 emodin、formononetin、rutin、gallic acid、liquiritigenin 核心成分;获得 47 个莲花清瘟入血成分干预细胞因子风暴防治 COVID-19 潜在作用靶点,包括 AKT1、IL-6、TP53、JUN、TNF、CASP3、IL1B、EGF 等 22 个核心靶点。为了更好的诠释靶点涉及的功能,本研究对 47 个靶点进行了 GO 富集分析和 KEGG 通路分析,结果发现莲花清瘟入血成分作用机制主要富集 RNA 聚合酶

II 启动转录正调控 (positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)、炎症反应 (inflammatory response)、NF- $\kappa$ B 转录因子活性正调控 (positive regulation of NF-KappaB transcription factor activity) 等与炎症相关的生物过程;KEGG 通路分析主要涉及癌症通路 (pathways in cancer)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、NF- $\kappa$ B 信号通路 (NF- $\kappa$ B signa-

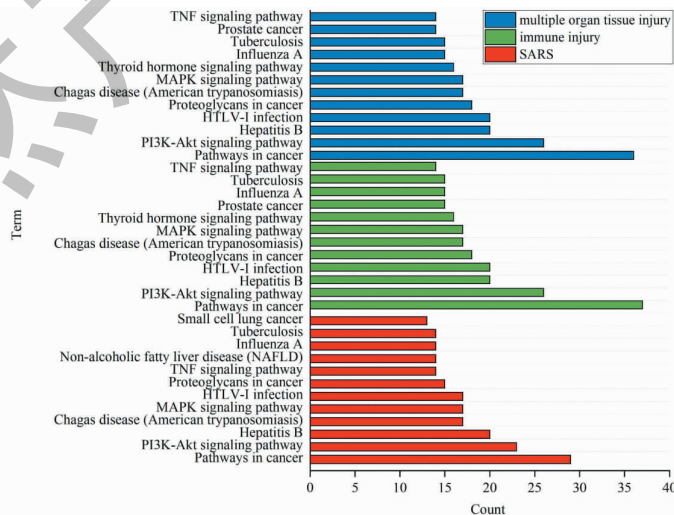


图 9 莲花清瘟入血成分与 SARS、多器官组织损伤和免疫损伤 KEGG 通路分析

Fig. 9 KEGG pathway analysis of absorbed components of Lianhua Qingwen and multiple organ tissue injury, immune injury and SARS

ling pathway)等。分子对接显示连花清瘟入血成分中 emodin、formononetin、rutin、gallic acid、liquiritigenin 核心化合物与 AKT1、IL-6、TP53、JUN、TNF 核心靶点有良好的结合能力,推测连花清瘟入血成分可能通过调节相关靶点,抑制炎症细胞因子分泌,阻断 SARS-CoV-2 病毒与 ACE2 蛋白结合,防止 SARS-CoV-2 感染人体细胞,进而发挥干预细胞因子风暴的效果。

为了进一步分析连花清瘟入血成分对多器官组织损伤以及免疫损伤是否有调控作用,通过数据库检索多器官组织损伤以及免疫损伤相关靶点,并与连花清瘟入血成分靶点之间取交集,结果显示连花清瘟胶囊入血成分与多器官组织损伤及免疫损伤相交交集靶点比例为 1.6%~2%。因 SARS 病毒与冠状病毒具有高度的同源性,把连花清瘟入血成分与 SARS 病毒两者之间取交集,得出连花清瘟入血成分与 SARS 交集靶点比例为 4.3%。提示连花清瘟入血成分有调节免疫,保护组织器官以及抗病毒的可能。KEGG 通路分析结果显示多器官组织损伤、免疫损伤和 SARS 主要涉及癌症通路、PI3K-Akt、MAPK、TNF、HIF-1 等信号通路。故本研究根据靶点预测,及 KEGG 通路分析,将从清除抗原,调节免疫系统,保护组织器官三个方面探讨连花清瘟入血成分干预细胞因子风暴防治 COVID-19 的作用。

### 3.1 清除抗原—抗病毒

新型冠状病毒是 COVID-19 的病原体,广州医科大学第一附属医院呼吸疾病国家重点实验室研究发现连花清瘟体外可明显抑制新型冠状病毒活性,减少细胞膜及胞浆中病毒含量,抑制细胞因子过度激活。研究发现,ACE2 是 SARS-CoV-2 宿主细胞受体,SARS-CoV-2 与 ACE2 结合是病毒感染人体细胞的重要环节,SARS-CoV-2 感染后进入肺泡细胞,短期内复制大量细胞因子,最终形成细胞因子风暴引发炎症<sup>[6,7]</sup>。Ho 等<sup>[8]</sup>发现大黄素通过阻断 SARS-CoV 蛋白与 ACE2 受体结合来抑制 SARS-CoV 感染,从而起到抗病毒作用。已有研究表明,芦丁 200mg/kg 时,对流感小鼠肺指数抑制率为 27.3%,具有明显抗流感病毒的作用,而对流感病毒抑制作用可能在释放和扩散阶段<sup>[9,10]</sup>。MAPK 是一种已知可被多种病毒激活的主要细胞信号通路,此前有关人冠状病毒感染的报道显示,p38 MAPK 通路激活,其下游调控蛋白磷酸化增强,促进促炎细胞因子的产生,并导致细胞因子风暴<sup>[11]</sup>。Wang 等<sup>[12]</sup>通过体

内和体外实验发现,大黄酸可以抑制甲型流感病毒 (IAV) 吸附和复制,可能是通过抑制 MAPK 以及 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。已经证实甘草主要成分甘草酸可以抑制 SARS-CoV 病毒在体外培养 Vero 细胞内的复制,还能抑制病毒在复制周期早期阶段的吸附和渗透<sup>[13]</sup>。以上说明连花清瘟入血成分具有广谱抗病毒作用,可能通过抑制病毒繁殖,进一步从源头遏制细胞因子风暴发生。

### 3.2 免疫调节—抑制炎症风暴

免疫紊乱是细胞因子风暴的核心,病毒进入机体后,使免疫调控网络失衡,导致促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间平衡失调,使机体走向一种高炎症状态,进而引发细胞因子风暴。通过韦恩图发现连花清瘟入血成分与免疫损伤有 133 个共同靶点,由此可知连花清瘟入血成分可能通过免疫调节达到抑制炎症风暴。根据已有研究发现,COVID-19 患者外周血 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞显著减少,但 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞 Th17 亚群增加,CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞含有更高浓度的细胞毒性颗粒,提示在某种程度上,病人免疫程度损伤严重<sup>[14]</sup>。IL-6 是一种促炎细胞因子,IL-6 分泌有助于辅助评估 COVID-19 严重程度,且 IL-6 水平动态变化可作为重症新冠肺炎患者病情监测的指标<sup>[15]</sup>。TNF- $\alpha$  主要有单核巨噬细胞分泌的小分子蛋白,释放炎性因子参与炎症反应,进而加重疾病发生发展。已有研究发现激活 NF- $\kappa$ B 通路,导致 TNF- $\alpha$  和 IL-6 等促炎细胞因子的过度表达,阻断 NF- $\kappa$ B 信号通路不仅可以抑制病毒传播,还可以抑制相关炎症发展<sup>[16]</sup>。甘草酸在绵羊肺炎支原体 (MO) 感染中,可以通过增加 MO 感染后的巨噬细胞增殖,从而起到免疫调控作用<sup>[17]</sup>。大黄素作为大黄的主要成分之一,除了能抑制炎症早期细胞因子外,还能抑制炎症级联反应,降低“次级”炎症细胞因子表达,通过抑制 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化,能使 IL-6、TNF- $\alpha$  在外周血中表达降低,抑制 LPS 诱导的巨噬细胞释放细胞因子,具有较理想抗炎功效<sup>[18,19]</sup>。已有研究表明芒柄花黄素可以降低对脑组织炎症因子表达,主要是通过控制 SphK1/SIP 信号通路的激活,从而抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路,进一步改善炎症因子对脑组织的损伤<sup>[20]</sup>。Liu 等<sup>[21]</sup>观察发现红景天苷能使血清中促炎细胞因子和肺部炎症显著降低,明显抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 促炎细胞因子,使抗炎细胞因子 IL-10 水平明显升高。以上表明,连花清瘟入血成分通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路,下调促炎细胞因子

表达,上调抗炎细胞因子水平,使促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间平衡,从而起到干预细胞因子风暴作用。

### 3.3 组织器官保护

细胞因子风暴的后果是多器官功能衰竭,过量的细胞因子释放会导致组织损伤,严重者导致死亡。在临床生化检验指标中发现,COVID-19 主要损伤器官是肺,其次对心、肝、肾也有不同程度的损伤<sup>[22]</sup>。根据莲花清瘟入血成分与各脏器损伤的靶点制作韦恩图可知,莲花清瘟入血成分对各脏器损伤都有交集靶点,可能通过这些靶点减轻组织器官损伤,增强机体免疫功能。PI3K 属于胞内磷脂酰肌醇激酶,Akt 是 PI3K 下游非常重要的活性靶标,属于一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。PI3K/Akt 信号通路在 LPS 诱导的慢性肝损伤中表达升高,显著影响 NF- $\kappa$ B 信号通路,导致细胞转录改变,最终导致肝功能障碍;有研究证明苦杏仁苷对细胞中 PI3K 和磷酸化 AKT 表达降低,表明苦杏仁苷通过抑制 PI3K/AKT 和 NF- $\kappa$ B 信号通路,增强抗炎能力,对肝损伤具有显著保护作用<sup>[23]</sup>。Hu 等<sup>[24]</sup>研究发现 LPS 诱导 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 炎症反应是急性肺损伤(ALI)恶化的关键因素,因此,抑制促炎细胞因子过量产生和表达来降低 LPS 诱导 ALI 不可忽视。大黄素在重症急性胰腺炎(SAP)肺损伤大鼠模型中,通过下调 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  炎症表达,起到保护 SAP 肺损伤,保护机体的作用<sup>[25]</sup>。说明莲花清瘟入血成分,通过抑制 PI3K/AKT、NF- $\kappa$ B 炎症信号通路,具有减轻组织器官损伤的作用。

综上所述,通过网络药理学与分子对接对莲花清瘟入血成分进行探究性研究,表明莲花清瘟入血成分具有多成分、多靶点、多通路的特点,能通过调节相关细胞因子及信号通路发挥清除抗原、调节免疫和保护组织器官的作用。该研究为莲花清瘟胶囊有效防治 COVID-19 提供了物质基础及理论依据。

### 参考文献

- Xie JY, Wang MS, Cheng AC, et al. Cytokine storms are primarily responsible for the rapid death of ducklings infected with duck hepatitis A virus type 1[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6596.
- Vaninov N. In the eye of the COVID-19 cytokine storm[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(5): 277.
- Xu Z, Shi L, Wang YJ, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome[J].

- Lancet Respir Med*, 2020, 8: 420-422.
- Yao KT, Liu MY, Li X, et al. Retrospective clinical analysis on treatment of coronavirus disease 2019 with traditional Chinese medicine Lianhua Qingwen[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2020, 26(11): 8-12.
- Yu H, Jia WN, Liu JP, et al. UPLC-Q-TOF-MS was used to analyze the absorbed components of Lianhua Qingwen Capsules[J]. *Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药)*, 2016, 33: 756-759.
- Totura AL, Whitmore A, Agnihotram S, et al. Toll-like receptor 3 signaling via TRIF contributes to a protective innate immune response to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection[J]. *Med Biol*, 2015, 6(3): e00638-15.
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579: 270-273.
- Ho T, Wu S, Chen J, et al. Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction[J]. *Antiviral Res*, 2007, 74(2): 92-101.
- Wang YF, Wang XH, Zhu YT, et al. Experimental study on inhibition effect of rutin on influenza A virus[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中医药学刊)*, 2005, 23(5): 827.
- Ding Y, Cao ZY, Ke ZP, et al. Inhibition of rutin against influenza virus *in vitro* and its mechanism[J]. *Drugs Clin(现代药物与临床)*, 2015, 30: 1431-1436.
- Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, et al. Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319: 1228-1234.
- Wang QW, Su YS, Jiang T, et al. Anti-influenza A virus activity of rhein through regulating oxidative stress, TLR4, Akt, MAPK, and NF- $\kappa$ B signal pathways[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0191793.
- Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus[J]. *Lancet*, 2003, 361: 2045-2046.
- He MM, Zhu YL, Shang XJ, et al. Association of inflammatory markers with severity of COVID-19[J]. *South China J Prev Med(华南预防医学)*, 2020, 46(3): 247-249.
- Zhang J, Jin H, Gu L, et al. Correlation between serum IL-17 IL-6 TNF- $\alpha$  and mycoplasma pneumoniae infection in children with atopic constitution[J]. *Chin J Nosocomiol(中华医院感染学杂志)*, 2020, 30: 2201-2205.
- Ding YW, Zeng LJ, Li RF, et al. The Chinese prescription lianhuaqingwen capsule exerts anti-influenza activity through the inhibition of viral propagation and impacts immune function[J]. *BMC Complem Altern M*, 2017, 17(1): 130.

- 17 Gao LY, Zhang K, Wang QH, et al. The effects of glycyrrhizic acid on mycoplasma ovipneumiae-infected macrophages[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:1075-1081.
- 18 Ma CF, Wang Y, Shen AJ, et al. The Effect of emodin on the inflammatory cytokine production by lipopolysaccharide-induced macrophage[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药学刊), 2015, 33:1320-1323.
- 19 Liu C, Gao HJ, Zhu YZ, et al. Immunomodulation of emodin and its effect on the expression of TNF- $\alpha$  and IL-10 in splenocytes from mice[J]. Basic Clin Med(基础医学与临床), 2018, 38:1298-1302.
- 20 Huang BS, Wang X, Li QQ, et al. Formononetin reduces inflammation in focal brain ischemia reperfusion rat via inhibiting sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling pathway[J]. J Nanjing Med Univ: Nat Sci(南京医科大学学报:自科版), 2017, 37:1239-1242.
- 21 Liu M, Su MX, Qin LF, et al. Effect of salidroside on lung injury by upregulating peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression in septic rats[J]. Exp Ther Med, 2014, 7:1446-1456.
- 22 He Y, Gan W, Zhang M, et al. Evaluation of clinical biochemical indexes in the progression and treatment of COVID-19[J]. Int J Lab Med(国际检验医学杂志), 2020, 41:906-909.
- 23 Yang Y, Zhao J, Song X, et al. Amygdalin reduces lipopolysaccharide-induced chronic liver injury in rats by down-regulating PI3K/AKT, JAK2/STAT3 and NF- $\kappa$ B signalling pathways[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47:2688-2697.
- 24 Hu X, Li H, Fu L, et al. The protective effect of hyperin on LPS-induced acute lung injury in mice[J]. Microb Pathog, 2019, 127:116-120.
- 25 Cai DL, Gao K, Chen ZY, et al. Effect of emodin on expression of Toll-Like receptor 4 and 9 in pancreas and lung tissue of lung injury rats with severe acute pancreatitis[J]. Zhejiang J Tradit Chin Med(浙江中医杂志), 2018, 53:914-915.

(上接第 1844 页)

- 18 Wang X, Xu M, Peng Y, et al. Triptolide enhances lipolysis of adipocytes by enhancing ATGL transcription via upregulation of p53[J]. Phytother Res, 2020, 34:3298-3310.
- 19 Chen M, Wang JM, Wang D, et al. Triptolide inhibits migration and proliferation of fibroblasts from ileocolonic anastomosis of patients with Crohn's disease via regulating the miR-16-1/HSP70 pathway[J]. Mol Med Rep, 2019, 19:4841-4851.
- 20 Wang S, Liu Z, Wang J, et al. The triptolide-induced apoptosis of osteoclast precursor by degradation of cIAP2 and treatment of rheumatoid arthritis of TNF-transgenic mice[J]. Phytother Res, 2019, 33:342-349.
- 21 Noel P, Von Hoff DD, Saluja AK, et al. Triptolide and its derivatives as cancer therapies[J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40:327-341.