

基于网络药理学和分子对接技术的抗病毒颗粒治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在物质基础研究

姚运秀^{1,2}, 贺桢翔², 刘晓凤³, 何勇志², 雷 阳², 张书滔², 赵灵丽², 刘 涛^{1,2*}

1. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530000

2. 成都大学药学与生物工程学院, 四川 成都 610106

3. 四川天一学院, 四川 德阳 618000

摘要: 目的 通过网络药理学及分子对接技术探寻抗病毒颗粒治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在物质基础。方法 借助 TCMSP 检索抗病毒颗粒中板蓝根、连翘、石膏、知母、芦根、地黄、广藿香、石菖蒲、郁金的化学成分和作用靶点。通过 UniProt 数据库查询靶点对应的基因, 进而运用 Cytoscape 3.6.1 构建药材-化合物-靶点 (基因) 网络, 通过 DAVID 进行基因本体 (GO) 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 预测其作用机制, 将药材-化合物-靶点网络中排名前 15 的成分与新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 3CL 水解酶进行分子对接, 同时将比枯枯灵、木犀草素、槲皮素与血管紧张素转化酶 II (ACE2) 进行分子对接。结果 药材-化合物-靶点 (基因) 网络包含药材 8 个、化合物 75 个、靶点 255 个。GO 功能富集分析得到 GO 条目 161 个 ($P < 0.05$), 其中生物过程 (BP) 条目 65 个, 细胞组成 (CC) 条目 36 个, 分子功能 (MF) 条目 60 个。KEGG 通路富集筛选得到 131 条信号通路 ($P < 0.05$)。分子对接结果显示抗病毒颗粒中比枯枯灵、木犀草素、槲皮素等核心活性化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的亲和力与临床推荐化学药相似。结论 抗病毒颗粒中的活性化合物比枯枯灵、木犀草素、槲皮素等能通过与 ACE2 结合作用于 PTGS2、HSP90AB1、PTGS1 等靶点调节多条信号通路, 从而可能发挥对 COVID-19 的治疗作用。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 抗病毒颗粒; 新型冠状病毒肺炎; 血管紧张素转换酶 II; 比枯枯灵; 木犀草素; 槲皮素
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)06-1386-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.003

Potential material basis of Kangbingdu Granules for treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) based on network pharmacology and molecular docking technology

YAO Yun-xiu^{1,2}, HE Zhen-xiang², LIU Xiao-feng³, HE Yong-zhi², LEI Yang², ZHANG Shu-tao², ZHAO Ling-li², LIU Tao^{1,2}

1. School of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530000, China

2. College of Pharmacy and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

3. Sichuan Tianyi University, Deyang 618000, China

Abstract: Objective To explore the potential material basis of Kangbingdu Granules for the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) through network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The chemical constituents and action targets of *Isatidis Radix*, *Forsythiae Fructus*, *Gypsum Fibrosum*, *Anemarrhenae Rhizoma*, *Phragmitis Rhizoma*, *Rehmanniae Radix Praeparata*, *Pogostemon cablin*, *Acoritataninowii Rhizoma* and *Curcumae Radix* in Kangbingdu Granules were searched by TCMSP. The gene corresponding to the target was searched by UniProt database, and Cytoscape 3.6.1 was used to build a medicinal material-compound-target (gene) network. DAVID was used to perform gene ontology (GO) function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis to predict its mechanism. Molecular docking of the top 15 components was carried out in the medicinal material-compound-target network with SARS-CoV-2 3CL hydrolase, and molecular docking with bicuculline, luteolin, quercetin and angiotensin-converting enzyme II (ACE2) was performed. **Results** The medicinal material-compound-target (gene) network contained eight medicinal materials, 75 compounds and 255 targets. GO function enrichment analysis revealed 161 GO

收稿日期: 2020-02-16

基金项目: 2020 年成都市龙泉驿区科技计划项目 (新型冠状病毒感染的肺炎疫情防控专项); 四川省科学技术厅 2020 年省级科技计划项目

作者简介: 姚运秀 (1995—), 在读研究生。Tel: 18328019891 E-mail: 2606273248@qq.com

*通信作者 刘 涛 (1976—), 博士, 研究员级高级工程师, 主要从事中成药新药开发及再评价工作。Tel: 13378118375 E-mail: liutao0578@sina.com

items ($P < 0.05$), including 65 biological process (BP) items, 36 cell composition (CC) items, and 60 molecular function (MF) items. KEGG pathway enrichment screened 131 signaling pathways ($P < 0.05$). The results of molecular docking showed that the core active compounds such as bicuculline, luteolin, and quercetin in the Kangbingdu Granules had similar affinities with those recommended by COVID-19. **Conclusion** The active compounds in Kangbingdu Granules can interact with angiotensin-converting enzyme II (ACE2) via targets PTGS2, HSP90AB1, and PTGS1 to regulate multiple signaling pathways, thereby exerting therapeutic effects on COVID-19.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Kangbingdu Granules; coronavirus disease 2019 (COVID-19); angiotensin converting enzyme II; bicuculline; luteolin; quercetin

2019 年 12 月底,我国湖北省武汉市部分医院发现不明原因肺炎病例,经过致病源分析表明是一种新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的疾病,2020 年 2 月 11 日,世界卫生组织(WHO)将这种疾病命名为 COVID-19 (coronavirus disease 2019)。COVID-19 具有强烈传染性、家族聚集性^[1],人群普遍易感且其临床表现具有多样性与不典型性^[2]的特点。轻型患者仅表现为低热、轻微乏力等,无肺炎表现,严重者快速进展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、出凝血功能障碍等^[3]。COVID-19 确诊病例数量仍然在上升,疫情防控形势严峻。截至 2020 年 2 月 27 日 24 时,据 31 个省(自治区、直辖市)和新疆生产建设兵团报告,我国累计报告确诊病例 78 824 例,现有疑似病例 2 308 例^[4]。目前针对于 COVID-19,还没有确切有效的抗病毒治疗方法,主要采用中西医结合对症治疗。西医治疗时一般试用 α -干扰素雾化吸入、洛匹那韦/利托那韦或可加用利巴韦林。而这些抗病毒药物及激素治疗缺乏循证依据,且多伴随腹泻、恶心、呕吐、肝功能损害等不良反应。COVID-19 属于中医“疫”病范畴,在数千年中华文明史上,中医药学对于瘟疫诊治积累了丰富的临床经验,中医药的参与有助于降低病死率、提高预后。

抗病毒颗粒是以《伤寒论》为基础,依中医经典名方“白虎汤”“菖蒲郁金汤”“清瘟败毒饮”加减化裁而成,由板蓝根、连翘、石膏、知母、芦根、地黄、广藿香、石菖蒲、郁金所组成。板蓝根味苦、性寒,具有清热解毒、凉血利咽的功效,在抗病毒方面疗效确切,是较为广谱的天然抗病毒药物。连翘既有辛凉透邪、清热之功,又具芳香辟秽解毒之效;芦根可清热生津;石膏可清热泻火、除烦止渴;知母为苦寒之性滋阴降火;地黄可解热消炎;广藿香可开胃止呕;石菖蒲去湿;郁金行气解郁。抗病毒颗粒可清热祛湿、凉血解毒,兼具抗病毒、退热、抗炎及改善头昏、鼻塞、流涕、喷嚏、咳嗽、咽痒、头痛等症状,其已上市多年,临床疗效确切^[5-6]。香

港大学医学院与汕头大学医学院联合流感研究中心国际认可 P3 实验室(WHO 参比实验室)合作研究证实抗病毒颗粒对 H5N1 型高致病性禽流感病毒增殖有良好的抑制作用^[6]。此外,抗病毒颗粒在抗击 2003 年 SARS 病毒和 2009 年甲型 H1N1 流感病毒中均发挥过重要作用。目前抗病毒颗粒已列入广东省卫生健康委员会 2020 年 1 月 22 日发布的“新型冠状病毒感染的肺炎防控物质参考清单——医疗机构参考药品需求目录”及《四川省新型冠状病毒感染的肺炎中医药防控技术指南》(2020 年 2 月 4 日)推荐用药^[7],推荐用于 COVID-19 的儿童预防以及成人医学观察期发热或伴咳嗽、咽痛患者。

网络药理学是以高通量组学数据分析、计算机虚拟计算及网络数据库检索为基础,在系统生物学的理论基础上,对生物系统进行网络分析,从整体上预测药物靶点、提高药物发现效率的新兴学科^[8]。其系统性、整体性的特点与中药复方组方配伍的整体观不谋而合^[9]。目前已经被广泛用于筛选活性成分、阐释药物作用机制、研究疾病发病机制等^[10-14]。分子对接则是通过受体的特征及受体与药物分子之间的相互作用方式来预测其结合模式和亲和力的一种理论模拟方法^[15]。本研究拟通过网络药理学和分子对接技术探讨抗病毒颗粒中潜在物质基础,为深入探讨抗病毒颗粒治疗 COVID-19 的物质基础提供参考,同时为治疗 COVID-19 提供新思路。

1 方法

1.1 抗病毒颗粒中成分搜集

采用中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP^[16] (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>),在中药系统药理学平台“信息设定”模块,分别以“板蓝根”“连翘”“石膏”“知母”“芦根”“地黄”“广藿香”“石菖蒲”“郁金”为关键词检索获得抗病毒颗粒中所含的化学成分。

1.2 活性化合物及靶标蛋白的筛选

口服生物利用度(OB)是药物吸收、分布、代谢、排泄(ADME)中最重要的药动力学参数之一,

它表示口服药物的有效成分或活性基被吸收到达体循环并被吸收的速度与程度,是评价药物能否发挥药效的重要指标。类药性(DL)值代表成分与已知化学药的相似性,对确定中药成分是否对机体产生活性具有重要参考价值^[17]。OB 值越高通常表示药物的生物活性分子的 DL 越好^[18]。考虑到抗病毒颗粒采用口服的给药方式。因此在 TCMSP 数据库中使用 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 筛选抗病毒颗粒的活性成分,并利用 TCMSP 数据库中的靶点预测功能收搜抗病毒颗粒中化学成分的靶标蛋白,借助 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库,通过导入蛋白名称并限定物种为人,将检索得到的所有蛋白靶标校正为 UniprotID,并得到靶标蛋白所对应的基因名。

1.3 药材-化合物-靶点网络的构建

先将化合物基因带入蛋白质相互作用分析平台 STRING (<https://string-db.org/>),获取蛋白相互作用的关系,再将方中药材、化合物、靶点导入 Cytoscape Version 3.6.1 软件构建“药材-化合物-靶点”网络。设置节点度(degree)值大于所有节点连接度 2 倍中位数为标准进行筛选,确定关键节点,探讨抗病毒颗粒的潜在物质基础。

1.4 靶点通路分析

为进一步观察作用靶标的生物学功能,将所有化合物靶基因导入到 DAVID 数据库中对其进行通路富集分析。在 DAVID 的基因列表通用管理面板中复制粘贴基因列表,Select Identifier 选择“OFFICIAL GENE SYMBOL”,List Type 设置为“Gene List”,提交基因列表;为所提交的基因列表选择对应的物种“Homo Sapiens”,选择 GO (gene ontology) 生物学过程富集分析和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 信号通路富集分析,点击“Functional Annotation Chart”获得通路富集结果。使用 Omicshare 数据库 (<http://www.omicshare.com>) 绘制成气泡图,用 GraphPad Prism 6.0 软件绘制柱状图。

1.5 成分-靶点分子对接

先从 RSCB PDB 数据库^[15] (<https://www.rcsb.org/>) 下载 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和血管紧张素转化酶 II (ACE2) 的 3D 结构 pdb 格式文件,运用 Discovery Studio 2020 Client 软件移除靶蛋白中的配体和非蛋白分子(如水分子),再保存为 pdb 后缀的文件。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载化合物 2D 结构的 sdf 格式

文件。利用 PyRx 软件先上传去水加氢后的蛋白质文件,将其转化为 pdbqt 格式文件,再上传化合物文件使其能量最小化,并将其转化为 pdbqt 格式文件,最后运用 vina 进行对接。结合能小于 0 说明配体与受体可以自发结合,研究选取结合能 ≤ -5.0 kJ/mol^[19] 的活性成分作为抗病毒颗粒治疗 COVID-19 靶点的筛选依据。

2 结果

2.1 活性化合物的筛选

通过 TCMSP 检索到板蓝根、连翘、石膏、知母、芦根、地黄、广藿香、石菖蒲、郁金中化合物共 928 个,其中 169 个来自板蓝根,150 个来自连翘,81 个来自知母,31 个来自芦根,76 个来自地黄,94 个来自广藿香,105 个来自石菖蒲,222 个来自郁金,石膏的化学成分并未在数据库中查到。以 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$,剔除缺少靶点预测数据的化合物,筛选出活性化合物 85 个,其中 35 个来自板蓝根,19 个来自连翘,12 个来自知母,1 个来自芦根,2 个来自地黄,9 个来自广藿香,4 个来自石菖蒲,3 个来自郁金。抗病毒颗粒中活性化合物基本信息见表 1。

2.2 药材-化合物-靶点网络

药材-化合物-靶点网络总共包括 338 个节点(8 个药材节点、75 个化合物节点、255 个靶点节点)和 1 542 条边,其中墨绿色箭头代表药材,红色圆形代表化合物,紫色菱形代表靶点,边代表三者之间的相互作用,其中波浪线代表药材与化合物之间的关系,实线代表化合物与靶点的关系,虚线是靶点之间的相互作用关系,节点的大小与节点的度值呈正比例关系(图 1)。从图中可看出抗病毒颗粒中存在一个化合物与多个靶点作用,同时也存在不同化合物共同作用于同一个靶点的现象,这体现了中药多成分与多靶点之间共同作用的机制。在网络中,一个节点的度值表示网络中和节点相连的节点的数量,利用节点度值排序确定网络关键节点是目前网络分析的主要策略之一,一般认为节点的连接度大于等于所有节点连接度 2 倍中位数则对整个网络具有重要的贡献意义。本研究根据网络的拓扑学性质度值排序确定关键节点,网络中度值 > 中位数(成分度值中位数 = 10,靶点度值中位数 = 4,药材度值中位数 = 6.5)的药材有 4 个,成分有 34 个,靶点有 116 个。排名前 10 位的化合物分别是 MOL000098-槲皮素、MOL000422-山柰酚、

表 1 抗病毒颗粒中活性化合物的基本信息
Table 1 Basic information of active compounds in Kangbingdu Granules

药材	Mol ID	化合物名称	OB/%	DL
板蓝根	MOL001689	acacetin	34.97	0.24
	MOL002322	isovitexin	31.29	0.72
	MOL001721	isaindigodione	60.12	0.41
	MOL001722	2- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -glucopyranosyl-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3 (4 <i>H</i>)-one	43.62	0.31
	MOL001733	eupatorin	30.23	0.37
	MOL001734	3-[[<i>(2R,3R,5R,6S)</i> -3,5-dihydroxy-6-(1 <i>H</i> -indol-3-yloxy)-4-oxooxan-2-yl] methoxy]-3-oxopropanoic acid	85.87	0.47
	MOL001735	dinatin	30.97	0.27
	MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27
	MOL001749	bis(2-ethylhexyl) phthalate	43.59	0.35
	MOL001750	glucobrassicin	66.02	0.48
	MOL001755	24-ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76
	MOL001756	quindoline	33.17	0.22
	MOL001767	hydroxyindirubin	63.37	0.30
	MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75
	MOL001774	ineketone	37.14	0.30
	MOL001779	sinoacutine	49.11	0.46
	MOL001781	indigo	38.20	0.26
	MOL001782	(2 <i>Z</i>)-2-(2-oxoindolin-3-ylidene) indolin-3-one	48.40	0.26
	MOL001783	2-(9-((3-methyl-2-oxopent-3-en-1-yl)oxy)-2-oxo-1,2,8,9-tetrahydrofuro [2,3- <i>h</i>] quinolin-8-yl) propan-2-yl acetate	64.00	0.57
	MOL001790	linarin	39.84	0.71
	MOL001792	liquiritigenin	32.76	0.18
	MOL001793	(<i>E</i>)-2-[(3-indole) cyanomethylene]-3-indolinone	54.59	0.32
	MOL001798	neohesperidin Qt	71.17	0.27
	MOL001800	rosasterol	35.87	0.75
	MOL001803	sinensetin	50.56	0.45
	MOL001804	stigmasta-5,22-diene-3beta,7alpha-diol	43.04	0.82
	MOL001810	6-(3-oxoindolin-2-ylidene) indolo [2,1- <i>b</i>] quinazolin-12-one	45.28	0.89
	MOL001814	(<i>E</i>)-3-(3,5-dimethoxy-4-hydroxy-benzylidene)-2-indolinone	57.18	0.25
	MOL001820	(<i>E</i>)-3-(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzylidene)-2-indolinone	65.17	0.25
	MOL001828	3-[(3,5-dimethoxy-4-oxo-1-cyclohexa-2,5-dienylidene)methyl]-2,4-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrolo [2,1- <i>b</i>] quinazolin-9-one	51.84	0.56
	MOL001833	glucobrassicin-1-sulfonate Qt	42.52	0.24
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
	MOL000953	cholesterol	37.87	0.68
连翘	MOL000173	wogonin	30.68	0.23
	MOL003283	(2 <i>R,3R,4S</i>)-4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol	66.51	0.39
	MOL003290	(3 <i>R,4R</i>)-3,4-bis [(3,4-dimethoxyphenyl) methyl] oxolan-2-one	52.30	0.48
	MOL003295	(+)-pinoresinol monomethyl ether	53.08	0.57
	MOL003305	phillyrin	36.40	0.86

续表 1

药材	Mol ID	化合物名称	OB/%	DL
连翘	MOL003306	forsythin	85.12	0.57
	MOL003308	(+)-pinoselinol monomethyl ether-4- <i>D</i> -beta-glucoside_qt	61.20	0.57
	MOL003315	3beta-acetyl-20,25-epoxydammarane-24alpha-ol	33.07	0.79
	MOL000211	mairin	55.38	0.78
	MOL003322	forsythinol	81.25	0.57
	MOL003330	(-)-phillygenin	95.04	0.57
	MOL003347	hyperforin	44.03	0.60
	MOL003370	onjixanthone I	79.16	0.30
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
	MOL000522	arctiin	34.45	0.84
	MOL000006	luteolin	36.16	0.25
	MOL000791	bicuculline	69.67	0.88
	MOL000098	quercetin	46.43	0.28
	MOL001677	asperglaucide	58.02	0.52
知母	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
	MOL004373	anhydroicaritin	45.41	0.44
	MOL004489	anemarsaponin F	60.06	0.79
	MOL004497	hippeastrine	51.65	0.62
	MOL004514	timosaponin B III	35.26	0.87
	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
	MOL004528	icariin I	41.58	0.61
	MOL004540	anemarsaponin C	35.50	0.87
	MOL000483	(<i>Z</i>)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)- <i>N</i> -[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	118.35	0.26
	MOL000546	diosgenin	80.88	0.81
芦根	MOL000631	coumaroyltyramine	112.90	0.20
	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
地黄	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
广藿香	MOL002879	diop	43.59	0.39
	MOL005573	genkwanin	37.13	0.24
	MOL005911	5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanon	51.54	0.27
	MOL005916	irisolidone	37.78	0.30
	MOL005918	phenanthrone	38.70	0.33
	MOL005921	quercetin 7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside	49.57	0.27
	MOL005922	acanthoside B	43.35	0.77
	MOL005923	3,23-dihydroxy-12-oleanen-28-oic acid	30.86	0.86
	MOL000098	quercetin	46.43	0.28
石菖蒲	MOL003542	8-isopentenyl-kaempferol	38.04	0.39
	MOL003576	(1 <i>R</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>aS</i>)-1,4-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3,3 <i>a</i> ,4,6,6 <i>a</i> -hexahydrofuro [4,3- <i>c</i>] furan	52.35	0.62
	MOL003578	cycloartenol	38.69	0.78
	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
郁金	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
	MOL004328	naringenin	59.29	0.21

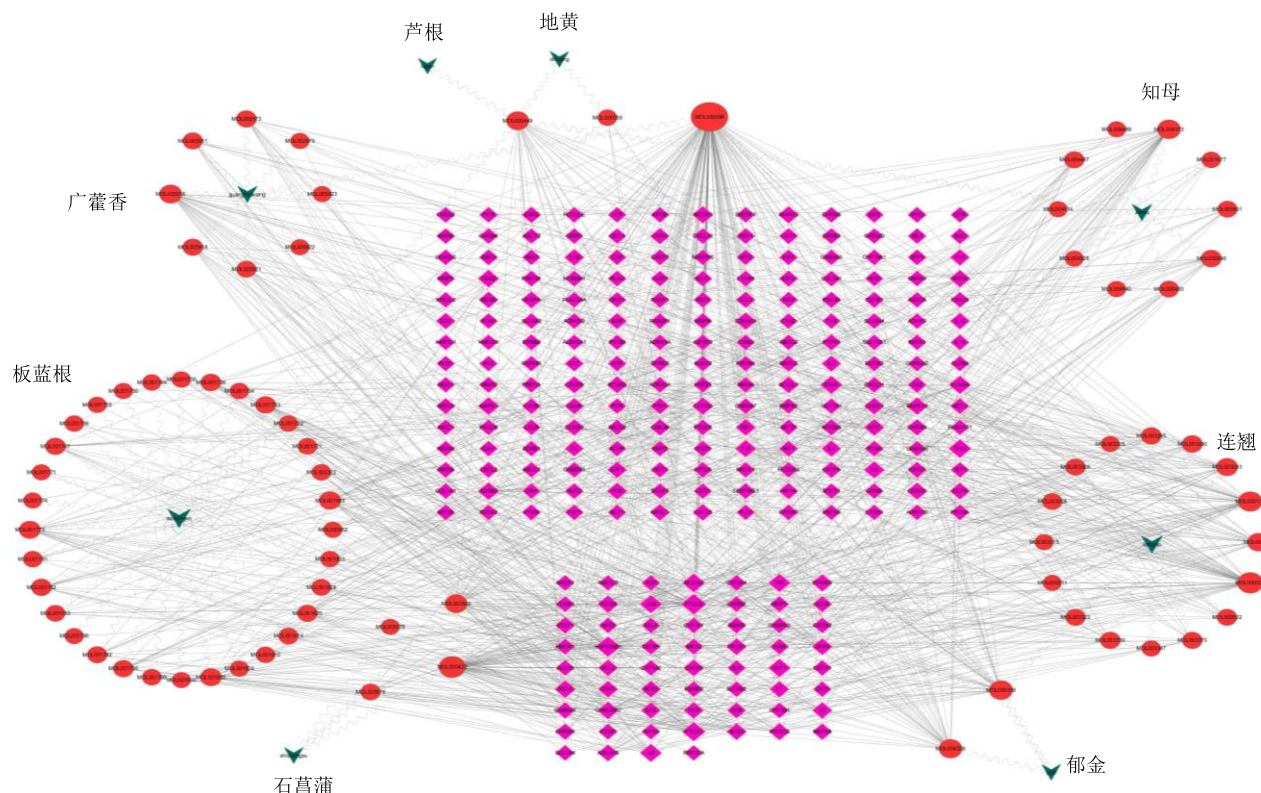


图 1 抗病毒颗粒药材-化合物-靶点网络

Fig. 1 Medicinal material-compound-target network of Kangbingdu Granules

MOL000006-木犀草素、MOL000173-汉黄芩素、MOL000358-β-谷甾醇、MOL004373-去水淫羊藿黄素、MOL004328-柚皮素、MOL000449-豆甾醇、MOL005916-5,7-二羟基-6-甲氧基-3-(4-甲氧基苯基)苯并吡喃-4-酮、MOL003542-去甲脱水淫羊藿黄素，度值分别为 145、63、57、45、39、38、36、32、32、30；排名前 10 位的靶点分别是 PTGS2、HSP90AB1、PTGS1、TP53、NCOA2、AKT1、JUN、TNF、ESR1、SCN5A，度值分别为 55、52、41、35、35、32、31、30、30、30，相对较高，为网络中的关键节点。

2.3 抗病毒颗粒中交集化合物

由药材-化合物-靶点网络可知，抗病毒颗粒中不同的药材里面存在相同的化合物的情况，通过在线韦恩图（图 2）可知，MOL000449-豆甾醇为板蓝根、知母、芦根和地黄所共有；MOL000422-山柰酚为连翘、知母和石菖蒲所共有；MOL000359-谷甾醇为板蓝根、地黄和郁金所共有；MOL000358-β-谷甾醇为板蓝根、连翘和郁金所共有；MOL000098-槲皮素为连翘和广藿香所共有。

2.4 靶点通路分析

DAVID 中 GO 功能富集分析得到 GO 条目 161 个 ($P < 0.05$)，其中生物过程 (BP) 条目 65 个，细胞组成 (CC) 条目 36 个，分子功能 (MF) 条目 60 个，分别占 41%、37%、22%。结果见图 3。

KEGG 通路富集筛选得到 131 条信号通路 ($P < 0.05$)，涉及癌症通路、前列腺癌通路、TNF 信号通路和小细胞肺癌通路等，见图 4。

2.5 抗病毒颗粒中核心化合物作用于 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的分子对接

一般认为配体与受体结合的构象稳定时能量越低，发生的作用可能性越大。分子对接结果显示，将抗病毒颗粒在药材-化合物-靶点网络中度值 ≥ 2 倍成分度值中位数的 15 个核心活性化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶进行分子对接，与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶结合能最低的化合物分别为比枯枯灵（结合能为 -26.78 kJ/mol ）、木犀草素（结合能为 -26.78 kJ/mol ）、槲皮素（结合能为 -26.36 kJ/mol ）。以结合能 $\leq -5.0 \text{ kJ/mol}$ 作为筛选标准，可知，抗病毒颗粒中核心化合物与 SARS-CoV-2 3CL

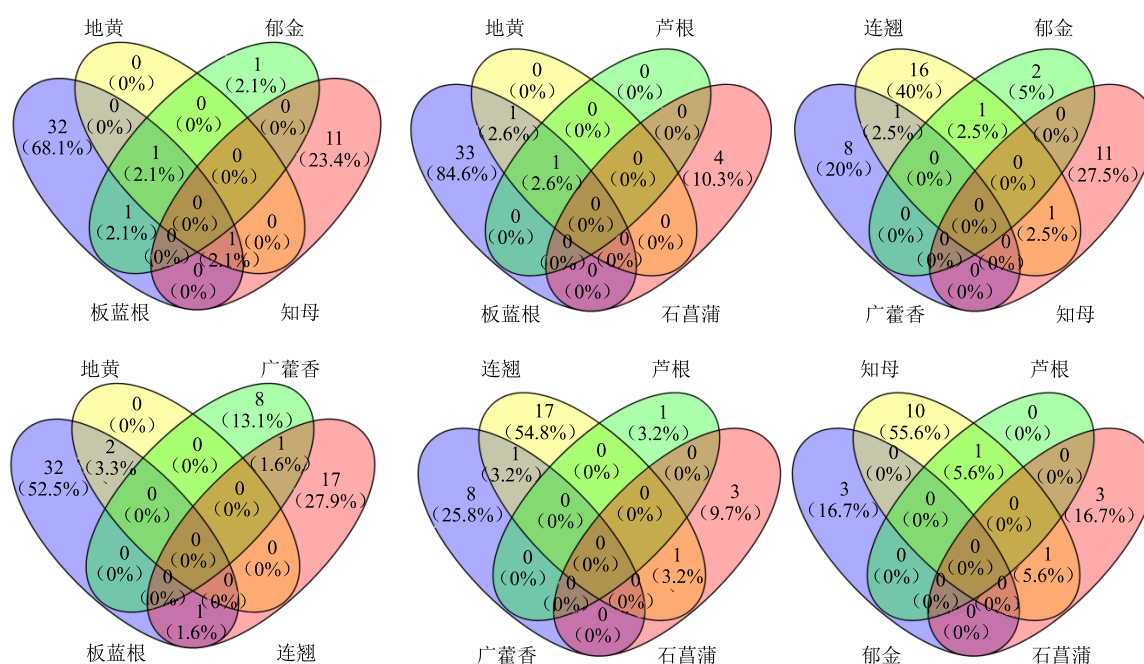


图 2 抗病毒颗粒中交集化合物分布

Fig. 2 Distribution of intersection compounds in Kangbingdu Granules

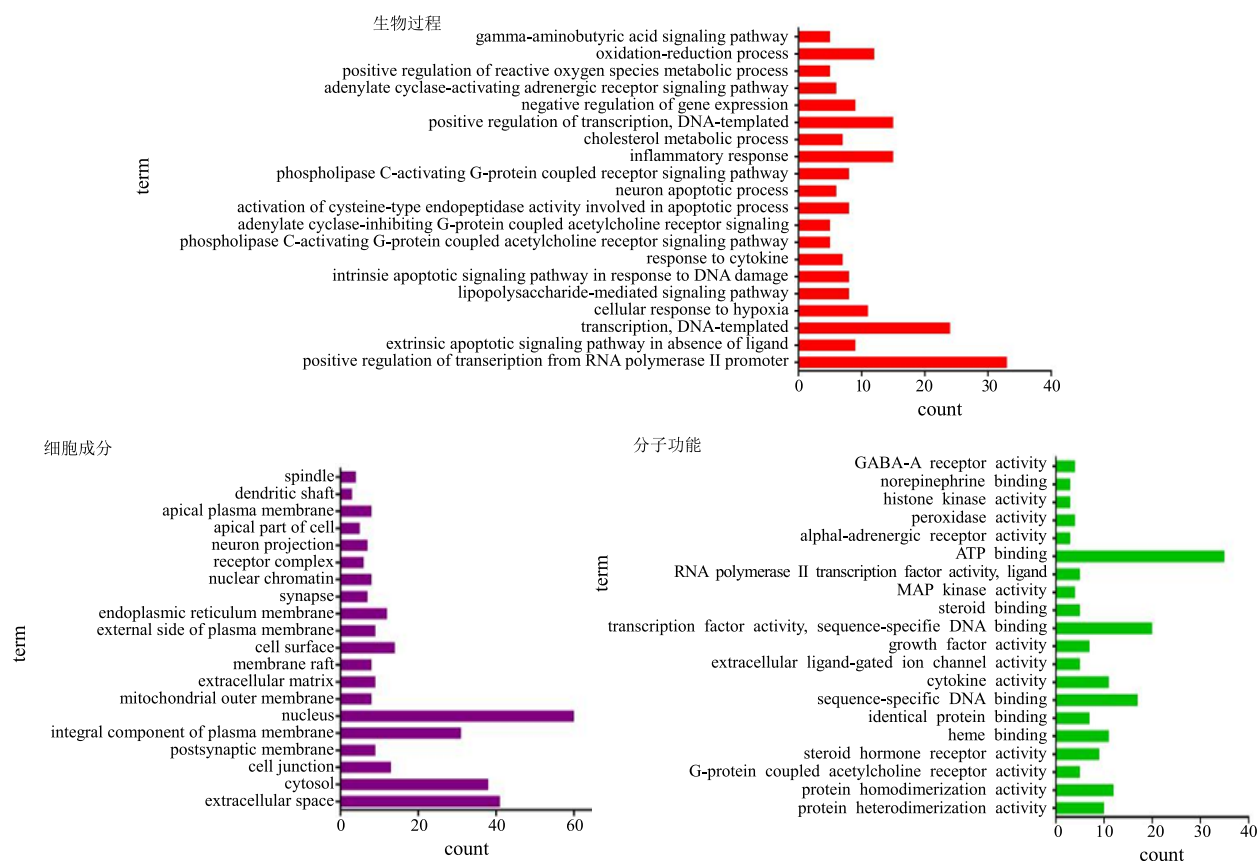


图 3 抗病毒颗粒作用靶点的 GO 富集分析的前 20 个通路

Fig. 3 Top 20 pathways for GO enrichment analysis of targets of Kangbingdu Granules

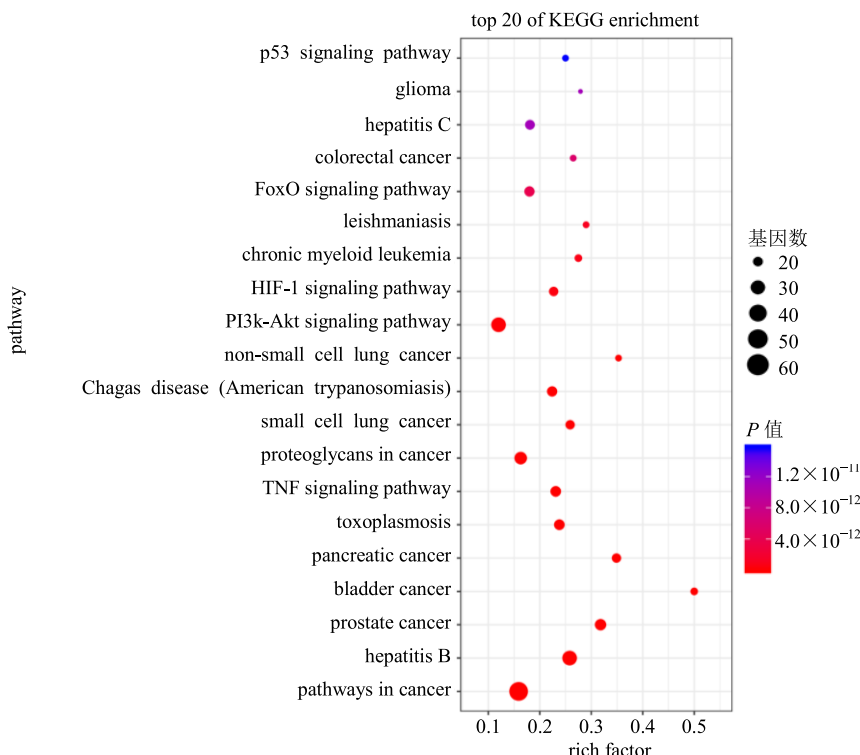


图 4 抗病毒颗粒作用靶点 KEGG 富集分析的前 20 条通路

Fig. 4 Top 20 pathways for KEGG enrichment analysis of targets of Kangbingdu Granules

水解酶结合能均远小于 -5.0 kJ/mol。由此可见抗病毒颗粒中的核心化合物与受体蛋白 SARS-CoV-2 3CL 水解酶形成构象能量低, 结构稳定, 结合活性较高。将抗病毒颗粒及目前报道的可能具有抗 SARS-CoV-2 作用的化学药中结合能最低的 3 种成分分别与 ACE2 (PDB ID: 1R42) 进行分子对接, 结果见表 2 和图 5。

3 讨论

从 COVID-19 疫情发生至今, 国家卫生健康委员会联合国家中医药管理局已经颁布了 7 版《关于新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》, 方案中将抗艾滋病药物“克立芝”纳入治疗药物名单, 虽有一定疗效, 但缺乏针对性。近来有报道称瑞德西韦 (Remdesivir) 能有效抵御病毒感染, 预防和治疗冠状病毒引发的呼吸症状和肺部损伤^[20], 但瑞德西韦的 COVID-19 III 期临床试验还在进行当中, 并不能短时间内广泛用于临床。中医药防治瘟疫具有悠久历史, 中医“治未病”的早期干预、综合治疗的整体调节作用对防控突发流行性传染病具有明显优势。新中国成立以来, 在乙脑、流脑、出血热、甲流等流行传染性疾病预防中, 中医药发挥了重要作

用, 许多有效方法至今临床广泛应用。2003 年, 中医药治疗 SARS 的安全性和有效性得到了政府和世界卫生组织的肯定。而目前, 针对 COVID-19 的治疗尚无有效药物, 西医主要是支持和对症治疗, 中医药治疗瘟疫不是单纯与病毒对抗, 而是注重驱邪与扶正并举, 使邪有出路, 正气得复。根据 COVID-19 的症状表现, 李建生等^[21]认为 COVID-19 属于中医学“湿毒疫”范畴, 主要病因为湿邪疫毒, 首先犯肺, 病位在肺、由气及血, 时及脾胃, 病机特点为“湿、热、毒、瘀、虚”。

在网络药理学研究部分, 发现处方中矿物药石膏在 TCMSP 数据库中未收录其成分, 若换成其他数据库, 存在数据库收录标准和算法不同的问题, 故删除了此药物。查阅文献报道^[22], 生石膏主要治疗外感热病所致的高热烦渴, 肺经实热导致的肺热咳喘, 而石膏的主要成分为硫酸钙, 且肺热咳喘是 COVID-19 的主要症状之一。因此, 将硫酸钙与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶进行分子对接, 结果显示其结合能为 -4.60 kJ/mol, 大于 -5.0 kJ/mol, 因此硫酸钙未纳入抗病毒颗粒治疗 COVID-19 的核心活性化合物。

表 2 抗病毒颗粒中核心化合物以及临床治疗药物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶及 ACE2 的结合亲和力

Table 2 Binding affinities of core compounds in Kangbingdu Granules and clinical treatment drugs with SARS-CoV-2 3CL hydrolase and ACE2

化合物	化学式	相对分子质量	CAS 号	与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶结合能/(kJ·mol ⁻¹)	与 ACE2 结合能/(kJ·mol ⁻¹)
比枯桔灵	C ₂₀ H ₁₇ NO ₆	367.40	485-49-4	-26.78	-41.42
木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	491-70-3	-26.78	-36.82
槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	117-39-5	-26.36	-36.40
去甲脱水淫羊藿黄素	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	354.40	28610-31-3	-25.94	
5,7-二羟基-6-甲氧基-3-(4-甲氧基苯基) 苯并吡喃-4-酮	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.29	2345-17-7	-25.52	
金合欢素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.26	480-44-4	-24.69	
清风藤碱	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.40	4090-18-0	-24.69	
柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.25	480-41-1	-24.27	
汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.26	632-85-9	-23.43	
去水淫羊藿黄素	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368.40	118525-40-9	-22.59	
β-谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	414.70	83-46-5	-22.59	
山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	520-18-3	-22.18	
豆甾醇	C ₂₉ H ₄₈ O	412.70	83-48-7	-22.18	
甜橙黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372.40	2306-27-6	-21.76	
硫酸钙	CaH ₄ O ₆ S	172.17	10101-41-4	-4.60	
瑞德西韦	C ₂₇ H ₃₅ N ₆ O ₈ P	602.60	1809249-37-3	-25.94	-32.22
利巴韦林	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅	244.20	36791-04-5	-25.52	-27.20
利托那韦	C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂	720.90	155213-67-5	-24.69	-34.73
硝唑尼特	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅ S	307.28	55981-09-4	-23.85	
洛匹那韦	C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅	628.80	192725-17-0	-22.59	
法匹拉韦	C ₅ H ₄ FN ₃ O ₂	157.10	259793-96-9	-20.92	
氯喹	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃	319.90	54-05-7	-18.41	

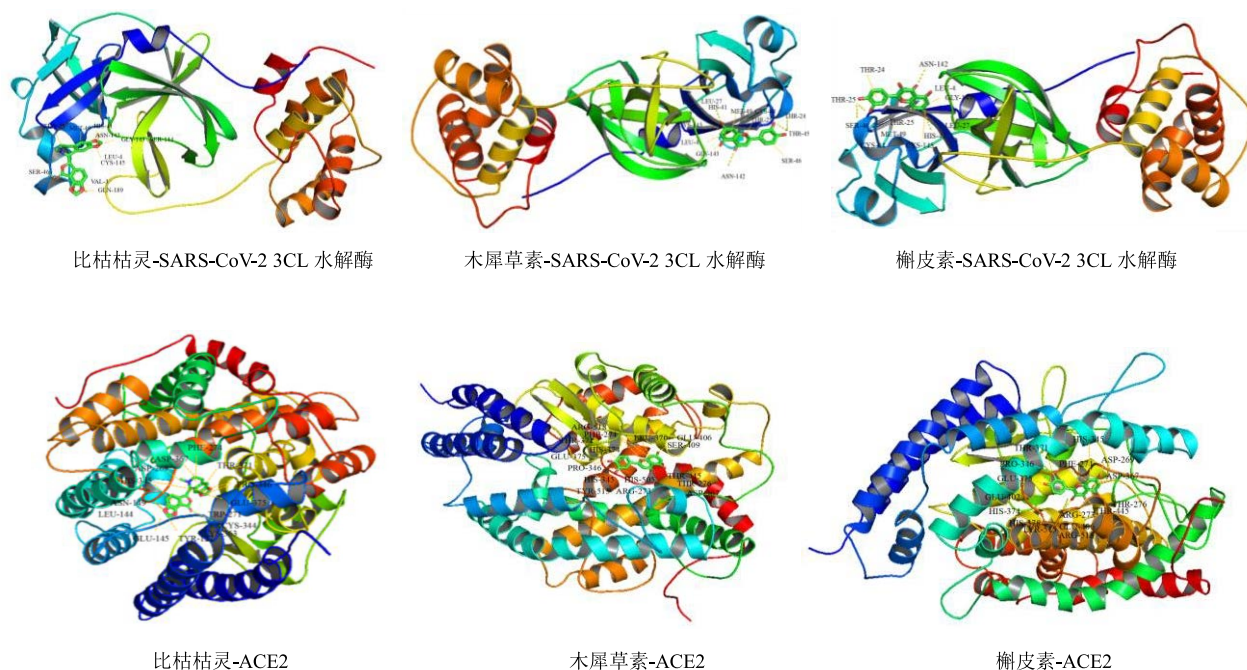


图 5 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 与比枯桔灵、木犀草素、槲皮素的分子对接模式

Fig. 5 Molecular docking of SARS-CoV-2 3CL hydrolase and ACE2 with bicuculline, luteolin and quercetin

通过网络药理学分析可知,抗病毒颗粒中评分最高的 10 个化合物中有 8 个属于黄酮类成分, β -谷甾醇和豆甾醇属于植物甾醇。将这些核心化合物及目前临床推荐使用的化学药与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶进行分子对接对比研究,发现抗病毒颗粒中核心活性化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的结合能与化学药相近甚至优于化学药,尤其是比枯枯灵、木犀草素和槲皮素均低于瑞德西韦、利巴韦林和利托那韦等的结合能。根据文献报道,SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 病毒感染的途径均通过其表达的 S-蛋白与人体内 ACE2 的结合^[23],导致病毒侵入机体而致病。因此本研究又将比枯枯灵、木犀草素、槲皮素、瑞德西韦、利巴韦林和利托那韦与 ACE2 进行分子对接,结果显示比枯枯灵、木犀草素和槲皮素的结合能分别为-41.42、-36.82、-36.40 kJ/mol,瑞德西韦、利巴韦林和利托那韦的结合能分别为-32.22、-27.20、-34.73 kJ/mol,抗病毒颗粒核心化合物结合能均低于化学药的结合能。一般认为配体与受体结合的构象稳定时能量越低,发生的作用可能性越大,结果表明通过网络药理学和分子对接技术筛选出来的核心化合物与 COVID-19 推荐用药与可能靶点的亲和力相似,说明抗病毒颗粒对于治疗 COVID-19 应该有较好的疗效,比枯枯灵、木犀草素、槲皮素等核心化合物可能是抗病毒颗粒治疗 COVID-19 的潜在物质基础。此外,网络药理学分析排名前 3 位的靶点分别是 PTGS2、HSP90AB1 和 PTGS1,均是比枯枯灵、木犀草素和槲皮素的作用靶点。KEGG 分析得到的与 PTGS2、HSP90AB1 和 PTGS1 有关的且排名前 10 的通路有 4 条,分别是癌症通路、前列腺癌通路、TNF 信号通路和小细胞肺癌通路。文献报道表明^[24-26],PTGS2、HSP90AB1、TNF 和小细胞肺癌通路等在影响 RNA 病毒的复制以及在治疗肺炎的过程中起关键作用,利用网络药理学预测抗病毒颗粒治疗 COVID-19 的潜在物质基础具有一定可靠性。根据研究结果,抗病毒颗粒是否通过 PTGS2、HSP90AB1、PTGS1 等靶点作用于癌症通路、前列腺癌通路、TNF 信号通路和小细胞肺癌通路,从而起到抗 COVID-19 的作用需要进一步验证研究。

本研究通过网络药理学和分子对接技术对抗病毒颗粒治疗 COVID-19 的潜在物质基础进行了研究,研究主要是通过查阅已有药材成分从而进行相关分析。而中成药中每种药材的比例不同,且制剂

工艺的不同会导致有效成分溶出的差异。抗病毒颗粒主要采用沸水提取,乙醇沉淀除杂的制备工艺,制剂中的成分大多是既溶于水,又溶于醇的成分,研究筛选出来的主要成分是比较枯灵、木犀草素和槲皮素。通过查阅资料,这些成分的极性适中,能溶解于抗病毒颗粒的制备工艺参数中所用的溶媒,故本研究基于药材成分的分析成药,有一定的依据。当然,由于个别成分含量与制剂中药材处方量和极性有一定的关系,可能在成药中含量不高,甚至没有,因此本课题组后续将根据研究结果,采用现代分析方法对抗病毒颗粒中的成分进行定性定量测定,以期深入研究抗病毒颗粒治疗 COVID-19 的潜在物质基础。

目前中医药对于 COVID-19 的治疗起到了重要作用,在湖北确诊病例救治中,中医药参与度在 75% 以上,在全国其他地区的比例达到 90% 以上。2 月 7 日,国家卫生健康委员会和国家中医药管理局联合发布通知将“清肺排毒汤”推荐用于中西医结合救治新冠肺炎。2 月 14 日,湖北省政府召开发布会,邀请相关专家,介绍中医药参与 COVID-19 疫情防控的有关情况。黄璐琦院士提到采用中西医结合救治 COVID-19 能提高救治的质量,减少死亡,减少重症变成危重症的发生率。本研究基于中药在治疗 COVID-19 临床有效性,以抗病毒颗粒为代表,对其潜在药效成分进行探索,对其靶标、通路进行研究,以期为临床应用提供一定的依据。

综上所述,本研究利用网络药理学和分子对接技术对抗病毒颗粒治疗 COVID-19 的潜在物质基础进行了探索性研究,通过与目前临床推荐使用的化学药进行比较,发现抗病毒颗粒有潜在的治疗作用。课题组在后续研究中也将在此基础之上,对抗病毒颗粒的生产和质量控制过程进行有重点、针对性的控制,以期为抗病毒颗粒治疗 COVID-19 提供理论和实验依据。

参考文献

- [1] 孙增涛,安兴,肖玮,等.基于分期辨证论治探讨新型冠状病毒感染肺炎[J/OL].陕西中医药大学学报,[2020-02-28].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1501.R.20200211.1318.002.html>.
- [2] 扶琼,吕良敬.疫情之下,风湿免疫病合并呼吸道感染的应对策略[J/OL].上海医学,[2020-02-28].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1366.R.20200210.1355.003.html>.

- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)的通知 [EB/OL]. [2020-02-04]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202002/3b09b894ac9b4204a79db5b8912d4440.shtml>.
- [4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会官方网站. 截至 2 月 27 日 24 时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况 [EB/OL]. [2020-02-28]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/202002/d5e15557ee534fcb5aaa9301ea5235f.shtml>.
- [5] 王士强. 新型抗病毒感冒药抗病毒颗粒剂 [J]. 首都医药, 2000(1): 63.
- [6] 曹 晖. 201401-07 ZY-26 抗病毒颗粒抗新发传染性疾病的发明及其应用 [A] // 第四次中华中医药科技成果论坛论文集 [C]. 北京: 中华中医药学会, 2014.
- [7] 四川省中医药管理局. 四川省中医药管理局关于印发《四川省新型冠状病毒感染的肺炎中医药防控技术指南》的通知 [EB/OL]. [2020-02-05]. <http://sctcm.sc.gov.cn/sctcm/gggs/2020/2/5/891d684e02e948128b32547ae2eb8da4.shtml>.
- [8] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [9] 夏聪敏, 许 波, 李 刚, 等. 基于网络药理学探讨桂枝芍药知母汤治疗骨性关节炎的分子机制 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(11): 2681-2684.
- [10] Wei S Z, Zhou X L, Niu M, *et al*. Network pharmacology exploration reveals the bioactive compounds and molecular mechanisms of Li-Ru-Kang against hyperplasia of mammary gland [J]. *Mol Genetics Genomics*, 2019, 294(5): 1159-1171.
- [11] Qin T Y, Wu L L, Hua Q, *et al*. Prediction of the mechanisms of action of Shenkang in chronic kidney disease: A network pharmacology study and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, doi: 10.1016/j.jep.2019.112128.
- [12] Jiang Y Y, Liu N, Zhu S R, *et al*. Elucidation of the mechanisms and molecular targets of Yiqi Shexue Formula for treatment of primary immune thrombocytopenia based on network pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.01136.
- [13] Qu Y, Zhang Z J, Lu Y F, *et al*. Network pharmacology reveals the molecular mechanism of Cuyuxunxi Prescription in promoting wound healing in patients with anal fistula [J]. *Evidence-Based Compl Altern Med: eCAM*, 2019, doi: 10.1155/2019/3865121.
- [14] Niu B X, Zhang H, Li C Y, *et al*. Network pharmacology study on the active components of *Pterocypsela elata* and the mechanism of their effect against cerebral ischemia [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2019, doi: 10.2147/DDDT.S207955.
- [15] 吴 娜, 毛祥坤, 魏 武, 等. 基于网络药理学和分子对接的理肠四方治疗溃疡性结肠炎分子机制的比较研究 [J/OL]. 中 药 材, [2020-02-11]. <https://doi.org/10.13863/j.issn1001-4454.2020.01.036>.
- [16] 陈 璟, 徐贝贝, 徐坠成, 等. 基于网络药理学的防己黄芪汤防治 2 型糖尿病的潜在作用机制研究 [J]. 现代盐化工, 2020, 47(1): 10-13.
- [17] 郭 璐, 夏道宗, 骆叶姣, 等. 基于网络药理学探讨土茯苓治疗痛风的作用机制 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1413-1418.
- [18] 宗 阳, 董宏利, 陈 婷, 等. 基于网络药理学黄芩-黄连药对治疗 2 型糖尿病作用机制探讨 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 888-894.
- [19] 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(2019-nCoV)肺炎活性化合物的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 836-844.
- [20] de Wit E, Feldmann F, Cronin J, *et al*. Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection [J]. *PANS*, 2020, doi: 10.1073/pnas.1922083117.
- [21] 李建生, 李素云, 谢 洋. 河南省新型冠状病毒肺炎中医辨证治疗思路与方法 [J/OL]. 中医学报, [2020-02-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.R.20200224.1332.004.html>.
- [22] 王凤霞. 石膏的药性功效及临床应用文献整理研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [23] 牛 明, 王睿林, 王仲霞, 等. 基于临床经验和分子对接技术的抗新型冠状病毒中医组方快速筛选模式及应用 [J/OL]. 中国中药杂志, [2020-02-16]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20200206.501>.
- [24] Sun J H, Sun F, Yan B, *et al*. Data mining and systematic pharmacology to reveal the mechanisms of traditional Chinese medicine in mycoplasma pneumoniae pneumonia treatment [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, doi: 10.1016/2020/109900.
- [25] 许运斌, 孙玉章, 刘 娟, 等. Hsp90AB1 在狂犬病毒复制过程中的功能初探 [J]. 动物医学进展, 2018, 39(6): 1-5.
- [26] 邓燕君, 刘博文, 贺桢翔, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索藿香正气口服液预防新冠病毒肺炎(COVID-19)活性化合物研究 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1113-1122.