

【实验研究】

基于网络药理学和分子对接的金银花抗新型冠状病毒肺炎活性成分及机制研究

刘洪涛¹, 陈梦涵¹, 孙启慧¹, 王立清¹, 王峥涛², 杨 勇^{1, 3, 4*}, 容 蓉^{1, 4, 5*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 上海中医药大学 上海市复方中药重点实验室, 上海 200032

3. 山东省中医药抗病毒工程研究中心, 山东 济南 250355

4. 山东省抗病毒中药协同创新中心, 山东 济南 250355

5. 山东中医药大学 中医药经典理论教育部重点实验室, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 将金银花化学成分与网络药理学研究结合, 探讨金银花抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在作用机制。**方法** 采用四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术(UPLC-Q-Exactive/MS)对金银花化学成分进行定性分析, 根据色谱峰保留时间、精确相对分子质量、特征碎片离子, 结合相关文献数据, 鉴定金银花的化学成分; 通过SWISSTargetPrediction数据库获得成分靶点, 通过GeneCards和OMIM数据库获得COVID-19疾病靶点, 利用Venny2.1.0获得金银花和COVID-19共同的药效靶点, 利用Cytoscape 3.7.2软件构建“成分-靶点”网络关系图; 以STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络关系图并对靶点进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析; 利用分子对接技术验证核心靶点与相对应的成分的结合能力; 利用体外抗病毒检测验证金银花中活性成分绿原酸抗COVID-19的潜在作用机制。**结果** 共鉴定出金银花化学成分77个。咖啡酸、腺苷、5,3'-二甲氧基木犀草素、芹菜素、阿魏酸等5个成分可能是金银花抗COVID-19的活性成分, 其中表皮生长因子受体(EGFR)、白细胞介素-2(IL-2)为关键靶点, 涉及低氧诱导因子-1信号通路(HIF-1 signaling pathway)、磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶B信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)等。进一步分子对接结果表明金银花的5个关键活性成分与疾病的2个核心靶点均具有良好的结合活性, 结合能均 $<-20.9\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。同时金银花中主要有效成分绿原酸对3CLpro具有较好的体外抑制活性[半数抑制浓度(IC_{50})为 $(106.40\pm 0.71)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]。**结论** 金银花可能通过EGFR、IL2和3CLpro等多靶点发挥抗COVID-19作用, 可进一步探讨金银花抗COVID-19的作用机制。

关键词: 金银花; 新型冠状病毒肺炎; 网络药理学; 分子对接; 主蛋白酶; 绿原酸; 咖啡酸; 芹菜素**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)11-2459-16**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.002Anti-COVID-19 active ingredients and mechanism of *Lonicerae Japonicae Flos* based on network pharmacology and molecular dockingLIUHongtao¹, CHENMenghan¹, SUNQihui¹, WANG Liqing¹, WANG Zhengtao², YANG Yong^{1, 3, 4}, RONG Rong^{1, 4, 5}

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Shanghai Key Laboratory of Compound Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

3. Shandong Anti-Virus Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

4. Shandong Collaborative Innovation Center for Antiviral Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

5. Key Laboratory of Classical Theory of Chinese Medicine, Ministry of Education, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

收稿日期: 2024-04-13**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(82274397);“新高校20条”资助项目(自主培养创新团队)(2021GXRC028);国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(ZYYZDXK-2023119);山东省自然科学基金项目(中医药联合基金)(ZR2021LZY012);上海市复方中药重点实验室(上海中医药大学)开放课题基金资助(21DZ2270500);2023年度济南市市校融合发展战略工程项目(JN-SX2023054);山东省技术创新引导计划(YDZX2023044)**第一作者:** 刘洪涛,男,硕士研究生,研究方向为中药化学。E-mail:liuhongtao1169@163.com***共同通信作者:** 杨 勇,男,博士,教授,研究方向为经典名方抗病毒的药效及机制。E-mail:yy7204@163.com

容 蓉,女,博士,教授,研究方向为中药及复方活性成分与质量控制。E-mail:rosierong@163.com

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of *Lonicerae Japonicae Flos* against COVID-19 by combining the chemical composition of *Lonicerae Japonicae Flos* with network pharmacology study. **Methods** The chemical constituents of *Lonicerae Japonicae Flos* were qualitatively analyzed by UPLC-Q-Exactive/MS. The chemical constituents of *Lonicerae Japonicae Flos* were identified according to the peak retention time, exact molecular mass, characteristic fragment ions, and related literature data. The targets of constituents were obtained by SWISS Target Prediction database, the disease targets of COVID-19 were obtained by GeneCard and OMIM database, the common pharmacodynamic targets of *Lonicerae Japonicae Flos* and COVID-19 were obtained by Venny 2.1.0, and the "constituent-target" network was constructed by Cytoscape 3.7.2 software. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING database, and the GO analysis and KEGG analysis were performed on the targets. The molecular docking technology was used to verify the binding ability of core targets and corresponding constituents. The potential mechanism of chlorogenic acid in *Lonicerae Japonicae Flos* against COVID-19 was verified by *in vitro* antiviral test. **Results** A total of 77 chemical constituents were identified from *Lonicerae Japonicae Flos in vitro*. Caffeic acid, adenosine, chrysoeriol 5-methyl ether, apigenin and ferulic acid, may be the active components of *Lonicerae Japonicae Flos* against COVID-19. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and interleukin-2 (IL2) were the key targets, involving hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway, phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B (PI3K-AKT) signaling pathway. Further molecular docking results showed that the five key active components of *Lonicerae Japonicae Flos* and the two core targets of the disease had good binding activity, and the binding energy values were less than $-20.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. At the same time, chlorogenic acid, the main effective component of *Lonicerae Japonicae Flos*, had good *in vitro* inhibitory activity against 3CLpro [IC_{50} was $(106.40 \pm 0.71) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]. **Conclusions** *Lonicerae Japonicae Flos* may inhibit COVID-19 through multiple targets such as EGFR, IL2 and 3CLpro, which can provide a valuable basis for further research on the mechanism of *Lonicerae Japonicae Flos* against COVID-19. **Key words:** *Lonicerae Japonicae Flos*; COVID-19; network pharmacology; molecular docking; 3CLpro; chlorogenic acid; caffeic acid; apigenin

严重呼吸综合征冠状病毒-2(SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)导致了严重的全球公共卫生危机^[1]。对于SARS-CoV-2的防治,抗SARS-CoV-2病毒的靶点目前主要分为2大类,一类与病毒入侵、识别相关,包括病毒刺突蛋白(S-RBD)、宿主细胞表面的血管紧张素转化酶2(ACE2)受体;另一类与病毒复制、转录相关,包括主蛋白酶(3CLpro)及木瓜样蛋白酶(PLpro)等。其中3CLpro引起了广泛的关注,是抗COVID-19药物研发的热门靶点,并已有3CLpro抑制剂获得临床批件,进入临床研究^[2]。3CLpro是抑制病毒复制的重要靶点,3CLpro蛋白水解切割pp1a和pp1ab多蛋白形成功能蛋白,是病毒复制过程中的关键步骤。若阻断3CLpro蛋白水解切割过程,RdRp等病毒复制必需酶就无法发挥作用,病毒复制过程受阻^[3-5]。

在SARS-CoV-2的防治过程中,中药发挥了良好的治疗效果^[6-7]。现代药理研究表明,具有清热解毒作用中药对SARS-CoV-2病毒常有一定的抑制作用^[8]。清热解毒类中药大多性味苦寒,主要归于肺、心、胃经。对于COVID-19引起的发热、咽痛、腹泻等临床症状具有很好的治疗作用^[9]。金银花是具有代表性的清热解毒类中药,为忍冬科忍冬属植物忍冬*Lonicera japonica* Thunb.的干燥花蕾或带初开的花,其性味甘、寒,归肺、心、胃经,具有清热解毒、疏

散风热的功效,主要用于痈肿疮疖、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热^[10-11]。自古以来历代医家多用金银花防治疫毒。现代药理学研究表明,金银花对SARS-CoV-2具有一定程度的抑制作用^[12-14],是COVID-19防治推荐用药连花清瘟胶囊、银翘解毒丸、抗感颗粒等重要的组方药材。但是金银花抗SARS-CoV-2的药效物质基础及作用机制尚不明确^[15-17]。

因此,本研究利用液质联用技术鉴定金银花中的主要成分,与网络药理学分析相结合,预测金银花间接抗SARS-CoV-2的作用靶点与通路。同时纯化病毒复制转录过程中重要蛋白3CLpro,测定金银花中重要成分对3CLpro的直接抑制作用。本研究从间接抑制SARS-CoV-2病毒作用与直接抑制病毒3CLpro作用2方面出发,阐明金银花抑制SARS-CoV-2的药效物质基础与作用机制。

1 材料

1.1 试剂

氨苄青霉素、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(TRIS)、十二烷基磺酸钠(SDS)(批号:SLBQ5295V、SLBC2807V、SLCD7674、B8431, Sigma-Aldrich公司);胰蛋白胨、酵母提取物(批号:123456、70232, BD Biosciences公司);琼脂粉(批号:LP0026, Oxoid公司);蛋白Marker、异丙基- β -D-硫代半乳糖

昔(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG, 批号: 26616、1671206, ThermoFisher Scientific 公司); EDTA(批号: 772611, 北京索莱宝科技有限公司); 3CLpro 荧光底物 Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans(批号: ZQ20201015, 南京肽业生物科技有限公司); 依布硒啉(Ebselen, 批号: E12119, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 12% SDS-PAGE 凝胶超快速配制试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 $\times$)(批号: P1200、P0012, 上海碧云天生物技术有限公司); β -巯基乙醇(批号: M6250, AMRESCO 公司); 考马斯亮蓝染色液试剂盒[批号: CBB250, 赛文创新(北京)生物科技有限公司]; 绿原酸、芦丁(批号: YE20181005、R2808, 质量分数均 $\geq$ 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 咖啡酸、獐芽菜苦苷(批号: C8949、SM3428, 质量分数均 $\geq$ 98%, 上海麦克林生物科技有限公司); 木犀草苷(批号: MU20190115, 质量分数 $\geq$ 98%, 成都德思特生物技术有限公司); 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 药材

金银花(批号: 220301, 山东百味堂中药饮片有限公司), 由山东中医药大学药学系徐凌川教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或初开的花, 药材标本保存于山东中医药大学天然药物实验室。

1.3 仪器

AKTA Pure 纯化仪、HisTrap HP 亲和色谱柱(Cytiva 公司); 超声波细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); Q-ExactiveTM 混合四极轨道 TM 质谱仪、超微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific 公司); 数显恒温振荡器(常州上特仪器制造公司); 蛋白质电泳仪(Bio-Rad 公司); 胶片观察灯(北京六一生物科技有限公司); Neo2 型多功能酶标仪(BioTek 公司)。

2 方法

2.1 溶液配制

LB 液体培养基(1 L): 称取酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 倒入烧杯中, 超纯水溶解, 磁力搅拌至澄清。非变性裂解液, 即 buffer A(1 L): 50 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ NaH₂PO₄ $\cdot$ 2H₂O 7.8 g, 300 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ NaCl 17.532 g, Mili-Q 配制, 用氢氧化钠调 pH 值至 8.0, 室温保存。考马斯亮蓝染色液(500 mL): Coomassie®brilliant blue R-250(0.25%) 1.25 g, 甲醇 225 mL, 冰醋酸 50 mL, 双蒸水 225 mL。存于棕色瓶子中, 室温保存。考马斯亮蓝脱色液(1 L): 10%

冰醋酸 100 mL, 无水乙醇 50 mL, 双蒸水 850 mL, 室温保存。5 $\times$ TRIS-Glycine 电泳缓冲液(1 L): Tris 15.1 g, 甘氨酸 94 g, SDS(0.5%) 5 g, 双蒸水配制, 室温保存。

50 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ Tris-HCl(1 L): Tris 6.06 g, Mili-Q 配制, 浓盐酸调至 pH 值 7.3, 室温保存。100 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ EDTA(500 mL): EDTA 14.62 g, Mili-Q 配制, 氢氧化钠调至 pH 值 8.0, 室温保存。2% 碳酸氢钠: NaHCO₃ 4 g, 100 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ EDTA 2 mL, Mili-Q 配制。Lysis buffer(1 L): 20 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ NaH₂PO₄ $\cdot$ 2H₂O 3.120 2 g、0.5 mol $\cdot$ L $^{-1}$ NaCl 29.22 g, 0.45 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 或 0.22 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 滤膜滤过, 低频超声 15 min 除气泡, pH 值 7.4 室温保存。Elution buffer(1 L): 20 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ NaH₂PO₄ $\cdot$ 2H₂O 3.120 2 g, 0.5 mol $\cdot$ L $^{-1}$ NaCl 29.22 g, 500 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 咪唑, 34.05 g, pH 值 7.4, 0.45 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 或 0.22 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 滤膜滤过, 低频超声 15 min 除气泡, 室温保存。Binding buffer(1 L): 20 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ NaH₂PO₄ $\cdot$ 2H₂O 3.120 2 g, 0.5 mol $\cdot$ L $^{-1}$ NaCl 29.22 g, 20 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 咪唑 1.362 g, pH 值 7.4, 0.45 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 或 0.22 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 滤膜过滤, 低频超声 15 min 除气泡, 室温保存。20% 乙醇(1 L): 无水乙醇 200 mL、Mili-Q 800 mL, 0.45 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 或 0.22 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 滤膜滤过, 低频超声 15 min 除气泡, 室温保存。

2.2 金银花粗提物中化学成分质谱分析

液质分析在 UHPLC Ultimate 3000 上进行, 该仪器与 Q-ExactiveTM 混合四极轨道 TM 质谱仪连接, 在正、负电喷雾电离模式下进行数据采集。参数: 离子喷雾电压, -3 kV; 毛细管温度, 350 $^{\circ}$ C; 辅助气体加热器温度, 350 $^{\circ}$ C; 扫描方式: full scan MS 和 MS/MS; 扫描范围: m/z 80~1 000; 碰撞能量分别为 15、25、35 eV。UPLC-Q-Exactive/MS 的仪器控制、数据采集和分析使用 Xcalibur 3.0 软件进行。

色谱条件如下, Agilent Extend-C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5 μ m); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.5 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 进样量 10 μ L。流动相: 0.05% 甲酸水(A)-含有 0.05% 甲酸的乙腈(B)。梯度洗脱: 0~15 min, 20% $\rightarrow$ 32% B; 15~30 min, 32% $\rightarrow$ 70% B; 30~40 min, 70% $\rightarrow$ 80% B。检测波长分别为 210、230、254、280、360 nm。

精密称取金银花 50.071 g, 每次用 500 mL 甲醇超声提取 60 min(功率为 70 W), 共 3 次, 获取提取液。减压旋转蒸发提取液, 获得粗提物。称取适量的粗提物溶解在 40% DMSO 溶液中, 配成 4 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的金银花粗提物溶液, 进样分析。

根据粗提物的质谱图, 分析得到的 MS 数据, 以及已经报道的文献数据^[18-21], 进行化合物结构的解析, 确定粗提物中含有的化合物及其结构。

2.3 基于网络药理学金银花抗 COVID-19 作用机制分析

2.3.1 成分库的构建和活性成分的筛选 根据“2.2”项中所得的成分,与 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行核对,进一步确认化合物结构,收集成分通用名,Canonical SMILES,汇总成表格,建立金银花活性成分库。

口服药物在体内需要经过吸收、分布、代谢、排泄4个过程,从而进入器官、组织中发挥作用。通常将这一过程称为 ADME 过程。构建 Lipinski 规则模型:相对分子质量<500、氢键给体数目<5、氢键受体数目<10、脂水分配系数<5、可旋转键的数量不超过10个,满足3个以上为条件,筛选金银花中的潜在活性成分,并与文献对照确定金银花的潜在活性成分。

2.3.2 活性成分药效靶点的筛选 将筛选出的金银花活性成分的 Canonical SMILES 导入到 SWISS TargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中,基于已知配体与待测化合物的结构相似性原理预测潜在靶点,选择“Homo sapiens”,保留参数设置为 probability>0,进行靶点预测,以 CSV 的格式导出结果,作为活性成分的靶点蛋白及潜在的靶点基因。

在 GeneCard 和 OMIM 上通过搜索关键词 COVID-19,查询相关基因,得到 COVID-19 潜在疾病靶点基因。

通过 Venny2.1.0(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>),将金银花成分靶点与 COVID-19 相关靶点取交集,获得的交集基因即为金银花中作用于 COVID-19 的药效靶点。

2.3.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将金银花活性成分抗 COVID-19 的药效靶点基因导入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>),为保证数据的可靠性,本研究选择了0.7的高置信度。将结果以 tsv 格式导入 Cytoscape(version3.7.2)构建 PPI 网络,对该网络进行可视化分析,并将节点的大小、颜色和透明度设置用于反映度值的大小。

2.3.4 构建“成分-靶点”网络图 将获得的金银花 PPI 网络中度值前20的药效靶点输入 Cytoscape 3.7.2 软件中,构建金银花的“成分-靶点”网络图。对网络图进行度值分析,选取排名靠前的5个成分为核心成分、排名靠前的2个靶点为核心靶点。

2.3.5 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将金银花抗 COVID-19

潜在靶点基因提交至 Metascape 数据库(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)中,进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,以探讨潜在靶点基因聚类于抗 COVID-19 相关的生物学过程或信号通路。

2.4 金银花抗 COVID-19 关键活性成分与核心靶点分子对接

从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得相应化合物的 3D 结构,随后在 Chem3D 19.0 软件上使用 MM2 力场最小化,将化合物的能量最小化。从 PDB 数据库(<https://www.pdbus.org/>)中选择带有阳性药或小分子配体的蛋白,利用 Pymol 软件删除溶剂和配体。通过添加极性氢和科尔曼电荷,利用 AutoDockTools-1.5.6 对它们进行进一步预处理,确定蛋白受体的活性袋区域。应用 AutoDock vina 进行对接,并通过亲和能评估结果。Pymol 和 LigPlus+ 用于可视化受试化合物与关键残基之间的相互作用。一般认为,配体和受体结合的构象稳定时能量越低发生作用的可能性就越大,当结合能<0时,配体和受体可以发生自由结合。

2.5 金银花主要有效成分的 3CL 酶抑制活性测定

2.5.1 菌种扩大培养 约 200 mL LB 液体培养基分装至1个500 mL 橡胶塞锥形瓶中,高压蒸汽灭菌 121 °C 灭菌 15 min;吸取 0.5 μL 含有 pGEX-6P-1-SARS-CoV-2-3CL 质粒(C 端携带 His 标签)的大肠杆菌表达菌株 BL21(北京博迈德基因技术有限公司,货号:BC201-01)菌液放置在 5 mL 氨苄抗性的 LB 液体培养基中,37 °C、200 r·min⁻¹过夜培养。

将过夜培养的 5 mL 菌液倒入 200 mL 具有氨苄抗性的培养基中,37 °C、220 r·min⁻¹培养,培养至 A₆₀₀ 值为 0.4~0.6。向菌液中加入 IPTG(终浓度为 1 mmol·L⁻¹),在 25 °C 下诱导 6 h。6 h 后将菌液置于 50 mL 离心管中,6 000 r·min⁻¹、室温,离心 5 min,弃培养基,菌体存于-20 °C。

2.5.2 3CLpro 的纯化 向菌体中加入 12 mL Lysis buffer 重悬,冰上超声破碎,将功率调至 20%,破碎 10 s,暂停 10 s,破碎 1 h。10 000 ×g,4 °C,离心 20 min,收集上清。上清用 0.22 μm 滤膜过滤,用 AKTA 仪器纯化 3CLpro。

2.5.3 SDS-PAGE 检测 3CLpro 的表达 参考试剂盒说明书配制 12% SDS-PAGE 胶。向纯化后的蛋白中再加入碧云天公司 5×的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 12.5 μL(终浓度 1×)和 β-巯基乙醇 4 μL(1/20),

100 °C金属浴 15 min 后, 13 000 ×g, 室温, 离心 5 min, 吸取 5 μL 样品上样。在 1×TRIS-Glycine 电泳缓冲液中进行上样跑胶, 等待溴酚蓝自胶板跑出后, 停止跑胶。考马斯亮蓝进行 1 h 染色, 再脱色至蛋白条带清晰为止。

2.5.4 3CLpro 的透析 使用索莱宝透析袋 MD25(相对分子质量 8 000~14 000), 裁剪透析袋, 透析袋的大小可为 5~10 cm, 不宜太短。在 2% 碳酸氢钠中煮沸 10 min, 用 Mili-Q 清洗 10 次; 放在 1 mmol·L⁻¹ EDTA(pH 值 8.0) 煮沸 10 min。冷却后, 用 Mili-Q 清洗 10 次; 置于 15% 甘油(提前高温高压灭菌 121 °C, 15 min) 中, 放于 4 °C 冰箱。

选择适当长度的透析袋, Mili-Q 清洗, 预留一段额外长度作为头部空间, 使用索莱宝的透析袋专用夹子把透析袋的一端夹住, 将样品装入, 再使用透析袋夹子夹住另一端, 注意不要折叠透析袋。

将 1 L 的 3CLpro 缓冲液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl) 加入含有磁力搅拌棒的烧杯中, 将其放置在磁力搅拌器上。将装有样品的透析袋放在酶活缓冲液中, 于 4 °C 进行透析。前 3 次每隔 0.5 h 换 1 次酶活缓冲液, 后 3 次每隔 1 h 换 1 次, 最后过夜。取出透析袋中样品溶液, 用 0.22 μmol·L⁻¹ 滤膜滤过, 分装, 即为所需 3CLpro。

2.5.5 体外活性测定 3CLpro 酶活缓冲液: 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA; 经预测 3CLpro 的相对分子质量为 34 773.66, 即 34 773.66 g·mol⁻¹; 以酶活缓冲液稀释纯化后的 3CLpro 至 250 nmol·L⁻¹。3CLpro 荧光底物每管分装, 1 mg 底物对应 500 μL Mili-Q, 13 000 r·min⁻¹, 离心 5 min, 去除沉淀后用酶活缓冲液稀释 20 倍避光使用。

酶活体系: 40 μL 蛋白储存液与 10 μL 药物在 96 孔板中孵育 30 min 后, 再加入 50 μL 底物。检测方法: 3CLpro 检测波长 336/20, 490/20; 间隔 30 s, 振板

0.01 s, 持续 1 h, 增益值 100。检测 1 h 内荧光强度增加值, 蛋白终浓度为 100 mmol·L⁻¹, 3CLpro 底物终浓度为 25 μmol·L⁻¹。每块板中除药物孔以外, 还应包含只加 DMSO(40 μL 蛋白+50 μL 底物+10 μL DMSO) 的阴性对照; 只加蛋白不加底物(40 μL 蛋白+50 μL 酶活缓冲液+10 μL DMSO) 的空白对照; 只加底物不加蛋白(40 μL 酶活缓冲液+50 μL 底物+10 μL DMSO) 的空白对照。

选取金银花中的绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、芦丁、獐芽菜苦苷, 在 NEST 公司的透明平底 96 孔板上与 3CLpro 进行体外活性测试, 根据每个浓度的抑制率, 由剂量-抑制率曲线计算出 3CLpro 的平均半数抑制浓度(IC₅₀)。

3 结果

3.1 金银花中化学成分质谱检测

金银花粗提物的质谱分析结果如图 1 所示, 使用 Xcalibur 3.0 软件对 Q-Exactive/MS 得到的原始信息进行数据处理, 根据已报道文献中的质谱数据, 共鉴定得到 77 种化学成分, 见表 1。

3.2 药物活性成分及相应靶点筛选

鉴定出 77 种化合物, 经过 Lipinski 规则筛选, 去掉无对应靶点成分, 并与文献数据对照, 共得到潜在有效成分 55 种, 靶点基因 512 个。

3.3 COVID-19 靶点的筛选

与 COVID-19 相关的疾病靶点共有 5 079 个, 通过构建韦恩图, 获得金银花与 COVID-19 共同靶基因 179 个, 见图 2。

3.4 PPI 网络的构建

基于 STRING 数据库获取金银花抗 COVID-19 的药效靶点之间的蛋白互作信息, 将其导入 Cytoscape 3.7.2 进行可视化分析, 获得金银花抗 COVID-19 靶蛋白相互作用网络。如图 3 所示。其中, 边代表药效靶点之间的相互作用关系, 节点代表

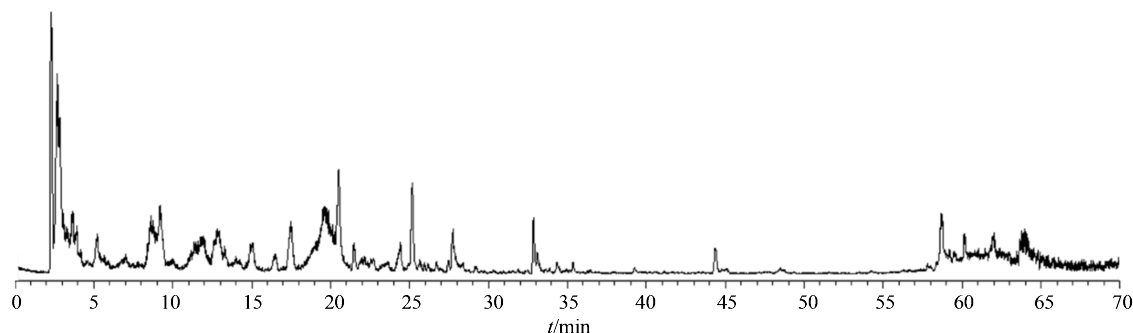


图1 金银花粗提物质谱图

Fig. 1 Mass spectrum of crude extract of *Lonicerae Japonicae Flos*

表1 金银花粗提物化学成分鉴定结果

Table 1 Identification results of chemical components in crude extract of *Lonicerae Japonicae Flos*

序号	成分	分子式	<i>m/z</i>	误差/($\times 10^{-6}$)	离子模式	二级碎片离子	参考文献
1	精氨酸 (arginine)	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175.118 80	-0.869	M+H	175.118 80、151.035 16、128.019 30、 116.070 84、70.065 84	18
2	蔗糖 (sucrose)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.108 49	1.912	M-H	341.108 49、179.054 84、119.033 33、 89.022 67、71.012 12	19
3	缬氨酸 (valine)	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118.086 46	1.735	M+H	118.086 46、102.055 70、87.044 57、 71.069 31、59.073 78	18
4	奎宁酸 (quinic acid)	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.055 04	0.133	M-H	191.055 04、173.007 84、154.996 77、 127.038 41、111.007 14	19
5	尿苷 (uridine)	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	243.062 18	4.186	M-H	243.062 18、200.055 53、152.033 89、 128.033 72、110.023 12	19
6	酪氨酸 (tyrosine)	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182.081 05	-0.658	M+H	182.081 05、165.054 57、136.075 64、 123.044 17、91.054 68	19
7	苏氨酸 (threonine)	C ₄ H ₉ NO ₃	120.065 52	0.002	M+H	120.065 52、91.054 73、74.060 73、 65.039 28、56.050 33	18
8	腺苷 (adenosine)	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.102 87	-4.328	M+H	268.102 87、213.212 11、136.061 72、 115.039 09、87.044 76	18
9	亮氨酸 (leucine)	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.101 88	-0.919	M+H	132.101 88、87.100 30、86.096 98、 69.070 63、57.058 22	18
10	异亮氨酸 (isoleucine)	C ₆ H ₁₃ NO ₂	130.085 82	-3.345	M-H	130.085 82、115.919 12、101.022 77、 85.027 80、71.012 21	19
11	8-表马钱酸 (8-epimarinic acid)	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	375.128 63	0.151	M-H	375.128 63、213.076 11、151.075 06、 125.059 25、89.022 73	20
12	乙酰基绿原酸 (acetyl chlorogenic acid)	C ₁₈ H ₂₀ O ₁₀	395.098 48	3.055	M-H	395.098 48、297.060 27、197.044 62、 153.054 41、88.986 38	19
13	原儿茶酸 (protocatechuic acid)	C ₇ H ₆ O ₄	153.017 90	-2.190	M-H	153.017 90、136.014 54、125.548 81、 109.027 85、91.016 89	19
14	马钱苷酸 (loganic acid)	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	375.129 39	2.177	M-H	375.129 39、337.056 58、213.076 14、 169.085 80、89.022 74	19
15	断马钱子苷半缩醛内酯 (vogeloside)	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	387.128 23	-0.887	M-H	387.128 23、341.108 61、179.054 90、 119.033 39、89.022 71	20
16	绿原酸 (chlorogenic acid)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 62	2.581	M-H	353.087 62、292.762 70、191.055 08、 135.043 37、85.027 95	20
17	新绿原酸 (neochlorogenic acid)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 55	2.383	M-H	353.087 55、191.055 07、127.038 63、 85.027 63、61.919 09	18
18	隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 59	2.497	M-H	353.087 59、317.658 94、191.055 10、 161.023 24、85.027 58	18
19	咖啡酰奎宁酸 (caffeyl quinic acid)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 71	2.836	M-H	353.087 71、191.055 07、161.022 87、 135.043 21、85.027 85	19
20	獐牙菜苦苷 (swertiamarin)	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.113 74	2.189	M-H	373.113 74、193.049 64、149.059 39、 97.027 84、69.032 88	19
21	断马钱子酸 (secologanic acid)	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.113 77	2.269	M-H	373.113 77、193.049 70、149.059 43、 119.033 41、97.027 85	19
22	6-肉桂酰-D-葡萄糖 (6-O-cinnamoyl-D-glucopyranose)	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	309.097 99	3.593	M-H	309.097 99、253.918 43、179.033 75、 161.023 16、135.043 75	21

表1 (续)

序号	成分	分子式	m/z	误差($\times 10^{-6}$)	离子模式	二级碎片离子	参考文献
23	咖啡酸 (caffeic acid)	$C_9H_8O_4$	179.033 86	-0.141	M-H	179.033 86、135.043 69、121.028 02、 101.022 62、89.022 71	19
24	四乙酰开联番木鳖苷 (secologanoside)	$C_{16}H_{22}O_{11}$	389.108 95	2.858	M-H	389.108 95、345.119 08、165.054 38、 121.064 32、89.022 71	19
25	对香豆酰奎宁酸 (<i>p</i> -coumarinyl quinic acid)	$C_{16}H_{18}O_8$	337.092 80	2.985	M-H	337.092 80、191.055 07、173.044 31、 145.027 95、93.032 88	19
26	7- <i>O</i> -乙基獐芽菜苷 (7- <i>O</i> -ethyl swertidine)	$C_{18}H_{26}O_{10}$	401.145 57	3.357	M-H	401.145 57、269.102 91、161.044 19、 113.022 77、101.022 73	19
27	咖啡酰莽草酸 (caffeoyl shikimic acid)	$C_{16}H_{16}O_8$	335.077 39	3.719	M-H	335.077 39、179.034 03、161.023 10、 135.043 69、93.032 82	19
28	獐芽菜苷 (sweroside)	$C_{16}H_{22}O_9$	357.119 02	2.832	M-H	357.119 02、195.065 26、151.074 94、 125.022 84、81.032 84	19
29	阿魏酰奎宁酸 (feruloyl quinic acid)	$C_{17}H_{20}O_9$	367.103 15	2.156	M-H	367.103 15、191.055 11、173.044 37、 111.043 56、93.032 92	19
30	异绿原酸A (isochlorogenic acid A)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.118 59	0.364	M-H	515.118 59、323.056 12、191.055 13、 173.044 36、93.032 95	18
31	开联番木鳖苷 (secologanin)	$C_{17}H_{24}O_{10}$	387.127 66	-2.359	M-H	387.127 66、341.108 58、155.033 57、 111.043 51、89.022 70	19
32	异绿原酸B (isochlorogenic acid B)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.119 32	1.781	M-H	515.119 32、323.056 12、191.055 07、 128.033 74、89.022 63	18
33	3- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸甲酯 (3- <i>O</i> -caffeoyl quinic acid methyl ester)	$C_{17}H_{20}O_9$	367.103 06	1.911	M-H	367.103 06、179.033 80、161.023 04、 135.043 62、85.027 88	20
34	莫诺苷(morrioniside)	$C_{17}H_{26}O_{11}$	405.139 01	-0.316	M-H	405.139 01、179.054 89、101.022 74、 89.022 68、71.012 12	19
35	金银花苷 (secoxyloganin)	$C_{17}H_{24}O_{11}$	403.124 15	1.642	M-H	403.124 15、371.098 11、223.060 49、 121.027 91、89.022 71	19
36	异绿原酸C (isochlorogenic acid C)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.118 96	1.082	M-H	515.118 96、353.087 59、191.055 05、 173.044 30、161.023 07	18
37	异槲皮苷 (isoquercitrin)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.088 23	2.435	M-H	463.088 23、343.045 75、301.035 19、 151.002 24、61.986 69	18
38	二甲基四乙酰开联番木鳖 苷(dimethyl secologanoside 7- methyl ester)	$C_{18}H_{26}O_{11}$	417.140 08	2.258	M-H	417.140 08、341.124 02、179.070 05、 109.027 86、101.022 74	19
39	忍冬苷(ionicerin)	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.151 12	1.726	M-H	593.151 12、447.096 37、285.040 37、 191.055 13、101.022 29	20
40	黄芪苷(astragalin)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.093 14	2.130	M-H	447.093 14、285.040 28、227.887 53、 173.044 01、88.986 31	18
41	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷 (kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside)	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.151 06	1.624	M-H	593.151 06、447.092 80、285.040 13、 191.054 96、88.985 96	19
42	3,4-二甲氧基肉桂酰奎宁 酸(3,4-dimethoxy cinnamoyl quinic acid)	$C_{18}H_{22}O_9$	381.119 60	4.176	M-H	381.119 60、345.155 36、283.288 27、 161.043 84、101.022 82	19
43	芦丁(rutin)	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.146 00	1.623	M-H	609.146 00、300.027 56、271.024 90、 151.002 47、84.639 18	19

表1 (续)

序号	成分	分子式	<i>m/z</i>	误差($\times 10^{-6}$)	离子模式	二级碎片离子	参考文献
44	金丝桃苷(hyperoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.088 29	2.565	M-H	463.088 29、300.027 50、271.024 11、 178.997 60、151.002 41	19
45	马钱子苷 A(brucin A)	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₉	743.240 60	1.742	M-H	743.240 60、511.145 45、203.034 15、 101.022 77、89.022 72	19
46	芥子酰咖啡酰奎宁酸 (3- <i>O</i> -caffeoyl-4- <i>O</i> - sinapoylquinic acid)	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	561.158 75	-2.704	M+H	561.158 75、453.100 07、317.084 20、 249.051 74、60.081 59	19
47	对香豆酰咖啡酰奎宁酸 (1- <i>p</i> -coumaroyl-3- caffeoylquinic acid)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₁	499.124 88	2.789	M-H	499.124 88、337.092 83、173.044 28、 163.038 73、119.048 61	19
48	阿魏酸(ferulic acid)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.049 61	0.387	M-H	193.049 61、161.023 07、137.022 92、 121.027 50、93.032 88	19
49	野漆树苷(rhoifolin)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.155 76	1.002	M-H	577.155 76、353.087 28、269.045 41、 191.055 16、118.996 82	19
50	芹菜素-7- <i>O</i> -芸香糖苷 (apigenin-7- <i>O</i> -rutinoside)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.155 76	1.002	M-H	577.155 76、353.087 28、269.045 41、 191.055 16、118.996 82	20
51	阿魏酰咖啡酰奎宁酸 (3-feruloyl-4-caffeoylquinic acid)	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	529.134 64	1.110	M-H	529.134 64、367.103 00、191.055 07、 179.033 75、161.023 03	19
52	金圣草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 (chrysoeriol 7- <i>O</i> -glucoside)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.108 76	2.000	M-H	461.108 76、446.085 24、283.024 66、 122.023 28、89.022 77	19
53	(<i>E</i>)-醛糖碱碱 [(<i>E</i>)-aldosecologanin]	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₉	757.255 74	1.036	M-H	757.255 74、595.203 49、525.161 07、 179.054 98、89.022 72	20
54	4-羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid)	C ₇ H ₆ O ₃	137.022 93	-2.850	M-H	137.022 93、94.036 23、93.032 90、 84.843 34、74.718 48	19
55	金圣草素-7- <i>O</i> -新橙皮糖苷 (chrysoeriol 7- neohesperidoside)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	607.166 93	1.949	M-H	607.166 93、401.084 50、299.055 91、 284.032 29、173.044 42	20
56	肉桂酸 (cinnamic acid)	C ₉ H ₈ O ₂	149.059 71	0.026	M+H	149.059 71、121.064 99、103.054 57、 93.070 40、67.055 03	19
57	(<i>Z</i>)-二聚断马钱苷烯醛 (centauroside)	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₉	757.255 62	0.878	M-H	757.255 62、525.161 07、179.054 98、 101.022 78、89.022 73	19
58	木犀草苷 (luteoloside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.093 02	1.861	M-H	447.093 02、284.032 53、255.029 42、 227.034 01、151.002 44	19
59	木犀草素-7- <i>O</i> -芸香糖苷 (luteolin-7- <i>O</i> -rutinoside)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.151 25	1.945	M-H	593.151 25、285.040 10、204.065 81、 172.039 17、88.985 98	20
60	异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 (isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.103 58	1.735	M-H	477.103 58、314.043 30、271.024 57、 197.044 62、151.002 38	20
61	欧槲寄生苷B (viscoside B)	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	475.124 91	2.993	M-H	475.124 91、460.100 34、313.071 81、 298.047 94、88.986 21	19
62	tri-咖啡酰基奎宁酸 (tri-caffeoyl quinic acid)	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅	677.149 54	-0.822	M-H	677.149 54、515.119 20、353.087 74、 191.055 11、173.044 36	19
63	芥子酰奎宁酸 (sinapsyl quinic acid)	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₀	397.113 22	0.747	M-H	397.113 22、173.044 28、152.010 09、 108.019 94、61.986 66	19
64	脱落酸 (abscisic acid)	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	263.128 66	3.323	M-H	263.128 66、219.138 34、152.082 92、 139.075 04、111.043 53	21

表1 (续)

序号	成分	分子式	<i>m/z</i>	误差($\times 10^{-6}$)	离子模式	二级碎片离子	参考文献
65	咖啡酰乙酯 (caffeic ethyl ester)	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	207.065 51	1.568	M-H	207.065 51、179.033 81、161.023 12、 135.043 66、101.022 65	19
66	山柰酚 (kaempferol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.040 41	3.668	M-H	285.040 41、241.049 68、175.038 59、 133.027 82、76.138 38	18
67	木犀草素 (luteolin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.040 41	3.668	M-H	285.040 41、241.049 39、199.038 93、 151.002 40、80.839 42	19
68	8-羟基-2,6-二甲基-2-辛酸 (8-hydroxy-2,6-dimethyl-2-octenoic acid)	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	185.117 32	0.535	M-H	185.117 32、166.557 95、141.090 65、 117.017 79、99.007 19	21
69	壶状内酯(urceolide)	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₁	461.202 39	1.413	M-H	461.202 39、415.233 37、347.171 08、 185.117 43、113.022 75	21
70	苜蓿素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 E (tricin 7-glucoside)	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	491.118 71	0.626	M-H	491.118 71、329.066 59、314.043 18、 149.044 05、89.022 71	19
71	5-羟基-4',7-二甲氧基黄酮 (5-hydroxy-4',7-dimethoxy flavone)	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	297.076 42	2.255	M-H	297.076 42、236.164 61、191.033 97、 102.955 02、61.986 42	19
72	6-羟基-2,6-二甲基-2,7-十八烯酸(2,6-dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadienoic acid)	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	183.101 67	0.542	M-H	183.101 67、139.111 40、101.022 67、 89.022 61、71.012 26	21
73	香叶木素 (diosmetin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.056 03	3.396	M-H	299.056 03、256.036 74、169.085 75、 143.069 95、59.012 13	18
74	3'-甲氧基木犀草素 (3-methoxy luteolin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.055 94	3.095	M-H	299.055 94、284.032 56、256.036 83、 180.101 10、120.976 14	19
75	5,3'-二甲氧基木犀草素 (chrysoeriol 5-methyl ether)	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313.071 53	2.765	M-H	313.071 53、271.061 00、253.050 20、 153.090 53、97.119 11	19
76	常春藤皂苷元 (hederagenin)	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.347 84	2.023	M-H	471.347 84、374.396 33、205.953 17、 129.974 12、92.926 32	19
77	芹菜素 (apigenin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 65	4.461	M-H	269.045 65、179.055 28、113.022 93、 89.022 73、71.012 26	19

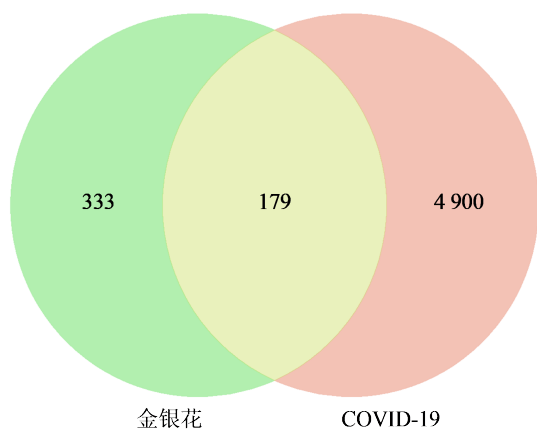


图2 金银花-COVID-19靶点 Venn图

Fig. 2 Venn diagram of *Lonicerae Japonicae Flos*-COVID-19 targets

药效靶点,节点越大,表明相应靶点在PPI网络中的地位越重要。其中,排名前20节点为GAPDH、TNF、AKT1、ALB、IL6、VEGFA、EGFR、SRC、HSP90AA1、CASP3、CTNNB1、STAT3、TLR4、ERBB2、MAPK1、IL2、AR、PPARA、BCL2L1、HSPA5。

3.5 构建“成分-靶点”网络图

将筛选出的20个金银花抗COVID-19的药效靶点和对应成分构建“成分-靶点”网络图,共包含59个节点(39个成分和20个靶点),不同的颜色的节点分别代表靶点及相关成分,边代表二者之间的相互作用,如图4。根据结果,得到5种金银花治疗COVID-19的关键活性成分,分别为咖啡酸、腺苷、5,3'-二甲氧基木犀草素、芹菜素、阿魏酸。同时得

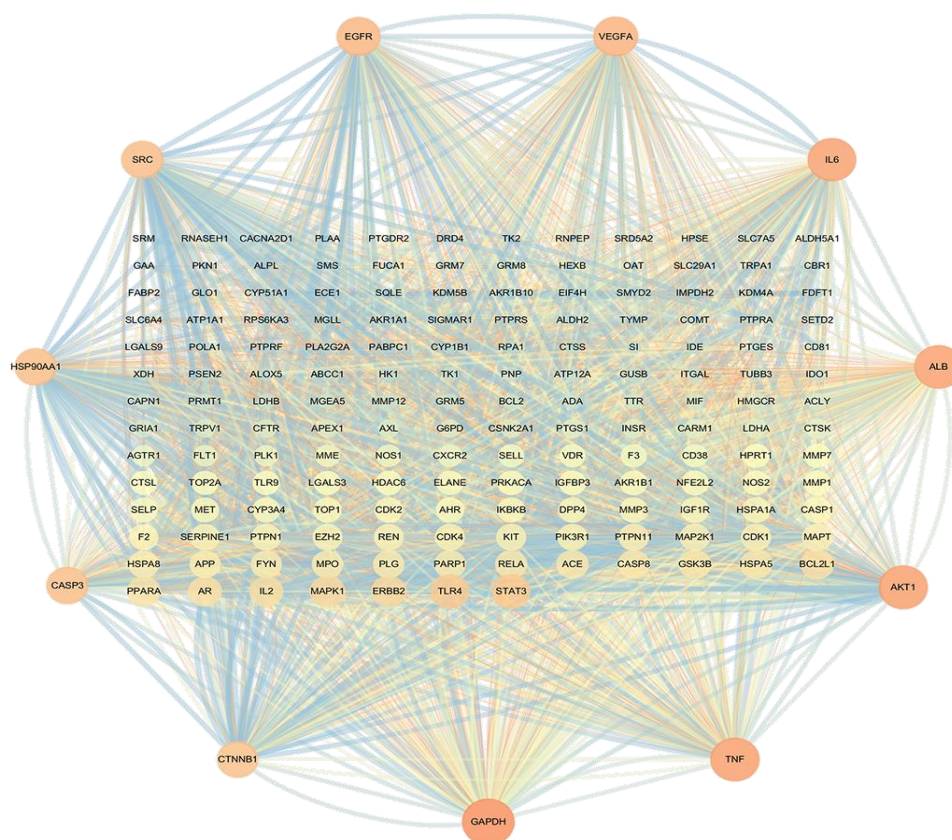


图 3 金银花治疗 COVID-19 靶点的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of COVID-19 efficacy targets of *Lonicerae Japonicae Flos*

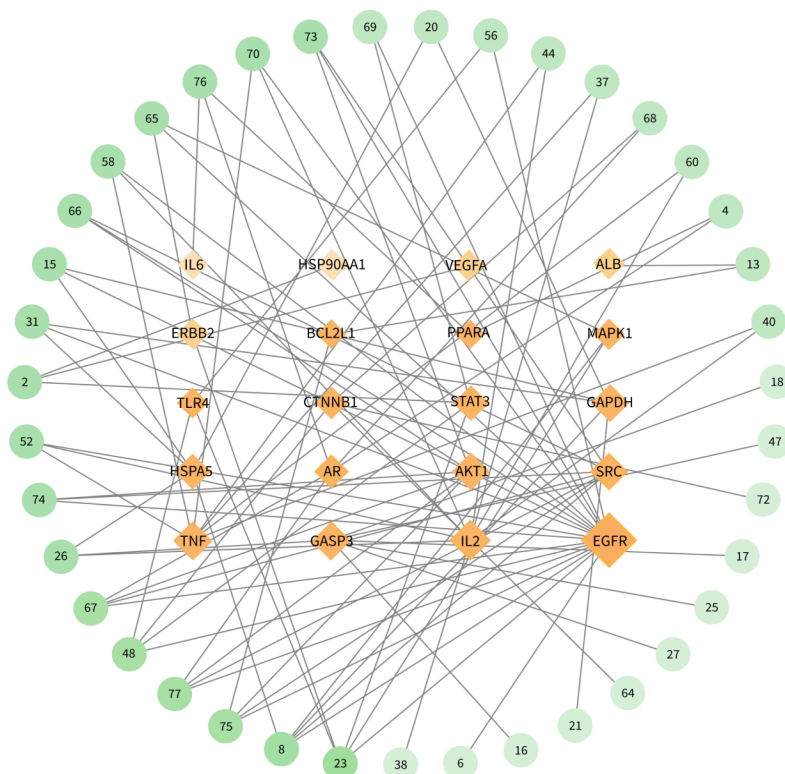


图 4 金银花-COVID-19 的“成分-靶点”网络

Fig. 4 “Component-target” network of *Lonicerae Japonicae Flos* -COVID-19

到了2个金银花治疗 COVID-19 的核心靶点 EGFR 和 IL2。

3.6 GO与KEGG通路富集分析

将“3.2”项下的金银花药效靶点导入 Metascape 数据库进行 GO 与 KEGG 分析。根据药效靶点分析结果,将 P 值排名前 10 的结果展示在图 5。其中 GO 富集分析从生物学过程(BP)、细胞组成(CC)以及分子功能(MF)3个方面对药效靶点参与的基因功能进行阐释。结果表明,金银花抗 COVID-19 的药效靶点主要是通过细胞对氮化合物的反应、细胞对有机氮化合物的反应及激素反应等 BP 发挥作用;在 CC 方面主要与薄膜筏、膜微区及囊泡腔有关;在 MF 方面主要包括蛋白质结构域特异性结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性及氧化还原酶活性等有关。

此外,KEGG 通路富集注释分析结果表明,金银花药效靶点主要涉及 41 条信号通路,其中与金银花抗 COVID-19 密切相关的信号通路包括:低氧诱导因子-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、磷脂酰

肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、丝裂原激活蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway)、磷脂酶 D 信号通路(Phospholipase D signaling pathway)、Toll 样受体信号通路(toll-like receptor signaling pathway)等。见图 6。

3.7 药物成分与靶点蛋白分子对接

采用 AutoDock vina 分子对接,验证金银花中关键活性成分与病毒核心靶点(EGFR、IL2)的结合能力,如表 2 所示。分子对接结果表明,金银花的 5 个关键活性成分与病毒的 2 个核心靶点均具有良好的结合活性,结合能数值均 $< -20.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。其中,芹菜素对 EGFR 的结合活性最好,结合能为 $-34.28 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$;5,3'-二甲氧基木犀草素与 IL2 结合活性最好,结合能为 $-33.86 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。5,3'-二甲氧基木犀草素和芹菜素分别对 IL2 和 EGFR 的相互作用模式见图 7。

3.8 金银花有效成分对 3CLpro 抑制作用

利用分子生物学手段纯化得到了 3CLpro 蛋白,并测定了金银花主要有效成分对 3CLpro 的抑制活性,结

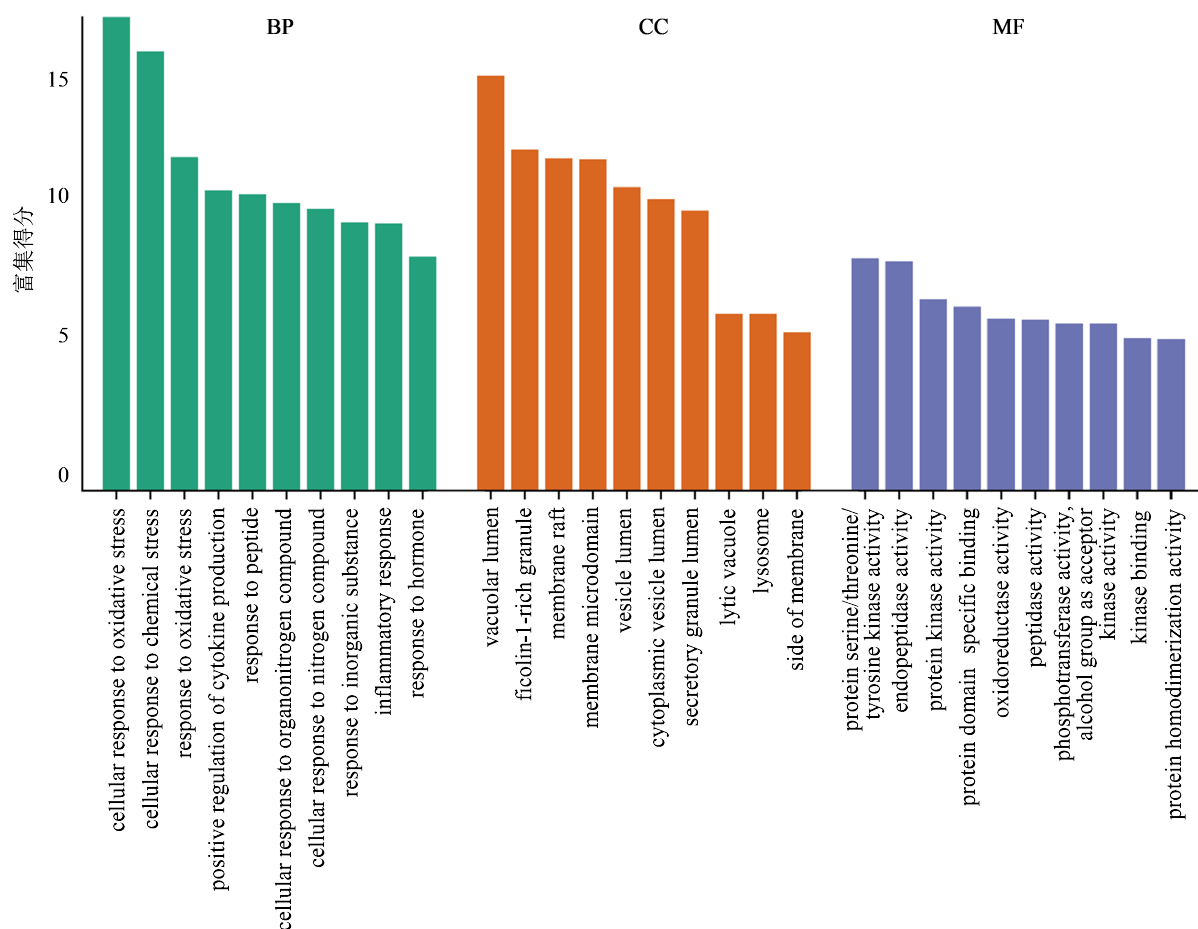


图5 COVID-19相关靶蛋白的GO富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of COVID-19-related target proteins

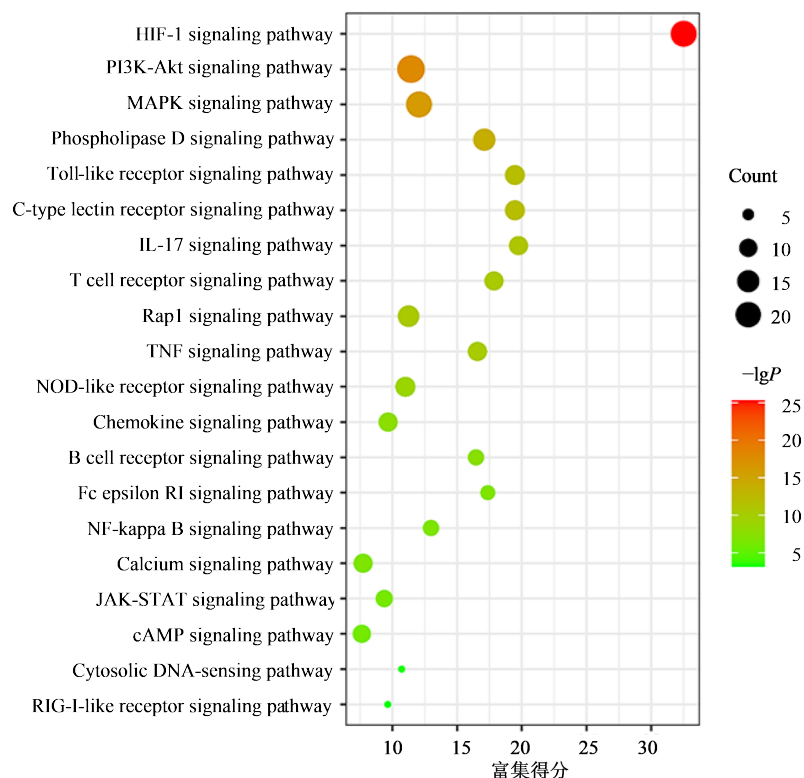


图6 COVID-19相关靶蛋白的KEGG富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of COVID-19-related target proteins

表2 金银花预防COVID-19的成分和靶点分子对接结果

Table 2 Molecular docking results for components and targets of *Lonicerae Japonicae Flos* in prevention of COVID-19

靶点	靶点PDB ID	成分	相对分子质量	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
EGFR	6DUK	咖啡酸(caffeic acid)	180.16	-25.08
		腺苷(adenosine)	267.24	-27.17
		5,3'-二甲氧基木犀草素(chrysoeriol 5-methyl ether)	314.29	-33.86
		芹菜素(apigenin)	270.24	-34.28
		阿魏酸(ferulic acid)	194.18	-26.33
IL2	1T1B	咖啡酸(caffeic acid)	180.16	-19.23
		腺苷(adenosine)	267.24	-19.65
		5,3'-二甲氧基木犀草素(chrysoeriol 5-methyl ether)	314.29	-25.50
		芹菜素(apigenin)	270.24	-24.24
		阿魏酸(ferulic acid)	194.18	-23.41

果见表3。以依布硒啉作为阳性对照药,绿原酸对3CLpro的 IC_{50} 为 $(106.40 \pm 0.71) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,咖啡酸的 IC_{50} 为 $(189.60 \pm 16.12) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,木犀草素的 IC_{50} 为 $(189.60 \pm 16.12) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,芦丁的 IC_{50} 为 $(211.80 \pm 3.32) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,獐牙菜苦苷表现为对3CLpro无抑制活性。其中绿原酸对3CLpro的抑制活性最好。各成分与3CLpro剂量-抑制率曲线见图8。

4 讨论

本研究从间接抑制SARS-CoV-2病毒作用与直

接抑制病毒3CLpro作用2方面出发,阐明金银花抑制COVID-19的药效物质基础与作用机制。通过网络药理学研究方法预测了金银花治疗COVID-19潜在的活性成分、关键靶点、作用机制及相关通路,并通过分子对接和3CLpro的活性测定进一步证明金银花对COVID-19具有潜在的治疗作用。

金银花具有潜在的抗炎以及抗病毒作用^[22],在质谱分析得到的化学成分中,已有研究表明,其中的luteolin和金银花水提物能够改善伪狂犬病毒诱导的RAW264.7细胞的炎症,能够通过抑制JAK/转

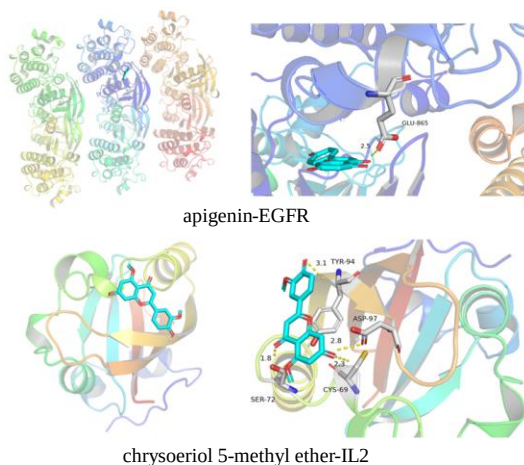


图7 金银花治疗 COVID-19 的受体与核心成分相互作用的分子对接图

Fig. 7 Molecular docking diagram of interaction between receptor and core component of *Lonicerae Japonicae Flos* treating COVID-19

表3 有效成分对3CLpro的IC₅₀抑制浓度

Table 3 Average IC₅₀ of 3CLpro of effective components

成分	分子式	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	106.40±0.71
咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	189.60±16.12
木犀草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	312.00±10.75
芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	211.80±3.32
獐牙菜苦苷	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	—
ebselen	C ₁₃ H ₉ NOSe	18.82

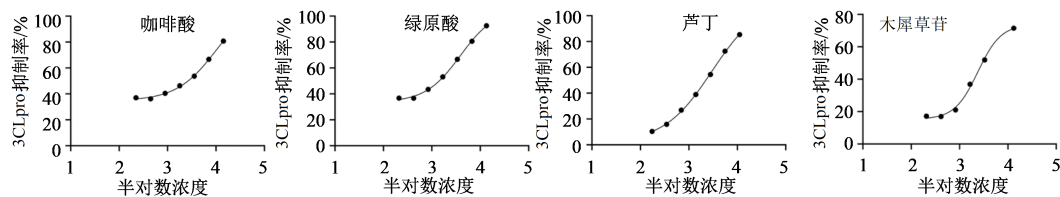


图8 金银花活性成分和3CLpro的浓度-抑制率曲线

Fig. 8 Dose-inhibition curve of main active ingredients of *Lonicerae Japonicae Flos* and 3CLpro

防治 COVID-19 主要与细胞信号传导、细胞黏附、迁移、免疫反应等过程密切相关。并且通过分子对接技术,金银花中的咖啡酸、腺苷、5,3'-二甲氧基木犀草素、芹菜素、阿魏酸与 EGFR 和 IL2 靶点均具有较低的结合能,说明金银花的关键成分与疾病相关靶点有较好的结合活性。

金银花抗 COVID-19 主要通过 HIF-1、PI3K-Akt、MAPK、Phospholipase D、Toll-like receptor 等信号通路参与调节和防御机制。EGFR 和 IL2 均能够调节主要信号通路,EGFR 能够调节 HIF-1 的表达和

录激活因子 1 (stat1)/3 依赖性 NF- κ B 通路 (3-dependent NF- κ B pathway) 和诱导血红素加氧酶-1(HO-1)的表达,降低促炎介质和炎症细胞因子诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶-2(COX-2)的表达^[23]。网络药理学筛选出的金银花成分中,咖啡酸作为免疫刺激剂,可以通过激活免疫系统的防御机制来防治 COVID-19^[24]。腺苷对炎症介质具有调节作用,可以通过吸入治疗的方法,减轻炎症,减少细胞因子风暴的发生,从而改善预后,对 COVID-9 具有防治作用^[25-26]。芹菜素对 COVID-19 表现出潜在的抑制活性,具有抗炎、抗病毒的潜力^[27-28]。阿魏酸是一种潜在的具有抗肿瘤和抗病毒活性的药物,对 COVID-19 具有潜在的抑制作用^[29-30]。

结合网络药理学预测的金银花抗 COVID-19 的靶点中,EGFR 在其介导的宿主对肺损伤过度反应导致肺纤维化中起着重要作用^[31];SRC 在细胞骨架收缩、细胞黏附和迁移中起着重要作用^[32];AKT1 作为自噬抑制物,在减少细胞自噬行为中起着重要的作用^[33];IL2 在免疫应答中起佐剂作用,可以增强特异性免疫应答^[34];CASP3 的基因或者其产物可以维持细胞动态平衡和生存能力,在预防 SARS-CoV-2 感染引起的损伤中具有重要作用^[35];TNF 是一种在急性肺损伤中普遍上调的促炎细胞因子,它可以触发 CRS 并促进 SARS-CoV-2 与血管紧张素转换酶 2(ACE2)的相互作用^[36]。由此,可以推断出,金银花

活性^[37],HIF-1 信号通路能够调控细胞增殖、代谢和血管生成等重要细胞过程;此外,该因子与 MAPK 通路在免疫反应中被激活,会诱导促炎因子的产生,在炎症部位发挥重要作用^[38-40]。PI3K-Akt 信号通路参与细胞的增殖、蛋白质合成和对环境变化反应^[41],EGFR 可以激活 PI3K-Akt 信号通路在癌症中发挥作用^[42],抑制 PI3K-Akt 信号通路有助于抑制病毒通过网状蛋白介导的途径进入宿主细胞^[43]。

EGFR 能够通过 MAPK 信号通路调控细胞增殖和生存^[44],对 Phospholipase D 信号通路也具有调控

作用^[45], Phospholipase D 信号通路广泛参与细胞过程, 包括受体信号、细胞骨架调节和膜运输^[46]。Toll-like receptor 信号通路的激活会引起促炎细胞因子的分泌, 在识别病毒颗粒和激活天然免疫系统中发挥着重要作用^[47]。IL-2 能够通过调节 HIF-1 信号通路调控免疫细胞代谢^[48], 也会通过 PI3K-Akt 信号通路调控 T 细胞功能^[49], 通过 MAPK 途径影响 T 细胞的转录因子活性^[50]。由此, 可以推断出, 金银花抗 COVID-19 主要与细胞增殖、调节免疫及炎症通路相关。

根据金银花化学成分组成并结合潜在的抗病毒作用, 分别选择了酚酸类、黄酮类和环烯醚萜类化合物进行了体外抗病毒测定, 体外酶活结果分析发现, 金银花中酚酸类成分对 3CLpro 具有较好的抑制活性。酚酸类的绿原酸不仅能够对木瓜蛋白酶(PLpro)具有抑制效果^[51]; 咖啡酸还能够降低 ACE2 的表达, 抑制与 SARS-CoV-2 的结合, 具有潜在的抗病毒活性^[52]。黄酮类的芦丁在体外还能够抑制 SARS-CoV-2 非结构蛋白, 在 Vero E6 细胞中抑制 SARS-CoV-2 感染^[53]; 木犀草苷同时也是 SARS-CoV-2 甲基转移酶(Mtase)的潜在抑制剂^[54]。

综上所述, 金银花主要作用靶点和通路涉及 HIF-1、PI3K-Akt、MAPK、Phospholipase D、Toll-like receptor 等信号通路参与调节和防御机制, 其中活性成分咖啡酸、腺苷、5, 3'-二甲氧基木犀草素、芹菜素、阿魏酸对 EGFR 和 IL2 疾病靶点有较好的结合活性, 并且金银花中的绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、芦丁可以通过抑制 3CLpro 发挥抗病毒活性, 从间接抑制 SARS-CoV-2 病毒作用与直接抑制病毒作用 2 方面出发, 阐明金银花抑制 COVID-19 的作用机制与药效物质基础, 为中药治疗 COVID-19 提供新的作用靶点及途径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Baloch S, Baloch M A, Zheng T L, et al. The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic [J]. Tohoku J Exp Med, 2020, 250(4): 271-278.
- [2] Wang Q, Zhao Y, Chen X J, et al. Virtual screening of approved clinic drugs with main protease (3CL^{pro}) reveals potential inhibitory effects on SARS-CoV-2 [J]. J Biomol Struct Dyn, 2022, 40(2): 685-695.
- [3] Kuo C J, Liang P H. SARS-CoV-2 3CL^{pro} displays faster self-maturation *in vitro* than SARS-CoV 3CL^{pro} due to faster C-terminal cleavage [J]. FEBS Lett, 2022, 596(9): 1214-1224.
- [4] 杨璐, 王辉强, 李玉环. COVID-19 治疗药物的研究进展 [J]. 药学报, 2020, 55(6): 1081-1090.
Yang L, Wang H Q, Li Y H. Research progress of COVID-19 therapeutic drugs [J]. Acta Pharm Sin, 2020, 55(6): 1081-1090.
- [5] Yan S M, Wu G. Potential 3-chymotrypsin-like cysteine protease cleavage sites in the coronavirus polypeptides pp1a and pp1ab and their possible relevance to COVID-19 vaccine and drug development [J]. FASEB J, 2021, 35(5): e21573.
- [6] Ni L Q, Chen L L, Huang X, et al. Combating COVID-19 with integrated traditional Chinese and western medicine in China [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(7): 1149-1162.
- [7] 卫博凯, 胡静. 基于中医传承辅助平台与网络药理学探析中药干预新型冠状病毒感染后遗症肺纤维化的作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 190-204.
Wei B K, Hu J. Analysis on mechanisms of traditional Chinese medicine in intervention of pulmonary fibrosis in sequela of SARS-CoV-2 infection based on Traditional Chinese Medicine Inheritance Auxiliary Platform and network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(1): 190-204.
- [8] 陈莉莉, 葛广波, 荣艳, 等. 中药在新冠肺炎防治中的应用和研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(3): 1-8.
Chen L L, Ge G B, Rong Y, et al. Application and research progress of traditional Chinese medicine in prevention and treatment of COVID-19 [J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2020, 34(3): 1-8.
- [9] 杨安辉, 刘宇灵, 林龙飞, 等. 清热解毒类中药抗新型冠状病毒肺炎研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1): 181-186.
Yang A H, Liu Y L, Lin L F, et al. Research progress of heat-clearing and detoxifying traditional Chinese medicine in treatment of Corona virus disease 2019 [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2021, 39(1): 181-186.
- [10] 中国药典 [S]. 三部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume III. 2020.
- [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.
He L L, Gong P Y, Feng Y, et al. Analysis on application of Chinese materia medica in treatment of COVID-19 by suppressing cytokine storm [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(6): 1375-1385.
- [12] 张美玲, 李峰, 刘雯, 等. 中药金银花抗病毒作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(9): 156-158.

- Zhang M L, Li F, Liu W, et al. Research progress on the anti-virus effect of *Lonicerae flos* [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2016, 18(9): 156-158.
- [13] Wu X Q, Zhang W N, Hao M Z, et al. How Chinese herbal medicine prevents epidemics: From ancient pestilences to COVID-19 pandemic [J]. Am J Chin Med, 2021, 49(5): 1017-1044.
- [14] Luo H, Tang Q L, Shang Y X, et al. Can Chinese medicine be used for prevention of *Corona* virus disease 2019 (COVID-19)? A review of historical classics, research evidence and current prevention programs [J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(4): 243-250.
- [15] Lee Y R, Chang C M, Yeh Y C, et al. Honeysuckle aqueous extracts induced *let-7a* suppress EV71 replication and pathogenesis *in vitro* and *in vivo* and is predicted to inhibit SARS-CoV-2 [J]. Viruses, 2021, 13(2): 308.
- [16] Yu R, Chen L, Lan R, et al. Computational screening of antagonists against the SARS-CoV-2 (COVID-19) coronavirus by molecular docking [J]. Int J Antimicrob Agents, 2020, 56(2): 106012.
- [17] Yeh Y C, Doan L H, Huang Z Y, et al. Honeysuckle (*Lonicera japonica*) and Huangqi (*Astragalus membranaceus*) suppress SARS-CoV-2 entry and COVID-19 related cytokine storm *in vitro* [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 765553.
- [18] Cai Z C, Wang C C, Zou L S, et al. Comparison of multiple bioactive constituents in the flower and the caulis of *Lonicera japonica* based on UFLC-QTRAP-MS/MS combined with multivariate statistical analysis [J]. Molecules, 2019, 24(10): 1936.
- [19] 龚兴成, 刘文静, 曹丽波, 等. DI-MS/MSALL 法快速定性分析金银花的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2220-2228.
- Gong X C, Liu W J, Cao L B, et al. Rapid chemome profiling of chemical components of *Lonicerae Japonicae Flos* using DI-MS/MSALL [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(9): 2220-2228.
- [20] 李泮霖, 李楚源, 刘孟华, 等. 基于 UFLC-Triple-Q-TOF-MS/MS 技术的金银花、山银花化学成分比较 [J]. 中南药学, 2016, 14(4): 363-369.
- Li P L, Li C Y, Liu M H, et al. Systematic analysis of chemical constitute of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* by UFLC-Triple-Q-TOF-MS/MS [J]. Cent South Pharm, 2016, 14(4): 363-369.
- [21] Qiu S, Bai M, Zhao P, et al. Phytochemical and network-based chemotaxonomic study of *Lonicera japonica* Thunb [J]. Biochem Syst Ecol, 2021, 94: 104210.
- [22] 刘畅, 周枝, 尹志刚, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探究金银花入血成分干预新型冠状病毒肺炎的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(2): 264-274.
- Liu C, Zhou Z, Yin Z G, et al. Explore mechanism of blood components *Lonicerae Japonicae Flos* intervening COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. Drugs Clin, 2022, 37(2): 264-274.
- [23] Lin H W, Lee Y J, Yang D J, et al. Anti-inflammatory effects of *Flos Lonicerae Japonicae* water extract are regulated by the STAT/NF- κ B pathway and HO-1 expression in Virus-infected RAW_{264.7} cells [J]. Int J Med Sci, 2021, 18(11): 2285-2293.
- [24] Shah M A, Rasul A, Yousaf R, et al. Combination of natural antivirals and potent immune invigorators: A natural remedy to combat COVID-19 [J]. Phytother Res, 2021, 35(12): 6530-6551.
- [25] Geiger J D, Khan N, Murugan M, et al. Possible role of adenosine in COVID-19 pathogenesis and therapeutic opportunities [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 594487.
- [26] Caracciolo M, Correale P, Mangano C, et al. Efficacy and effect of inhaled adenosine treatment in hospitalized COVID-19 patients [J]. Front Immunol, 2021, 12: 613070.
- [27] Farhat A, Ben Hlima H, Khemakhem B, et al. Apigenin analogues as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: *In-silico* screening approach [J]. Bioengineered, 2022, 13(2): 3350-3361.
- [28] Moezzi M S. Comprehensive *in silico* screening of flavonoids against SARS-CoV-2 main protease [J]. J Biomol Struct Dyn, 2023, 41(19): 9448-9461.
- [29] Pang G F, Yi T Z, Luo H C, et al. Preclinical findings: The pharmacological targets and molecular mechanisms of ferulic acid treatment for COVID-19 and osteosarcoma *via* targeting autophagy [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 971687.
- [30] Allam A E, Amen Y, Ashour A, et al. *In silico* study of natural compounds from sesame against COVID-19 by targeting M^{pro}, PL^{pro} and RdRp [J]. RSC Adv, 2021, 11(36): 22398-22408.
- [31] Venkataraman T, Frieman M B. The role of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in SARS coronavirus-induced pulmonary fibrosis [J]. Antiviral Res, 2017, 143: 142-150.
- [32] Pan Q, Qiao F, Gao C, et al. Cdk5 targets active Src for ubiquitin-dependent degradation by phosphorylating Src (S75) [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(20): 3425-3436.
- [33] Gassen N C, Papies J, Bajaj T, et al. SARS-CoV-2-mediated dysregulation of metabolism and autophagy uncovers host-targeting antivirals [J]. Nat Commun,

- 2021, 12(1): 3818.
- [34] Hu H, Tao L, Wang Y B, et al. Enhancing immune responses against SARS-CoV nucleocapsid DNA vaccine by co-inoculating interleukin-2 expressing vector in mice [J]. Biotechnol Lett, 2009, 31(11): 1685-1693.
- [35] Yildiz Gulhan P, Erozu R, Ataoglu O, et al. The evaluation of both the expression and serum protein levels of Caspase-3 gene in patients with different degrees of SARS-CoV2 infection [J]. J Med Virol, 2022, 94(3): 897-905.
- [36] Guo Y, Hu K, Li Y X, et al. Targeting TNF- α for COVID-19: Recent advanced and controversies [J]. Front Public Health, 2022, 10: 833967.
- [37] Li Z B, Wang D K, Messing E M, et al. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1 α [J]. EMBO Rep, 2005, 6(4): 373-378.
- [38] Jahani M, Dokaneheifard S, Mansouri K. Hypoxia: A key feature of COVID-19 launching activation of HIF-1 and cytokine storm [J]. J Inflamm, 2020, 17: 33.
- [39] Tian M F, Liu W Y, Li X, et al. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19 [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 308.
- [40] Goel S, Saheb Sharif-Askari F, Saheb Sharif Askari N, et al. SARS-CoV-2 switches on MAPK and NF- κ B signaling via the reduction of nuclear DUSP1 and DUSP5 expression [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 631879.
- [41] Khezri M R, Ghasemnejad-Berenji M, Moloodsouri D. Hesperetin and the PI3K/AKT pathway: Could their interaction play a role in the entry and replication of the SARS-CoV-2? [J]. J Food Biochem, 2022, 46(9): e14212.
- [42] Alzahrani A S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 125-132.
- [43] Khezri M R. PI3K/AKT signaling pathway: A possible target for adjuvant therapy in COVID-19 [J]. Hum Cell, 2021, 34(2): 700-701.
- [44] Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions [J]. Growth Factors, 2006, 24(1): 21-44.
- [45] Foster D A, Xu L Z. Phospholipase D in cell proliferation and cancer [J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(11): 789-800.
- [46] McDermott M I, Wang Y, Wakelam M J O, et al. Mammalian phospholipase D: Function, and therapeutics [J]. Prog Lipid Res, 2020, 78: 101018.
- [47] Khanmohammadi S, Rezaei N. Role of toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19 [J]. J Med Virol, 2021, 93(5): 2735-2739.
- [48] Krzywinska E, Stockmann C. Hypoxia, metabolism and immune cell function [J]. Biomedicines, 2018, 6(2): 56.
- [49] Cantrell D. Protein kinase B (Akt) regulation and function in T lymphocytes [J]. Semin Immunol, 2002, 14(1): 19-26.
- [50] Zhang W, Liu H T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells [J]. Cell Res, 2002, 12(1): 9-18.
- [51] Soleimani Asl S, Roozbahani M H. A novel robust inhibitor of papain-like protease (PLpro) as a COVID-19 drug [J]. J Biomol Struct Dyn, 2024, 42(13): 6863-6870.
- [52] Chien L H, Deng J S, Jiang W P, et al. Study on the potential of *Sanghuangporus sanghuang* and its components as COVID-19 spike protein receptor binding domain inhibitors [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113434.
- [53] Ali A M, Kunugi H. *Propolis*, bee honey, and their components protect against coronavirus disease 2019 (COVID-19): A review of *in silico*, *in vitro*, and clinical studies [J]. Molecules, 2021, 26(5): 1232.
- [54] Chandra A, Chaudhary M, Qamar I, et al. *In silico* identification and validation of natural antiviral compounds as potential inhibitors of SARS-CoV-2 methyltransferase [J]. J Biomol Struct Dyn, 2022, 40(14): 6534-6544.

[责任编辑 齐静雯]