

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.21.011

抗白细胞介素6受体的活性成分虚拟筛选及其核心中药干预新冠肺炎的网络药理学机制探讨

吴坚¹, 张锡洪¹, 徐文坚²

(1. 广东省汕头市中心医院, 广东 汕头 515031; 2. 广东省中山市小榄人民医院, 广东 中山 528400)

摘要:目的 筛选白细胞介素6受体(IL-6R)的天然小分子抑制剂,预测含有该类成分最多的中药干预新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制。方法 利用ADME-Lipinski规律筛选IL-6R的活性成分,以IL-6R为靶点,运用Autodock Vina软件和Python脚本对IL-6R的天然小分子抑制剂进行高通量分子对接,获得具有潜在IL-6R抑制活性的天然小分子化合物及含有该类成分的核心中药;构建“成分-靶点-通路”网络,预测核心中药干预COVID-19的作用机制。结果 获得口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18的成分1511个,涉及372种中药。其中,芝麻素与IL-6R对接最好,木犀草素来源最广,甘草含抗IL-6R活性成分最多。网络药理学研究结果显示,甘草抗COVID-19的潜在靶点共16个,并富集获得了7条与COVID-19发生、发展密切相关的生物通路,包括低氧诱导因子1、血管内皮生长因子、血小板活化、肿瘤坏死因子、磷脂酰肌醇3-激酶-苏氨酸蛋白激酶、白细胞介素17、Toll样受体等,上述通路主要涉及免疫调节、炎症干预、氧化应激、抗凝与凝血系统调控等方面。结论 芝麻素、木犀草素和甘草对COVID-19的发生、发展具有多途径的潜在干预能力,可为抗COVID-19的新药开发提供理论基础。

关键词:分子对接技术;白细胞介素6受体;新型冠状病毒肺炎;作用机制;天然小分子抑制剂;芝麻素;木犀草素;甘草;网络药理学

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)21-0035-09

Virtual Screening of Active Components of Interleukin-6 Receptor and Investigation of the Network Pharmacological Mechanism of the Core Traditional Chinese Medicine Against COVID-19

WU Jian¹, ZHANG Xihong¹, XU Wenjian²

(1. Shantou Central Hospital, Shantou, Guangdong, China 515031; 2. Xiaolan People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan, Guangdong, China 528400)

Abstract: Objective To screen natural small molecule inhibitors of interleukin-6 receptor (IL-6R) and to predict the mechanism of traditional Chinese medicine (TCM) containing the most IL-6R inhibitors in the intervention of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).

Methods The IL-6R active components were screened by the ADME-Lipinski rule. Taking IL-6R as the target, the natural small molecule inhibitors of IL-6R were docked with high-throughput molecules by the Autodock Vina software and Python script, and the natural small molecule compounds with potential IL-6R inhibitory activity and the core TCM containing these components were obtained. The "component-target-pathway" network was constructed to predict the mechanism of core TCM in the intervention of COVID-19. **Results** A total of 1511 components with oral bioavailability(OB)≥30% and drug-likeness(DL)≥0.18 were obtained, involving 372 kinds of TCM. Among them, sesamin had the best docking with IL-6R, luteolin had the widest source, and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma contained the most anti-IL-6R active components. The results of network pharmacology showed that there were 16 potential targets of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma against COVID-19, and seven biological pathways closely related to the occurrence and development of COVID-19 were enriched, including hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet activation, tumor necrosis factor(TNF), phosphatidylinositol 3-kinase threonine-protein kinase(PI3K-Akt), interleukin-17(IL-17), Toll like receptor (TLR) and other pathways, which were mainly involved in immune regulation, inflammatory intervention, oxidative stress, anticoagulation and coagulation system regulation. **Conclusion** Sesamin, luteolin and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma have potential intervention ability in multiple ways on the occurrence and development of COVID-19, which can provide a theoretical basis for the development of new drugs against COVID-19.

Key words: molecular docking technology; interleukin-6 receptor; Coronavirus Disease 2019; mechanism; natural small molecule inhibitors; sesamin; luteolin; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; network pharmacology

发热、乏力、干咳等症状是新型冠状病毒肺炎(COVID-19)感染初期的临床表现,重症患者可出现呼吸困难与低氧血症,甚至发展为急性呼吸窘迫综合征等^[1]。目前尚无特效药物及疫苗,临床针对严重急性呼吸综合

征冠状病毒2(SARS-CoV-2)感染患者的治疗,多数沿用既往冠状病毒感染的临床治疗经验^[2]。炎性风暴由于机体的免疫系统应答过于强烈,大量释放细胞因子对肺组织造成损伤,是致使患者病情恶化甚至死亡的重要

第一作者:吴坚,男,大学本科,主管药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)106392666@qq.com。

原因^[3]。COVID-19患者由于后期机体产生炎症风暴导致多器官衰竭而死亡。参考文献[4]分析了COVID-19患者的特征,发现患者特别是重症患者的淋巴细胞计数均显著降低,炎症因子白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)等水平均显著升高。IL-6是与炎症反应关系最密切的炎症因子,常在急慢性炎症部位产生,通过与IL-6受体(IL-6R)结合诱导转录炎症应答,刺激更多细胞因子产生,参与炎症风暴^[5]。IL-6/IL-6R的结合效应引发蛋白酪氨酸激酶(JAK)、信号传导与转录激活因子(STAT3)、白细胞介素17A(IL-17A)、磷脂酰肌醇3-激酶-苏氨酸蛋白激酶(PI3K-Akt)、转录因子- κ B(NF- κ B)、Toll样受体(TLR)等下游信号级联反应^[6-7],其信号通路的激活会刺激IL-6靶向应答基因的表达,在信息传导、细胞增殖、分化、免疫调节、炎症、血管生成、肿瘤的发生和转移中起重要作用。此外,低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)信号通路靶向调控B细胞分泌IL-6,影响T细胞分化^[8]。该过程参与免疫调控,和机体的炎症密切相关。IL-6可诱导免疫细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF),VEGF可提高血管的通透性,促使炎症细胞渗出^[9]。血管形成和炎症反应是2个相互依赖的过程。上述因子间相互调节,形成一个复杂的网络,促进组织炎症的发生和发展。目前,我国发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)》^[10]已明确将IL-6水平上升作为病情恶化的临床警示指标,采用糖皮质激素作为免疫抑制剂治疗炎症风暴,用于遏制重症患者的免疫激化反应,但糖皮质激素的使用可能会降低机体抗病毒的能力,造成二次感染、病程延长及骨质疏松、股骨头坏死等不良预后,且存在严重后遗症风险,严重影响患者的生活质量^[11]。

我国中医药在治疗SARS-CoV-2感染、COVID-19患者中发挥了重大作用。中药“多成分-多靶点-多效应”的整体治疗特点使其在疾病防治方面具备独特的优势和潜力。中药成分复杂,中药单体作为中药发挥疗效的物质基础,挖掘和筛选中药单体具有重要意义。目前尚缺乏抗COVID-19炎症风暴相关机制研究的文献报道,且尚未系统阐明中药各组分及其治病机理。随着各种高通量多组学技术的迅速发展,网络药理学及分子对接技术为探索中药的科学依据提供了新策略^[12]。网络药理学在系统药理学和生物信息学及计算机技术的基础上通过计算、分析与预测的研究方式将中药及其成分和疾病生物网络联系起来,以期挖掘和发现药效物质及其潜在的治病机制^[13]。分子对接技术通过化学计量学方法模拟受体和配体间的相互作用,准确预测两者结合的可能性,还可根据两者的结合情况优化受体和配体的结构,为药物筛选及设计提供新思路^[14]。本研究针对

临床报道的与炎症风暴最密切的IL-6R,利用分子对接技术对中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)中的天然小分子进行高通量挖掘,虚拟筛选出IL-6R的天然小分子抑制剂,并通过网络药理学预测富集IL-6R天然小分子抑制剂最多的核心中药干预COVID-19的作用机制,为新药开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 小分子数据库的建立

基于TCMSP数据库,纳入2015年版《中国药典(一部)》收录的499种中药及其含有IL-6R天然小分子抑制剂的化合物共13143个,下载化合物的MOL2格式3D结构的文件,建立分子对接技术虚拟筛选的小分子数据库。

1.2 基于ADME和Lipinski规则的评估

基于ADME参数^[15]即口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$,类药性(DL) ≥ 0.18 ,以及Lipinski规则^[16]即相对分子质量(MW) < 500 、脂水分配系数(clogP) < 5 、氢键给体数目(Hdon) < 5 ,对小分子抑制剂数据库的活性成分进行初步筛选,筛选药动学性质和OB良好的化合物,以减少阴性结果出现的概率,从结构和性质角度过滤成药性较低的化合物,以提高筛选效率。

1.3 分子对接

在RCSB PDB(<http://www.rcsb.org/>)网站中下载IL-6R(1N26)的3D结构文件,通过Raccoon软件对小分子进行加氢、加电荷、移除非极性氢、删除孤对电子,以及建立特殊可旋转键等批量预处理。采用Discovery studio 2.5软件将1N26中的配体/底物清除,并获得IL-6R。据报道,Phe229 and Phe279两个氨基酸残基不仅是IL-6R的关键结合位点^[17-19],也是目前IL-6R的研究热点。因此,以Phe229和Phe279两个氨基酸残基在IL-6R中的位置设置用于本研究中分子对接的结合口袋。运用Autodock Vina和Python脚本完成高通量分子对接,根据每个化合物的最优结合能进行排序,若结合能小于0,则说明配体和受体可自发结合,目前分子对接结果的筛选尚无统一标准,以结合能 ≤ -20.92 kJ/mol作为对接依据^[19],为提高结果的可靠性,以结合能 ≤ -25.10 kJ/mol作为筛选潜在活性成分的对接依据。

1.4 成分靶点预测及其抗COVID-19靶点确认

将核心中药的潜在活性成分导入TCMSP数据库中,获得成分对应的靶点,将潜在靶点进一步映射到Uniprot(<http://www.uniprot.org/>)数据库,并转换为官方名称(gene symbol)。检索OMIM和GeneCard数据库有关COVID-19的相关靶点,将成分靶点和疾病靶点输入Venny 2.1.0(<https://bioinfopg.cnib.csic.es/tools/venny/>)在线服务器中,获得两者的交集部分,即为核心中药干预COVID-19发生、发展的潜在靶点,并将这些靶点导

入 String 数据库中获得蛋白质相互作用(PPI)网络。

1.5 GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析

将预测核心中药对有效成分的潜在靶点提交到生物信息学数据库 DAVID 6.8 进行 GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析,以预测核心中药的分子机制。

1.6 成分-靶点-通路网络构建

将核心中药的活性成分、潜在靶点及相关通路信息导入 Cytoscape 3.7.1 软件,以构建成分-靶点-通路网络,阐释其多效协同的作用特点。

2 结果

2.1 基于 ADME 和 Lipinski 规则的评估

13 143 个化合物中,2 454 个成分满足要求,即 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 。在符合 ADME 性质的基础上,1 511 个成分同时符合 ADME 和 Lipinski 规则的要求,共涉及 372 个中药,提示上述成分具有良好的药动学性质、OB 及 OL。

2.2 分子对接

2.2.1 与 IL-6R 对接结合能在不同区间的分析

初筛结果显示,分子对接数据显示结合能在 $(-25.10, 0]$ kJ/mol 区间的成分有 624 个,在 $(-29.29, -25.10]$ kJ/mol 区间的成分有 800 个,在 $(-33.47, -29.29]$ kJ/mol 区间的成分有 86 个,结合能小于 -33.47 kJ/mol 的成分仅 1 个,提示存在 87 个成分具有较强且稳定的结合结果,说明上述成分具有良好的开发潜能。其中,芝麻素(sesamin)与 IL-6R 的结合最好,提示该化合物具有良好的开发潜能,由于数据较多,因此本研究仅展示结合能小于 -29.29 kJ/mol 的结果。详见表 1。

2.2.2 成分和中药分布情况

由表 1 可知,结合能小于 -25.10 kJ/mol 的成分共 887 个,通过 TCMSP 进行成分的中药归属分析见图 1。6 味清热药板蓝根、白屈菜、苦地丁、苦参、赤芍、关黄柏,4 味活血化瘀药丹参、延胡索、没药、桃仁,3 味止咳平喘药百部、桑白皮、洋金花,3 味补益药甘草、枸杞子、灵芝,2 味理气温理药枳实、吴茱萸,化瘀止血药降香,1 味祛风湿散寒药雷公藤。其中,甘草含有 IL-6R 天然小分

子抑制剂成分最多,主要包括多糖类、黄酮类、三萜类等,提示甘草在干预 COVID-19 中发挥着重要作用。

结合能小于 -25.10 kJ/mol 的成分中,能富集 10 种中药以上的成分有 16 个(见表 2)。其中,木犀草素富集的中药种类最多,为 90 种。说明木犀草素来源广泛,且其与 IL-6R 也有较好的结合。16 个化合物中,多数为黄酮类化合物,说明黄酮类化合物在天然药物中广泛存在,提示该类成分在抑制 IL-6R 活性上具有良好的开发潜能。

由表 1 可知,与 IL-6R 的结合能小于 -29.29 kJ/mol 的 87 个成分中,能富集 4 种中药以上的成分有 9 个(见图 2)。其中,富集药材数量排名前 3 的成分分别为 MOL001458-黄连碱(9 味中药)、MOL001558-芝麻脂素(7 味中药)、MOL007180-维生素 E(8 味中药),其中芝麻脂素与 IL-6R 的结合最强,来源广泛。

包含 4 个及以上活性成分的中药有 7 味(见图 3),包含成分数量排名前 3 的中药分别为甘草(10 个成分)、苦地丁(8 个成分)、白屈菜(6 个成分)。可见,甘草不仅是与 IL-6R 结合能小于 -25.10 kJ/mol 化合物最多的中药,还是与 IL-6R 结合能小于 -29.29 kJ/mol 化合物最多的中药,提示甘草在抑制 IL-6R 中具有潜在的活性。

2.3 甘草干预 COVID-19 的网络药理学机制分析

潜在靶点:甘草为治疗 COVID-19 的核心中药,共获得 82 个甘草对应的靶点,259 个 COVID-19 相关靶点,将两者的靶点进行比对,获得 16 个甘草干预 COVID-19 的潜在靶点。结果见图 4。

KEGG 通路富集分析:甘草干预 COVID-19 的通路可视化结果见图 5。图中显示了排名前 20 的信号通路,16 个潜在靶点参与的信号通路主要与免疫与炎症、癌症、慢性疾病等密切相关,包括 HIF-1 signaling pathway、VEGF signaling pathway、血小板活化(Platelet activation)、Pathways in cancer、TNF signaling pathway 等 79 条, $P < 0.01$ 的通路有 63 条。其中, HIF-1, VEGF, Platelet activation, TNF, PI3K-Akt, IL-17, TLR 信号通路与 COVID-19 的发生、发展密切相关,提示甘草可能通过

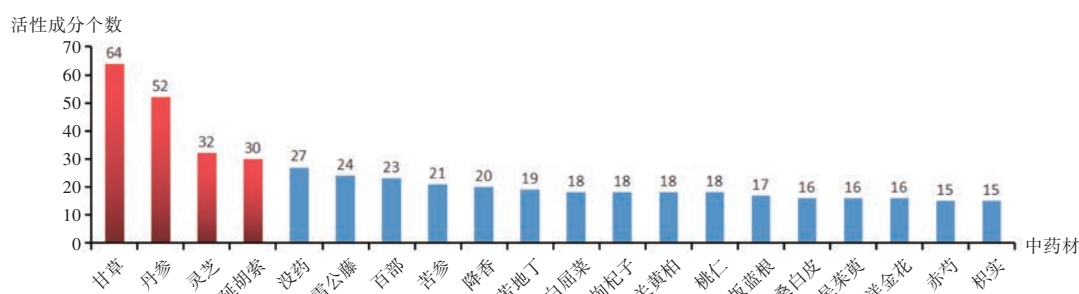


图 1 活性成分整体富集 15 个及以上的中药

Fig. 1 Traditional Chinese medicine with overall enrichment of 15 or more active components

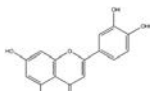
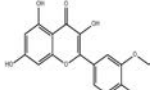
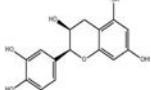
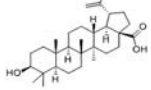
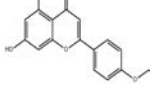
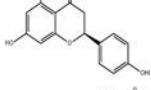
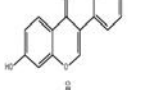
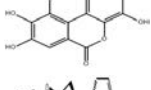
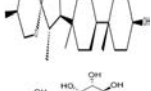
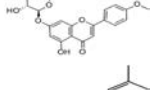
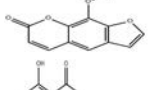
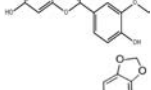
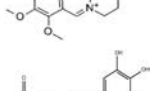
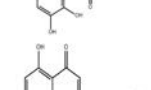
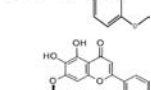
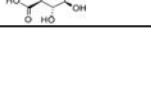
表 1 与 IL-6R 对接结合能小于 -29.29 kJ/mol 的成分

Tab. 1 Components with docking binding energy less than -29.29 kJ/mol with IL-6R

成分编码	英/中文名称	结合能(kJ/mol)	成分编码	英/中文名称	结合能(kJ/mol)
MOL001558	sesamin/芝麻素	-35.98	MOL002005	hinokinin/扁柏脂素	-29.71
MOL004908	glabridin/光甘草定	-33.05	MOL002544	1,7-diphenyl-5-hydroxy-3-heptanone/ 1,7-二苯基-5-羟基-3-庚酮	-29.71
MOL007180	vitamin E/维生素 E	-33.05	MOL004907	glyzaglabrin/亚甲二氧基异黄酮	-29.71
MOL008641	norsanguinarine/去甲血根碱	-32.21	MOL008209	deoxycampothecin/去氧喜树碱	-29.71
MOL006401	melanone/苦木酮碱	-31.80	MOL009254	galbacin/古蓬香素	-29.71
MOL008647	moupinamide/N-反式阿魏酰酰胺	-31.80	MOL009834	sesamol/芝麻林素	-29.71
MOL013287	physovenine/毒扁豆次碱	-31.80	MOL010478	shionoside C/紫菀苷 C	-29.71
MOL000456	phaseolin/菜豆碱	-31.38	MOL010580	diglycol dibenzoate/二苯甲酸二甘醇酯	-29.71
MOL001476	(S)-stylopine/金罂粟碱	-31.38	MOL012388	aristolactam-N-β-glucopyranoside/马兜铃内酰胺	-29.71
MOL003847	inophyllum E/香豆素	-31.38	MOL012992	mauritie D	-29.71
MOL005018	xambioona	-31.38	MOL000507	psi-baptigenin	-29.29
MOL006277	shinjudilactone/臭椿双内酯	-31.38	MOL000832	alisol,b,23-acetate/泽泻醇 b-23-醋酸酯	-29.29
MOL008397	daturilin	-31.38	MOL001458	coptisine/黄连碱	-29.29
MOL009387	didehydrotuberostemonine/二去氢对叶百部碱	-31.38	MOL001463	dihydrosanguinarine/二氢血根碱	-29.29
MOL010660	melianol/苦辣子醇	-31.38	MOL001614	(E,E,E)-11-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-(2-methylp- ropyl)-i-1-5-2,4,10-undecatrienenamide	-29.29
MOL000238	1,7-diphenyl-5-hydroxy-6-hepten-3-one/ 1,7-双苯-5-羟基-6-庚烯-3-酮	-30.96	MOL003187	triptolide/雷公藤甲素	-29.29
MOL000729	oxysanguinarine/氧化血根碱	-30.96	MOL003433	brucine-N-oxide/马钱子碱	-29.29
MOL002659	kihadanin A	-30.96	MOL003608	O-acetylcolombianetin/O-乙酰二氢欧山芹酯	-29.29
MOL002996	odorcarpin/左旋降香紫檀素	-30.96	MOL003851	isoramanone/异热马酮	-29.29
MOL006411	obacunone/黄柏酮	-30.96	MOL004225	pseudocoptisine/异黄连碱	-29.29
MOL007374	5-[(5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl)methyl-ene]barbituric acid	-30.96	MOL004440	peimisine/贝母辛碱	-29.29
MOL011124	wikstrocin/南茛菪素	-30.96	MOL004989	6-prenylated eriodictyol	-29.29
MOL012719	moracin O/桑辛素 O	-30.96	MOL005003	licoagrocarnin/番茄果苷	-29.29
MOL013197	piperenol B/胡椒醇 B	-30.96	MOL005102	oxymitidine/氧化两面针碱	-29.29
MOL002392	deltoin/石防风素	-30.54	MOL005251	gibberellin/赤霉素	-29.29
MOL004025	N-(2-methylaminobenzoyl)tryptamine/N-去甲吴茱萸酰胺	-30.54	MOL005405	cusparine/西花椒碱	-29.29
MOL005105	oxychelethrine/氧化白屈菜红碱	-30.54	MOL005578	7-hydroxy-3-(2-ketochromen-7-yl)-6-methoxy-coumarin	-29.29
MOL006596	glyceollin/大豆素	-30.54	MOL005686	periplocoside O/杠柳毒苷	-29.29
MOL008638	13-epicorynoline/右旋 13-表紫堇醇灵碱	-30.54	MOL006279	shinjudilactone B/臭椿内酯 Bb	-29.29
MOL010193	ussuriendine/全草含平贝七环碱	-30.54	MOL006393	epiberberine/表小檗碱	-29.29
MOL000332	N-coumaroyltyramine/N-反式对香豆酰基酰胺	-30.12	MOL007094	danshenspiroketallactone/丹参螺缩酮内酯	-29.29
MOL001462	dihydrochelirubine/氢白屈菜红碱	-30.12	MOL007345	Boc-D-Trp-OH/Boc-D-色氨酸	-29.29
MOL001474	sanguinarine/血根碱	-30.12	MOL008646	6-acetylhydrosanguinarine/6-丙酮基二氢血根碱	-29.29
MOL002224	aurantiamide acetate/金色酰胺醇酯	-30.12	MOL008648	acetylorynoline/乙酰紫堇灵	-29.29
MOL002862	piperidine/胡椒酰胺	-30.12	MOL008792	11-hydroxynoracronycine/11-羟基去甲丙烯酰胺胆碱	-29.29
MOL004815	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	-30.12	MOL009363	tuberostemonine C/对叶百部碱	-29.29
MOL004884	licoisoflavone B/半甘草异黄酮 B	-30.12	MOL009377	bisdehydronotuberostemonine/二去氢新对叶百部碱	-29.29
MOL007105	epidanshenspiroketallactone/表丹参螺缩酮内酯	-30.12	MOL009562	ohioensin-A	-29.29
MOL012588	7-[(1S,4a S,6 R,8a R)-6-hydroxy-5,5,8a-trimethyl-2-methylene-decalin-1-yl]methoxy coumarin	-30.12	MOL010643	sendanolactone/仙丹内酯	-29.29
MOL012893	(E)-(4-methylbenzylidene)-(4-phenyltri-azol-1-yl)amine	-30.12	MOL011540	-29.29	-29.29
MOL000780	adlumidine/紫罂粟次碱	-29.71	MOL012136	5-[(2S,3 S,4 R,5 R)-5-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,4-dimethyl-2-tetrahydrofuran-1,3-benzodioxole	-29.29
MOL001484	inermine	-29.71	MOL012760	sanggenone M/桑根酮 M	-29.29
MOL001910	11alpha,12alpha-epoxy-3beta-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12beta-olide	-29.71	MOL013098	[(9R)-8,8-dimethyl-2-oxo-9,10-dihydropyrano[6,5-h]chromen-9-yl](Z)-2-methylbut-2-enoate	-29.29

表 2 整体成分富集 10 种中药以上的成分

Tab. 2 Components with more than 10 traditional Chinese medicines enriched in overall components

成分	成分结构	结合能(kJ/mol)	中药材数量(种)	成分种类
木犀草素/luteolin		-28.03	90	黄酮类
异鼠李素/ isorhamnetin		-25.10	40	黄酮类
(+)-表儿茶素/ epicatechin		-26.36	26	多酚物质
白脂酸/mairin		-26.36	26	有机酸类
金合欢素/acacetin		-27.20	21	黄酮类
柚皮素/naringenin		-25.94	20	黄酮类
刺芒柄花素/ formononetin		-27.61	18	黄酮类
鞣花酸/ellagic acid		-25.52	16	有机酸类
薯蓣皂苷/diosgenin		-26.36	15	甾醇类
蒙花苷/linarin		-25.52	15	黄酮类
欧前胡素/ammidin		-25.52	13	香豆素类
金圣草(黄)素/ chryseriol		-28.03	13	黄酮类
小檗碱/berberine		-27.20	12	生物碱类
间双没食子酸/ digallate		-26.36	12	有机酸类
香叶木素/diosmetin		-25.52	12	黄酮类
黄芩苷/baicalin		-26.36	11	黄酮类

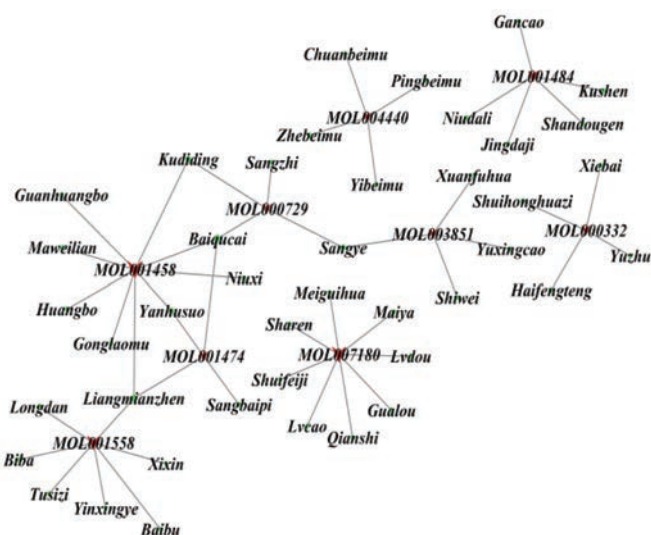


图 2 筛选关键成分(能富集 4 种以上的中药)的网络

Fig. 2 Network for screening key components (capable of enriching more than four kinds of traditional Chinese medicines)

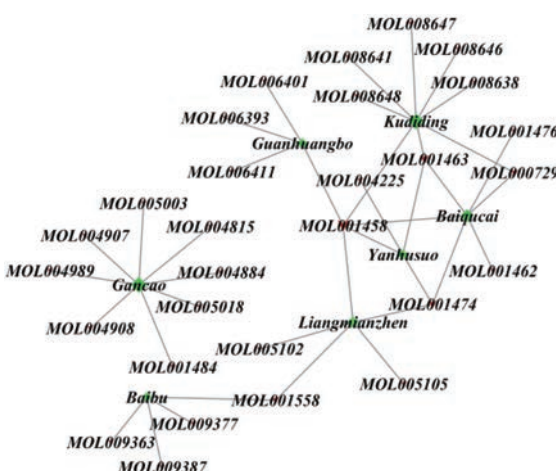


图 3 筛选核心中药(包含活性成分不少于 4 个)的网络

Fig. 3 Network for screening core traditional Chinese medicine (including no less than four active components)

上述通路发挥抗 COVID-19 的作用。甘草干预 COVID-19 的 GO 生物功能注释结果见图 6。结果显示,16 个靶点主要注释了 7 个方面的生物功能,包括胸腺发育(thymus development)、花生四烯酸代谢过程(arachidonic acid metabolic process)、肌肉收缩的负调节(negative regulation of muscle contraction)、超氧化物代谢过程(superoxide metabolic process)、脂多糖类介导的信号通路(lipopolysaccharide-mediated signaling pathway)、血管内皮细胞迁移的调节(regulation of blood vessel endothelial cell migration)、细胞氧化剂排毒(cellular oxidant detoxification),上述功能主要与免疫调节、炎症干预、氧化应激、抗凝与凝血系统调控等生物过程的发生、发展密切相关。

潜在“成分-靶点-通路”网络构建:为了阐释甘草干预 COVID-19 生物网络的复杂分子机制,本研究筛

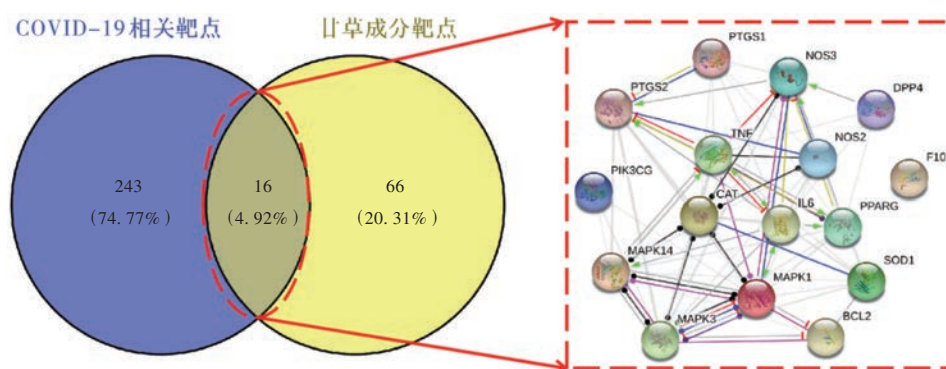


图 4 甘草治疗 COVID-19 的潜在靶点

Fig. 4 Potential targets of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma against of COVID-19

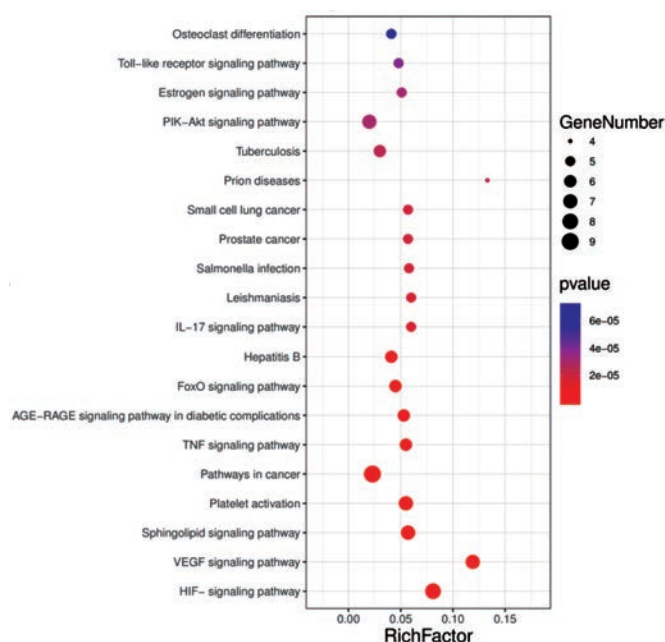


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

选通路中 P 值排名前 20 的通路,构建“成分-靶点-通路”网络。结果见图 7。该网络中共含有 98 个节点,其中有 62 个成分(红色)、16 个靶点(黄色)、20 条通路(绿色),上述节点共构成了 578 条关系,其中靶点与成分之间存在 400 条关系,靶点与靶点之间存在 65 条关系,靶点与通路之间存在 113 条关系,提示甘草的作用靶点不仅在一定程度上相互影响,还分布于不同的通路上,充分体现了中药治疗疾病是“多成分-多靶点-多途径”相互协调的共同结果。

3 讨论

COVID-19 属中医“湿毒疫”范畴,主要表现为发热、干咳、乏力、咽痛等。感染病毒后,机体在对抗病毒过程中产生大量氧自由基和炎症因子,破坏支气管及肺泡中的上皮-内皮屏障,造成肺泡-毛细血管氧传递功能障碍和氧扩散能力受损,致使重症 COVID-19 患者出现呼吸困难与低氧血症,甚至产生严重的凝血功能障碍

及形成血栓,易导致患者并发脓毒血症及发展为急性呼吸窘迫综合征,直至后期机体产生炎症风暴导致多器官衰竭乃至死亡。面对 COVID-19 发生与发展的复杂多变性,在中医辨证施治的理论指导下,中药的整体疗效具有得天独厚的优势。为促进天然分子的高效开发与利用,探讨中药抗 COVID-19 的药效物质基础及其作用机制意义重大。故本研究在多项研究的基础上,运用分子对接技术高通量的虚拟筛选,获得了符合 ADME-Lipinski 规则且与 IL-6R 结合较好的 IL-6R 天然小分子抑制剂 887 个,其中结合最强的是芝麻素。本研究中筛选获得的 IL-6R 天然小分子抑制剂多数为黄酮类成分,其中来源最广的为木犀草素;多数 IL-6R 天然小分子抑制剂集中在清热类药材中,其中含有最多潜在 IL-6R 天然小分子抑制剂的为甘草,可为 IL-6R 天然小分子抑制剂的开发提供候选化合物和理论依据。

芝麻素^[20]和木犀草素^[21]具有显著的抗炎药效,其主要作用机制是通过显著降低环氧合酶 2(COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)等活性,诱导产生炎症介质的限速酶的表达及 IL-6、TNF- α 等促炎因子的产生。芝麻素^[22]和木犀草素^[23]还有平衡氧化应激稳态的作用,其主要通过抑制活性氧(ROS)的产生和提高过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性,保护细胞免受氧化应激的损伤。此外,芝麻素^[24]和木犀草素^[25]还有显著的抗高血压、高血脂、高血糖(简称三高)作用及血管内皮保护功能,表明芝麻素和木犀草素具有潜在的保护心血管系统功能。近期研究表明,冠状动脉粥样硬化性心脏病、高血压、糖尿病患者是 COVID-19 的易感人群^[26],且三高疾病会加重 COVID-19 患者的病情。因此,面对并发症心血管疾病的 COVID-19 患者,对其进行抗病毒、抗炎、增强免疫治疗的同时,还应加强防范诱发或加重 COVID-19 患者病情的危险因素。

此外,本研究中从网络药理学的角度进一步探讨了甘草抗 COVID-19 可能参与的生物过程与信号通路。KEGG 通路富集和 GO 生物功能注释分析结果表明,甘

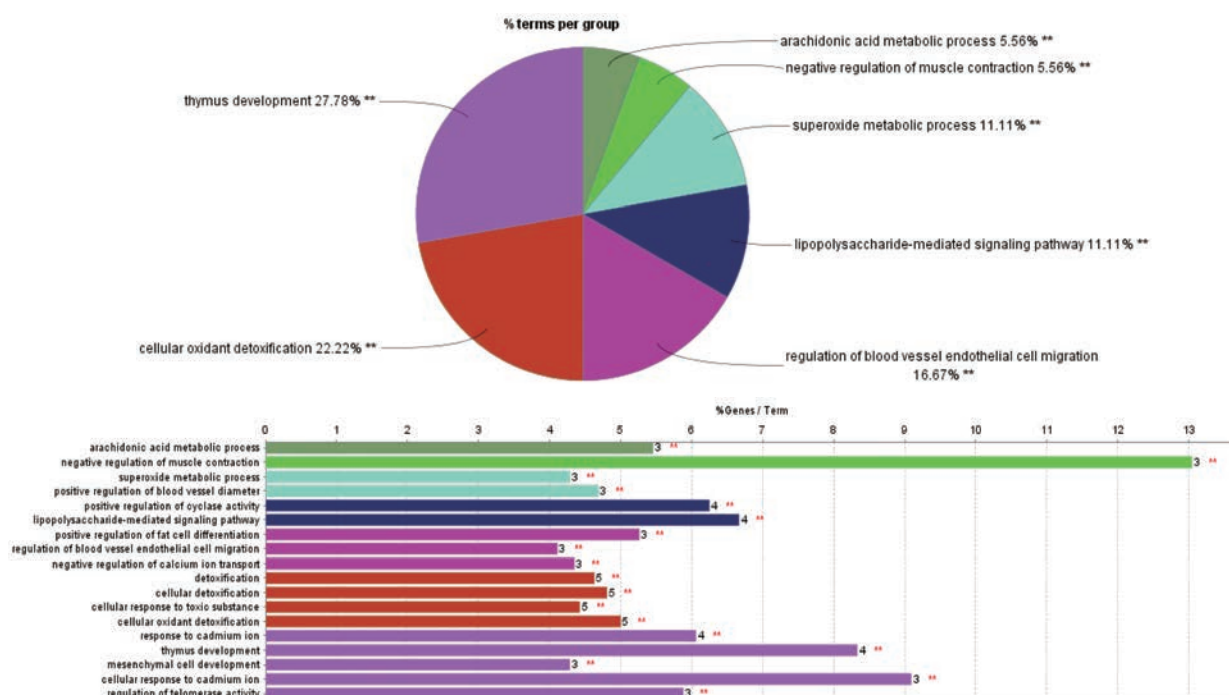


图 6 GO 生物功能注释

Fig. 6 GO biological function annotation

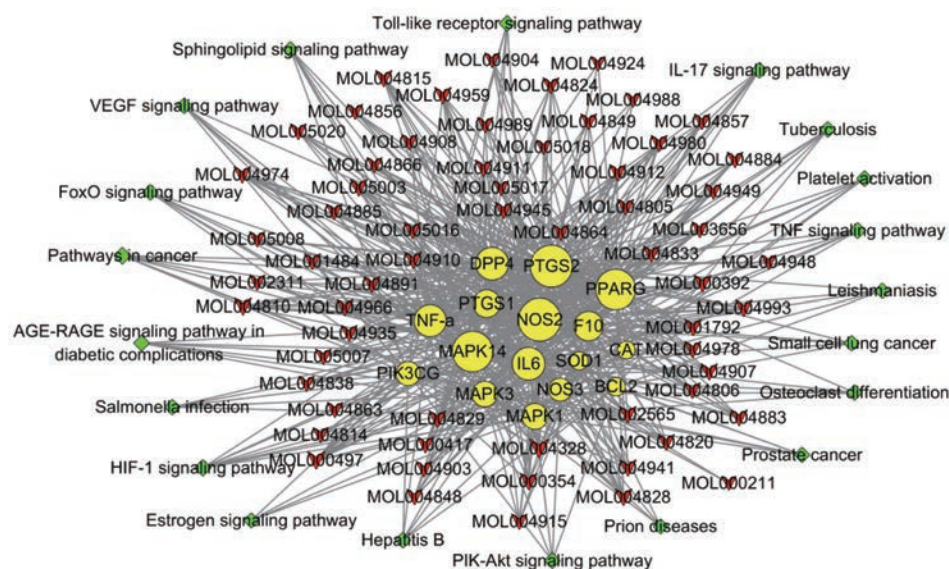


图 7 甘草抗 COVID-19 的潜在“成分 - 靶点 - 通路”网络

Fig. 7 Potential "component - target - pathway" network of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma against COVID-19

草参与治疗 COVID-19 的 16 个潜在作用靶点主要富集在 HIF-1, VEGF, Platelet activation, TNF, PI3K-Akt, IL-17, TLR 等与肺癌、肺纤维化、肺炎、气道炎症、肺栓塞等肺部疾病密切相关的信号通路中,上述通路主要涉及免疫调节、炎症干预、氧化应激、抗凝与凝血系统调控等生物功能,提示甘草通过多通路协同发挥治疗 COVID-19 的作用。

甘草具有润肺止咳、补气益肾、调和解毒、缓急止痛等功效,具有抗炎、抗病毒、抗氧化、调节免疫等多种药理学作用,国内外一直用甘草及其提取物治疗咳嗽、支

气管炎、肺炎等呼吸系统疾病,主要通过抑制氧化应激和细胞凋亡,改善免疫功能而抑制炎症细胞因子表达、减轻肺纤维化形成和急性肺损伤等,以保护肺上皮细胞,改善肺功能,保护宿主;其物质基础主要包括多糖类、黄酮类、三萜类等,尤其是甘草酸苷、甘草素、异甘草素、甘草酸二铵及甘草酸、甘草查尔酮 A、光甘草定等成分^[27]。有研究证实,甘草酸作为甘草中含量最高的有效成分,其化学结构与激素类似,具有类皮质激素作用,主要用于对抗病毒性炎症风暴,两者同为抗炎药,最大的区别在于甘草酸无免疫抑制作用^[28]。因此,甘草酸在抗炎

的安全剂量范围内既可抵抗炎症风暴,又不干扰机体对抗病毒的能力。复方甘草酸苷用于治疗非典型肺炎的临床效果确切,其主要成分甘草酸苷为甘草中的有效活性成分^[29],具有保护肝细胞膜、抗炎、抗病毒、调节免疫等药理学作用,鉴于 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 有很多相似之处^[30],因此,考虑甘草酸苷用于治疗 SARS-CoV-2 具有很大的借鉴意义。作为甘草主要活性成分之一的甘草酸二胺能明显抑制普通型 COVID-19 患者的炎症反应,提高免疫功能^[31],且临床疗效显著,安全性高。

甘草次酸具有抑制血小板聚集的作用,可能是通过抑制血小板活化因子生物合成的通路,除了通过抑制 COX-2 蛋白和 mRNA 表达外,还能抑制磷脂酶 A₂ 活性、血栓素 A₂ 合成、磷酸二酯酶升高,降低环磷酸腺苷水平等多个环节,实现抑制血小板聚集作用,阻断血栓形成,进而防治肺栓塞的发生、发展^[32]。异甘草素和甘草酸作为甘草的主要活性成分^[33],是一种凝血酶抑制剂,能延长血浆复钙、凝血酶和纤维蛋白原凝块时间,抑制凝血酶诱导血小板聚集,抑制血栓形成,上述过程主要受 VEGF 信号通路和 Platelet activation 通路调控。甘草及其有效成分具有降糖、调脂作用,可从源头上防治糖尿病及其并发症的发生和发展^[34]。糖尿病并发症信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)为调控糖尿病、糖尿病并发症的重要信号通路^[35],甘草酸及其苷元甘草次酸可通过 AGE-RAGE 信号通路防治糖尿病肾病和糖尿病血管病变^[36]。甘草单一成分的多靶点药效和机制研究提示上述成分对甘草抗 COVID-19 药效具有重要贡献。

甘草有效成分对心、脑、血管、肝、肾、肺等各种脏器具有保护作用^[37],有助于防治糖尿病引起的各种并发症,提示甘草有利于阻断 COVID-19 炎症风暴对患者多器官的损伤。因此,甘草可在减轻炎症对机体急性损伤的同时,面对危重患者的高凝状态还有防治肺栓塞的潜在药效,提示甘草不仅具有潜在的抗 COVID-19 炎症风暴作用,还能有效防治并发症的发生、发展,这可能与甘草配伍其他中药治疗 COVID-19 患者起到协同增效、调和诸药作用有关。目前,未见甘草及其主要活性成分抗 COVID-19 的潜在机制 HIF-1, PI3K-Akt 信号通路的相关报道,但可为甘草及其主要活性成分抗 COVID-19 的作用机制研究提供新的研究方向和思路,以及为抗 COVID-19 的新药开发提供候选化合物及甘草抗 COVID-19 的物质基础和作用机制的阐释提供一定理论依据。

我国自主研发的“三方三药”^[38]在此次抗疫中起到了非常重要的作用,“三方三药”中的“清肺排毒汤”“化湿败毒方”“宣肺败毒方”,以及连花清瘟颗粒/胶囊、血必

净注射液、金花清感颗粒 6 个中药组方均含有甘草。从清肺排毒汤中共鉴定出了 39 种化学成分^[39],且检测到其入血成分共 12 种,这些成分广泛分布于血清、心、肝、脾、肺、肾中,包括甘草的甘草酸、甘草苷等主要成分;连花清瘟中鉴定出 61 种化学成分,且 22 种以原型入血,包括甘草的主要成分芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸等^[40]。对全国抗 COVID-19 方剂的组方规律的分析结果表明,甘草的使用频次最高^[41]。本研究结果与以上研究不谋而合,可为抗 COVID-19 方剂配伍甘草的原因提供更多参考。

本研究中以分子对接技术高通量虚拟筛选获得了最具代表性的潜在抗 IL-6R 的天然小分子抑制剂如芝麻素和木犀草素等化合物,以及包含该类天然小分子抑制剂最多的中药甘草。芝麻素和木犀草素除了具有抗 IL-6R 的潜在活性外,还具有抗炎、抗氧化、降血压、调脂、降血糖等多种药理作用,具备应对 COVID-19 复杂发生、发展的潜在能力。作为“国老”的甘草,不仅其多种化学成分具有潜在的抗 IL-6R 活性,其多种主要活性成分还具有抗炎、抗氧化、抗血小板聚集、抗血栓、调脂、降血糖、增强免疫力等广泛的药理学作用,且对多种器官具有保护作用。甘草通过多种途径抵抗 COVID-19 对患者器官损伤的同时,还能防治重症患者并发症的发生、发展,充分体现了中药“多成分-多靶点”作用机制的复杂性及其药理学作用的多效性和广泛性,说明了抗 COVID-19 方剂中配伍甘草入药的原因。本研究中仅采用虚拟对接技术分析,具有一定局限性,还需进行试验验证。

参考文献

- [1] 谢保平,谢景春,赵 玥,等. 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)药物防治研究进展[J]. 赣南医学院学报,2020,40(2):119-123.
- [2] 宋 果,成梦群,魏贤文. 新型冠状病毒(2019-nCoV)治疗药物体内外研究及药物研发进展[J]. 病毒学报,2020,36(2):300-305.
- [3] HUANG QW, WU XM, ZHENG XY, et al. Targeting inflammation and cytokine storm in COVID-19[J]. Pharmacological Research, 2020, 159:105051.
- [4] XU Z, SHI L, WANG YJ, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome[J]. The Lancet Respiratory Medicine, 2020, 8(4):420-422.
- [5] KRAAKMAN MJ, KAMMOUN HL, ALLEN TL, et al. Blocking IL-6 trans-Signaling Prevents High-Fat Diet-Induced Adipose Tissue Macrophage Recruitment but Does Not Improve Insulin Resistance[J]. Cell Metabolism, 2016, 23(3):563.
- [6] HEO TH, WAHLER J, SUH N. Potential therapeutic implications of IL-6/IL-6R/gp130-targeting agents in breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(13):15460-15473.
- [7] YANG QY, YANG KP, LI ZZ. MiR-22 restrains proliferation of

- rheumatoid arthritis by targeting IL-6R and may be concerned with the suppression of NF- κ B pathway[J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2020, 36(1): 20-26.
- [8] 范超凡. HIF-1 α 促进 B 细胞分泌 IL-6 诱导 Th 细胞分化参与 RA 发病[D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- [9] 王 硕, 李时荣. VEGF/IL-6 在类风湿关节炎发病中的作用研究进展[J]. 山东医药, 2014, 54(7): 94-96.
- [10] 国家卫生健康委员会, 国家中医药管理局. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2020, 13(5): 321-328.
- [11] 何黎黎, 龚普阳, 封 玥, 等. 中药在抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)引起的细胞因子风暴中的应用分析[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1375-1385.
- [12] 孔鹏云, 孙 抗, 杨力强. 网络药理学: 中医药现代化研究的新契机[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(9): 206-207.
- [13] 张彦琼, 李 梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 883-892.
- [14] HIRAYAMA N. Docking Simulations between Drugs and HLA Molecules Associated with Idiosyncratic Drug Toxicity[J]. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2017, 32(1): 31-39.
- [15] LI JS, ZHAO P, LI Y, et al. Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufei Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15290.
- [16] LIPINSKI CA. Chris Lipinski discusses life and chemistry after the Rule of Five[J]. Drug Discovery Today, 2003, 8(1): 12-16.
- [17] VARGHESE JN, MORITZ RL, LOU MZ, et al. Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor α -chain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(25): 15959-15964.
- [18] BOULANGER MJ, CHOW DC, BREVNOVA EE, et al. Hexameric Structure and Assembly of the Interleukin-6/IL-6 α -Receptor/gp130 Complex[J]. Science, 2003, 300(5628): 2101-2104.
- [19] 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.
- [20] KABE Y, TAKEMOTO D, KANAI A, et al. Annexin A1 accounts for an anti-inflammatory binding target of sesamin metabolites[J]. NPJ Sci Food, 2020, 4: 4.
- [21] 刘 圆, 李园园, 冯婷婷, 等. 木犀草素镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2010, 31(15): 2368-2370.
- [22] RUANKHAM W, SUWANJANG W, WONGCHITRAT P, et al. Sesamin and sesamol attenuate H₂O₂-induced oxidative stress on human neuronal cells via the SIRT1-SIRT3-FOXO_{3a} signaling pathway[J]. Nutritional Neuroscience, 2021, 24(2): 90-101.
- [23] ROOBAN BN, SASIKALA V, DEVI VG, et al. Prevention of selenite induced oxidative stress and cataractogenesis by luteolin isolated from Vitex negundo[J]. Chemico-Biological Interactions, 2012, 196(1/2): 30-38.
- [24] LIANG YT, CHEN JN, JIAO R, et al. Cholesterol-Lowering Activity of Sesamin is Associated with Down-Regulation on Genes of Sterol Transporters Involved in Cholesterol Absorption[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(11): 2963-2969.
- [25] 段宗强. 木犀草素对高脂血症大鼠血脂、血糖及氧化应激指标的影响[J]. 中医学报, 2014, 29(1): 55-57.
- [26] LI XC, XU SY, YU MQ, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2020, 146(1): 110-118.
- [27] 王 兵, 王亚新, 赵红燕, 等. 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(3): 215-218.
- [28] 张明发, 沈雅琴. 甘草酸及其苷元甘草次酸的糖皮质激素样作用[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 33-35.
- [29] 陆海英, 霍 娜, 王广发, 等. 复方甘草酸苷治疗传染性非典型肺炎(SARS)的临床研究[J]. 中国药房, 2003, 14(10): 610-612.
- [30] ZHOU P, YANG XL, WANG XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature, 2020, 579(7798): 270-273.
- [31] 周外民, 赵富明, 李榜龙, 等. 甘草酸二胺在普通型新型冠状病毒肺炎患者治疗中的临床价值[J]. 病毒学报, 2020, 36(2): 160-164.
- [32] 白 炜, 杨宏昕. 甘草酸对兔鼠血小板聚集及主动脉 PGI₂ 样物质生成的影响[J]. 内蒙古中医药, 2000, 19(3): 41.
- [33] MENDES-SILVA W, ASSAFIM M, RUTA B, et al. Antithrombotic effect of Glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor[J]. Thrombosis Research, 2003, 112(1/2): 93-98.
- [34] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其有效成分抗糖尿病并发症药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2015, 12(3): 324-327.
- [35] TONG YN, CHUAN JL, BAI L, et al. The protective effect of shikonin on renal tubular epithelial cell injury induced by high glucose[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98: 701-708.
- [36] 侯绍章, 郑芳芳, 李 媛, 等. 甘草酸对 AGEs 培养肾小球系膜细胞及 ECM 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(5): 642-645.
- [37] 张耀峰. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J]. 中医临床研究, 2019, 11(9): 141-142.
- [38] 李 芮. 国新办举行中医药防治新冠肺炎重要作用及有效药物发布会[J]. 中医药管理杂志, 2020, 28(6): 5.
- [39] 刘 伟, 葛广波, 王永丽, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术研究清肺排毒汤化学成分及小鼠组织分布[J]. 中草药, 2020, 51(8): 2035-2045.
- [40] JIA WN, WANG CH, PAN YF, et al. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medical preparation Lianhua-Qingwen capsule by UPLC-DAD-QTOF-MS[J]. The Scientific World Journal, 2015, 2015: 1-19.
- [41] 毛 果, 谢 乐, 王钦玉, 等. 基于中医传承辅助平台探讨新型冠状病毒肺炎中医诊疗方案的用药规律[J]. 中医药通报, 2020, 19(3): 1-5.

(收稿日期: 2020-11-18; 修回日期: 2021-03-28)