

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.07.001

基于网络药理学和分子对接技术探讨自拟“清瘟汤” 治疗新型冠状病毒肺炎的机制*

马诗瑜¹, 方洁¹, 卞晓岚^{1△}, 杨铭^{2△}, 郑岚¹, 郑林³

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海 200023; 2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032;
3. 上海中医药大学附属光华医院, 上海 200003)

摘要:目的 利用中药网络药理学和分子对接技术,探讨清瘟汤作用靶标与新型冠状病毒(SARS-CoV-2)之间的关联以及多成分、多靶标的治疗机制。方法 通过建立化学成分、靶点,筛选主要活性成分和靶标,用 Cytoscape 软件构建和分析网络,使用 String 对靶标进行 GO 及 KEGG 功能富集分析,采用 Autodock 软件对“清瘟汤”(QWT)主要活性成分与 SARS-CoV-2 的 3C 类似蛋白酶(3CLpro)和血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 蛋白进行分子对接。结果 QWT 中共有 172 个活性成分涉及 480 个靶标,其中大多数中药归胃经、肺经和脾经,27 个活性成分(琥珀酸、香豆素、 γ -氨基丁酸、谷氨酰胺、槲皮素、山柰酚、脯氨酸、赖氨酸、木犀草素、色氨酸、L-缬氨酸、胆碱、芹菜素、 β -谷固醇、苯丙氨酸、丙氨酸、水杨酸、DL-缬氨酸、羽扇豆酚、腺苷、谷氨酸、熊果酸、大黄素、异鼠李素、黄豆苷元、柠檬酸、阿魏酸)与靶标关系最密切;QWT 关键靶点涉及 CASP3, CYP1A1, JUN, TP53, HMOX1, ICAM1, FOS, PPARG, CXCR4, SRC, TYR, B2M, MMP9, RPS27A, PSMD3, NPEPPS, CNDP2, TNF, AKT1, APP, NPY1R, CTSS, PTGER3, GGCT, UBB, HLA-A, PTGS2, CXCL8, FUM, PSMC4 等,重要靶标富集在感染性疾病、肺部疾病和免疫性疾病三大类疾病通路上,GO 分类和 KEGG 通路富集主要调控抗炎、免疫、血管生成、钙通道等相关。分子对接结果显示,槲皮素、芹菜素、熊果酸、异鼠李素、羽扇豆酚与 3CLpro 和 ACE2 蛋白具有一定的亲和力。结论 QWT 中的活性化合物主要作用于 CASP3, CYP1A1, JUN, TP53, HMOX1 等靶点,其中有 5 种化合物可与 SARS-CoV-2 的 2 种主要蛋白进行分子对接,QWT 总体通过调节多条信号通路,从而可能产生抗 SARS-CoV-2 作用。

关键词:新型冠状病毒;分子对接技术;清瘟汤;网络药理学;抗病毒;作用机制

中图分类号:R285.5;R254.3

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)07-0001-09

Mechanism of Self-Designed Qingwen Decoction in the Treatment of the Coronavirus Disease 2019 Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

MA Shiyu¹, FANG Jie¹, BIAN Xiaolan¹, YANG Ming², ZHENG Lan¹, ZHENG Lin³

(1. Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China 200023; 2. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China 200032; 3. Guanghua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China 200003)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the action target of Qingwen Decoction and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the therapeutic mechanism of its multi-component and multi-target based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The main active components and targets were screened by establishing a database of chemical components and targets, the network was constructed and analyzed by using the Cytoscape software, the GO and KEGG functional enrichment analysis of targets was carried out by String, the molecular docking of the main active components of Qingwen Decoction and the 3C-like protease(3CLpro) and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) protein of SARS-CoV-2 were carried out by Autodock software. **Results** There were 172 active components and 480 targets in Qingwen Decoction and most of them belonged to the stomach, lung and spleen meridian. Totally 27 active components(succinic acid, coumarin, gamma-aminobutyric acid, glutamine, quercetin, kaempferol, proline, L-lysine, luteolin, tryptophan, L-valine, choline, apigenin, beta-sitosterol, phenylalanine, alanine, salicylic acid, DL-valine, lupeol, adenosine, glutamate, ursolic acid, emodin, isorhamnetin, daidzein, citric acid, ferulic acid) were most closely related to the targets. The key targets of Qingwen Decoction involved CASP3, CYP1A1, JUN, TP53, HMOX1, ICAM1, FOS, PPARG, CXCR4, SRC, TYR, B2M, MMP9, RPS27A, PSMD3, NPEPPS, CNDP2, TNF, AKT1, APP, NPY1R, CTSS, PTGER3, GGCT, UBB, HLA-A, PTGS2, CXCL8, FUM, PSMC4 and so on. The important targets are enriched in the three major disease pathways of infectious disease, lung disease and immune disease, and the GO classification and KEGG pathway enrichment were mainly regulated anti-inflammatory, immune, angiogenesis, calcium channels and so on. The results of molecular docking showed that quercetin, apigenin, ursolic acid, isorhamnetin and lupeol had affinity with 3CLpro and ACE2 protein. **Conclusion** The active components in Qingwen Decoction mainly act on targets such as CASP3, CYP1A1, JUN, TP53 and HMOX1. Among them, five components can be molecularly docked with

*基金项目:上海交通大学医学院“临床药学创新研究院”重点专项建设项目[CXYJY2019MS004];2020年度上海交通大学医学院新型冠状病毒感染肺炎抗疫相关药事管理与合理用药研究专项[JYX2020KYZX010];2020年度上海交通大学医学院新型冠状病毒感染肺炎抗疫相关药事管理与合理用药研究专项[JYX2020KYZX011];上海中医药大学附属龙华医院防治新型冠状病毒(COVID-19)应急科研攻关项目。

第一作者:马诗瑜,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为生物信息学、医院药学,(电子信箱)may7679@163.com。

△共同通信作者:卞晓岚,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)bxl@163.com;杨铭,男,博士研究生,副主任药师,研究方向为药物信息学、医院药学,(电子信箱)yangpluszhu@sina.com.cn。

two main proteins of SARS-CoV-2. Qingwen Decoction may have anti-SARS-CoV-2 by regulating multiple signal pathways.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; molecular docking technology; Qingwen Decoction; network pharmacology; antivirus; mechanism of action

临床实践显示,中医药及中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎(简称新冠肺炎,COVID-2019)成效明显,在疫情防控中发挥了重要作用。武汉市首个以中医治疗为主的方舱医院患者观察数据显示,与单纯西医治疗相比,中西医结合治疗患者的临床症状消失时间(5.15 d)少2 d,体温恢复时间(2.64 d)少1.7 d,平均住院时间少2.2 d,CT影像好转率高22%,临床治愈率高33%,普通转重症比率低27.4%^[1]。瑞金医院中医科自拟“清瘟汤”(QWT),主要由贯众、大青叶、板蓝根、金银花、蒲公英、金荞麦、藿香、黄芪、防风、白术、甘草11味中药组方,发挥益气固表、祛湿排毒功效,疫情前已在瑞金医院感染科重症监护室(ICU)使用,对病毒性肺炎患者疗效良好。新冠肺炎中医辨证为“湿毒疫”,主要病位在肺。根据《温病条辨》《伤寒论》等医学著作,结合实际辨证论治,目前QWT已在瑞金医院援助的武汉同济协和医院(光谷院区)、孝感市中心医院、随州市中心医院、武汉大学附属中南医院等使用,取得了较好的临床效果。

网络药理学研究策略主要是从系统性和整体性的特点来研究中药复方的多成分、多靶点、多途径的协同作用,从而阐明药物作用机制^[2-9]。分子对接技术是一种较成熟的发现新药的技术手段,采用计算机辅助进行药物设计,通过化学计量学模拟分子的作用力和结构,寻找小分子(或配体)与已知结构的大分子(或受体)活性位点的低能结合模式^[9]。本研究中基于网络药理学技术和分子对接技术探讨QWT对新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的作用机制,为进一步合理控制疫情及使用中药提供理论基础。现报道如下。

1 研究方法

1.1 疾病及相关基因信息数据库建立

利用公共数据库,包括GeneCard(<https://www.genecards.org/>),收集SARS-CoV-2的相关靶点信息,根据现有文献报道的相关作用靶点^[3,10-11]进行补充和合并,共得到32个相关基因。详见表1。

1.2 QWT化学成分及作用靶点数据库建立^[4-8]

化学成分筛选:通过搜索5个开源的数据库(TCMID, ChEMBL, TCMSP, HIT, STITCH),得到QWT的相关活性成分及作用靶点数据,并使用NCBI数据库的Gene基因搜索功能对靶点信息进行标准化。使用了类药性描述符(QED)对化合物的吸收、分布、代谢、排泄(ADME)性质进行筛选^[4-8],QED整合了8个重要的分子描述符,设定的化合物类药性指数阈值为0.2,大于0.2的类药性成分纳入网络药理学分析。

表1 SARS-CoV-2的相关基因

基因ID	基因名称	基因ID	基因名称	基因ID	基因名称
7276	TTR	6352	CCL5	6441	SFTPD
50943	FOXP3	245930	DEFB116	23586	DDX58
727897	MUC5B	3586	IL-10	3627	CXCL10
3576	IL8	6347	CCL2	920	CD4
4599	MX1	7098	TLR3	925	CD8A
7113	TMPRSS2	3569	IL6	343413	FCRL6
624	BDKRB2	7124	TNF	10410	IFITM3
1401	CRP	3605	IL17A	116442	RAB39B
959	CD40LG	56160	NSMCE3	59272	ACE2
785	CACNB4	1378	CR1	5045	FURIN
784	CACNB3	782	CACNB1		

作用靶点筛选:按照公式(1)计算复方作用靶标GS,其中分子与分母分别表示靶标与k个以上活性成分具有相互作用概率的负对数及按升序排列的秩次,P值越小相对应的GS值越大,而 $P \geq 0.05$ 时相应的GS值为0。按照二项分布理论以 $P(X \geq k)$ 表示靶点与k个以上活性成分具有相互作用的概率值[公式(2)]进行筛选,公式(2)中n是活性化合物总数,g是平均每个靶标相互作用的活性化合物数,k为当前靶标相互作用的活性化合物数。当靶标 $P \leq 0.05$ 时,说明该靶标与k个活性成分相互作用是小概率事件,则该靶标可以认为是复方的主要作用靶标。最终得出GS得分不为0的基因,即主要作用靶标。

$$GS = \begin{cases} \frac{-\log[P(X \geq k)]}{\text{Rank}[P(X \geq k)]} [P(X \geq k) \leq 0.05] \\ 0 (P \geq 0.05) \end{cases} \quad (1)$$

$$P(X \geq k) = \sum_{m=k}^n C_n^m \left(\frac{g}{n}\right)^m \left(1 - \frac{g}{n}\right)^{n-m} \quad (2)$$

活性成分筛选:在GS值基础上,进一步采用复方作用靶标得分的GS值[公式(3)]进行筛选,式中GS是活性化合物i的靶标基因得分, N_i 是活性化合物i的靶标基因数,I是指示变量,活性化合物i的得分等于其相应靶标得分的均值。通过GS值,可最终发现与复方中有效成分作用最相关的靶点。

$$GS_i = \frac{I}{N_i} \sum_{j=1}^{N_i} GS_j \quad (3)$$

上述工作由中药网络药理学分析系统完成,TCMNPAS(TCM network pharmacology analysis system)国家计算机软件著作权登记号:2019SR1127090。

1.3 生物靶标网络模型构建和分析

采用String V11.0软件构建QWT靶标的蛋白质相

互作用(protein-protein interactoin)网络,物种设置为“Homo Sapiens”,最低阈值设置中等置信度“Medium confidence”为0.4。使用 Cytoscape 3.7.0 软件计算相应的拓扑参数值进行筛选,使用 MCODE 功能对 PPI 网络进行模块分析,设置 K-core 值需大于4。

1.4 生物功能分析

对靶标基因生物功能分析主要有3个层次,即基因本体(GO分析)、信号通路(pathway)及医学主题词(Mesh),采用超几何分布模型 P 值,评估靶标基因是否与特定的基因本体、信号通路及主题词显著关联,同时还有经过 False Discovery Rate(FDR)法调整的 P 值,反映靶点群与基因本体、信号通路的关联强度,以调整的 $P < 0.01$ 为关联最显著。

基于网络的 QWT 作用于疾病靶标相关性分析,使用最短路径长度评估 QWT 作用靶标与疾病的相关性,以 P 值判断;显示复方靶标与疾病靶标的关联程度,按 P 值显著性排序关联程度最高的 GO 术语、KEGG 通路。

1.5 分子对接试验方法^[9]

从 QWT 的有效成分中,选取等级值(degree,等级值越高,说明其在网络拓扑关系中作用越重要)最高的活性成分(27种),与 SARS-CoV-2 的 3C 类似蛋白酶(3CLpro, PDB ID: 6Lu7)和天然人类血管紧张素转换酶相关的羧肽酶(ACE2, PDB ID: 1R42.)进行分子对接。从 RCSB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载相关蛋白的结构,从 ChemicalBook 数据库(<https://www.chemicalbook.com/>)下载化合物结构,使用 Pymol 软件去除溶剂分子与配体,使用 AutoDock 软件进行加氢、加电子、加 ROOT 等操作,完成后进行分子对接,其中蛋白结构的设置为刚性大分子。使用算法为 Local Search Parameters,得到结果(蛋白结构)中每个蛋白结合能最低的两组,使用 Pymol 软件对得到的最佳结果(蛋白结构)进行绘图。

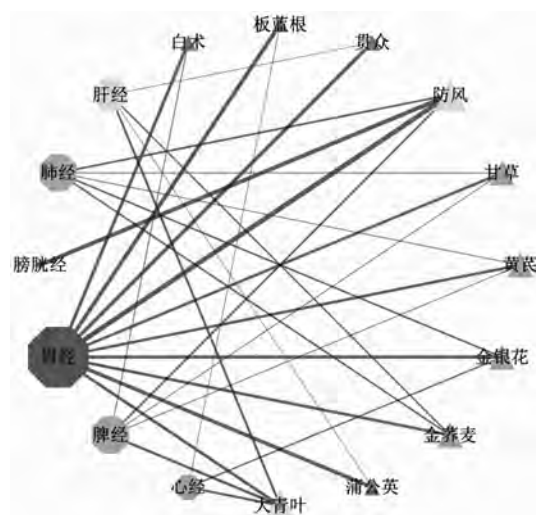
2 结果

2.1 QWT 化学成分及作用靶点数据库建立

共获得 QWT 中活性成分 172 个及主要靶标 480 个,详见表 1。根据组成 QWT 的归经信息,构建复方的中药-归经网络及重要活性成分-靶标网络。详见图 1 和图 2。

表 1 QWT 中各药材活性成分与对应 366 个靶标成分数量(个)

药材	活性成分	靶标成分	药材	活性成分	靶标成分	药材	活性成分	靶标成分
大青叶	23	366	贯众	3	40	藿香	3	14
甘草	51	208	白术	20	316	金荞麦	13	304
金银花	39	98	防风	33	268	蒲公英	7	32
板蓝根	39	393	黄芪	32	407			



(注:△表示不同的中药,○表示不同的归经。)

图 1 QWT“中药-归经”网络图

图 1 和图 2 中每个节点的大小代表了其等级值(表示该节点和网络中其他节点相连的路线数目,等级值越大代表该节点是连接其他节点的重要桥梁),颜色由冷到暖代表了中心度值(betweenness centrality),连线的粗细和颜色代表了 Edge betweenness,所有的颜色和粗细都是越大越粗,越大越暖色。由图 1 可见,等级值较大的依次为胃经、肺经、脾经,等级值分别为 10,5,5,说明大多数中药归属此三经。

对 QWT 中 172 个活性成分及 480 个主要靶标构建 QWT 活性成分-靶点网络图,共 609 个节点、2 556 条边,筛选其中等级值 ≥ 20 的活性成分有 27 种,详见表 3;等级值 ≥ 30 的靶标共有 89 个,详见表 4。绘制 27 种重要成分与靶点间的网络图(图 2)可知,与靶标相关的主要活性成分主要分为两类,一类是清热解毒药中抗炎、抗菌、抗病毒的有效成分,另一类主要是扶正固表药中提高免疫的氨基酸成分。

2.2 QWT 靶标干预的生物功能分析

将 480 个作用靶标进行通路及基因本体的富集分析。QWT 与 SARS-CoV-2 在 GO 水平上显示出共关联性,在前 400 个主要关联的 GO 分类中两者共关联占比达 73.60%。在 $P < 0.01$ 水平上,与两者显著共关联的 GO 分类主要有 4 类作用:1)抗炎作用(积极调控发热、干扰素 γ 产生的正向调节、IL-12 产生的正向调节、IL-6 产生的正向调节、细胞对肿瘤坏死因子的反应、I- κ B 激酶/NF- κ B 信号传导、NIK / NF- κ B 信号);2)免疫作用(α - β T 细胞活化、B 细胞活化参与免疫反应、免疫球蛋白的生成、白细胞参与免疫反应、淋巴细胞活化参与免疫反应、单核细胞趋化、巨噬细胞趋化性的正调控、T 细胞活化的正调控);3)血管生成作用(肾素-血管紧张素调节血容量、血管生成);4)钙离子

表3 QWT 中与靶标最相关的重要活性成分

PubChem CID	活性成分	等级值	来源	PubChem CID	活性成分	等级值	来源
1110	琥珀酸(succinic acid)	1564	板蓝根、大青叶、金荞麦、金银花	222284	β -谷固醇(beta-sitosterol)	96	板蓝根、大青叶、防风、黄芪、金荞麦、金银花
323	香豆素(coumarin)	760	防风、黄芪	994	苯丙氨酸(phenylalanine)	86	白术
119	γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid)	748	板蓝根、黄芪	5950	丙氨酸(alanine)	79	甘草
33032	谷氨酰胺(glutamine)	530	白术	338	水杨酸(salicylic acid)	76	板蓝根、大青叶
5280343	槲皮素(quercetin)	494	黄芪、金荞麦、金银花	1182	缬氨酸(DL-valine)	71	白术
5280863	山柰酚(kaempferol)	378	大青叶、贯众、黄芪、金银花	259846	羽扇豆醇(lupeol)	65	板蓝根、大青叶、黄芪
145742	脯氨酸(proline)	292	黄芪、白术	54732806	腺苷(adenosine)	48	板蓝根、大青叶、黄芪
5962	赖氨酸(L-lysine)	194	白术	611	谷氨酸(glutamate)	48	白术
5280445	木犀草素(luteolin)	146	金荞麦、金银花	64945	熊果酸(ursolic acid)	46	金银花
6305	色氨酸(tryptophan)	144	板蓝根、大青叶	3220	大黄素(emodin)	46	板蓝根、金荞麦
6287	缬氨酸(L-valine)	144	白术	5281654	异鼠李素(isorhamnetin)	41	黄芪、金荞麦
305	胆碱(choline)	133	黄芪、蒲公英	5281708	黄豆苷元(daidzein)	35	黄芪
5280443	芹菜素(apigenin)	114	板蓝根、金银花	311	柠檬酸(citric acid)	32	大青叶
				709	阿魏酸(ferulic acid)	26	黄芪

表4 QWT 中等级值较高的靶标

Gene symbol	等级值	Gene symbol	等级值	Gene symbol	等级值	Gene symbol	等级值	Gene symbol	等级值	Gene symbol	等级值
CASP3	69	NPEPPS	35	PSMB7	32	SEC61B	31	SEC61A2	31	HLA-C	31
CYP1A1	52	CNDP2	35	PDIA3	32	LNPEP	31	PSMC3	31	PSME1	31
JUN	47	TNF	35	CALR	32	SEC61A1	31	PSMD1	31	PSME4	31
TP53	46	AKT1	35	TPP2	32	PSMC1	31	PSMD2	31	PSMB11	31
HMOX1	42	APP	34	HLA-B	32	PSMA6	31	PSMC5	31	PSMD14	31
ICAM1	42	NPY1R	34	NOS3	32	PSMD11	31	PSMA8	31	UBA52	31
FOS	41	CTSS	34	MMP1	32	BLMH	31	PSMF1	31	PSMD13	31
PPARG	39	PTGER3	33	ALB	31	PSMB1	31	SEC61G	31	ERAP2	31
CXCR4	39	GGCT	33	PSMA4	31	PSMB6	31	UBC	31	PSMC6	31
SRC	39	UBB	33	PSMD5	31	PSMA5	31	PSMD12	31	PSMA1	31
TYR	38	HLA-A	33	PSMD8	31	PSMB4	31	PSMB10	31	PSMD9	31
B2M	36	PTGS2	33	PSMA3	31	PSMC2	31	PSMB5	31	POMC	30
MMP9	35	CXCL8	32	PSME2	31	PSME3	31	PSMD4	31	CAT	30
RPS27A	35	FUM	32	PSMD10	31	PSMD6	31	PSMA7	31	CYP1A2	30
PSMD3	35	PSMC4	32	PSMD7	31	ERAP1	31	PSMB2	31		

通道作用(胞浆钙离子浓度的正调控、钙离子稳态、钙离子转运的正向调节、钙离子进入的正调控)。其中钙离子通道作用与血管生成作用之间互相作用,免疫调节作用与抗炎作用之间也相互关联。

KEGG 富集分析(图3)显示,在 $P < 0.01$ 水平上, QWT 靶标与 132 条信号通路显著关联,与 SARS-CoV-2 关联为 36 条,与两者均有关联为 26 条。在两者均有关联的 26 条通路中,KEGG 通路富集结果中限定为人类疾病部分的通路,得到 14 条靶标富集的疾病通路,其中有 12 条通路与感染性疾病、肺部疾病及免疫疾病相关,包括疟疾、阿米巴病、军团菌病、单纯疱疹病毒感染、乙型肝炎、丙型肝炎、百日咳、甲型流感、肺结核、类风湿关节炎、同种异体移植排斥。其他通路主要与抗炎及免疫相关,包括主要作用于肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、白细胞介素 17(IL-17)信号通

路、核转录因子(NF- κ B)信号通路、TLR 多蛋白复合体(Toll)样受体信号通路、辅助 T 细胞 17(Th17)细胞分化 T 细胞受体信号通路、趋化因子信号通路、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、NF- κ B 信号通路、NLR 蛋白(NOD)样受体信号通路、T 细胞受体信号通路、产生 IgA 的肠道免疫网络。

2.3 QWT 和 SARS-CoV-2 的生物 PPI 网络分析

使用 String 在线平台对 QWT 的作用靶标进行 PPI 网络构建,PPI 网络包含 419 个蛋白质节点、21 519 条边。根据 PPI 结果进一步进行网络分析和计算,选取等级值 ≥ 100 的节点,主要包括 CXCL8, CXCR4, CXCL12, APP, CXCL1, AGT, CXCL10, KNG1, POMC, CCR5, CCR2, CXCL2 等 200 个靶点,对高等级值的靶点进一步进行 PPI 分析。String 功能富集分析结果中,设定统计指标为 $FDR < 1 \times 10^{-6}$,在 KEGG 通路富集的结果中发现,

表 5 QWT 中活性成分的分子对接结果

PubChem CID	活性成分	分子式	结合能(3CLpro)	结合能(ACE2)	PubChem CID	活性成分	分子式	结合能(3CLpro)	结合能(ACE2)
119	γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid)	C ₄ H ₉ NO ₂	-3.8	-4.1	6287	缬氨酸(L-valine)	C ₅ H ₁₁ NO ₂	-4.5	-4.8
305	胆碱(choline)	C ₅ H ₁₄ NO ⁺	-3.2	-3.4	6305	色氨酸(tryptophan)	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	-5.8	-6.7
311	柠檬酸(citric acid)	C ₆ H ₈ O ₇	-5	-5.6	33032	谷氨酰胺(glutamine)	C ₅ H ₉ NO ₄	-4.6	-5.1
323	香豆素(coumarin)	C ₉ H ₆ O ₂	-5.7	-6.4	64945	熊果酸(ursolic acid)	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	-8.3	-9.6
338	水杨酸(salicylic acid)	C ₇ H ₆ O ₃	-5.6	-6.3	145742	脯氨酸(proline)	C ₅ H ₉ NO ₂	-4.4	-4.9
611	谷氨酸(glutamate)	C ₅ H ₉ NO ₄	-4.7	-5	222284	β -谷固醇(beta-sitosterol)	C ₂₉ H ₅₀ O	-5.6	-7.4
709	阿魏酸(ferulic acid)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-5.2	-6.1	259846	羽扇豆酚(lupeol)	C ₃₀ H ₅₀ O	-8	-9.4
994	苯丙氨酸(phenylalanine)	C ₉ H ₉ NO ₂	-4.7	-5.7	5280343	槲皮素(queretin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-7.1	-8.2
1110	琥珀酸(succinic acid)	C ₄ H ₄ O ₄	-4.1	-4.7	5280443	芹菜素(apigenin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	-6.7	-8
1182	缬氨酸(DL-valine)	C ₅ H ₁₁ NO ₂	-4.5	-4.8	5280445	木犀草素(luteolin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-6.9	-8.3
3220	大黄素(emodin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	-6.9	-8.2	5280863	山柰酚(kaempferol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-6.6	-8.3
5950	丙氨酸(alanine)	C ₃ H ₇ NO ₂	-3.9	-3.9	5281654	异鼠李素(isorhamnetin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	-7.4	-8.2
5962	赖氨酸(L-lysine)	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	-4.5	-4.9	5281708	黄豆苷元(daidzein)	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	-6.9	-7.3
					54732806	腺苷(adenosine)	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	-5.4	-7.3

高等级蛋白主要影响的 KEGG 疾病通路与感染性疾病、肺部疾病、免疫疾病、心血管疾病相关,包括肺结核、人嗜 T 淋巴细胞病毒-1(HTLV-1)感染、乙型病毒性肝炎、百日咳、军团菌病、沙门菌感染、扩张型心肌病、动脉粥样硬化、类风湿关节炎、阿米巴病、甲型流感。主要影响的信号通路有 NOD 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、血管平滑肌收缩等。同时,对高等级蛋白靶点的 PPI 网络进一步使用网络模块功能分析(MCODE)进行模块分析,共得到 2 个子网络模块。详见图 4。其中模块 1 的靶点主要与免疫系统(图中所示紫色)、抗炎(TNF 信号通路,图中所示绿色;MAPK 信号通路,图中所示黄色;白细胞介素信号,图中所示红色)相关;模块 2 的靶点主要与细胞转录(图中所示红色)和 RNA 聚合酶 II 特异的 DNA 结合转录因子结合(图中所示紫色)相关。

2.4 分子对接结果

QWT 中主要的 27 种活性成分与 3CLpro 和 ACE2 的对接结果见表 5。其中,每个蛋白对接最好的前 5 位化合物的对接结果见图 5。5 种化合物均能与 2 种蛋白形成氢键,其中异鼠李素均能与 2 种蛋白形成 5 个氢键;槲皮素能与 3C 类形成 5 个氢键,与 ACE2 结合形成 2 个氢键;芹菜素能与 3C 类形成 4 个氢键,与 ACE2 结合形成 3 个氢键;熊果酸均能与 2 种蛋白形成 2 个氢键;羽扇豆酚均能与 2 种蛋白形成 1 个氢键。

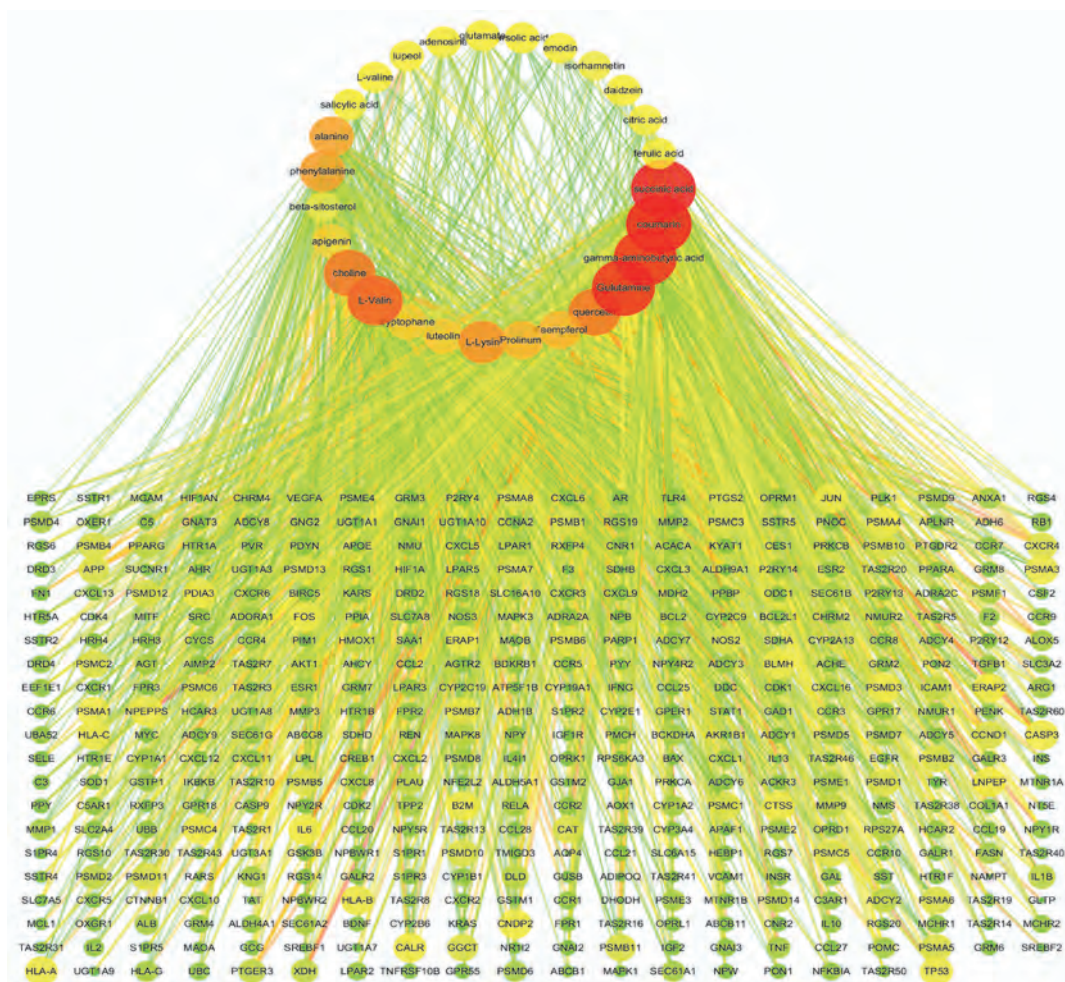
3 讨论

本研究中对 QWT 的活性成分、归经、靶标及生物功能均进行了分析,并通过分子对接技术对直接作用于 SARS-CoV-2 的 2 种蛋白进行了对接,希望为进一步抗 SARS-CoV-2 治疗提供支持。

新冠肺炎属中医“疫”范畴,病因为感受疫疠之气,主要为“湿毒”疫气,病位在肺,但前期的许多研究发

现^[12],多数患者有消化道症状。QWT 主要作用于胃经、肺经、脾经,方中有 10 味中药作用于胃经,有 5 味中药作用于肺经和脾经。说明 QWT 对于改善脾胃症状有较好作用,同时作用于肺经,祛湿和胃,调节胃肠道功能,共同改善肺部症状。

网络药理学研究发现,QWT 中最相关的活性成分为琥珀酸、香豆素、 γ -氨基丁酸、谷氨酰胺、槲皮素、山柰酚、脯氨酸、赖氨酸、木犀草素、色氨酸、L-缬氨酸、胆碱、芹菜素、 β -谷固醇、苯丙氨酸、丙氨酸、水杨酸、DL-缬氨酸、羽扇豆酚、腺苷、谷氨酸、熊果酸、大黄素、异鼠李素、黄豆苷元、柠檬酸、阿魏酸。其中主要为 4 类成分:1)黄酮/黄酮苷元等清热解毒中药中常见的有效成分,槲皮素、山柰酚、异鼠李素、木犀草素、芹菜素、黄豆苷元;2)五环三萜类的抗炎有效成分,熊果酸、羽扇豆酚;3)有机酸类有效成分,阿魏酸、琥珀酸、水杨酸、柠檬酸;4)氨基酸类成分,如赖氨酸、脯氨酸、色氨酸、丙氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺等。山柰酚、槲皮素、木犀草素、芹菜素是经典的抗炎和抗菌有效成分,以上几种成分目前在抗炎、抗病毒、抗肿瘤、心血管保护、免疫调节等研究中也报道有一定作用。山柰酚和槲皮素均能降低人肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、细菌内毒素和白细胞介素(IL)-1 β 的刺激等的表达^[13-14]。槲皮素对疱疹病毒感染机体后的增殖具有抑制作用,也可拮抗病毒诱导的细胞凋亡^[15]。木犀草素^[16-19]和芹菜素对病毒均有一定作用,芹菜素更是已有发明专利涉及其用于预防和治疗中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)感染的药物组合^[19]。熊果酸作为经典的保肝有效成分,除了能抑制乙型肝炎病毒转录用于病毒性肝炎^[20]外,对疱疹病毒也有作用^[21]。黄豆苷元能有效抑制老年冠心病患者血清炎症因子水平(hs-CRP,IL-6,TNF- α),对冠状动脉粥样硬化具有抗炎作用^[22]。大黄素作为常见蒽醌类成分,体内



注: □表示不同靶标, ○表示不同重要活性成分。

图2 QWT中重要活性成分-靶标网络图^[3]

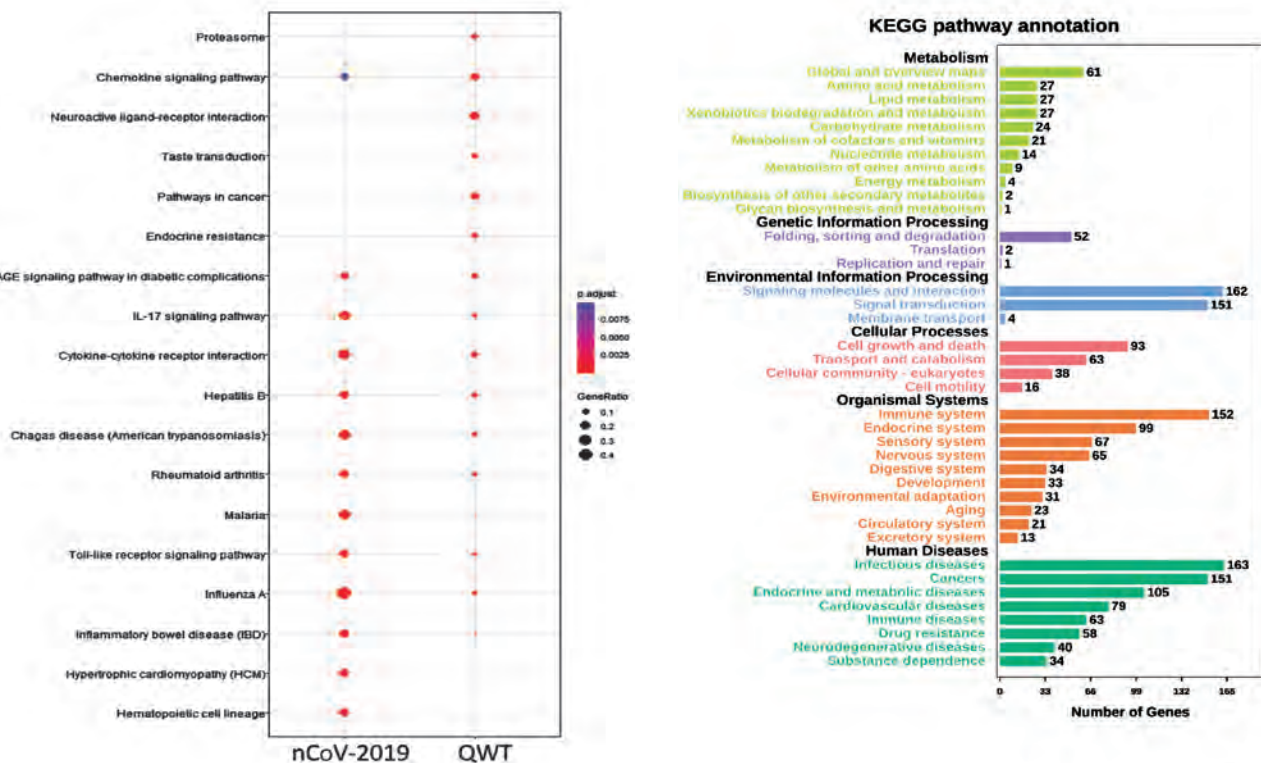
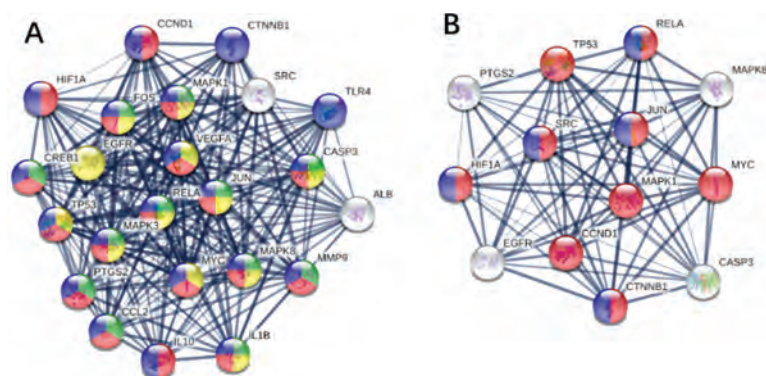
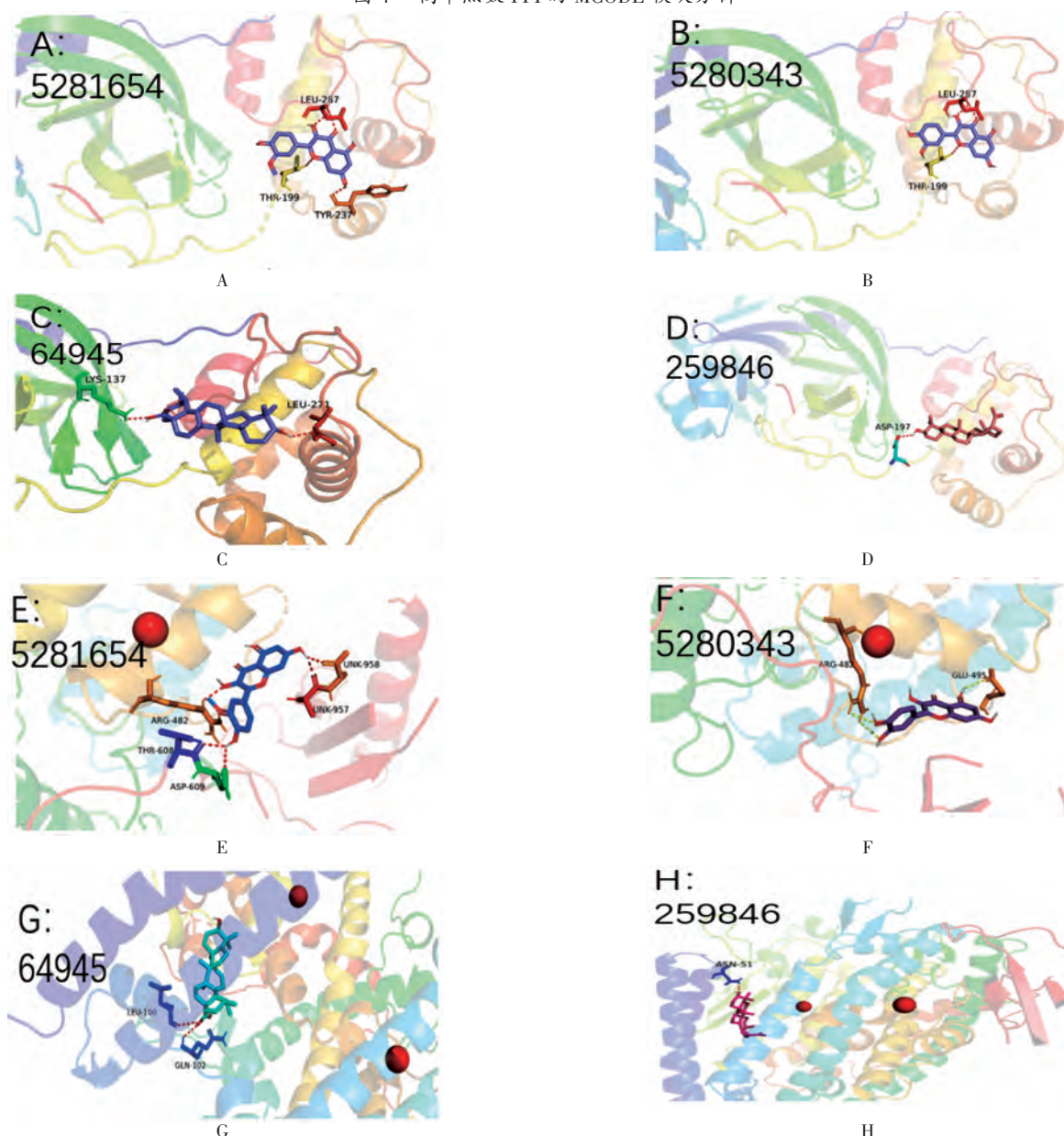


图3 KEGG富集分析



A. Score22, 364, Nodes23, Edges246, containing: HIF1A, VEGFA, CTNNB1, RELA, PTGS2, CASP3, IL-10, TLR4, SRC, CREB1, MMP9, CCND1, CCL2, MAPK8, MYC, FOS, EGFR, JUN, IL1B, TP53, ALB, MAPK1, MAPK3; B. Score13, Nodes13, Edges78, containing: HIF1A, CTNNB1, RELA, PTGS2, CASP3, SRC, CCND1, MAPK8, MYC, EGFR, JUN, TP53, MAPK1

图 4 高节点数 PPI 的 MCODE 模块分析



A. 3CLpro 蛋白与异鼠李素的分子对接 B. 3CLpro 蛋白与槲皮素 C. 3CLpro 蛋白与熊果酸的分子对接 D. 3CLpro 与羽扇豆酚的分子对接
E. ACE2 与异鼠李素的分子对接 F. ACE2 与槲皮素的分子对接 G. ACE2 与熊果酸的分子对接 H. ACE2 与羽扇豆酚的分子对接

图 5 分子对接结果^[5]

及体外试验中均表现出了抗炎活性,与其阻滞低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/NF- κ B-COX-2信号通路相关^[23]。氨基酸类的有效成分主要发挥调节免疫作用,提高患者的免疫功能。多种活性成分协同作用,对于患者的抗炎、抗病毒、保肝、增强免疫力等多方面提供治疗支持。

QWT与SARS-CoV-2,在生物功能、KEGG通路作用中,以及PPI互作网络中,最为相关的信号通路主要为:IL-6免疫反应、IL-17信号通路、NOD样受体信号通路、Toll样受体信号通路等,最相关的疾病聚集主要为百日咳、甲型流感、类风湿关节炎、疟疾等。由于新冠肺炎目前没有特效药物,发病早期患者的外周血白细胞总数正常或减低,淋巴细胞计数减少,提示免疫功能改变,因此应用中药调节免疫功能显得尤为重要。在重症肺炎中就有报道,对炎症因子的调控与预后具有相关性^[24],PCT,CRP,TNF- α ,IL-6水平均能较好地预测病情进展及急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发生,提示QWT可能通过相关的炎症通路来进一步避免炎症介质的进一步释放。Toll样受体和NOD样受体均为与自身免疫疾病相关的受体^[25],QWT通过调节两者的信号通路,可以影响自噬和抗炎,自噬可影响感染炎症性疾病的缓解和炎症性疾病的病理过程。此外,新冠肺炎患者可能出现心功能损害,QWT的靶标可能影响肾素-血管紧张素调节血容量、调节血液循环、对钙离子通道中的胞浆钙离子浓度起正调控等,说明QWT有潜在的心血管保护作用,可能在一定程度上减轻患者的心脏负担,改善心功能。

在分子对接结果中发现了5种活性成分(异鼠李素、槲皮素、芹菜素、熊果酸、羽扇豆酚)均能与SARS-CoV-2的S蛋白和人体内血管紧张素转换酶II(ACE2)蛋白结合并形成氢键,说明其有潜在的成药性,可能需要进一步的药效学验证。现阶段的研究认为^[26],使用ACEI或者ARB类药物可能是一把“双刃剑”,而和中药的配合使用,可能有“减毒增效”之功用。本研究中还发现,QWT与SARS-CoV-2最相关的5个靶标可作用于疟疾和类风湿关节炎,提示中药制剂与氯喹的联合使用可能进一步改善新冠肺炎的治疗。

综上所述,本研究中采用网络药理学的手段和分子对接技术,对自拟QWT的活性成分、归经和靶标进行了系统性研究,阐释了其对SARS-CoV-2的分子水平作用机制,突出了中药制剂多成分、多靶标对机体整体调控的特点,为该复方制剂治疗新冠肺炎提供了理论支持。

参考文献:

- [1] 杨丰文,黄明,张俊华,于春泉. 应对疫情中医药救治有哪些优势-张伯礼院士权威解答[J/OL]. 天津中医药,2020:1-2. (2020-03-04) [2020-03-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1349.R.20200304.1638.004.html>.
- [2] 宗阳,丁美林,贾可可,等. 基于网络药理学和分子对接法

探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究[J]. 中草药,2020,51(4):836-844.

- [3] 赵静,田赛赛,杨健,等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨[J]. 中草药,2020,51(4):829-835.
- [4] LI S. Mapping ancient remedies: applying a network approach to traditional Chinese medicine[J]. Science, 2015, 350(Supplement 6262):S72-S74.
- [5] YANG M, CHEN JL, XU LW, et al. Navigating Traditional Chinese Medicine Network Pharmacology and Computational Tools[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, Article ID 731969[M6].
- [6] YANG M, CHEN JL, XU LW, et al. A Network Pharmacology Approach to Uncover the Molecular Mechanisms of Herbal Formula Ban-Xia-Xie-Xin-Tang[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2018, Article ID 4050714[M7].
- [7] YANG M, CHEN JL, SHI XF, et al. Development of in Silico Models for Predicting P-Glycoprotein Inhibitors Based on a Two-Step Approach for Feature Selection and Its Application to Chinese Herbal Medicine Screening[J]. Mol Pharmaceut, 2015, 12(10):3691-3713.
- [8] YANG M, CHEN J, XU L, et al. A novel adaptive ensemble classification framework for ADME prediction[J]. Rsc Adv, 2018, 8(21):11661-11683.
- [9] 吴昊,王佳琪,杨雨薇,等. 基于网络药理学和分子对接技术初步探索“清肺排毒汤”抗新型冠状病毒肺炎作用机制[J]. 药科学报,2020,55(3):374-383.
- [10] WANG J, ZHAO S, LIU M, et al. ACE2 expression by colonic epithelial cells is associated with viral infection, immunity and energy metabolism[J]. Med Rxiv, 2020: 545. (2020-02-05) [2020-03-05]. <https://doi.org/10.1101/2020.02.05.20020545>[M8].
- [11] 刘千勇,王晓良. 新型冠状病毒(2019-nCoV)的靶向药物研究策略[J]. 药科学报,2020,55(2):181-188.
- [12] 张明鑫,路宁,王佳,等. 新型冠状病毒细胞受体血管紧张素转化酶II在消化道及其肿瘤中的表达[J]. 现代肿瘤医学,2020,28(7):1229-1233.
- [13] 陈育华,周克元,袁汉尧. 山柰酚药效的研究进展[J]. 广东医学,2010,31(8):1064-1066. DOI:10.3969/j.issn.1001-9448.2010.08.058.
- [14] 张文志,周新,赵学增. 黄酮醇苷元山柰酚和槲皮素的研究[J]. 中国误诊学杂志,2007,7(22):5219-5220. DOI:10.3969/j.issn.1009-6647.2007.22.008.
- [15] 李聪,胡强,张燕翔,等. 槲皮素的药理学活性研究进展[J]. 湖北中医杂志,2018,40(6):63-64.
- [16] 邓东沅,顾立刚,刘晓婷,等. 木犀草素体外对H1N1感染A549作用的研究[J]. 中医药导报,2017,23(3):11-14.
- [17] 宋雪娇,刘晓琳,金安妍,等. 木犀草素抗菌及消除耐药作用的研究进展[J]. 中国家禽,2015,37(17):44-46. DOI:10.16372/j.issn.1004-6364.2015.17.010.
- [18] 张爱琼,梁海英,曾智勇. 芹菜素衍生物芫花素对非洲猪瘟病毒感染的抑制作用[J]. 猪业科学,2019,36(7):18-