

青蒿琥酯-葛根素组合干预新型冠状病毒肺炎心血管损伤的 网络药理学研究和作用机制探讨

邓硕秋^{1,2},田亚^{1,2},陈利娜^{1,2},沈硕^{1,2},杨源民^{1,2},
张雨^{1,2},瞿水清^{1,3},郑钟原^{1,2},刘慧^{1,3},王茜^{1,4},李洪梅^{1*},李玉洁^{1,2*}

¹中国中医科学院中药研究所,北京 1007002; ²中国中医科学院青蒿素研究中心;

³广东药科大学中药学院,广州 510006; ⁴山西医科大学药学院,太原 030001

摘要:新型冠状病毒肺炎全球累计感染已超 5 000 万例,心血管并发症发生率高,共病患者死亡率高。本文旨在通过网络药理学和分子对接预测两单体成分组合干预 COVID-19 心血管损伤的潜在作用机制。借助 TCMSP、Swiss target prediction 等检索和预测两单体成分作用靶点;借助 GenCards 等检索 COVID-19 及心血管损伤靶点;借助 STRING 分析蛋白互作关系;通过 DAVID 进行 GO、KEGG 分析;借助 Vina 软件进行模拟对接。共收集 16 个关键靶点;GO 功能富集分析收集到 146 个($P < 0.05$);KEGG 通路富集分析筛选得到 77 条($P < 0.05$);对接结果显示青蒿琥酯和葛根素与病毒关键蛋白均有较强亲和力。推测两单体成分通过多靶点、多通路协同作用调控机体,通过防止病毒入侵、抑制病毒增殖、抑制细胞因子风暴、增强心血管保护等途径发挥干预作用。

关键词:新型冠状病毒肺炎 (COVID-19);新型冠状病毒 (SARS-CoV-2);青蒿琥酯;葛根素;心血管损伤

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)Suppl-0070-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.S.009

Study on the mechanism of artesunatum-puerarin combination in intervening COVID-19 cardiovascular complications based on network pharmacology

DENG Shuo-qiu^{1,2}, TIAN Ya^{1,2}, CHEN Li-na^{1,2}, SHEN Shuo^{1,2}, YANG Yuan-min^{1,2},
ZHANG Yu^{1,2}, QU Shui-qing^{1,3}, ZHENG Zhong-yuan^{1,2}, LIU Hui^{1,3}, WANG Xi^{1,4}, LI Hong-mei^{1*}, LI Yu-jie^{1,2*}

¹Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100702, China;

²Artemisinin Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

³School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

⁴School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: More than 50 million confirmed coronavirus disease 2019 (COVID-19)-related cases have been reported across the world. There is high incidence of cardiovascular complication and a high mortality rate among patients. This study aims to predict and explore the potential pathways and mechanistic targets of artesunate-puerarin combination in the intervention of COVID-19 cardiovascular injury through network pharmacology and molecular docking. Firstly, the related targets of SARS-CoV 2 were collected from GenCards and UniProt. And the related targets of Artesunate and Puerarin were collected and predicted from TCMSP and Swiss target prediction. Secondly, protein-protein interaction of common targets was analyzed by STRING. GO and KEGG enrichment analysis were performed by DAVID. At last, Vina was used for molecular docking of compounds and key targets including ACE2, TMPRSS2, SARS-CoV-2 3CL hydrolase and S protein. A total of 16 key targets were collected. GO enrichment analysis collected 100 biological processes, 14 cell compounds and 32 molecular functions ($P < 0.05$). According to the results, Artesunate and Puerarin may regulate the body processes through multiple targets and pathways. We predicted that, on the one hand, two monomer compositions may prevent the process of virus invasion and proliferation. On the

other hand, they can also inhibit cytokine storm and protect cardiovascular from injury. Two compositions play a role on protection of COVID-19 cardiovascular damage. Based on these results, we obtained the potential protection mechanisms of Artesunate-Puerarin combination, which would laid a solid foundation for the subsequent development and research, and provide the basis for expanding clinical existing treatments and reference.

Key words: artesunatum; puerarin; SARS-CoV-2; COVID-19; heart injury; network pharmacology

2019年12月以来,新型冠状病毒肺炎(*coronavirus disease 2019, COVID-19*)肆虐全球,成为危害人类健康和生命的重大公共卫生危机,由病毒导致的传染病多属于我国传统医学的“瘟疫”范畴,多为邪气侵体、体内正气不足所导致。全球各地形势稍有好转,据Worldometers (<https://www.worldometers.info/coronavirus/>)实时统计数据显示,截止2021年4月13日,全球病例数为137 242 780,已康复110 420 272例,中国已普遍接种疫苗,疫情得到了有效控制。

国家卫生委员会统计数据显示,武汉COVID-19重症患者中,有58%患有高血压,20%患有心脏病,44%患有心律不齐^[1],提示心血管系统受累,可能在新冠肺炎高重症率、高致死率中发挥重要的作用。新冠肺炎对心血管系统的影响是一种多环节的综合作用,涉及心脏、血管组织细胞直接损伤,也涉及因缺血、缺氧^[2]及炎症^[3]等因素的继发受损,同时神经调节、体液调节、凝血过程^[4]的紊乱也参与其中。老年人和有基础病的患者感染COVID-19后会产生极其严重的影响,如可加重心血管危险因素,导致心血管疾病发生或恶化^[5],有报道25%的COVID-19患者发生心力衰竭,且死亡率比普通患者更高^[6]。我国新冠肺炎病例中,新冠肺炎合并心血管病的死亡率达10.5%,远高于2.6%粗死亡率^[7]。心血管基础疾病患者不仅更易感染新型冠状病毒(SARS-CoV-2)且症状更重,死亡风险更高。我国心血管病现患人数3.3亿^[8],面对庞大的心血管病患者群和不断攀升的确诊病例,重视新冠与心血管疾病共病患者,加大新冠肺炎并发心血管损伤的发病机制、药物的筛选等深入研究具有重大意义。

COVID-19目前尚无公认的特效药,“老药新用”始终是治疗新冠病毒的业内共识^[9],因此对确有疗效的上市中药进行筛选,有望提高药物发现的成功率,并且大大缩短药物研发的时间周期^[10]。前期,本课题组通过大量的文献调研和预初实验分析,推测青蒿琥酯(artesunate, AS)和葛根素组合可能对新冠病毒心血管损伤有一定的保护作用。

青蒿琥酯又名青蒿酯(artesunatum, AS),是具有倍半萜结构的青蒿素衍生物之一,研究发现具有抗炎^[11]等作用,可发挥抗心律失常、抗心肌缺血、抗动脉粥样硬化等心血管保护用,还具有恢复免疫平衡、减轻多器官损伤、广谱抗病毒等作用,可能对COVID-19心血管并发症发挥的干预作用的理论推导提供了进一步的支撑。葛根素(puerarin, Puer)为中药葛根的主要活性成分,具有心脑血管保护^[12]、抗氧化^[13]、保护血管内皮^[14]、促进细胞凋亡^[15]等作用,能降低血压、减慢心率、降低心肌耗氧指数而改善缺血心肌的代谢^[16],同时通过降低血浆和心肌组织Ang II含量显著及NF-κB p65的蛋白活性保护心血管系统^[17]。结合文献调研与前期研究,我们推测青蒿琥酯、葛根素联合使用可干预COVID-19心血管损伤,本研究采用网络药理学和分子对接的方法预测相关机制,为进一步深入研究提供参考。

1 方法

1.1 网络药理学预测分析作用机制

具体方法如图1。

1.1.1 收集单体成分的作用靶点

运用化源网(<https://www.chemsrc.com/>)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、swiss target prediction (<http://new.swisstargetprediction.ch/>)、TCMSP (<http://tcmsp.w.com/tcmsp.php>)、ETCM (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/>)等数据库进行靶点富集和预测,结合文献进行适当补充,整合后纳入单体成分作用靶点。

1.1.2 疾病靶点的获取

新型冠状病毒肺炎相关关键词为:“novel coronavirus”“novel coronavirus pneumonia”“corona virus disease 2019”;心血管疾病相关关键词为:“cardiovascular injury”、“arrhythmia”“heart arrhythmia”“cardiac arrhythmia”(心律不齐/心律失常)、“acute myocardial injury”(急性心肌损伤)、“acute myocardial infarction”(急性心肌梗死)、“acute myocarditis”(急性心肌炎)、“atherosclerosis”“coronary artery atherosclerosis”(动脉粥样硬化)。

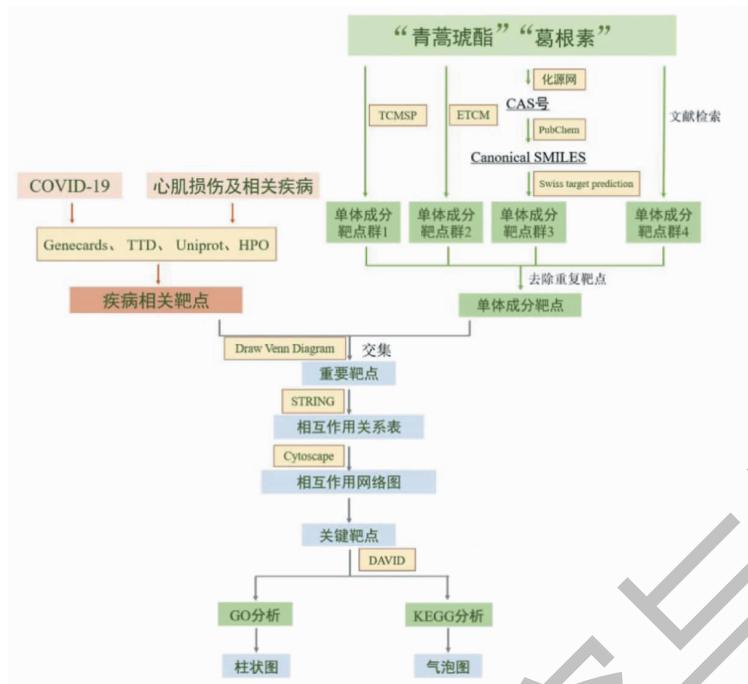


图 1 网络药理学预测分析作用机制

Fig. 1 Whole analysis for the pharmacology study

检索 GenCards (<https://www.genecards.org/>)、UniProt (<https://www.uniprot.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、HPO (<https://hpo.jax.org/app/>) 等数据库,选择物种为“homo sapiens”,整合后纳入疾病靶点。

1.1.3 靶点蛋白基因名的确定及重要靶点的获得

借助 UniProt (<https://www.uniprot.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、CTD (<http://ctdbase.org/>) 等数据库将全部靶点矫正为人源 (homo sapiens) 靶标蛋白对应的基因名 (Gene name), 导入网站 Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 中, 取单体成分与疾病靶点的交集为重要靶点。

1.1.4 重要靶点互作分析及关键靶点的获得

对重要靶点进行蛋白质互作分析 (PPI), 物种选择为人, 得到靶点相互作用关系表, 将结果导入 Cytoscape3.6.0, 构建靶点相互作用网络图。利用 Cytoscape3.8.0 中 network analysis 功能进行网络图分析筛选关键靶点蛋白。

1.1.5 靶点的 GO 和 KEGG 分析

将关键靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), 输入靶基因名称列表并限定物种为人, 进行对单个基因进行分析注释, 构建 GO 生物学过程 (biological process, BP)、细胞组成

(cellular components, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 及 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 信号通路富集分析。分别用 GraphPad9.0 和 R studio 将其结果绘制成柱状图与气泡图进行可视化。

1.2 单体成分-靶点分子对接

从 RSCB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 SARS-CoV-2 3CL 水解酶、血管紧张素转化酶 II (ACE2)、人体细胞膜表面的跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (TMPRSS2)、S 蛋白 (Spike glycoprotein) 的 3D 结构, 运用 DiscoveryStudio 2020 Client 软件移除靶蛋白中的配体和非蛋白分子 (如水分子)。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载单体成分 3D 结构的 SDF 格式文件。利用 PyRx 软件上传优化后的蛋白质文件, 再上传单体成分结构使其能量最小化, 并将其转化为 * pdbqt 格式文件, 最后运用 Vina 进行对接。

2 结果

2.1 重要靶点的获取

预测得青蒿琥酯 (AS) 靶点 105 个, 葛根素 (Puer) 靶点 150 个。

数据库与文献中检索新型冠状病毒靶点并去除重复项后得靶点 371 个, 检索心血管损伤相关靶点 6 214 个, 心律不齐、心律失常靶点 3 515 个, 急性心

肌损伤靶点 2 955 个,急性心肌梗死靶点 2 744 个,急性心肌炎靶点 467 个,动脉粥样硬化靶点 3 900 个。

单体成分与疾病靶点重合部分为重要靶点,共 40 个,包括 ACE2、半胱天冬酶 3(caspase3, CASP3)、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPARG)、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、蛋白激酶 C(protein kinase C alpha, PRKCA)、B 细胞淋巴瘤-2(BCL2 apop-

tosis regulator, BCL2)、超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1)、肿瘤蛋白 P53(tumor protein p53, TP53)、B 淋巴细胞瘤-2 基因相关启动子(BCL2 associated agonist of cell death, BAD)、Bcl-2 相关 X 蛋白(BCL2 associated X protein, BAX)等。单体成分与疾病靶点的重合情况如表 1、图 2。可见青蒿琥酯与葛根素单体成分关键靶点与多种病毒和心肌损伤相关靶点有交集。青蒿琥酯、葛根素、COVID-19、心血管疾病的共同靶点有 7 个,提示两种单体成分可能通过这些靶点对新冠心血管合并症直接干预。

表 1 单体成分与疾病靶点的交集情况

Table 1 Intersection of monomer components and disease targets

交集情况 Name	合计 Total	重要靶点名 Core target
新冠病毒肺炎、心血管疾病、青蒿琥酯-葛根素 COVID-19、Cardiovascular disease、AS-Puer	7	EGFR, CASP3, ITGB1, PPARG, GSK3B, PIK3CA, CASP8
新冠病毒肺炎、心血管疾病、青蒿琥酯 COVID-19、Cardiovascular disease、AS	8	PTGDR, MAPK14, CASP6, CREBBP, MAPK1, PARP1, ACE, CTSL
新冠病毒肺炎、心血管疾病、葛根素 COVID-19 Cardiovascular disease, Puer	25	F10, FOS, NOS3, TNF, IFNB1, PRKCA, ITGA5, BCL2, VCP, SOD1, ACE2, TP53, CALM1, BAD, IL2, BAX, etc.

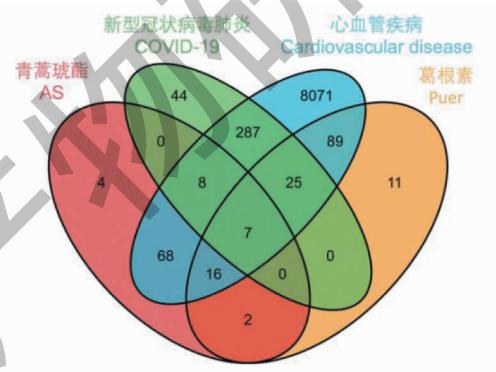


图 2 单体成分与疾病靶点的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram analysis of monomer components and disease targets

2.2 关键靶点的获取

为深入探究 2 个化合物的作用机制及 40 个重要靶点蛋白的关系,基于 PPI 网络关系,利用 STRING 的数据收集功能,忽略孤立节点,设置靶点互作关系卡值 >0.4 。以节点“度值(degree)”“节点紧密度(closeness)”“节点介度(betweenness)”平均值为最低标准,经分析、筛选后得关键靶点共 16 个,度值最高的为与凋亡相关的 CASP3、与增殖相关的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、TP53、TNF,度值均为 53,其中 TNF 具

有提高中性粒细胞吞噬能力、增强 T 细胞增殖能力、抑制病毒复制、抑制病毒蛋白合成、病毒颗粒的产生和感染性、杀伤病毒感染细胞的能力,提示青蒿琥酯、葛根素可能通过上述靶点干预新冠病毒与心肌损伤。其余包括表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、细胞核因子 κB p65 蛋白(RELA proto-oncogene, RELA)、前列腺素内过氧化物合成酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、白介素 2(interleukin 2, IL2)、一氧化氮合酶 2(nitric oxide synthase 2, NOS2)、PPARG 等,提示

这些关键靶点可能是两单体成分发挥作用的主要途径。相互作用关系见图 3, 图中节点越大表示度值越大, 颜色从蓝到红表示度值从小到大; 连接线越粗

表示连接越紧密, 颜色从蓝到红表示连接度从小到大。

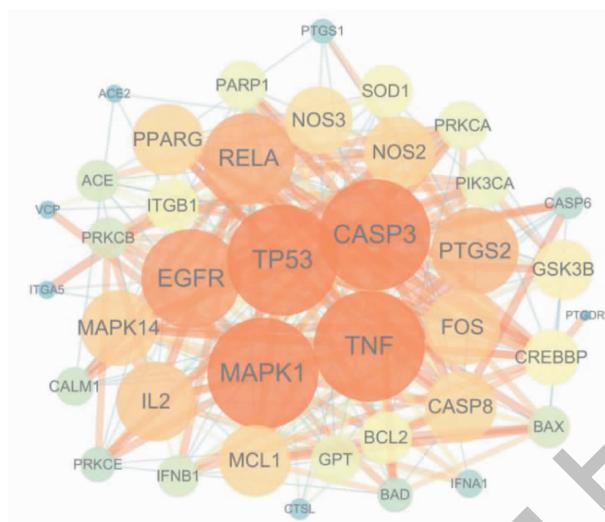


图 3 关键靶点的 PPI 网络图

Fig. 3 Protein-protein interaction network of core targets

2.3 靶点通路可视化

将“2.2”中筛选到的 16 个关键靶点导入 DAVID 数据库, 得到 GO 条目共 146 个 ($P < 0.05$), 其中生物过程(BP)条目 100 个, 细胞组成(CC)条目 14 个, 分子功能(MF)条目 32 个, 分别占 68.5%、9.7%、21.8%。其中, 生物过程(BP)以凋亡过程、氧化应激、血管舒张、脂多糖介导的信号通路、等条目较为富集, 体现了对应急过程局部与整体的总体调控; 细胞组成(CC)条目中显示大多条目富集在胞浆、核、细胞质等场所中, 提示可以在上述部位进行机制的研究探索; 分子功能(MF)以蛋白质结合、转录调控区 DNA 结合、转录因子活性、蛋白质异构化活性、蛋白酶结合、一氧化氮合酶活性等条目较为集中, 表明调节这些方面可能是活性物质产生作用的潜在机制。“Count”值排名前 20 位的条目见图 4, 其中 A 为生物过程, B 为细胞组成, C 为分子功能。

KEGG 通路富集分析筛选得到 77 条 ($P < 0.05$) 信号通路, 可见蛋白靶点主要富集在癌症途径、肿瘤坏死因子信号通路、T 细胞受体信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路、Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路、破骨细胞分化、细胞凋

亡等多个信号通路。如 MAPK 通路是细胞增殖、应激、炎症、凋亡等信号转导通路的共同交汇通路之一, 参与细胞增殖、分化、癌变、转移、凋亡等, 可产生多种效应。表明活性物质会通过多渠道调节免疫以及炎症反应, 降低其对机体产生的损伤。同一种化合物作用于不同靶点, 不同的化合物作用于相同靶点, 呈现出中药成分多靶点-多途径协同调节的特点。

选择 P 值最小的前 20 个通路进行可视化分析, 结果见图 5, 其中 X 轴代表富集因子 Enrichment, 即目标基因中属于这个分支的基因的数量; Y 轴代表通路名称; 气泡面积大小代表 Count, 即目标基因集中属于这个分支的基因数量; 气泡颜色代表 P value, 即 P 值的大小, 反应富集显著性。

通过 Cytoscape 绘制的“化合物-关键靶标-通路”网络可视化图, 如图 6, 其中, 上方左侧深绿色圆形节点表示青蒿琥酯中的关键靶点, 上方右侧浅绿色圆形节点表示葛根素中的关键靶点, 上方中间绿色圆形节点表示青蒿琥酯和葛根素中共有的关键靶点, 下方紫色三角形节点表示由关键靶点富集得到的通路。

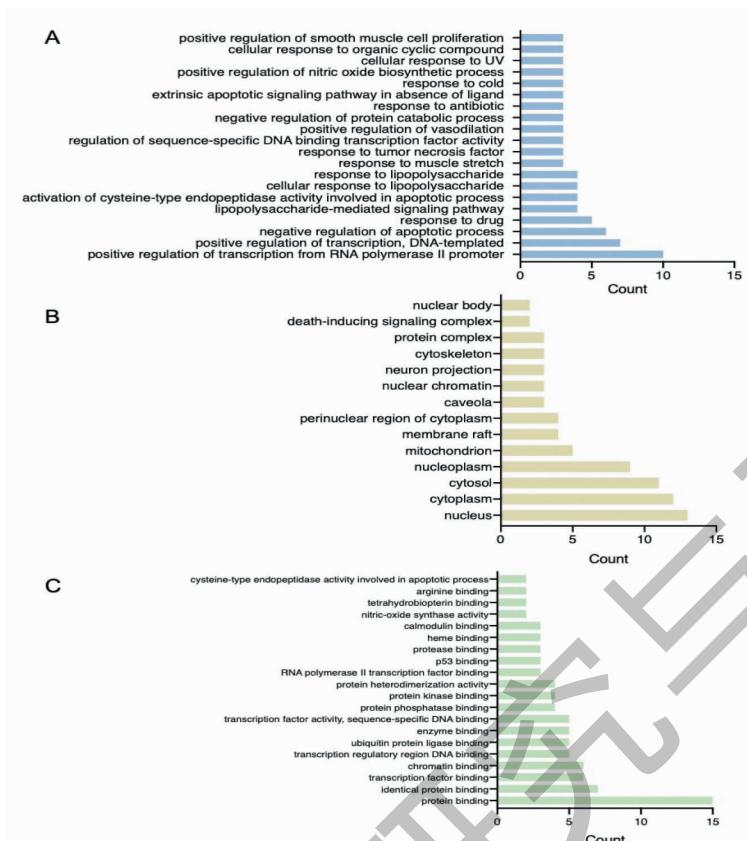


图 4 关键靶点的 GO 富集分析分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of core targets

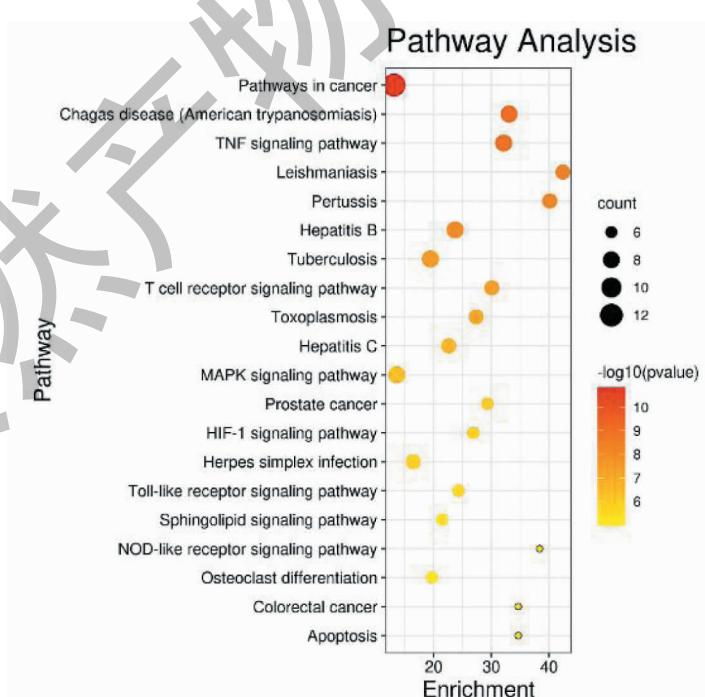


图 5 关键靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of core targets

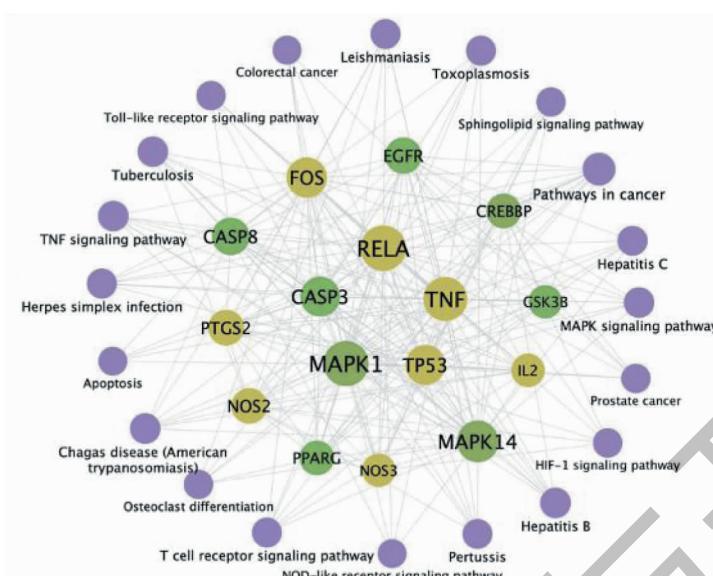


图 6 关键靶标-通路网络图
Fig. 6 Core targets-pathway network

2.4 分子对接

青蒿琥酯、葛根素及两种阳性药具体请见表 2。

表 2 青蒿琥酯、葛根素及阳性药

Table 2 Details of monomer components and positive comparison drugs

化合物 Compound	分子式 Molecular formula	分子质量 Molecular mass (g/mol)	CAS
青蒿琥酯 Artesunate	C ₁₉ H ₂₈ O ₈	384.4	88495-63-0
葛根素 Puerarin	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	416.4	3681-99-0
普萘洛尔 Propranolol	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259.3	525-66-6
依那普利 Enalapril	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	376.4	75847-73-3

病毒入侵细胞分为 3 个过程:一, 病毒吸附到细胞表面, 细胞膜上的 TMPRSS2 分别对细胞膜上的 ACE2 蛋白和病毒表面的刺突状 S 蛋白进行剪切修饰, 使两者空间构象更易结合^[18]; 二, ACE2 与 S 蛋白结合, 病毒通过吞饮作用、跨膜转位和融合作用穿入细胞, ACE2 随病毒内吞; 三, SARS-CoV-2 3CL 水解酶是病毒的主要蛋白酶之一, 在复制转录中起到尤为重要的作用, 病毒穿入后脱壳并进行生物合成, 成熟装配后从细胞释放。

对接结果显示, 与 ACE2 结合能最低的单体成分为葛根素(结合能为 -32.23 kJ/mol), 与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶结合能最低的单体成分为青蒿琥酯和葛根素(结合能均为 -33.49 kJ/mol), 与 S 蛋白

结合能最低的单体成分为青蒿琥酯(结合能为 -33.91 kJ/mol), 与 TMPRSS2 结合能最低的单体成分为葛根素(结合能为 -31.39 kJ/mol)。以结合能 ≤ -5 kcal/mol 作为筛选标准, 可见青蒿琥酯和葛根素与各 COVID-19 相关重要蛋白结合能均远小于 -5.0 kcal/mol, 且均小于阳性药的结合能(见表 3)。青蒿琥酯、葛根素与四种蛋白的对接情况请见图 7。

使用分子对接进行模拟验证, 结果显示, 两单体成分与受体蛋白结合能量低, 结合活性较高, 对接情况良好, 推测可能与关键蛋白发生自主对接。鉴于 4 个蛋白功能与病毒入侵、增殖和引起的心血管损伤有关, 提示两种单体化合物对新冠肺炎心血管并发症具有干预作用。

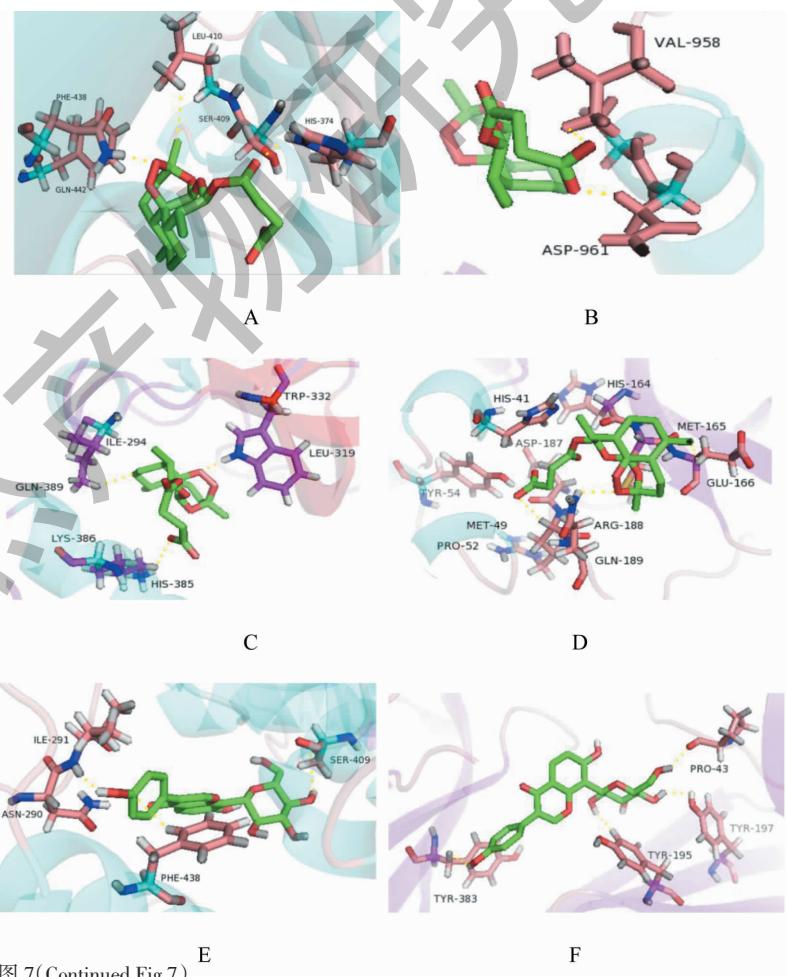
结果可见青蒿琥酯、葛根素与 ACE2 有良好的结合活性,推测其可能激活心血管保护作用,这是本课题组前期基于大量文献调研^[28]提出的。另外,两单体成分可能调节 ACE2 介导的免疫过激反应。前日,重庆大学的钟莉教授团队在预印本网站 Preprint.org 上发表重要结果^[29],认为 ACE2 参与调节

免疫过程,提示新冠病毒感染导致的 ACE2 水平下调,可能进一步引起细胞因子风暴和肺炎加重。新冠病毒致死的主要原因之一是人体免疫系统过度激活导致的细胞因子风暴,维持 ACE2 的正常表达对避免细胞因子风暴有重要作用。

表 3 四种小分子与四种蛋白对接的对接结果

Table 3 Molecular docking of related targets with monomer components and positive comparison drugs

蛋白 ID PDB ID	蛋白名 Protein name	普萘洛尔 Propranolol	依那普利 Enalapril	青蒿琥酯 Artesunate	葛根素 Puerarin
6nb6	Spike Glycoprotein	-28.46	-28.88	-33.91	-31.81
6lu7	3CLpro	-25.12	-27.21	-33.49	-33.49
5afw	TMPRSS2	-26.37	-28.05	-30.98	-31.39
1r42	ACE2	-26.37	-26.37	-30.14	-32.23



续图 7(Continued Fig.7) E

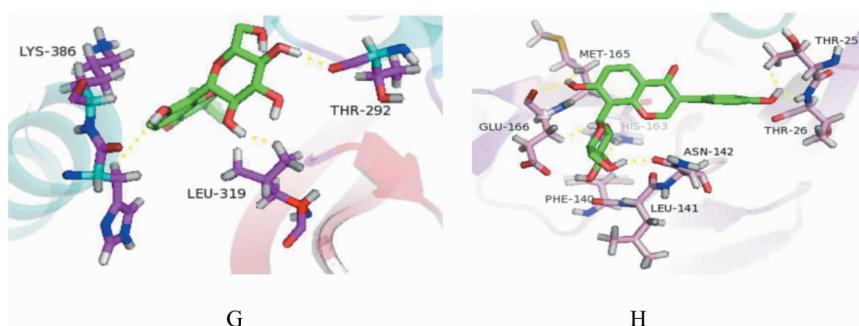


图 7 青蒿琥酯、葛根素与四种蛋白的对接模式

Fig. 7 Molecular docking diagram of related targets with monomer components and positive comparison drugs

注:A:青蒿琥酯与 ACE2;B:青蒿琥酯与 S 蛋白;C:青蒿琥酯与 TMPRSS2;D:青蒿琥酯与 3CL 水解酶;E:葛根素与 ACE2;F:葛根素与 S 蛋白;G:葛根素与 TMPRSS2;H:葛根素与 3CL 水解酶。Note: A:Artesunate-ACE2; B:Artesunate-spike glycoprotein; C:Artesunate-TMPRSS2; D:Artesunate-3CL pro; E:Puerarin-ACE2; F:Puerarin-spike glycoprotein; G:Puerarin-TMPRSS2; H:Puerarin-3CL pro.

3 讨论与结论

截止 2020 年 5 月,中医药治疗方法已成为我国卫健委推荐的 COVID-19 治疗方法之一,尤其在预防、疾病初期疗效明显,《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(第八版)》^[19]中提供了针对各个病程阶段、各个证型的中医用药建议,COVID-19 中医药诊疗方案体系已初见雏形,且临床疗效可观。方案中建议的中药复方制剂包括参麦注射液、生脉注射液等,常发挥

辅助作用。西医治疗方面,主要是给予常规对症治疗和支持治疗,有报道^[20]通过使用类固醇、静脉内免疫球蛋白、选择性细胞因子阻滞剂对新冠病毒心血管损伤进行干预,但结果仍存在争议。截至目前,心血管并发症的治疗问题尚未解决。

结合临床 COVID-19 心血管共病患者情况和特点,基于本次研究结果和前期关于两种单体成分的报道,本研究表明青蒿琥酯、葛根素可能对 COVID-

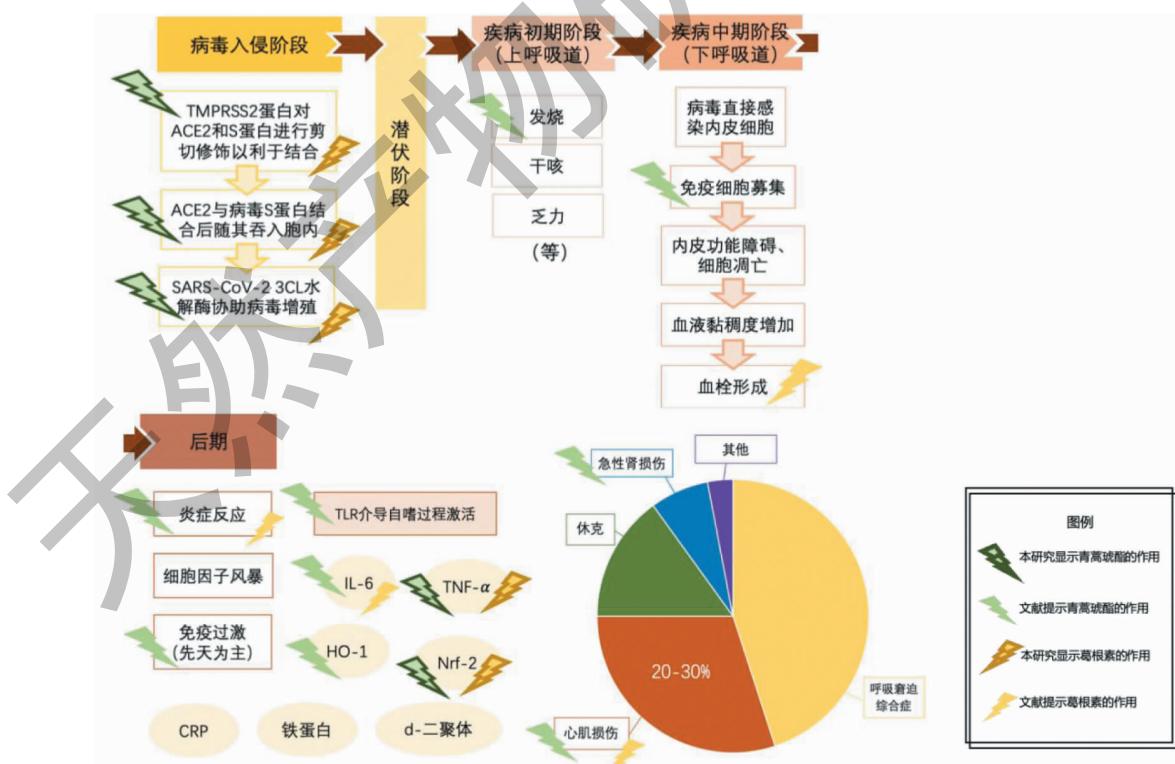


图 8 初步推测青蒿琥酯、葛根素对新冠心血管损伤的干预作用

Fig. 8 Interventional effects of artesunate and puerarin on COVID-19 cardiovascular complications were speculated

19 心血管损伤有多方面的干预作用,如图 8,“老药新用”成为可能,缩短了筛查有效化合物的时间,提高了研究效率,本结果为进一步的实验验证提供依据和理论基础。具体从以下 2 方面对作用机制进行阐述。

一方面,两单体成分可能在病毒入侵阶段进行干预。首先,单体成分对病毒的杀灭作用:基于青蒿琥酯表现出的 NF- κ B(核因子 κ B)-冠状病毒作用、氯喹样内吞抑制机制^[21]、抗病毒特性^[22]、抗肺纤维化^[23]等作用,学者们^[24]推测青蒿琥酯可治疗 COVID-19,提出了挖掘其潜在的药用价值,尝试用于临床治疗的观点。在一项体外实验中^[25],疟疾治疗中常用剂量下,甲氧喹-青蒿琥酯发挥最高的抗病毒活性,抑制率为 $72.1\% \pm 18.3\%$,提示青蒿琥酯较高的抗 SARS-CoV-2 潜能。另有临床研究表明^[26],青蒿琥酯可缩短 COVID-19 的治疗时间,改善预后,不良反应少,具有良好的应用前景。但本课题前期与呼吸疾病国家重点实验室广州医科大学第一附属医院广州呼吸疾病研究所合作,采用从广州和华盛顿州的 COVID-19 患者中分离得到的 SARS-CoV-2 菌株(保藏号:MT 123290, MN 985325. 1)和非洲绿猴肾脏来源的 Vero E6 细胞建立感染细胞模型^[27],青蒿琥酯在 $20 \mu\text{M}$ 抑制率约为 20%,葛根素未发现明显作用。其次,两单体成分阻止病毒入侵和复制作用:结合前期文献报道和本研究结果,现推测青蒿琥酯、葛根素可能与病毒入侵关键蛋白结合,阻止病毒入侵细胞,病毒无生存和繁殖条件,最终死亡。结合上述结果,青蒿琥酯及青蒿琥酯-葛根素组合对病毒的直接杀灭和抑制繁殖作用有待进一步的研究。

另一方面,两单体成分具有明确的清热、抗炎、调节免疫、减少脓毒症损伤等作用。青蒿苦、辛,寒,其清热解毒功效是共识,推测其可以缓解发热症状。青蒿素家族药物的提取物可调节先天和适应性免疫系统的细胞,并导致抗炎和调节免疫调节作用^[30];另有研究表明,青蒿琥酯具有抗炎作用^[21]、减少脓毒症造成的损伤^[31]等作用;Kuang 等^[32]发现,青蒿琥酯通过抑制 TLR4 介导的自噬激活,减弱了巨噬细胞 TNF- α 和 IL-6 的释放;青蒿琥酯还可减弱 TLR4 的表达和 NF- κ B 的激活,上调了核转录因子 2(Nrf2)和血红素加氧酶 1(HO-1)的表达^[33];在另一大鼠模型中^[34],青蒿琥酯通过减弱血清和肺中的巨噬细胞炎性蛋白 2(MIP-2)、前列腺素 E 2(PGE 2)、NO 和丙二醛(MDA),且能激活 HO-1 途径,以抑制肾脏再灌注刺激的肺部炎症,提示对 COVID-19 的

治疗可能有益^[35]。有研究表明,葛根素可通过激活 Sirt1 等途径抑制炎症^[36],且通过下调促炎因子、减轻氧化应激对脓毒症大鼠起保护作用^[37];此外, Zhang 等^[38]发现葛根素可以通过减少自噬和抑制细胞增殖来预防大鼠低氧诱导的肺动脉高压,改善肺组织病理学,并且还可以降低体内和体外自噬标记的表达;Wang 等^[39]发现葛根素通过激活 LXR α 减弱 ALI,随后抑制 LPS 诱导的炎症反应。

新冠疫情暴发至今,国内外研究者开展了大量相关研究,针对新冠肺炎的疫苗和药物研究不断取得阶段性进展,临床多使用抗病毒药、调节免疫药、糖皮质激素,但效果和不良反应不容乐观^[40],快速筛选疗效优良、不良反应小的药物是当务之急。本课题组根据临床线索、实验研究文献报道、现代药理学研究结果,初筛中药单体成分,青蒿琥酯、葛根素安全性高、毒性小,联用后对心肌缺血小鼠模型有明显的保护作用,可降低死亡率和 ST 段抬高率,还可减少心肌梗死面积。此外,两单体成分联用后对 LPS 造成的脓毒症具有干预作用。

现阶段的科学研究对 SARS-CoV-2 病毒感染致病机制与包括心血管在内的各系统相互作用等情况的认识还较为初步。由于 SARS-CoV-2 病毒存在的风险,体内外实验受到限制,同时目前 COVID-19 相关数据库、分析软件和各方法本身也处于不断进展更新的阶段,计算结果与临床疗效可能也会存在一定的差异性,多学科、多角度和多种技术手段的联合研究是非常必须的。本研究采用网络药理学和分子对接方法,初步对青蒿琥酯、葛根素干预新冠与心血管疾病共病患者的潜在机制进行分子层面的探讨,为 COVID-19 治疗药物的研发及疫情防控提供新的方向及依据,相关研究正在深入。

参考文献

- Shi S, Qin M, Shen B, et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China[J]. JAMA Cardiol, 2020, 5: 802-810.
- Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, et al. COVID-19 and the cardiovascular system[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17 (5): 259-260.
- Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome[J]. Lancet Respir Med, 2020, 8: 420-422.
- Zhang Y, Xiao M, Zhang S, et al. Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19[J]. N Engl J Med, 2020, 382 (17): e38.

- 5 Clerkin KJ, Fried JA, Raikhelkar J, et al. COVID-19 and cardiovascular disease [J]. Circulation, 2020, 141: 1648-1655.
- 6 Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study [J]. Lancet, 2020, 395: 1054-1062.
- 7 Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention. The epidemiology characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China [J]. Chin J Epidemiol (中华流行病学杂志), 2020, 41: 145-151.
- 8 The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2019 [J]. Cardio-Cerebrovasc Dis Prev Treat(心脑血管病防治), 2020, 20(5): 437-450.
- 9 Zou QM, Li HB, Zeng H. Current status and countermeasures for development of drugs to treat coronavirus disease 2019 [J]. J Third Mil Med Univ(第三军医大学学报), 2020, 42: 861-866.
- 10 Pantziarka P, Pirmohamed M, Mirza N. New uses for old drugs [J]. BMJ, 2018, 361: k2701.
- 11 Li B, Li J, Pan X, et al. Artesunate protects sepsis model mice challenged with *Staphylococcus aureus* by decreasing TNF-alpha release via inhibition TLR2 and Nod2 mRNA expressions and transcription factor NF-kappaB activation [J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10: 344-350.
- 12 Li XJ, Lin YH, Lin YB, et al. Influence of puerarin on endothelial dysfunction in hypertensive rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33: 841-844.
- 13 Guo BQ, Xu JB, Xiao M, et al. Puerarin reduces ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in diabetic rats via up-regulation of vascular endothelial growth factor A/angiotensin-1 and suppression of apoptosis [J]. Mol Med Rep, 2018, 17: 7421-7427.
- 14 Wang HJ, Wu JJ, Xue Q, et al. Effect factors and mechanisms of borneol's bidirectional regulation on blood-brain barrier permeability [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42: 2200-2207.
- 15 Wang LF, Zhou H, Liu LY. Effects of puerarin on proliferation and apoptosis of multiple myeloma H929 cells [J]. J Zhengzhou Univ: Med Sci(郑州大学学报:医学版), 2018, 53: 824-827.
- 16 Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, et al. The ACE2/angiotensin-(1-7)/MAS axis of the renin-angiotensin system: focus on angiotensin-(1-7) [J]. Physiol Rev, 2018, 98: 505-553.
- 17 Wu LM, Jiang T, Ye R, et al. Preconditioning of puerarin reduce the myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting the transcription of NF- κ B [J]. Chin J Cardiovasc Rehabil Med(心血管康复医学杂志), 2009, 18: 185-188.
- 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 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 (8th trial edition) [J] China Med(中国医药), 2020, 15: 1494-1499.
- 20 Pirzada A, Mokhtar AT, Moeller AD. COVID-19 and myocarditis: what do we know so far? [J]. CJC Open, 2020, 2: 278-285.
- 21 Uzun T, Toptas O. Artesunate: could be an alternative drug to chloroquine in COVID-19 treatment? [J]. Chin Med, 2020, 15: 54.
- 22 Cheong DHJ, Tan DWS, Wong FWS, Tran T. Anti-malarial drug, artemisinin and its derivatives for the treatment of respiratory diseases [J]. Pharmacol Res, 2020, 158: 104901.
- 23 Liu GM, Cai N, Xie J, et al. Discussion on artemisinin and its derivatives for treatment of COVID-19 [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2020, 43: 606-612.
- 24 Cao R, Hu H, Li Y, et al. Anti-SARS-CoV-2 potential of artemisinins *in vitro* [J]. ACS Infect Dis, 2020, 6: 2524-2531.
- 25 Gendrot M, Duflot I, Boxberger M, et al. Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa: *in vitro* inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate [J]. Int J Infect Dis, 2020, 99: 437-440.
- 26 Lin Y, Wu F, Xie Z, et al. Clinical study of artesunate in the treatment of coronavirus disease 2019 [J]. Chin Crit Care Med(中华危重症急救医学), 2020, 32: 417-420.
- 27 Sun J, Zhuang Z, Zheng J, et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment [J]. Cell, 2020, 182: 734-743.
- 28 Yang YM, Chen LN, Qu SQ, et al. Potential therapies for COVID-19 cardiovascular complications using artemisinin and its derivatives intervene based on its cardiovascular protection [J]. China J China Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45: 6053-6064.
- 29 Chen L, Liu Y, Wu J, et al. Lung adenocarcinoma patients have higher risk of SARS-CoV-2 infection [J]. Aging, 2021, 13: 1620-1632.
- 30 Hou L, Huang H. Immune suppressive properties of artemisinin family drugs [J]. Pharmacol Ther, 2016, 166: 123-127.
- 31 Cao T, Jin S, Fei D, et al. Artesunate protects against sepsis-induced lung injury via heme oxygenase-1 modulation [J]. Inflammation, 2016, 39: 651-662.