

醒脑静注射液保护新型冠状病毒致神经系统损害的药效网络分析与机制预测

谢丽华^{1,2}, 王瑾茜², 蔺晓源², 秦甜^{1,2}, 胡国恒^{1,2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 探寻醒脑静注射液(XNJI)保护新型冠状病毒(SARS-CoV-2)致神经系统损害的活性成分、靶点及通路,以期阐述其作用机制。**方法** 利用TCMSP、BATMAN、Swiss Target Prediction等数据库检索醒脑静注射液的中药的化学成分和作用靶点,使用Cytoscape软件分别构建醒脑静注射液“中药-活性成分-相关靶点”功效作用网络,通过GO富集和KEGG通路注释分析预测潜在的作用机制,并将醒脑静注射液中核心成分与SARS-CoV-2 3CL Mpro、血管紧张素转化酶II(ACE2)、2019-nCoV RBD/ACE2-B0AT1 complex进行分子对接验证。**结果** 筛选出醒脑静注射液105个活性成分,928个药物靶点,741个冠状病毒靶点,611个神经保护靶点,得到药物-疾病共同靶点83个,核心成分12个,关键靶点7个。GO富集分析共得到204个条目,KEGG注释分析共得到120条信号通路,涉及乙型肝炎通路、致癌通路、TNF、HIF-1及VEGF信号通路等。分子对接结果显示醒脑静注射液核心成分与3CL Mpro、ACE2、和complex的结合活性较好,其中绿莲皂苷元、山柰酚与3个蛋白的结合能均最低。**结论** 醒脑静注射液中核心成分绿莲皂苷元、山柰酚、5-羟基-6,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮、异山柰素、桑黄素、槲皮素、艾黄素、染料木素、龙脑香内酯、姜黄素、榄香素等可能通过作用PARP1、PTGS2、MMP9、CDK2、ADORA2A、ALOX5、GSK3B等关键靶点,干预多种信号通路,调控炎症反应、细胞凋亡、氧化应激、血管生成等过程改善SARS-CoV-2对神经系统的损害,还可能与3CL Mpro、ACE2和complex结合以抑制病毒复制及对宿主细胞的感染,提示醒脑静注射液可能对SARS-CoV-2引发的神经系统损害具有积极的治疗作用。

关键词: 醒脑静注射液; 新型冠状病毒; 神经系统损害; 网络药理学; 分子对接; 绿莲皂苷元; 山柰酚; 5-羟基-6,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮; 异山柰素; 桑黄素; 槲皮素; 艾黄素; 染料木素; 龙脑香内酯; 姜黄素; 榄香素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)12-3211-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.013

Network pharmacological analysis and mechanism prediction of Xingnaojing Injection in treatment of neurological damage caused by SARS-CoV-2

XIE Li-hua^{1,2}, WANG Jin-xi², LIN Xiao-yuan², QIN Tian^{1,2}, HU Guo-heng^{1,2}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: Objective To explore the active compounds, targets and signaling pathways of Xingnaojing Injection (XNJI) for the treatment of neurological damage caused by SARS-CoV-2, so as to explore its mechanism. **Methods** Using TCMSP, BATMAN, Swiss Target Prediction, and other databases, the chemical compounds and targets of XNJI were retrieved. Cytoscape software was used to construct XNJI efficacy network of “drug-compounds-targets” for coronavirus and neuroprotection, and the action mechanism was predicted by Gene Ontology (GO) and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment. Then core compounds were verified by molecular docking with 3CL Mpro, ACE2, and 2019-nCoV RBD/ACE2-B0AT1 complex. **Results** A total of 105 active compounds of XNJI, 928 drug targets, 741 targets of coronavirus, 611 targets of neuroprotection, 83 drug-disease common targets, 12 core compounds, and seven key targets were obtained. The function enrichment analysis of GO yielded 204 entries, KEGG pathway enrichment screened 120 signaling pathways, which included Hepatitis B, pathways in cancer, TNF, HIF-1, and VEGF signaling pathway, and so on. The results of molecular docking showed that core compounds of XNJI had a good bonding activity with

收稿日期: 2020-04-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573941); 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科

作者简介: 谢丽华(1995—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事心脑血管疾病的中医药防治研究。Tel: 18373134510 E-mail: 2497657968@qq.com

*通信作者 胡国恒(1961—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心脑血管疾病的中医药防治研究。

Tel: 13319512298 E-mail: hugh9198@163.com

3CL Mpro, ACE2 and complex. The chlorogenic acid and kaempferol had the lowest binding energy with three proteins and might play an important role in treatment. **Conclusion** The core compounds in XNJI including chlorogenic acid, kaempferol, 5-hydroxy-6,7,3',4',5'-pentamethoxyflavone, 3-methylkaempferol, morin, gardenin, quercetin, artemisinin, genistein, dryobalanone, curcumin, and elemicin, which might interfere with various signaling pathways by acting on key targets like PARP1, PTGS2, MMP9, CDK2, ADORA2A, ALOX5, GSK3B, and regulate the inflammatory response, apoptosis, oxidative stress, angiogenesis, and other processes to improve the neurological damage caused by SARS-CoV-2, and inhibit virus replication and prevent infection of the host cell by binding with 3CL Mpro, ACE2 and complex, which suggest that XNJI may have a positive therapeutic effect on the neurological damage caused by SARS-CoV-2.

Key words: Xingnaojing Injection; SARS-CoV-2; neurological damage; network pharmacology; molecular docking; chlorogenic acid; kaempferol; 5-hydroxy-6,7,3',4',5'-pentamethoxyflavone; isokaempferol; morin; gardenin; quercetin; artemisinin; genistein; dryobalanone; curcumin; elemicin

新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19), 由于其具有较高的传染性和人群易感性, 目前全球仍处于 COVID-19 疫情防控严峻形势之中。新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 主要侵犯呼吸系统, 表现为发热、咳嗽、乏力等症状, 还可累及神经系统^[1]、消化系统^[2]、泌尿系统^[3]等多个系统。目前已发现有一部分 COVID-19 患者发病后伴有头痛、癫痫、意识障碍等颅内感染的症状, 突发吐词不清、肢体瘫痪等急性脑血管病症状, 继发乏力、四肢酸痛、肌酶轻度升高肌肉损害症状^[4]。国家卫生健康委员会和国家中医药管理局印发《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》试行版, 强调中西医结合治疗, 发挥中医药抗病毒作用, 从第四版开始, 推荐了中药注射液的使用, 其中推荐醒脑静注射液作为重型或危重型高热伴意识障碍的 COVID-19 患者的辅助治疗^[5]。

醒脑静注射液由麝香、栀子、郁金、冰片组成, 是由安宫牛黄丸改制成的水溶性注射剂, 具有清热解毒、凉血活血、开窍醒脑之效。临床上主要用于颅脑损伤、急性脑血管疾病、病毒性脑炎、急性中毒等疾病的治疗^[6]。研究表明, 醒脑静注射液治疗急性脑血管疾病, 可以明显降低颅内压, 降低神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 水平, 从而明显改善脑功能和神经缺损症状^[7], 还可通过提高血小板衍生内皮细胞生长因子 (PD-ECGF) 水平, 降低白细胞介素-6 (IL-6)、IL-18 等炎症因子水平, 促进脑血管新生及改善脑神经功能^[8], 提示醒脑静注射液对神经系统具有一定的保护作用。

醒脑静注射液有效成分复杂, 而不同化学成分可通过多靶点、多通路对机体进行综合调控从而发挥治疗 COVID-19 及神经保护作用。网络药理学是基于系统生物学理论而产生的一门新兴学科, 在挖

掘中药活性成分及作用靶点、预测中药作用机制、发展创新药物等方面发挥重要作用^[9-10]。分子对接技术是通过研究配体与受体之间的相互作用力, 预测其结合模式和亲和力的一种模拟方法^[11]。故本研究基于网络药理学对醒脑静注射液抗 COVID-19 及神经保护的潜在活性成分及作用机制进行预测, 并结合分子对接对网络药理学获得核心成分进行验证, 为该药更广泛地应用于 COVID-19 临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

数据库: TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、TCMID 数据库 (<http://www.megabionet.org/tcmid/>)、BATMAN 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、Venny 2.1 在线软件做图工具平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)、STRING 11.0 数据库 (<https://string-db.org/>)、Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)、RCSB PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>)、在线绘图网站 Omicshare (<https://www.omicshare.com/>)。软件: GraphPad Prism 8 软件、ChemDraw 软件、Autodock Vina 1.1.2 软件、Cytoscape 3.6.1 软件、Pymol 软件。

1.2 方法

1.2.1 化学成分的收集 在 TCMSP、BATMAN 数据库中分别以醒脑静注射液组方中药麝香、冰片、郁金、栀子为关键词检索收集其化学成分, 对于 TCMSP 数据库未检索到的单味药麝香, 通过 TCMID 数据库搜索其化学成分。在 TCMSP 数据库中设定口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 ,

BATMAN 数据库中设定 $\text{Score} \geq 20$ 进行筛选, 通过 Pubchem 数据库获取化学成分的分子结构, 并保存各成分的 Canonical SMILES 格式。

1.2.2 潜在靶点的预测 将上述得到的各化学成分 SMILES 格式导入 Swiss 数据库, 以“人类”为研究对象, 得到其作用靶点, 整合去除重复靶点后得到醒脑静注射液潜在的作用靶点。在 GeneCards 数据库、CTD 数据库分别以“coronavirus”“neuroprotection”为关键词检索, 收集冠状病毒、神经保护相关潜在靶点, 合并数据库并保留唯一值。将得到的化学成分靶点、冠状病毒靶点、神经保护靶点分别录入 Venny 2.1 中映射筛选出 3 者的共同靶点, 作为醒脑静注射液抗冠状病毒感染后神经系统损害的潜在靶点, 即化学成分-疾病靶点, 并绘制韦恩图。

1.2.3 作用网络构建与分析 将收集到的冠状病毒、神经保护相关靶点及化学成分-疾病靶点分别导入 STRING 数据库获得蛋白-蛋白互作 (PPI) 网络; 运用 Cytoscape 软件构建醒脑静注射液-化学成分-靶点关系网络, 利用 Cytoscape 软件中 Merge 功能将醒脑静注射液-化学成分-靶点网络分别与冠状病毒、神经保护相关靶点及化学成分-疾病靶点 PPI 网络交集处理, 分别以靶点度 (degree) 值 2 倍中位数为条件进行关键作用网络的筛选^[12], 获得醒脑静注射液-化学成分-冠状病毒关系网络、醒脑静注射液-化学成分-神经保护关系网络; 以成分度值 2 倍中位数为条件筛选^[13], 获得醒脑静注射液核心成分抗冠状病毒神经系统损害的关系网络, 即核心成分-疾病关系网络。使用 NetworkAnalyzer 功能对药物中化学成分、靶点进行分析, 节点的大小代表度值的大小。

1.2.4 通路富集分析 将化学成分-疾病靶点以 Gene Symbol 的格式导入 DAVID 6.8 数据库, 分别选择生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞成分 (cellular component, CC) 进行基因本体 (GO) 富集分析, 选择 KEGG 进行靶点通路注释分析, 并且使用 GraphPad Prism 8 软件将 GO 富集分析满足 $P < 0.05$ 的结果做成可视化条形图。使用 Omicshare (<https://www.omicshare.com/>) 将 KEGG 分析满足 $P < 0.05$ 的结果制成可视化气泡图, 分析醒脑静注射液抗冠状病毒神经系统损害的生物过程和信号通路。

1.2.5 分子对接验证 从 Pubchem 数据库下载核心成分的 3D 结构 SDF 格式文件, 导入 ChemDraw 软件进行分子结构能量优化; 应用 RCSB PDB 数据库

下载 3CL Mpro (PDB ID: 6LU7)、ACE2 (PDB ID:1R42)、2019-nCoV RBD/ACE2-B0AT1 complex (PDB ID:6M17) 的晶体结构, 选择与该靶蛋白特有的小分子配体作为活性中心, 删除靶蛋白的水分子及位于活性口袋位置的配体。在 Mgltools 1.5.6 软件对配体进行加极性氢原子及计算电荷等操作, 并保存为 *pdbqt 格式。使用 Autodock Vina 1.1.2 进行小分子与蛋白对接, 取打分最高的构象, 并用 Pymol 进行分析作图。

2 结果

2.1 醒脑静注射液潜在活性成分

从 TCMSp、TCMID、BATMAN 数据库中检索麝香、冰片、郁金、栀子的活性成分, 根据在 TCMSp 数据库中设定 $\text{OB} \geq 30\%$ 和 $\text{DL} \geq 0.18$, BATMAN 数据库中设定 $\text{Score} \geq 20$, 剔除重复化合物和缺少靶点预测数据的化合物, 最终筛选出 105 个活性成分, 其中麝香 22 个、冰片 20 个、郁金 22 个、栀子 41 个。

2.2 潜在靶点预测

将 Swiss 数据库中得到的预测靶点去重复后, 共得到 928 个化学成分作用靶点, 中药-成分-靶点统计见表 1。通过 GeneCards 数据库、CTD 数据库共得到冠状病毒潜在靶点 741 个靶点, 神经保护潜在靶点 611 个。在 Venny 2.1 在线作图工具平台输入化学成分、冠状病毒、神经保护靶点, 绘制韦恩图, 见图 1。3 者取交集后得到化学成分与冠状病毒共同靶点 177 个, 化学成分与神经保护共同靶点 194 个, 3 者共同靶点 (即化学成分-疾病靶点) 83 个。结果显示, 醒脑静注射液可能通过多个潜在作用靶点协同发挥抗冠状病毒及神经保护作用。

表 1 醒脑静注射液“中药-成分-靶点”基本信息

Table 1 Information on Chinese medicine-compound-target of XNJI

中药名称	成分数量/个	预测靶点数量/个
麝香	22	366
冰片	20	406
郁金	22	467
栀子	41	660

2.3 作用网络构建与分析

通过 Cytoscape 软件构建醒脑静注射液治疗冠状病毒、神经保护的作用网络, 网络中节点的大小与度值呈正比关系, 节点度值越大, 说明该节点在网络中的作用越大。

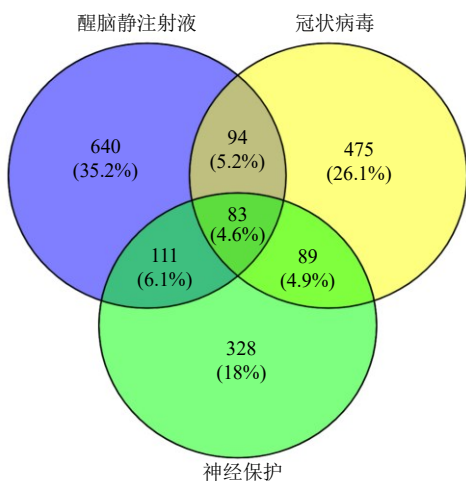


图 1 醒脑静注射液与冠状病毒靶点、神经保护靶点韦恩图
 Fig. 1 Venn diagram of targets in XNJI and coronavirus, neuroprotection

2.3.1 醒脑静注射液抗冠状病毒网络 根据靶点度值 2 倍中位数为筛选条件, 删除与靶点无交集的孤立成分, 构建醒脑静注射液抗冠状病毒作用网络。结果发现, 异山柰素 (3-methylkempferol)、5-羟基-6,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮 (5-hydroxy-6,7,3',4',5'-pentamethoxyflavone)、桑黄素 (morin)、山柰酚 (kaempferol)、槲皮素 (quercetin)、艾黄素 (artemisetin)、栀子黄素 A (gardenin)、金雀异黄酮 (genistein)、姜黄素 (curcumin)、苏丹 III (sudan III)、龙脑香内酯 (dryobalanone) 等 87 个活性成分作用于 PTGS2、ALOX5、CYP17A1、PTGS1、CA9、PPARA、ESR1、PARP1、NOS2、ADORA2A 等 54 个靶点发挥抗冠状病毒的作用。其中, 异山柰素、5-羟基-6,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮、桑黄素、山柰酚、槲皮素分别调控 30、29、29、28、28 个靶点, 见图 2。

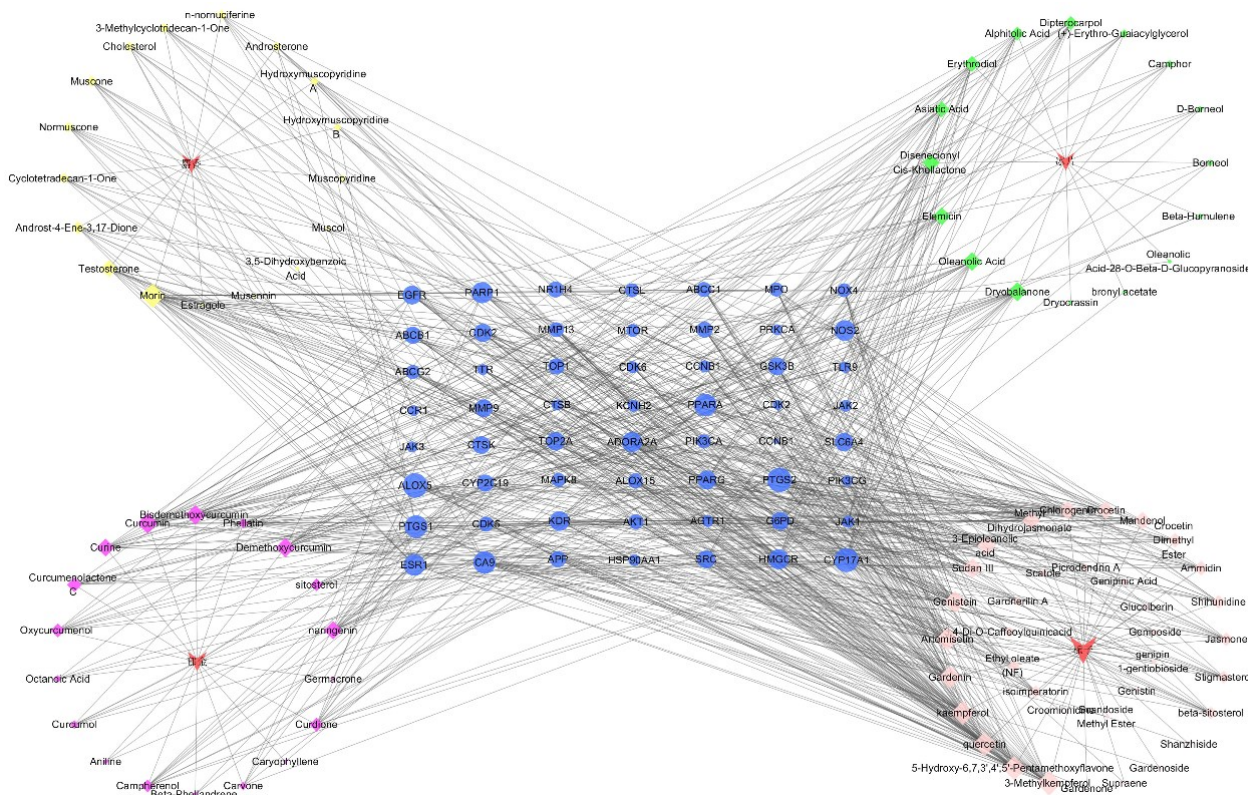


图 2 醒脑静注射液抗冠状病毒作用网络

Fig. 2 Network of anti-coronavirus of XNJI

2.3.2 醒脑静注射液神经保护网络 醒脑静注射液中异山柰素、山柰酚、5-羟基-6,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮、睾酮 (testosterone)、桑黄素、槲皮素、艾黄素、栀子黄素 A、齐墩果酸 (oleanolic acid)、龙脑香内酯等 92 个活性成分通过作用 CYP19A1、AR、

HSD11B1、ALOX5、PTGS2、PTGS1、ACHE、ESR2、PPARA、BACE1 等 56 个靶点保护神经系统。异山柰素作用靶点 30 个, 为方中最多, 其次为山柰酚 29 个, 5-羟基-6,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮 27 个, 睾酮 27 个, 桑黄素 27 个。见图 3。

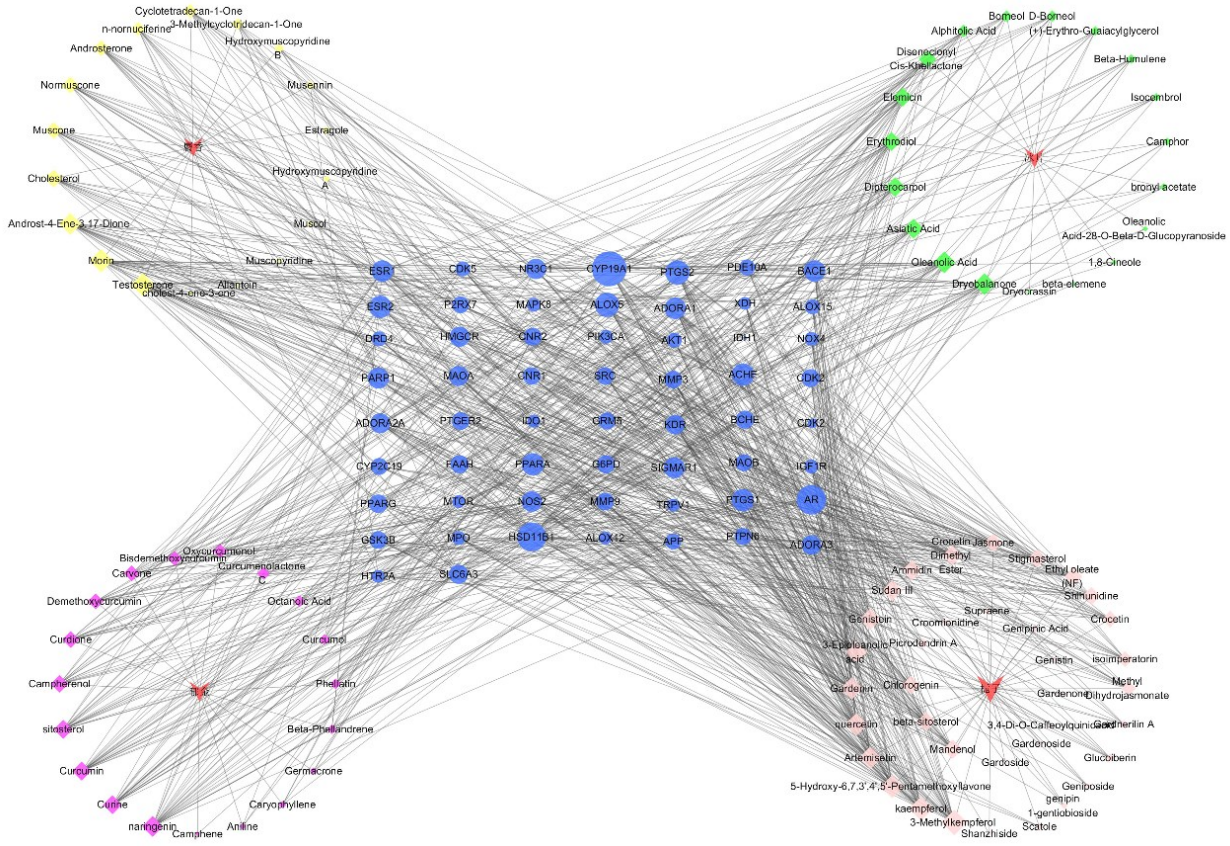


图 3 醒脑静注射液神经保护作用网络

Fig. 3 Network of neuroprotection of XNJI

2.3.3 核心成分-疾病关系网络 根据成分度值 ≥ 2 倍中位数(成分度值中位数=8,靶点度值中位数=5)为条件提取出核心成分-疾病关系网络,见图4。13个核心成分作用于CDK2、KDR、ADORA2A、ALOX5、GSK3B、NOX4、APP、MMP9、PARP1、PTGS2等62个靶点关系网络。该13个核心成分分别是绿莲皂苷元(chlorogenin)、5-羟基-6,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮、异山柰素、桑黄素、栀子黄素A、榄香素(elemicin)、槲皮素、山柰酚、艾黄素、苏丹III、染料木素(genistein)、龙脑香内酯、姜黄素,其中有1个活性成分来自于麝香,1个来自于郁金,2个来自于冰片,9个来自于栀子。苏丹III来源于栀子^[14],具有肝肾损害、致癌、致突变作用^[15],此处不予以分析。在抗冠状病毒关系网络及神经保护关系网络中,这12个化学成分均可作用于15个以上靶点,PARP1、PTGS2、MMP9、CDK2、ADORA2A、ALOX5、GSK3B等靶点均可与15个以上成分相连接,体现了醒脑静注射液多成分、多靶点协同调节的特点,并推测这12个成分和7个靶点是醒脑静注射液抗冠状病毒的神经系统损害的主

要活性成分和关键靶点。

2.4 GO及KEGG靶点通路富集分析

将活性成分-疾病靶点83个录入DAVID数据库中进行GO富集分析得到GO条目,见图5。其中生物过程有156个条目,主要涉及RNA转录调控、炎症反应、细胞凋亡、血管生成等;细胞成分有27个,涉及到细胞核、线粒体、RNA聚合酶II转录因子复合体等;分子功能有21个,主要涉及血红素结合、ATP结合、铁离子结合、过氧化物酶活性等。KEGG注释分析共得到120条信号通路,见图6。主要有乙型肝炎通路(Hepatitis B)、癌症通路(pathways in cancer)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、缺氧诱导因子-1信号通路(HIF-1 signaling pathway)、血管内皮生长因子信号通路(VEGF signaling pathway)、细胞凋亡(apoptosis)等。

2.5 醒脑静注射液核心成分的分子对接验证

一般认为结合能越低,配体与受体结合的构象越稳定,以结合能 ≤ -5.0 kJ/mol作为筛选条件^[16]。研究表明,ACE2是SARS-CoV和SARS-CoV-2的宿主细胞受体,病毒通过其表达的S蛋白与ACE2

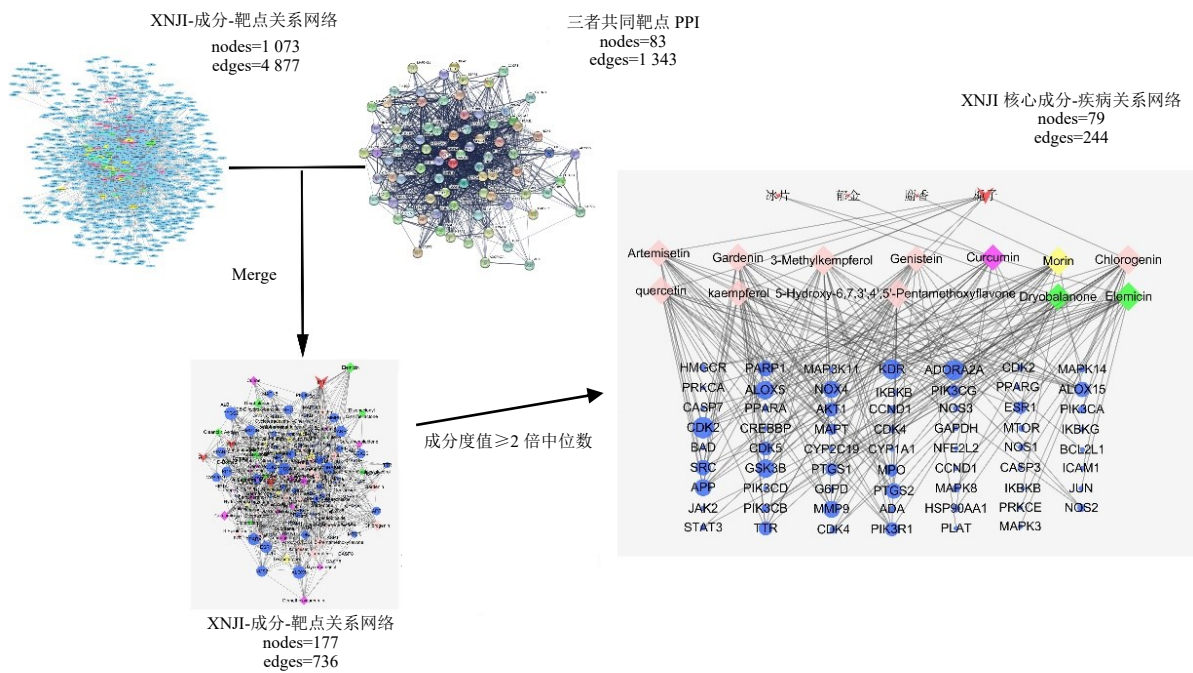


图 4 醒脑静注射液核心成分-疾病相互作用网络

Fig. 4 Network of core compounds-disease interaction network of XNJI

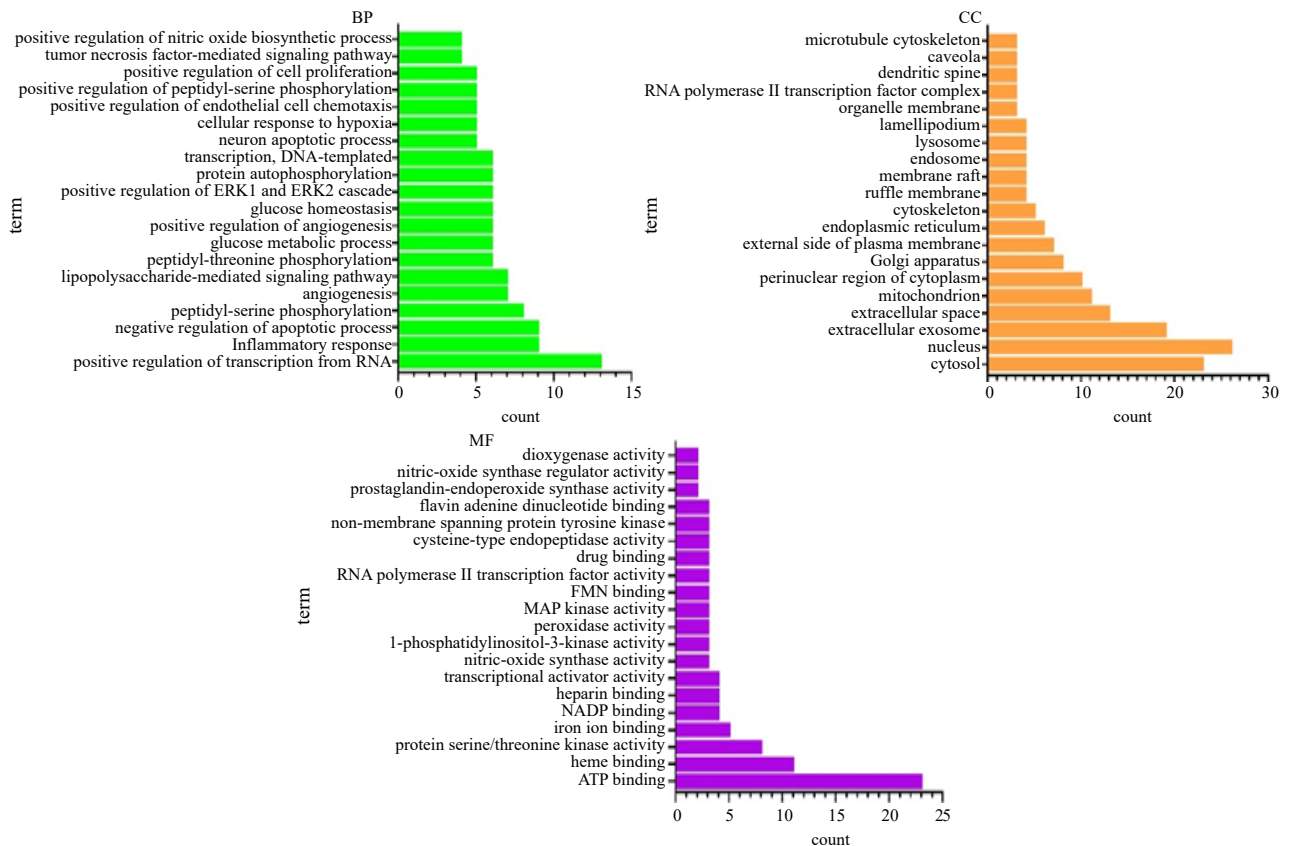


图 5 醒脑静注射液化学成分-疾病靶点的 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of compound-disease target of XNJI

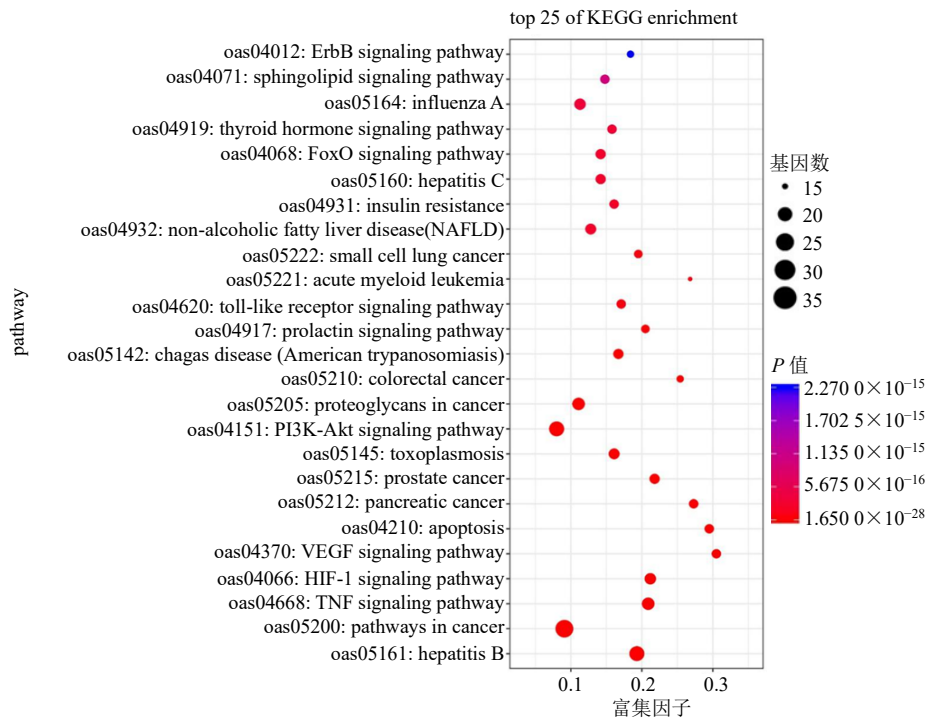


图 6 醒脑静注射液化学成分-疾病靶点 KEGG 富集分析的前 25 条通路

Fig. 6 Top 25 pathways of compound-disease target by KEGG enrichment analysis of XNJI

相结合，从而导致病毒侵入机体而致病^[17]。S 蛋白位于 SARS-CoV-2 最外层，可介导受体识别和膜融合，在病毒感染过程中，S 蛋白被切割成 S1 和 S2 亚基，S1 包含由 300 多个氨基酸构成的受体结合域 (RBD)，可直接与 ACE2 肽酶域结合形成复合体结构 (complex)，而后 S2 负责膜融合，最终使病毒核酸进入细胞^[18]。SARS-CoV-2 属于 RNA 病毒，3CL Mpro 参与单正链 RNA 病毒复制过程中病毒前体蛋白的切割过程，对 RNA 病毒复制起着至关重要的作用^[19]。故竞争性结合 ACE2 减少 S 蛋白与其结合或影响 complex 结构稳定以抑制病毒核酸侵入、抑制 3CL Mpro 活性以干扰病毒复制，可能为抑制 SARS-CoV-2 感染人体的方式。因此，将筛选的 12 个化学成分分别与 3CL Mpro、ACE2、complex 进行分子对接。结果显示，12 个核心化学成分与 3 个蛋白之间的结合能均远远低于 -5.0 kJ/mol，提示醒脑静注射液核心成分均可与 3CL Mpro、ACE2、complex 结合，且具有较好的结合能力，其中绿莲皂苷元、山柰酚与 3 种蛋白的结合能均最低，结果见表 2 和图 7。

3 讨论

SARS-CoV-2 主要以肺为靶器官造成严重损害，同时还可致心脏、肠道、神经系统、泌尿系统等多

部位损害。据统计，此次 COVID-19 患者中，中老年人占大多数，尤其是危重症患者，其中约 30% 伴有慢性基础疾病，以心血管疾病、糖尿病、脑血管疾病为主，发病时常见症状有约 40% 患者伴有肌痛或疲劳，约 8% 患者伴有头痛等神经系统症状^[20-21]，因此，COVID-19 疫情防控背景下，在积极应对 SARS-CoV-2 感染引起的呼吸系统损害外，神经系统损害的管理与积极应对亦至关重要。COVID-19 发病机制目前尚不十分明确，仍缺乏特效治疗药物，中医药辨证治疗发挥重要作用^[22]。COVID-19 属于中医“疫病”范畴，“寒湿疫毒”为其重要病因^[23]，COVID-19 引起的神经系统损害主要与寒湿疫中期、重症期湿、热、毒、瘀、闭的病机相关。寒湿疫毒外侵，正气亏虚于内而染病，在表不解入里或病邪直中于里，湿邪化热，毒邪闭肺，气营两燔，扰乱心神，则见胸闷气促、高热烦躁、甚或谵语；热毒煎灼津液而成瘀，瘀血阻络，脉络不通，筋脉肌肤失于濡养则见肌痛、疲乏；瘀血闭阻清窍，则见头痛、神昏，甚则热毒内闭心包，致内闭外脱而危及生命，诊疗方案推荐治疗可侧重宣肺解毒、开闭固脱、解毒救逆，醒脑静注射液作为推荐中成药，可明显缓解 COVID-19 引起的高热和意识障碍^[5]。

表 2 醒脑静注射液核心成分的结合能

Table 2 Binding energy of core compounds of XNJI

成分中文名	成分英文名	分子式	相对分子质量	CAS	结合能/(kJ·mol ⁻¹)		
					3CL Mpro	ACE2	complex
绿莲皂苷元	chlorogenin	C ₂₇ H ₄₄ O ₄	432.64	562-34-5	-36.82	-41.00	-35.98
5-羟基-6,7,3',4',5'- 五甲氧基黄酮	5-hydroxy-6,7,3',4',5'- pentamethoxyflavone	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	388.37	29215-55-2	-30.54	-32.22	-33.05
异山柰素	3-methylkempferol	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.26	1592-70-7	-30.12	-33.89	-30.96
桑黄素	morin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.24	480-16-0	-32.64	-36.40	-33.05
梔子黄素 A	gardenin	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.39	21187-73-5	-30.12	-29.71	-32.22
榄香素	elemicin	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	208.30	487-11-6	-20.50	-24.27	-23.85
槲皮素	quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.24	117-39-5	-32.22	-34.73	-34.31
山柰酚	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	520-18-3	-36.82	-40.58	-35.98
艾黄素	artemisetin	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	388.37	479-90-3	-31.80	-33.47	-32.22
染料木素	genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24	446-72-0	-33.47	-34.31	-32.22
龙脑香内酯	dryobalanone	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	458.72	17939-10-5	-30.54	-36.82	-34.31
姜黄素	curcumin	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368.38	458-37-7	-29.29	-31.80	-30.96
达芦那韦	darunavir	C ₂₇ H ₃₇ N ₃ O ₇ S	547.66	206361-99-1	-34.31	-35.98	-34.73
瑞德西韦	remdesivir	C ₂₇ H ₃₅ N ₆ O ₈ P	602.58	1809249-37-3	-33.89	-36.40	-35.56
法匹拉韦	favipiravir	C ₅ H ₄ FN ₃ O ₂	157.10	259793-96-9	-23.85	-23.85	-22.59
利巴韦林	ribavirin	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅	244.20	36791-04-5	-27.20	-28.87	-27.20
利托那韦	ritonavir	C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂	720.96	155213-67-5	-33.47	-35.98	-35.56
洛匹那韦	lopinavir	C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅	628.80	192725-17-0	-33.05	-36.40	-36.40
氯喹	chloroquine	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃	319.90	54-05-7	-25.52	-27.61	-25.52
硝唑尼特	nitazoxanide	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅ S	307.28	55981-09-4	-27.61	-28.45	-28.45

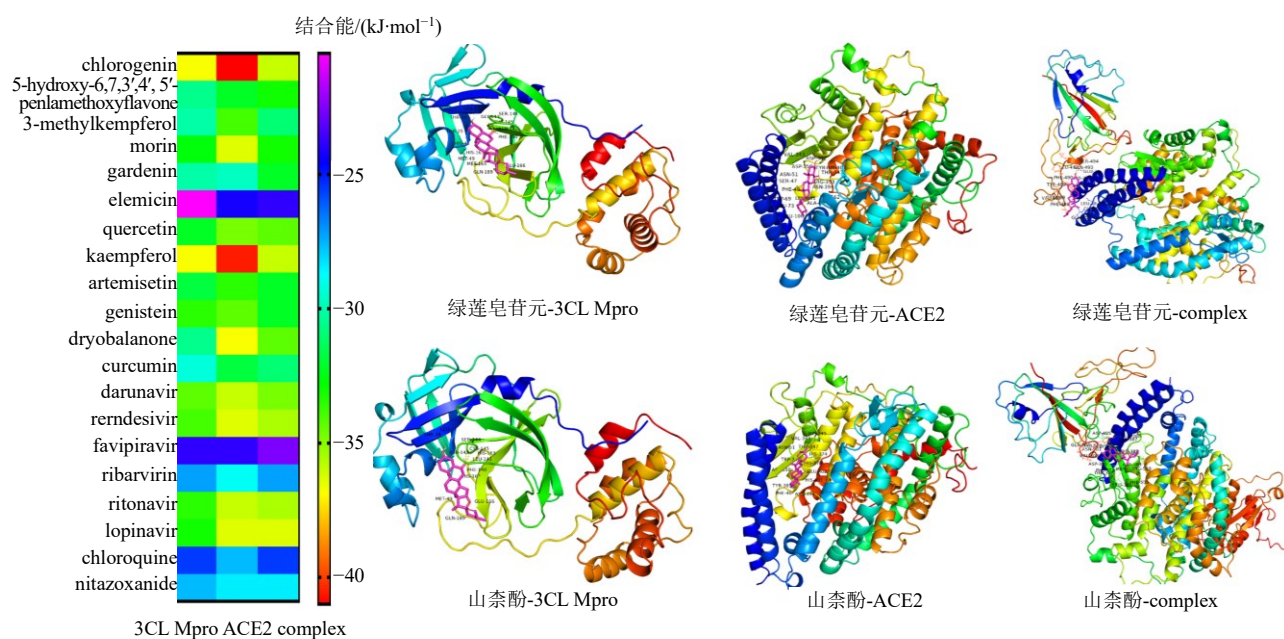


图 7 分子对接热图及绿莲皂苷元、山柰酚与 3CL Mpro、ACE2、complex 的分子对接模式

Fig. 7 Molecular docking heat map and molecular docking diagram of chlorogenin, kaempferol with 3CL Mpro, ACE2, complex

本研究采用网络药理学方法构建醒脑静注射液抗冠状病毒及神经保护的关系网络,结果表明,在冠状病毒感染后,醒脑静注射液 87 个活性成分作用于 PTGS2、ALOX5、CYP17A1、PTGS1 等 54 个靶点发挥抗冠状病毒的作用;在神经系统损害后,92 个活性成分通过调节 CYP19A1、AR、HSD11B1、ALOX5 等 56 个靶点发挥神经保护作用;进一步通过构建醒脑静注射液核心成分抗冠状病毒神经系统损害的关系网络,筛选出绿莲皂苷元、山柰酚、5-羟基-6,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮、异山柰素、桑黄素、槲皮素、艾黄素、染料木素、龙脑香内酯、姜黄素、榄香素等 12 个核心成分,通过分析核心成分分别在抗冠状病毒和神经保护的能力发现,这 12 个活性成分几乎可以调控抗冠状病毒网络和神经保护网络中的所有靶点。12 个核心成分中,除绿莲皂苷元、榄香素、姜黄素、龙脑香内酯,其余 8 个成分均为黄酮类化合物。研究表明,大多数黄酮类化合物具有抗病毒、抗炎、抗氧化、抗微生物、抗肿瘤等作用^[24],还可通过抗氧化、抗细胞凋亡发挥神经保护作用^[25]。槲皮素、木犀草素可抑制 SARS-CoV 3C 样蛋白酶(3CL Mpro)活性以抑制病毒复制^[26],并且可通过抗氧化、抑制神经炎症、促进髓鞘再生、调节自噬等发挥神经保护功效^[27-28]。槲皮素可通过上调 ACE2 水平,下调 ACE、血管紧张素 II(AngII)的表达,减轻心室重构和纤维化^[29],提示槲皮素与 ACE2 具有良好的结合力,推测其可竞争性结合 ACE2,减少 SARS-CoV-2 S 蛋白的结合。通过核心成分-疾病关系网络,筛选出 PARP1、PTGS2、MMP9、CDK2、ADORA2A、ALOX5、GSK3B 等 7 个关键靶点。多聚二磷酸腺苷核糖合成酶(PARP)与基质金属蛋白酶(MMP)的表达在 AngII 诱导的心脏重构发挥重要作用,下调 PARP1 表达,可明显降低 AngII 对心脏成纤维细胞的刺激,降低 MMP-2、MMP-9 水平,改善心脏重构^[30]。ALOX5 为花生四烯酸类家族成员,参与慢性肺部炎症及肺纤维化的发病过程,其机制与调控白三烯生物合成、炎症反应等有关^[31],姜黄素可影响 ALOX5 活性,抑制花生四烯酸/白三烯炎性级联反应^[32]。PTGS2 可调控炎症反应、细胞缺氧等过程,其产物前列腺素 A1(PGA1)能在早期抑制 RNA 病毒复制,PGD2 能调控炎症反应参与外周神经系统的神经再生和髓鞘再生^[33-34],PGE2 在炎症反应中发挥重要作用,山柰酚、桑黄素、槲皮素、染料

木素等黄酮类化合物可抑制脂多糖(LPS)诱导的 PGE2、COX2 表达,有效减轻炎症反应^[35]。ADORA2A 为腺苷 A2a 受体,可介导 IFNG、IL4 基因表达调控 IFN- γ 、IL-4 等炎症因子的释放^[36]。提示醒脑静注射液在治疗 COVID-19 患者神经系统损害方面具有巨大潜力。

GO 富集分析结果涉及 RNA 转录调控、炎症反应、细胞凋亡、血红素结合、ATP 结合、铁离子结合、血管生成等。SARS-CoV-2 属于单正链 RNA 病毒, RNA 转录可参与调控其复制增殖,该过程需要在细胞内完成,故病毒利用 S1 与细胞表面 ACE2 特异性结合形成 complex,再利用 S2 进行膜融合使病毒核酸 RNA 进入细胞内^[18],而后核酸 RNA 为模板进行自我复制及蛋白质翻译,在此过程,需要 3CL Mpro 参与病毒前体蛋白的切割^[19],从而完成病毒的复制与增殖,提示 ACE2、3CL Mpro、complex 与病毒 RNA 转录过程密切相关。病毒的复制增殖能引起宿主细胞凋亡及 ACE2 脱落与下调,而细胞凋亡及 ACE2 的脱落或下调可引发急性炎症反应^[37]。炎症反应是机体应对刺激产生 TNF、白细胞介素(IL)、趋化因子、干扰素(IFN)等促炎性因子的一种反应,既是一种抗病能力,亦可因过度激活而产生细胞因子风暴,致组织器官损伤。病毒 3CL Mpro 能抑制 IFN 激活,降低细胞因子表达进行免疫逃逸^[38],可加速细胞因子风暴产生。已知细胞因子风暴与 COVID-19 病情突然迅速加重、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、多器官功能衰竭等密切相关^[39]。血红素与铁离子参与氧结合,可为组织器官运载氧,而缺氧可引起肺组织炎症细胞浸润、促进炎症因子释放,加重多种组织的氧化应激损伤而加速低氧血症的发生发展,甚至引起 ARDS 及多器官衰竭,这与 COVID-19 患者出现 ARDS 表现相一致^[40]。

KEGG 信号通路主要涉及乙型肝炎通路、癌症通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、VEGF 信号通路、细胞凋亡等。乙型肝炎通路主要通过 NF- κ B 信号通路、Wnt/ β -catenin 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、Notch 信号通路等发挥作用,与炎症反应、免疫调节、细胞凋亡、氧化应激等有关^[41]。HIF-1 信号通路主要在低氧相关的生理病理过程发挥作用,参与调节血管生成、细胞代谢、炎症反应、细胞自噬^[42]。TNF 信号通路可驱动细胞因子产生,是炎症反应中的重要通路。槲皮素可通过抑制 TNF- α 、NF- κ B 降低炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 MMP1、

MMP3、MMP-13 的表达^[43]。TNF 诱导的炎症反应在神经系统损害方面发挥重要作用，山柰酚可通过减少 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达抑制炎症反应，降低 NF- κ B p65、Bax 水平，上调 Bcl-2 表达以抗氧化、抗凋亡达到缺血性脑损伤的神经保护作用^[44]。VEGF 信号通路主要参与血管生成，染料木素可通过调控 IL-6/JAK2/STAT3/VEGF 通路抑制 IL-6、VEGF 的表达发挥抗血管生成的作用^[45]。ACE2 在肺、心脏、消化系统、神经系统等多种组织中均有表达，虽尚无病理依据证明神经系统的 SARS-CoV-2 感染，但目前病例有提示病毒对神经系统有影响，亦有发现一例 SARS-CoV-2 感染相关性脑炎^[46]，同时，炎症反应、细胞凋亡、氧化应激等病理机制亦可致神经系统损害。故结合网络药理学和富集分析结果，可以预测，醒脑静注射液中的有效成分主要是通过作用多个靶点及干预多种信号通路以减少炎症反应、抑制细胞凋亡、抗氧化、调控血管生成来达到治疗 SARS-CoV-2 感染所致的神经系统损害的目的。

ACE2、complex、3CL Mpro 在 SARS-CoV-2 感染宿主细胞或自我复制过程中至关重要，故将 12 个核心成分分别与 3CL Mpro、ACE2、complex 进行分子对接，结果显示醒脑静注射液 12 个核心成分均可与 3 种蛋白结合，结合能力与瑞德西韦、洛匹那韦、利托那韦、达芦那韦相似，且高于诊疗方案中推荐的利巴韦林，验证了网络药理学成分筛选的结果，推测醒脑静注射液核心成分可通过竞争性结合 ACE2 或影响 S 蛋白与 ACE2 复合体结构的稳定以阻止病毒对宿主细胞的感染，通过与 3CL Mpro 结合以阻断病毒复制。其中绿莲皂苷元、山柰酚与 3 种蛋白的结合能均最低。研究表明，绿莲皂苷元对禽流感病毒 H5N1 感染的早期阶段和复制均有抑制作用^[47]。山柰酚对流感病毒诱导的细胞自噬具有抑制作用，亦可直接抑制流感病毒 mRNA 合成及蛋白表达^[48]，且还可通过调节炎症反应、细胞凋亡、神经传递和增强神经可塑性发挥神经保护作用^[49]。进一步验证了绿莲皂苷元、山柰酚可能在醒脑静注射液治疗 SARS-CoV-2 引发的神经系统损害中发挥重要作用。

综上所述，本研究基于网络药理学和分子对接研究，推测醒脑静注射液可能通过抗炎、抑制细胞凋亡、抗氧化、调控血管生成等多种药理活性并通过抑制 SARS-CoV-2 的复制及对宿主细胞的感染发

挥治疗 SARS-CoV-2 引发的神经系统损害的作用，本研究可为进一步开展抗 SARS-CoV-2 感染后神经系统损害中药活性成分的筛选和评价提供理论依据，鉴于网络药理学及分子对接技术的局限性、病毒的复杂性及多变性，预测结果还有待进一步验证。

参考文献

- [1] 李艳超, 白万柱, 端川勉. 潜在的神经侵袭特性可能是新型冠状病毒肺炎患者呼吸窘迫的原因之一 [J]. 医学争鸣, 2020, 11(1): 7-10.
- [2] 周琬琰, 陈 焯. 新型冠状病毒肺炎的消化系统特征与粪口传播问题 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(2): 143-145.
- [3] 王亚楠, 杨春光, 肖 俊, 等. 新型冠状病毒感染肺炎背景下泌尿外科诊疗防控工作建议 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2020, 25(2): 95-100.
- [4] 新型冠状病毒肺炎疫情防控期间神经外科病区防控专家共识 [J/OL]. 解放军医学杂志, [2020-04-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1056.r.20200309.1808.004.html>.
- [5] 陈 蕾, 谢俊刚. 《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》解读 [J/OL]. 医药导报, [2020-04-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1293.R.20200317.0956.002.html>.
- [6] 白翠莲, 王碌碌. 醒脑静注射液的合理应用和安全性分析 [J]. 中国食品药品监管, 2019(3): 63-66.
- [7] 胡瑾瑜. 醒脑静注射液治疗急性脑卒中伴意识障碍患者效果及对脑功能影响 [J]. 上海医药, 2020, 41(4): 25-26.
- [8] 翟 攀. 醒脑静注射液干预治疗对急性脑梗死患者 PD-ECGF、IL-6 及 IL-18 水平的影响 [J]. 临床医学研究与实践, 2019(1): 28-29.
- [9] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [10] Tao W Y, Xu X, Wang X, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal *Radix Curcumae* formula for application to cardiovascular disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 1-10.
- [11] Monteagudo M C, Gonzalezdiaz H. New experimental and computational tools for drug discovery: Medicinal chemistry, molecular docking, and machine learning-part-VI [J]. *Curr Top Med Chem*, 2019, 18(27): 2325-2326.
- [12] 孙凯滨, 张新雨, 刘 静, 等. 小柴胡汤治疗早期新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 邪热郁肺、枢机不利证功效网络分析与机制预测 [J]. 中草药, 2020, 51(7):

- 1750-1760.
- [13] 姚运秀, 贺桢翔, 刘晓凤, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1386-1396.
- [14] 陈红, 肖永庆, 李丽, 等. 栀子化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(11): 1041-1043.
- [15] 朱浩. 偶氮染料的致突变分子机制及其毒代动力学研究 [D]. 宁波: 宁波大学, 2014.
- [16] 刘钱, 贺桢翔, 杨慧, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索肺毒清治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在活性成分 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1713-1722.
- [17] Zhou P, Yang X L, Wang X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [18] Yan R H, Zhang Y Y, Li Y N, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 [J]. *Science*, 2020, 367(6485): 1444-1448.
- [19] Chen Y W, Yiu C P B, Wong K Y. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CL pro) structure: Virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates [J]. *F1000Res*, 2020, 9: 129.
- [20] Huang C L, Wang Y M, Li X W, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [21] Lian J S, Jin X, Hao S R, et al. Analysis of epidemiological and clinical features in older patients with Corona Virus disease 2019 (COVID-19) outside Wuhan [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, doi: 10.1093/cid/ciaa242.
- [22] 杨艳梅, 黄姗, 黄玉静, 等. 从武汉抗疫看中医药文化认同与新的医学模式 [J]. 中医药文化, 2020, 15(2): 1-7.
- [23] 郑榕, 陈琴, 黄铭涵. 从“寒湿疫毒”辨治新型冠状病毒感染肺炎 [J/OL]. 中国中医药信息杂志, [2020-04-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3519.r.20200213.1105.002.html>.
- [24] 鄢春旻. 黄酮类化合物抗病毒及抗炎活性研究 [D]. 南京: 南京大学, 2012.
- [25] Sureda A, Capó X, Tejada S. Neuroprotective effects of flavonoid compounds on neuronal death associated to Alzheimer's disease [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(27): 5124-5136.
- [26] Ryu Y B, Jeong H J, Kim J H, et al. Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CLpro inhibition [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(22): 7940-7947.
- [27] Cordaro M, Cuzzocrea S, Crupi R. An update of palmitoylethanolamide and luteolin effects in preclinical and clinical studies of neuroinflammatory events [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(3): 216.
- [28] Chen M M, Qin J, Chen S J, et al. Quercetin promotes motor and sensory function recovery following sciatic nerve-crush injury in C57BL/6J mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 46: 57-67.
- [29] Dang Z C, Su S S, Jin G E, et al. Tsantan Sumtang attenuated chronic hypoxia-induced right ventricular structure remodeling and fibrosis by equilibrating local ACE-AngII-AT1R/ACE2-Ang1-7-Mas axis in rat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112470.
- [30] 李小丽, 黄恺, 黄丹, 等. 多聚二磷酸腺苷核糖合成酶抑制剂对血管紧张素 II 诱导心脏成纤维细胞基质金属蛋白酶表达的影响 [J]. 临床心血管病杂志, 2008, 24(3): 213-216.
- [31] Yokomizo T, Nakamura M, Shimizu T. Leukotriene receptors as potential therapeutic targets [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(7): 2691-2701.
- [32] Šerý O, Hlinecká L, Povová J, et al. Arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5) gene polymorphism is associated with Alzheimer's disease and body mass index [J]. *J Neurol Sci*, 2016, 362: 27-32.
- [33] Caldas L A, Ferreira D F, Freitas T R P. Prostaglandin A1 triggers Mayaro virus inhibition and heat shock protein 70 expression in an epithelial cell model [J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2018, 51(5): 584-590.
- [34] Forese M G, Pellegatta M, Canevazzi P, et al. Prostaglandin D2 synthase modulates macrophage activity and accumulation in injured peripheral nerves [J]. *Glia*, 2020, 68(1): 95-110.
- [35] Hämäläinen M, Nieminen R, Asmawi M Z, et al. Effects of flavonoids on prostaglandin E2 production and on COX-2 and mPGES-1 expressions in activated macrophages [J]. *Planta Med*, 2011, 77(13): 1504-1511.
- [36] Cannata A, de Luca C, Korkina L G, et al. The SNP rs2298383 reduces ADORA2A gene transcription and positively associates with cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple chemical sensitivity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1858.
- [37] 吕鹏, 李登峰, 刘刚. 冠状病毒的致炎机制研究进展及疫苗研发特点 [J/OL]. 厦门大学学报: 自然科学版, [2020-05-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.n.20200402.1226.010.html>.
- [38] 王荡. 口蹄疫病毒 Lpro 和 3Cpro 调控宿主抗病毒天然免疫反应的分子机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大

- 学, 2011.
- [39] 王玉亮, 王峰, 耿洁. 细胞因子与细胞因子风暴[J/OL]. 天津医药, [2020-04-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1116.R.20200311.1245.002.html>.
- [40] 高钰琪. 基于新冠肺炎病理生理机制的治疗策略[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(3): 568-572.
- [41] 李智慧, 蔡春江, 李钰慧. 乙肝肝癌与信号通路的相互关系[J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(9): 137-139.
- [42] 王芊芊, 孔繁平, 陈学群, 等. 低氧细胞应激的 HIF-1 信号通路[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2011, 40(5): 559-566.
- [43] 贾庆运, 王拥军, 梁倩倩, 等. 槲皮素对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子和基质金属蛋白酶的表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(6): 738-741.
- [44] 郑红丽, 李广生. 山柰酚对缺血性脑损伤大鼠的神经保护作用研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(10): 919-922.
- [45] Cheng W X, Huang H, Chen J H, *et al.* Genistein inhibits angiogenesis developed during rheumatoid arthritis through the IL-6/JAK2/STAT3/VEGF signalling pathway [J]. *J Orthop Transl*, 2020, 22: 92-100.
- [46] Wu Y S, Xu X L, Yang L, *et al.* Nervous system damage after COVID-19 infection: Presence or absence? [J]. *Brain Behav Immun*, 2020, doi: 10.1016/j.bbi.2020.04.043.
- [47] Ding N, Chen Q, Zhang W, *et al.* Structure-activity relationships of saponin derivatives: A series of entry inhibitors for highly pathogenic H5N1 influenza virus [J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 53: 316-326.
- [48] Choi J G, Lee H, Kim Y S, *et al.* Aloe vera and its components inhibit influenza A virus-induced autophagy and replication [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(6): 1307-1324.
- [49] Subash S, Essa M M, Al-Adawi S, *et al.* Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(16): 1557-1566.