

基于网络药理学和分子对接技术探讨两色金鸡菊总黄酮治疗 COVID-19 的作用机制

布威阿丽耶·胡加阿布都拉^{1,2}, 西尔艾力·艾克穆², 国鲁源¹, 吴桂霞^{1*}

¹新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011; ²新疆维吾尔医学专科学校, 和田 848000

摘要:利用网络药理学和分子对接揭示两色金鸡菊总黄酮(total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt., CTFs)有效成分在治疗新型冠状病毒肺炎(corona virus disease in 2019, COVID-19)中的作用机理。利用 TCMSP 数据库查找 CTFs 的 27 种活性成分所对应的 319 个靶点,通过 GeneCards、DrugBank、Genemap 和 DisGeNET 数据库收集 COVID-19 治疗靶点;利用 Venny 2.1 在线数据库获得 CTFs 和 COVID-19 的 79 个共同交集靶点,STRING 数据库构建蛋白-蛋白互作(PPI)网络,并筛选 32 个核心靶点,利用核心靶点通过 Metascape 数据库和 DAVID 数据库进行 GO 及 KEGG 通路富集可视化分析,并预测其作用机制。其信号通路与 AGE-RAGE 信号通路、白细胞介素信号通路、PID API 通路、TNF 信号通路等通路相关;Cytoscape 软件进行"CTFs-靶点-通路-COVID-19"网络结构图的绘制,网络图得出 degree 值较高的 CTFs 化合物有槲皮素、表没食子儿茶素没食子酸酯、木犀草素、漆黄素、山柰酚。根据 degree 值较高的槲皮素和表没食子儿茶素没食子酸酯与 TNF、IL6、JUN、进行分子对接结果受体与配体结合构象较稳定。证明两色金鸡菊总黄酮具有多靶点、多通路、多系统调节疾病的特点,并可通过其特点对 COVID-19 提供潜在的治疗价值,为临床救治与合理用药提供理论依据。

关键词:两色金鸡菊总黄酮;COVID-19;网络药理学

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)Suppl-0125-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.S.016

Study on the mechanism of total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt. in treating COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking

BUWEIALIYE Hu-jia-a-bu-du-la^{1,2}, XIERAILI Ai-ke-mu², GUO Lu-yuan¹, WU Gui-xia^{1*}

¹School of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

²Xinjiang Uygur Medical College, Hetian 848000, China

Abstract: Network pharmacology and molecular docking were used to explore the the mechanism of the effective components of total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt. (CTFs) in the treatment of COVID-19 to reveal the potential compounds. To search corresponding 319 drug target compounds of 27 active compound in CTFs through the TSMCP database, then using the GeneCards, DrugBank, Genemap, and DisGeNET databases to collect the therapeutic targets of COVID-19; Using Venny 2.1 to obtain the 79 common targets of CTFs and COVID-19; Constructing PPI network by STRING database, and 32 core targets were screened. At the same time GO and KEGG pathways were enriched and performed through the Metascape and DAVID databases by using the core targets, and their mechanisms of action were predicted, including the AGE-RAGE signaling pathway, interleukin signaling pathway, PID-API pathway, TNF signaling pathway. Cytoscape software was used to construct the network structure diagram of "CTFs-targets -COVID-19", and the compounds of CTFs such as quercetin, (-)-epigallocatechin gallate, luteolin, fisetin, kaempferol were showed with higher degree values at network diagram. According to the molecular docking results, the quercetin and (-)-epigallocatechin gallate and TNF, IL6 and JUN the receptor ligand binding conformation is relatively stable and scored with higher degree values. This study reveals the mechanism of CTFs have the characteristics

收稿日期:2022-11-01 接受日期:2023-03-14

基金项目:新疆维吾尔自治区科学技术厅青年基金(2023D01855)

* 通信作者 E-mail:448418669@qq.com

of multiple targets, pathways, and systems to regulate diseases, and can provide potential therapeutic value for COVID-19 through their characteristics, providing a theoretical basis for clinical treatment and rational drug use.

Key words: total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt.; COVID-19; network pharmacology

COVID-19 是一种包膜 RNA 病毒引起的急性肺部感染,由于缺乏目标药物,病毒大流行仍在大多数国家肆虐^[1]。多从口鼻而入,人群普遍易感,致病脏器诱发多方面的问题能够覆盖多脏器治疗问题的特效药尚未被开发^[2],早日开发出有效针对 COVID-19 的治标又治本的治疗手段刻不容缓。当前,天然产物正被探索应用于预防和治疗 COVID-19。黄酮是天然产物的典型代表,被广泛报道具有抗炎和抗病毒作用^[3],已有报道预测黄酮类化合物通过多通路的协同作用来发挥疗效从而起到辅助治疗 COVID-19 的作用^[4]。实验鉴定了湖南新冠 2 号方中 64 个化学成分,其中 34 个黄酮类化合物,是检出最多的一类化合物负离子模式下响应度较高,具有调节机体免疫、抗炎、抗氧化等药理作用,黄酮类化合物对免疫细胞的调控与其对细胞信号通路的调节密切相关^[5]。

两色金鸡菊(*Coreopsis tinctoria* Nutt.) 为一年生植物,菊科金鸡菊属,也被称昆仑雪菊两色金鸡菊富含黄酮、多酚、挥发油、多糖等成分^[6]。《新华本草纲要》对两色金鸡菊全草的药效进行了记载其具有清热解毒、活血化瘀、和胃健脾、健脑明目之功效,主要治疗高血压、高血糖、高血脂、燥热烦渴等病症^[7]。两色金鸡菊富含黄酮类化合物具有抗菌、抗炎等多种功能^[8]。敬思群通过考察两色金鸡菊总黄酮、原花青素和多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉、枯草芽孢杆菌与黑曲霉的抑制作用对于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌与青霉的抑制作用最强,且主要活性部位为 CTFs 部位^[9]。Kang 等^[10]研究了两色金鸡菊总黄酮提取物对细菌、霉菌及酵母菌等微生物的抑制作用,抑菌能力较强并且对细菌的抑制作用最强。本研究 CTFs 中有效的黄酮类化合物进行拆分分析,利用网络药理学与分子对接技术可在基于传统功效及临床定位的基础上,系统地分析 CTFs 中的化合物作用机制,揭示中药药效价值及辅助治疗 COVID-19 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 数据库及软件

数据库: PubChem ([https://pubchem.ncbi.nlm.](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)

<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.ph>)、TCMSP 数据库 (<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.ph>)、TCMID 数据库 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>)、KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp/>)、Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index>)、STRING 数据库 (<https://string-db.org/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>)、PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>)、VENNY (<http://www.venny.com/Market-Dynamics/TechnologySeminar/70.html>)、Swiss Target prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/0>)。软件: Cytoscape、Autodock、Pymol 等。

1.2 方法

1.2.1 CTFs 活性成分与靶点的预测

通过课题组前期 HPLC 法得到 KCTF 的化合物组分^[11],从 TCMSP 中对 CTFs 的主要化合物分子进行吸收、分布、代谢、排泄和毒性 (ADME/T) 预测和评价。对符合药物口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 类药性值 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 的成分进行筛选,得出总黄酮的有效活性成分。再通过 TCMSP 平台预测上述两色金鸡菊总黄酮有效活性成分的靶点。将所有靶点通过 STRING 数据库以“Homo sapiens”为关键词进行基因-蛋白名称转换。

1.2.2 COVID-19 靶点的预测

以“COVID-19”为检索词在 DisGeNET、GeneCards、Omim、DrugBank 数据库检索并获取 COVID-19 的基因靶点,去除重复部分并对其名称标准化检索 COVID-19 相关靶标信息。

1.2.3 CTFs 活性成分与关键靶点相映射和共同靶点作用网络

获得 CTFs 活性成分靶点及 COVID-19 靶点后,在 Venny 2.1.0 数据库中取活性成分靶点与 COVID-19 靶点的交集并插入进 STRING 数据库绘制蛋白-蛋白相互作用 PPI 网络获取 CTFs 作用于 COVID-19 的共同靶点。

1.2.4 蛋白互作 PPI 网络构建获取核心靶点

使用“1.2.3”中 STRING 数据库得到的共同交集靶点文件输入到 Cytoscape 软件交集后进行 PPI 建立蛋白互作网络,通过 Cytocna 的连接度 (degree centrality, DC)、紧密度 (closeness centrality, CC)、介度 (betweenness centrality, BC)。通过 DC、BC 和 CC 大于或等于其中位数的筛选标准将其筛选为 CTFs 作用于 COVID-19 的核心靶点。

1.2.5 关键靶点 GO 与 KEGG 通路富集分析

将核心靶点文件内容导入至 Metascape 数据库,选择物种为 *Homo sapiens*,提交数据, P 值定义为 0.01,可以了解目的基因群富集 GO 及 KEGG 分析结果继续进行个性化分析并下载得到数据。通过 DAVID 数据库对核心靶点进行 KEGG 通路富集分析,并通过微生信台对结果进行可视化处理。

1.2.6 Cytoscape 软件进行“CTFs 成分-靶点-通路-COVID-19”网络结构图的绘制

根据 GO 和 KEGG 分析结果利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“两色金鸡菊黄酮成分-靶点-通路-新型冠状病毒”网络结构

1.2.7 活性成分的分子对接

为了进一步验证靶点预测结果的可靠性,选择了“CTFs 成分-靶点-通路-COVID-19”网络中度数大于平均度数的关键靶点和 Autodock vina,用于分子锁定,以验证关键靶标与组分的结合活性,利用 Py-mol 可视化呈现,验证 CTFs 活性成分与相关靶点的结合活性。

2 结果

2.1 CTFs 靶点的筛选

课题组前期通过 HPLC 方法对 CTFs 进行广靶代谢组分析获得了 27 个化合物成分,通过 TCM-SP 检索得到了 27 个 CTFs 化合物的 815 个靶点。根据 TCMSP 和 Swiss Target Prediction 的标准,去除初始成分的重复,并进行筛选,共获得 319 个 CTFs 靶点。

2.2 新型冠状病毒肺炎靶点的筛选

以“COVID-19”为检索词在 DisGeNET、GeneCards、DrugBank 数据库检索并获取 COVID-19 的基因靶点,去除重复部分并对其名称标准化,获取交集基因。检索 COVID-19 相关靶标信息 DrugBank 21 个、GeneCards 317 个、GeneMaps 329 个、DisGeNET

392 合并 4 个数据库基因靶点并删除重复值,最终获得 1 059 个 COVID-19 相关靶点。

2.3 CTFs 活性成分与关键靶点相映射和共同靶点作用网络

将疾病靶基因与 CTFs 活性成分所对应靶基因输入 Venny 2.1.0 数据库取交集和构建韦恩图 (见图 1),获得交集靶基因 79 个为 CTFs 活性成分潜在抗 COVID-19 作用靶点。把交集靶点输入到 STRING 数据库获得蛋白相互作用网络图 (见图 2)。

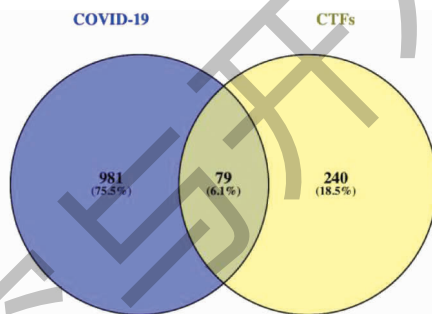


图 1 CTFs 与 COVID-19 作用交集靶点

Fig. 1 Venn diagram for the interaction targets of CTFs and COVID-19

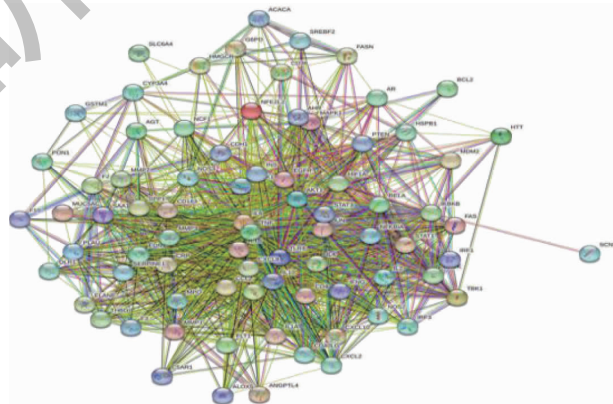


图 2 交集靶点蛋白互作网络

Fig. 2 Protein interaction network of intersecting targets

2.4 蛋白互作 PPI 网络构建获取核心靶点

使用“2.3”得到的共同交集靶点文件输入到 STRING 数据库建立蛋白互作网络,得到的文件输入到 Cytoscape 软件交集后进行 PPI,首先对数据进行 DC 中位数的筛选标准,然后通过 DC、BC 和 CC 大于或等于其中位数的筛选标准将其筛选为核心靶点 (见表 1),根据核心靶点反向查找 CTFs 相关化合物成分 (见表 2)。

表 1 CTFs 抗 COVID-19 核心靶点

Table 1 The core targets of anti-COVID-19 targets of CTFs

序号 No.	名称 Name	DC	BC	CC	序号 No.	名称 Name	DC	BC	CC
1	TNF	134	349.966	0.935 0649	17	EGFR	88	64.835 22	0.712 871
2	IL6	132	336.004	0.923 0769	18	NFκBIA	84	23.236 80	0.705 8824
3	AKT1	124	325.93	0.878 0488	19	IL1A	82	20.294 72	0.699 02915
4	IL1B	118	168.062	0.847 05883	20	CRP	82	52.253	0.692 307 7
5	CXCL8	116	115.553	0.837 2093	21	HMOX1	80	49.740 067	0.692 307 7
6	IL10	110	84.631	0.808 98875	22	MPO	78	43.213 627	0.679 245 3
7	CCL2	110	88.606	0.808 98875	23	RELA	78	29.261 345	0.685 714 3
8	TLR4	106	74.557	0.791 2088	24	CXCL10	76	18.473 452	0.679 245 3
9	ICAM1	106	76.612	0.791 2088	25	IL2	76	17.495 41	0.679 245 3
10	STAT3	106	103.193	0.791 2088	26	SERPINE1	74	32.115 288	0.666 666 7
11	INS	106	184.598	0.791 2088	27	STAT1	74	16.309 13	0.672 897 2
12	JUN	102	59.946	0.774 1935	28	EDN1	74	21.192 202	0.666 666 7
13	CD4	96	58.493	0.75	29	IκBκB	70	152.128 05	0.660 550 5
14	HIF1A	94	117.551	0.742 268	30	NOS3	70	36.692 986	0.660 550 5
15	IL4	94	46.572	0.742 268	31	CDH1	68	22.137 762	0.654 545 4
16	IFNG	90	29.839	0.727 272 75	32	SPP1	66	23.945 934	0.642 857 13

表 2 CTFs 抗 COVID-19 的活性化合物

Table 2 Main active compounds in CTFs against COVID-19

代谢物 Metabolite	OB(%)	DL	分子 ID ID MolID	分子量 Molecular weight	相关靶点 Related target
槲皮素 Quercetin	46.43	0.28	MOL000098	302.25	TNF、IL6、AKT1、IL1B、CXCL8、IL10、JUN、ICAM、HIF1A、EGFR、IFNG、NFκBIA、HMOX1、CRP、IL1A、MPO、RELA、IL2、NOS3、CXCL10、SERPINE1、STAT1、PTEN、SPP1、F3
表没食子儿茶素没食子酸酯 (-)Epigallocatechin gallate	55.09	0.77	MOL006821	458.4	TNF、IL6、AKT1、IL10、TLR4、STAT3、JUN、HIF1A、CD4、EGFR、NFκBIA、RELA、IκBκB、STAT1、CDH1
木犀草素 Luteolin	36.16	0.25	MOL000006	286.25	TNF、IL6、AKT1、IL10、JUN、ICAM、HIF1A、EGFR、IFNG、NFκBIA、HMOX1、RELA、IL2
漆黄素 Fisetin	52.6	0.24	MOL013179	286.25	TNF、IL6、AKT1、IL1B、CXCL8、JUN、IL4、EGFR、RELA
山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24	MOL000422	286.25	TNF、AKT1、JUN、ICAM1、HMOX1、RELA、NOS3、IκBκB、STAT1
黄芩素 Baicalein	33.52	0.21	MOL002714	270.25	AKT1、HIF1A、MPO、RELA
落新妇苷 Astilbin	36.46	0.74	MOL004575	450.43	TNF、IL10、IFNG
异鼠李 Isorhamnetin	49.6	0.31	MOL000354	316.28	RELA、NOS3
紫杉叶 Taxifolin	57.84	0.27	MOL004576	304.27	ICAM1
川芎素 Nobiletin	61.67	0.52	MOL005828	402.43	JUN
刺槐素 Acacetin	34.97	0.24	MOL001689	284.28	RELA

2.5 基因富集 KEGG、GO 分析

将核心靶点文件内容导入至 Metascape 数据库,选择物种为 Homo sapiens,提交数据,P 值定义为 0.01,对 KEGG 通路和 GO 富集分析进行可视化

分析可以了解目的基因群富集在哪些生物功能。富集分析将 CTFs 的 34 个核心靶点引入 Metascape 系统筛选出前 20 个具有预期 P 值的术语内容来显示结果(如图 3)。

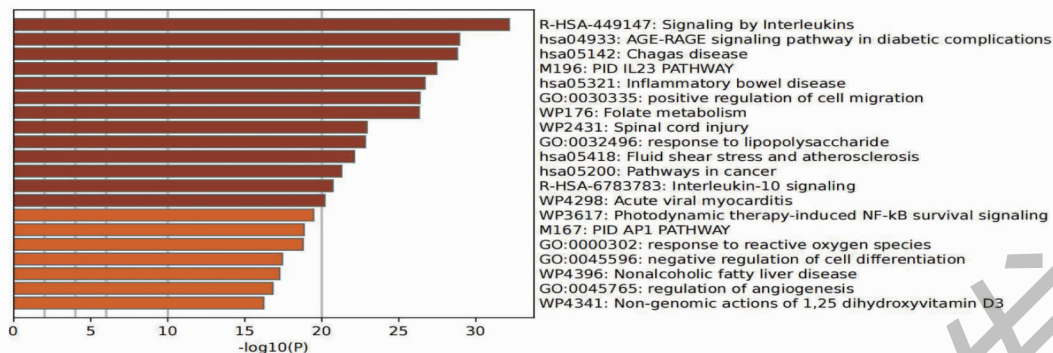


图3 Metascape 前 20 个集群可视化分析

Fig. 3 Visual analysis of top 20 clusters in Metascape

CTFs 治疗 COVID-19 的关键靶点涉及生物学过程。生物信息在线数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析,以 $P < 0.05$ 作为蛋白质生物学功能具有显著性的反应,确定 GO 分析总数为 806 条涉及细胞迁移的正调控、对脂多糖的反应、对活性氧的反应、细胞分化的负调节、白细胞迁移的调节、血管生成的调节、外部刺激反应的正调节。KEGG 通路 126 条主要涉及糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路,炎症性肠病,美洲锥虫病,流体剪切应力与动脉粥样硬化,癌症的途径。经典通路 57 条主要涉及白细胞介素信号通路、白细胞介素-10 信号、PID IL23 通路、白细胞介素的信号传导、PID AP1 通路。Wiki 通路有 175 条通路、叶酸代谢、急性病毒性心肌炎、金黄色葡萄球菌感染过程中的 T 细胞抗原受体 (TCR) 途径,1,25 二羟维生素 D3 的非基因组作用。

路径和过程富集分析已独立应用于每个 MCODE 组件并保留了按 P 值划分的两个最佳评分

项作为相应组件的功能描述(见图 4),结果所示分两个得分较高的模块第一模块有炎症性肠病,白细胞介素的信号传导,新冠肺炎不良结局途径,第二模块有抵抗素作为炎症调节因子,TNF 相关的弱凋亡诱导剂(TWEAK)信号通路,IL-4 信号通路(见表 3)。

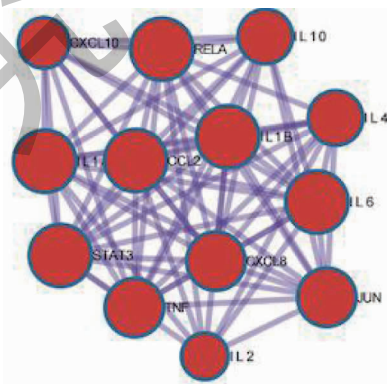


图4 模块分析基因网络图

Fig. 4 Gene network of MCODE analysis

表3 蛋白互作富集分析模块网络注释列表

Table 3 Mcode annotation list of Protein interaction enrichment analysis

模块 MCODE	注释 Annotation	$\log_{10}(P)$
MCODE_1	炎症性肠病 Inflammatory bowel disease	-27.2
MCODE_1	白细胞介素的信号传导 Signaling by interleukins	-25.4
MCODE_1	新冠肺炎不良结局途径 COVID-19 adverse outcome plthway	-23.9
MCODE_2	抵抗素作为炎症调节因子 Resistion as a regulator of inflammation	-8.9
MCODE_2	白细胞介素 4 的信号传导 IL-4 signaling pathway	-8.3
MCODE_2	TNF 相关的弱凋亡诱导因子 (TWEAK) 信号通路 TNF-related weak inducer of apposis(TWEAK) signaling pathway	-8.6

通过 DAVID 数据库进行 KEGG 通路分析表明 CTFs 作用于 COVID-19 分析结果与糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路、虫病、甲型流感、Toll 样受体

信号通路、冠状病毒病-新冠肺炎、HIF-1 信号通路、Th17 细胞分化、PD-L1 表达 PD-1 检查点通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、麻疹、细胞因子受体相互

作用、C 型凝集素受体信号通路、T 细胞受体信号通路、乙型肝炎、NOD 样受体信号通路、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染相关(见图 5)。与新冠肺炎相关的

机制分析与 TNF 信号通路, NOD 样受体信号通路, 胞质 DNA 传导途径相关(见图 6)。

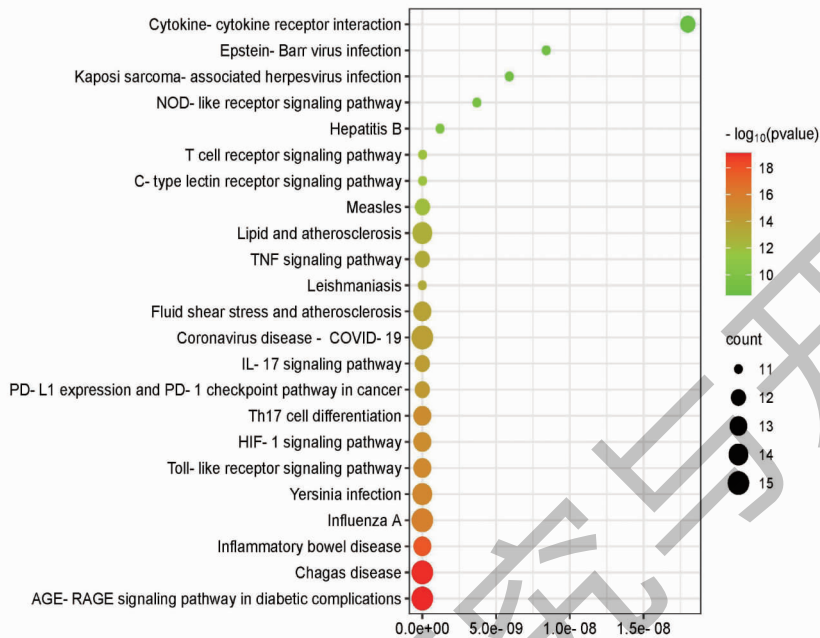


图 5 KEGG 通路分析气泡图

Fig. 5 Bubble diagram of KEGG pathway

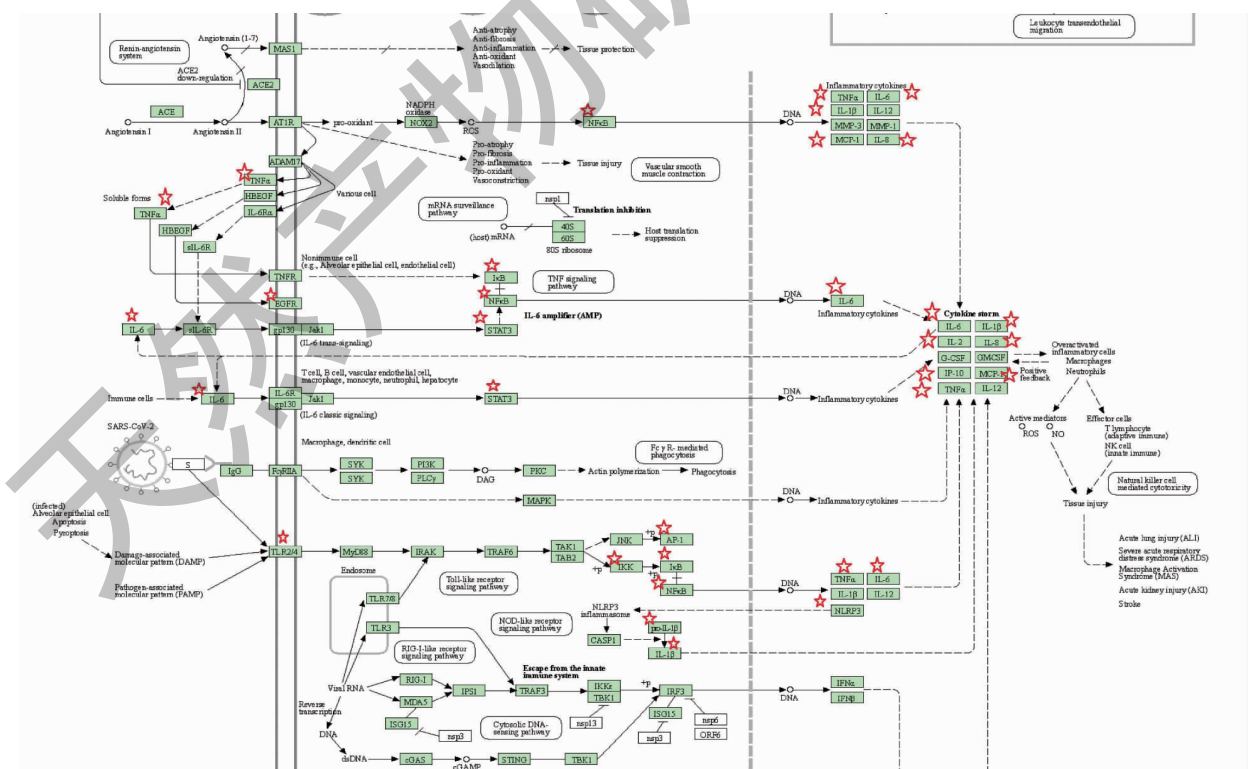


图 6 KEGG 通路图

Fig. 6 KEGG pathway

2.6 Cytoscape 软件分析 CTFs 与 COVID-19 的关系

利用 Cytoscape3.7.2 软件选取 CTFs 活性成分及相关靶点。CTFs 以及 COVID-19 交集靶点,GO 分析中获得与 COVID-19 相关通路冠状病毒肺炎-新冠肺炎不良结局途径、新冠肺炎中的 RAS 和缓激肽途径、川崎样疾病和新冠肺炎中的 STING 通路、

新冠肺炎中的 FOXP3 等通路构建“CTFs 成分-靶点-通路-COVID-19 靶点”网络结构图(见图 7),不同的节点连接度越大形态越大,颜色越浅连接度越小;形态越小颜色越深。大小和颜色代表颜色表示 CTFs 中不同的活性成分、关键目标和调节通路。

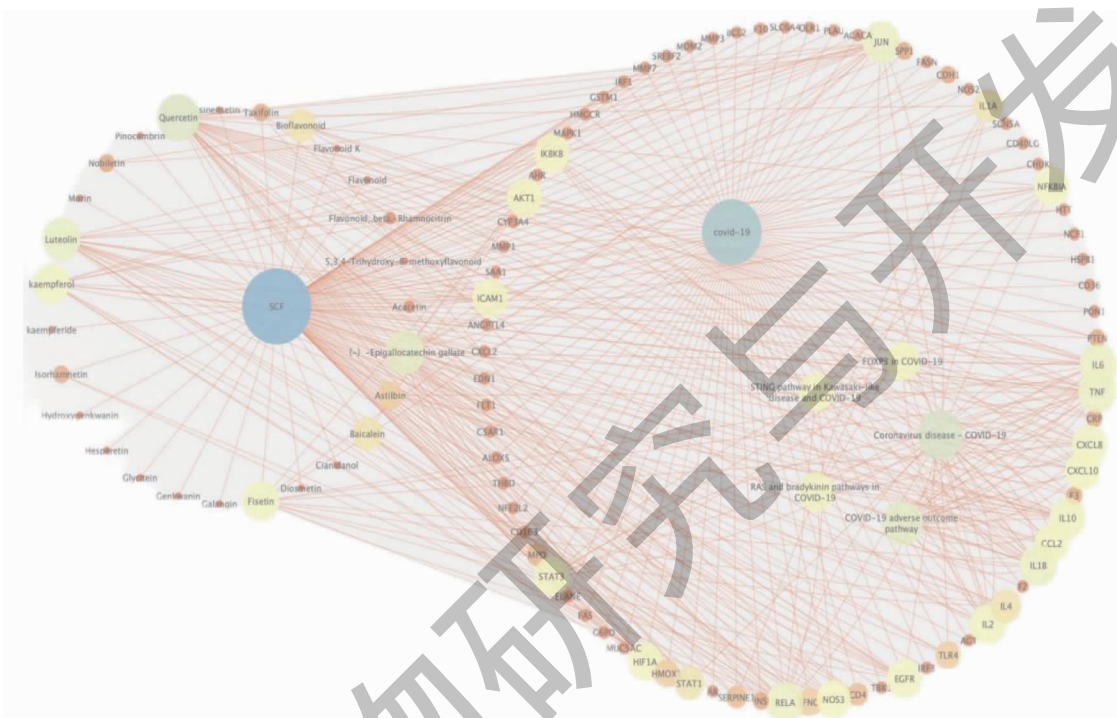


图 7 CTFs 成分-靶点-COVID-19 通路-网络图

Fig. 7 The diagram of CTF-target-pathway-COVID-19

2.7 活性成分的分子对接

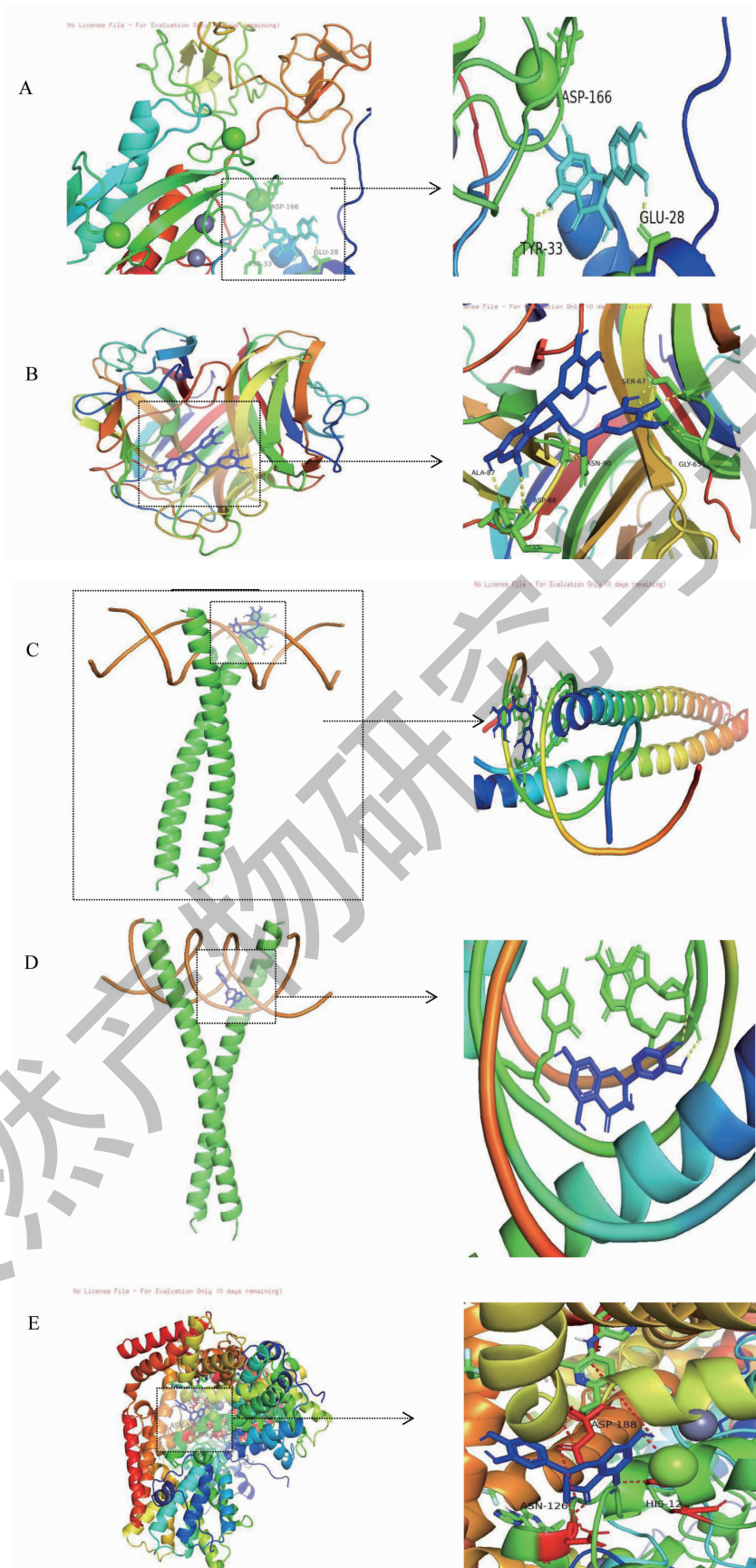
为了进一步验证靶点预测结果的可靠性,选择了“CTFs 成分-靶点-通路-新型冠状病毒肺炎靶点”网络中中度数较大关键靶点和活性化合物,利用 Autodock vina 5.6 软件用于分子锁定,以验证关键靶标与组分的结合活性,利用 pymol 可视化呈现。分子对接结果一般结合能低于-7 kJ/mol 对接结果

较稳定,对接结果低于-5 kJ/mol 就可以表示对接结果较稳定。通常认为受体与配体结合构象越稳定,能量越低,越容易结合产生作用^[12],结果显示槲皮素与 IL6、JUN、TNF、MAPK3、HIF 1 结合较稳定,表没食子儿茶素没食子酸酯与 TNF、JUN 结合性较稳定,与 IL6 结合也稳定。结合能结果见表 4,部分化合物分子对接模式见图 8。

表 4 分子对接结果

Table 4 Molecular docking results

组成 Composition	结合能 Binding energy (kJ/mol)	抑制常数 Inhibition constant	组成 Composition	结合能 Binding energy (kJ/mol)	抑制常数 Inhibition constant
TNF 和槲皮素	-2.57	12.97	TNF 和表没食子儿茶素没食子酸酯	-3.17	4.77
JUN 和槲皮素	-4.58	436.67	JUN 和表没食子儿茶素没食子酸酯	-3.45	2.96
IL6 和槲皮素	-4.54	471.61	IL6 和表没食子儿茶素没食子酸酯	-5.24	145.25



续图 8 (Continued Fig.8)

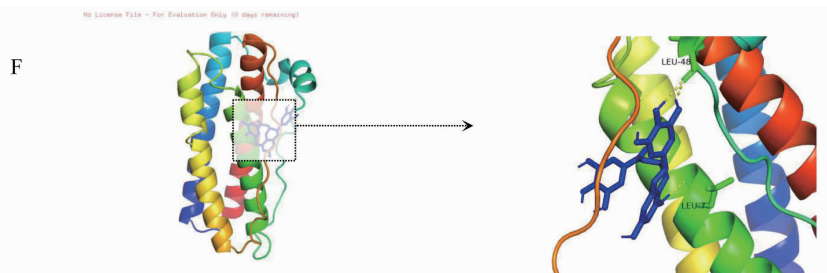


图8 分子对接

Fig. 8 Molecular docking

注:A:TNF 和槲皮素;B:TNF 和表没食子儿茶素没食子酸酯;C:JUN 和槲皮素;D:JUN 和表没食子儿茶素没食子酸酯;E:IL-6 和槲皮素;F:IL-6 和表没食子儿茶素没食子酸酯。Note:A:TNF and quercetin;B:TNF and (-)-epigallocatechin gallate;C:JUN and quercetin;D:JUN and (-)-epigallocatechin gallate;E:IL-6 and quercetin;F:IL-6 and (-)-epigallocatechin gallate.

3 讨论与结论

新冠肺炎在世界各地迅速传播,中医药为预防和治疗 COVID-19 感染做出了不可或缺的贡献^[13]。在本研究中通过分析 CTFs 23 种成分的活性成分, PPI 网络和关键网络分析在 79 个交集靶点中发现了 34 个核心靶点,通过核心靶点反推测核心化合物得出两色金鸡菊与 COVID-19 相关的活性化合物有槲皮素、表没食子儿茶素没食子酸酯、木犀草素、漆黄素、山柰酚、黄芩素、落新妇苷、花旗松素、川陈皮素、异鼠李亭等。湖南新冠 1 号方新冠药方活性成分-COVID-19 靶点通路网络分析结果显示柚皮素、槲皮素、木犀草素均与相关靶点有较好的结合效果^[14]。新疆祖卡木颗粒由木犀草素、毛茛草酚、大黄酸、芒丙花素、山柰甲黄素、半甘草异黄酮 B、异鼠李素、洋茛菪黄素、山柰酚和槲皮素等 10 个活性成分可能通过与 3C 类似蛋白酶结合作用于多靶点、多通路的协同作用来发挥疗效的,从而起到辅助治疗 COVID-19 的作用^[15]也证明 CTFs 的部分化合物成分也对 COVID-19 有效。

GO 和 KEGG 富集分析主要集中在白细胞介素信号通路、AGE-RAGE 信号通路、PID-IL23 通路、PID-AP1 通路、TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路、HIF-1 信号通路等相关。根据模块分析,得分高的第一模块有炎症性肠病,白细胞介素的信号传导,新冠肺炎不良结局途径,第二模块有抵抗素作为炎症调节因子, TNF 相关的弱凋亡诱导剂(TWEAK)信号通路,IL-4 信号通路。挑选 metaspape 数据分析中能直接 COVID-19 相互作用的靶点利用 Cytoscape 建立“CTFs 成分-靶点-通路-COVID-19”网络图得出 degeree 值较高的化合物有槲皮素、表没食子儿茶素没食子酸酯、木犀草素、漆黄素、山柰酚,疾病相关靶

点有 TNF、JUN、IL6、IL-1B、RELA、IL-10、I2、CXCL8 挑出其中 degree 值较高的槲皮素和表没食子儿茶素没食子酸酯与 TNF、IL6、JUN 分子对接结合性好,受体与配体结合构象稳定验证了 CTFs 活性化合物与靶点结合活性验证了我们预测。

研究表明, TNF 基因涉及多种疾病,包括传染性和免疫性疾病,可通过调节促炎细胞因子 TNF- α 的表达诱导炎症^[15,16]。JUN 是细胞内一类转录激活因子,以分子开关方式启动基因的转录。作为 AP-1 家族的主要成员 JUN 参与调节细胞存活和死亡信号通路以及与之相关的细胞过程,如细胞增殖、分化、转化、凋亡和炎症反应^[17]。生长因子、细胞因子和胞外应激等多种信号都会强烈诱导刺激 AP-1 活性其重要机制是由 JNK 诱导的 JUN 磷酸化^[18]。

临床研究显示白细胞增高的 COVID19 患者重型和危重型多见且炎症指标明显升高,死亡率高,尤其是入院首次白细胞增高患者,需引起临床重视^[19]。有研究报道^[20,21],细胞因子风暴是引起呼吸衰竭和多器官衰竭的主要因素,而 IL-6 则可能是 COVID-19 患者细胞因子风暴的驱动因素。因此将 IL-6 作为一个治疗靶点,抑制其释放减少细胞因子风暴的出现,可能是一个有效的治疗措施^[22]。第十四届全国免疫学学术大会指出 COVID-19 患者血浆 IL-6 和 C 反应蛋白(CRP)水平与线粒体质量呈正相关,与 T 细胞脂肪酸摄取呈负相关^[23]。淋巴细胞总数和 NLR 的增加以及 CRP、SAA、PCT、IL-6、CK 和 LDH 的升高与伴有胃肠道症状的新冠肺炎密切相关,这意味着具有胃肠道症状新冠肺炎患者更可能发展为严重疾病的可靠指标^[24],临床研究与本研究 GO 分析和模块分析预测结果相匹配,CTFs 抗 COVID-19 作用机制可能与白细胞信号通路密切相

关。

槲皮素也是一种有效的抗病毒药物抗流感病毒和冠状病毒^[25-27]。能起到止咳平喘、消肿利尿、清热解毒的作用,能抗氧化清除自由基,可减弱巨噬细胞中的促炎细胞因子和介质,可以限制细胞因子如 IL-12、IL-8、INF γ 、INF α 、COX-2 和 PGE^[28] 用于治疗炎症。在人视网膜色素上皮细胞中研究槲皮素对 TNF- α 诱导的炎症反应的影响,其能降低 ICAM-1 的表达,并抑制了 TNF- α 诱导的 PKC α 、JNK1/2、ERK1/2 的磷酸化,证明槲皮素通过 PKC α -JNK1/2-NF- κ B 途径减弱 TNF- α 诱导的 ICAM-1^[29] 的表达。槲皮素等抗炎作用机理也与 TNF、IL6、JUN 等基因有关,与分子对接预测的结果统一。

表没食子儿茶素没食子酸酯有抗菌、抗氧化作用。据日本《朝日新闻》网站报道绿茶和红茶的提取物具有抑制甲、乙型流感病毒的作用,而瑞士也有研究表明儿茶素对人体呼吸系统合孢体病毒(RSV)有抑制作用^[30]。它通过抑制 NF- κ B 和 MAPK 活性发挥抗炎作用从而抑制 IL-1 β + A β 诱导的 IL-6、IL-8 和 COX-2 在细胞中的表达^[31]。山柰酚还通过抑制 NF- κ B 和 AP-1 的活性,降低 TNF- α 、IL-1 和 IL-8 的基因表达抑制其活性来产生抗炎作用。山柰酚已证明对 H9N2 猪流感病毒感染有保护作用^[32]。CTFs 重要的活性化合物抗炎机制也与 TNF- α 、IL-6、JUN 等 COVID-19 相关靶基因相关也与本研究分子对接结果预测一致也能证明槲皮素、表没食子儿茶素没食子酸酯、山柰酚也可能起到辅助治疗 COVID-19 的作用,CTFs 重要的活性化合物可能通过减少炎症介质如 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的合成和分泌来对抗氧自由基而且这些炎症介质被认为是 COVID-19 疾病严重性和不良预后的关键标志^[33]。

本研究通过网络药理学技术 CTFs 作用于 COVID-19 的靶点、通路和生物功能进行系统地分析,从分子水平阐述了黄酮类化合物多靶点、多途径的作用机制,也充分显示出黄酮类化合物家族强大的疾病调控能力配合分子对接技术进一步论证 CTFs 类化合物作为防治 COVID-19 的潜在能力具有一定的预测性。本研究将为后期深入研究 CTFs 类化合物的抗病毒与抗炎机制提供合理的指导意义,也为临床合理治疗提供新的思路及方案。

参考文献

1 Wang DW, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138

hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China [J]. JAMA, 2020, 323: 1061-1069.

- 2 Li JL, Wang T. Development strategy and progress of novel coronavirus vaccine [J]. Chin J Pharm: Online (中国药理学杂志:网络版), 2021, 19: 193-202.
- 3 Gatadi S, Gour J, Nanduri S. Natural product derived promising anti-MRSA drug leads; a review [J]. Bioorg Med Chem, 2019, 27: 3760-3774.
- 4 Qu YF, Xu FY, Wang YZ, et al. Based on network pharmacology and molecular docking technology, explore the mechanism of flavonoids in the treatment of novel coronavirus pneumonia (COVID-19) [J]. J Baotou Med Coll (包头医学院学报), 2020, 36: 74-78.
- 5 Xiang F, Zhou Y, Liao XJ, et al. Study on chemical constituents of Hunan COVID-19 No. 2 recipe based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS [J]. J Hunan Univ Chin Med (湖南中医药大学学报), 2021, 41: 1313-1320.
- 6 Zhang ZZ, Sha AL. Research advances on pharmacological actions of flavonoids from *Coreopsis tinctoria* [J]. Ani Husband Feed Sci (畜牧与饲料科学), 2020, 41: 81-84.
- 7 Luo QZ. Studies on the chemical constituents and anti-inflammatory activity of polyacetylene effective parts from the head inflorescence of *Coreopsis bicolor* [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine (北京中医药大学), 2018.
- 8 Cao Y, Wang SL, Pan GY, et al. Advances in studies on chemical constituents and functional activities of Kunlun chrysanthemum (*Coreopsis tinctoria*) [J]. Chin Fruit Vegetab (中国果菜), 2019, 39: 44-48.
- 9 Jing SQ. Extraction and purification of effective components of Kunlun snow chrysanthemum species and their biological activities [D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2015.
- 10 Kang HL, Yang YH, Kang ZL. Extraction, antibacterial and antioxidant activities of total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt. [J]. Food Sci Technol (食品科技), 2018, 43: 236-241.
- 11 Yilimire WFE, Kurexi YNS, Wang ZB, et al. Prediction of the effects of total flavonoids of Kunlun chrysanthemum in the treatment of non-small cell lung cancer by network pharmacology and its preliminary verification study [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 1936-1945.
- 12 Kong Y, Wu HW, Chen Y, et al. Mechanism of tanreqing injection in the treatment of novel coronavirus pneumonia (COVID-19) based on network pharmacology and molecular docking [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 1785-1794.

- 13 Zhao ZY, Li YD, Zhou LY, et al. Prevention and treatment of COVID-19 using traditional Chinese medicine: a review [J]. *Phytomedicine*, 2021, 85: 153308.
- 14 Lai HB, Meng FS, Zeng JF, et al. Mechanism of Xinguan Formula No. 1 in the treatment of COVID-19 based on network pharmacology [J]. *Mod Hosp (现代医院)*, 2022, 22: 1299-1305.
- 15 Jimilihan SMY, Maimaitiming NMMT, Ji ZH, et al. Integrated pharmacology and network pharmacology of the active components of Xinjiang Zukamu Granules to prevent and cure novel coronavirus pneumonia [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2021, 33: 868-877.
- 16 Yang SJ, Wang J, David DB, et al. Role of TNF-TNF receptor 2 signal in regulatory T cells and its therapeutic implications [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 784.
- 17 Cha YM, Zhang JY, Yu W, et al. TNF- α Via NF- κ B signal pathway regulates malignant biological behavior of Xuanwei lung cancer [J]. *J Chin Oncol (肿瘤学杂志)*, 2021, 27: 560-565.
- 18 Deng YL, Ye XW, Liu MM, et al. Study on mechanism of the combination of the *Platycodon grandiflorum* and lily in treating pneumonia [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2021, 46: 2403-2412.
- 19 Li RY, Nie HX, Wu XJ, et al. Clinical features of coronavirus disease 2019 with leukocytosis [J]. *Med J Wuhan Univ (武汉大学学报:医学版)*, 2020, 41: 697-701.
- 20 Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression [J]. *Lancet*, 2020, 395: 1033-1034.
- 21 McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, et al. The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease [J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19: 102537.
- 22 Jiang SQ, Wang H, Liu YY, et al. Efficacy and safety of different IL-6 inhibitors in patients with severe COVID-19: a network Meta-analysis [J]. *Mod Prev Med (现代预防医学)*, 2022, 49: 3627-3636.
- 23 Xiao JL, Juan JZH, Hai YW, et al. Metabolic defects of peripheral T cells in COVID-19 patients [C]//14th Nation Immunol Acad Conf Wallpaper Exchange Collect (第十四届全国免疫学学术大会壁报交流集), 2021: 2.
- 24 Xiao XWU, Huan Y, Bing G. Immune response, viral shedding time, and clinical characterization in COVID-19 patients with gastrointestinal symptoms [C]//14th Nation Immunol Acad Conf Wallpaper Exchange Collect (第十四届全国免疫学学术大会论文摘要汇编), 2021: 173.
- 25 Ruben MLCB, Max B, John DC, et al. Quercetin and vitamin C: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19) [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1451.
- 26 Pan A, Saw WG, Manimekalai MSS, et al. Structural features of NS3 of Dengue virus serotypes 2 and 4 in solution and insight into RNA binding and the inhibitory role of quercetin [J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2017, 73: 402-419.
- 27 Shivraj HN, Doo HK, Arti N, et al. Probing the effect of quercetin 3-glucoside from *Dianthus superbus* L against influenza virus infection-*in vitro* and *in silico* biochemical and toxicological screening [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 135: 110985.
- 28 Mayack BK, Sippl W, Ntie-Kang F. Natural products as modulators of sirtuins [J]. *Molecules*, 2020, 25: 3287.
- 29 Wang RX, Zhou M, Ma HL, et al. The role of chronic inflammation in various diseases and anti-inflammatory therapies containing natural products [J]. *ChemMedChem*, 2021, 16: 1576-1592.
- 30 Wu DD, Qu CH, Zhang WF, et al. Inhibitory effect of epigallocatechin gallate on respiratory syncytial virus [J]. *Med J Wuhan Univ (武汉大学学报:医学版)*, 2016, 37: 177-182.
- 31 Bi XX, Han L, Qu T, et al. Anti-inflammatory effects, SAR, and action mechanism of monoterpenoids from *Radix Paeoniae Alba* on LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *Molecules*, 2017, 22: 715.
- 32 Zhang RH, Ai X, Duan YJ, 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.
- 33 Qi DX, Yang X, Jun LL, et al. Network pharmacology and molecular docking analyses on Lianhua Qingwen capsule indicate Akt1 is a potential target to treat and prevent COVID-19 [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53: e12949.