

基于UPLC法和网络药理学的黄芩茎叶防治新型冠状病毒肺炎潜在作用机制研究

严宝飞^{1,2}, 刘嘉^{1*}, 段金殿^{2*}, 刘圣金², 曾庆琪¹, 富莹雪²

1. 江苏卫生健康职业学院, 江苏 南京 211800

2. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心 国家中医药管理局中药资源循环利用重点研究室, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 利用超高效液相色谱 (UPLC) 对黄芩茎叶中的黄酮类、酚酸类成分进行分析与评价, 基于网络药理学和分子对接探讨黄芩茎叶防治新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在作用机制。方法 采用UPLC测定11个产地黄芩茎叶样品中9种黄酮类、3种酚酸类成分的含量, 并利用SPSS 19.0对不同产地样品进行主成分分析。利用TCMSP数据库获取上述12种化学成分的作用靶点, 使用GeneCards及NCBI数据库获取COVID-19靶点, 导入Cytoscape 3.7.0软件建立药物-化学成分-靶点-疾病网络, 导入STRING数据库获取靶点PPI网络, 导入Bioconductor进行GO功能注释和KEGG通路富集分析。利用AutoDock Vina将化合物与新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) S蛋白受体结合结构域与血管紧张素转化酶II (ACE2) 蛋白酶结构域复合物 (SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2) 进行分子对接。结果 不同产地黄芩茎叶中均含有丰富的黄酮类、酚酸类成分, 但含量差异较大, 野黄芩茎为黄芩茎叶中含量最高的成分, 相同产地黄芩茎叶化学成分相似度较高, 不同产地黄芩茎叶化学成分相似度较低, 表明不同产地黄芩茎叶样品化学成分含量差异可能与产地生态环境诸多生态因子密切相关。网络药理学结果显示黄芩茎叶10种成分可通过干预30个靶点、127条通路发挥防治COVID-19的作用。分子对接结果显示, 10种化学成分与SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2均有较好的结合活性, 其中8种成分的结合活性优于诊疗方案中4种COVID-19治疗药物。结论 研究建立了简单快速、全面可靠分析评价不同产地黄芩茎叶中黄酮类、酚酸类成分的方法, 可为黄芩茎叶质量控制、资源综合利用提供思路。黄芩茎叶治疗COVID-19具有多成分、多靶点、多途径的特点, 对COVID-19引起的免疫系统紊乱、炎症等具有潜在的防治作用。黄芩茎叶中多种黄酮类、酚酸类成分具有潜在的抗SARS-CoV-2活性及COVID-19治疗作用。黄芩茎叶、黄芩茎叶解毒胶囊和由黄芩茎叶制得的黄芩茶可用于COVID-19的防治中, 黄芩茎叶亦可作为原料提取用于治疗COVID-19的活性成分。

关键词: 黄芩茎叶; 不同产地; 超高效液相色谱法; 新型冠状病毒肺炎; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 06-0991-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.06.003

Study on potential mechanism of *Scutellaria baicalensis* stem-leaf to COVID-19 based on ultra high performance liquid chromatography and network pharmacology

YAN Baofei^{1,2}, LIU Jia¹, DUAN Jinan², LIU Shengjin², ZENG Qingqi¹, FU Yingxue²

1. Jiangsu Health Vocational College, Nanjing 211800, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, and Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** The components of flavonoids and phenolic acids in *Scutellaria baicalensis* stem-leaf were analyzed and

收稿日期: 2020-03-02

基金项目: 江苏省自然科学基金资助(BK20191498); 江苏省高校青蓝工程项目(苏教师[2017]15号); 2019年江苏省地方标准项目计划(苏市监标[2019]89号); 江苏卫生健康职业学院校级课题重大项目(JKA201903)

第一作者: 严宝飞, 助教, 硕士研究生。E-mail: baofei@163.com

*通信作者: 刘嘉, 副教授。E-mail: liujia402@163.com

段金殿, 教授, 博士生导师。E-mail: dja@njucm.edu.cn

evaluated by ultra high performance liquid chromatography (UPLC). Network pharmacology and molecular docking were adopted to discuss the potential mechanism of *S. baicalensis* stem-leaf on COVID-19. **Methods** The contents of nine flavonoids and three phenolic acids in the *S. baicalensis* stem-leaf from 11 regions were determined by UPLC, and the principal components of the samples were analyzed by spss19.0. TCMSP was used to obtain the target of the above 12 components. GeneCards and NCBI were used to obtain the target of COVID-19. Cytoscape 3.7.0 software was used to create a drug-chemical component-target-disease network. Using STRING and Cytoscape 3.7.0 software to establish and analyze the PPI network, and Bioconductor was used to analyze the GO function and KEGG pathway enrichment of the targets. **Results** The *S. baicalensis* stem-leaf from different regions are rich in flavonoids and phenolic acids, but the contents are quite different. Scutellarin is the highest content in the *S. baicalensis* stem-leaf. The similarity of chemical components in the *S. baicalensis* stem-leaf from the same region is higher than that from different regions, which indicates that the difference of chemical components in the *S. baicalensis* stem-leaf from different region may be closely related to many ecological factors in the ecological environment of the place of origin. The results of network pharmacology showed that 10 components of *S. baicalensis* stem-leaf could prevent and control COVID-19 by intervening 30 targets and 127 pathways. The results of molecular docking showed that 10 components had good binding activity with SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2, and the binding activity of seven components was better than that of four COVID-19 drugs in the treatment plan. **Conclusion** This study established a simple, rapid, comprehensive and reliable method for the analysis and evaluation of the flavonoids and phenolic acids of *S. baicalensis* stem-leaf from different regions, which can provide ideas for the quality control of *S. baicalensis* stem-leaf and the comprehensive utilization of resources. The treatment of COVID-19 with *S. baicalensis* stem-leaf has the characteristics of multi-component, multi-target and multi-channel, which has potential prevention and treatment effect on immune system disorder and inflammation caused by COVID-19. flavonoids and phenolic acids in *S. baicalensis* stem-leaf have potential anti-SARS-CoV-2 activity and COVID-19 therapeutic effect. *S. baicalensis* stem-leaf or *S. baicalensis* tea could be used in the prevention and treatment of COVID-19, and *S. baicalensis* stem-leaf could also be used as raw materials to extract the active ingredients for the treatment of COVID-19.

Key words: *Scutellaria baicalensis* stem-leaf; different regions; UPLC; COVID-19; network pharmacology; molecular docking

随着由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的新
型冠状病毒肺炎(COVID-19)的持续蔓延,美国、意
大利、西班牙等诸多国家和地区确诊患者持续增
加,疫情防控已成为全人类的重要工作。研究表
明,SARS-CoV-2的表达、复制与血管紧张素转化酶
2(ACE2)密切相关,除感染肺部外,亦能通过ACE2
受体攻击人体的心脏、食道、肾、膀胱和回肠等器
官,甚至引起免疫系统紊乱导致全身炎症反应^[1]。
在全国范围内的COVID-19的救治中,中医药深度介
入,参与救治病例占比超85%,并取得良好的临床疗效。

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis*
Georgi 的干燥根,具有清热燥湿、泻火解毒之功效,
味苦气寒,寒能清热,折火之本,善清心肺之湿热,
既清气分之实热,又能凉血止血,药理作用丰富,临
床疗效明确,为国家地方发布的COVID-19诊疗方
案和临床辨证治疗中诸多中药组方的重要组成部
分,如清肺排毒汤、透解祛瘟颗粒、金花清感颗粒
等。黄芩为中医临床常用大宗药材,资源分布广
泛,产量巨大。在黄芩的栽培加工过程中,生物量
数倍于根的地上部分如叶、茎、花等未被利用而废
弃,造成了资源浪费及生态环境破坏。黄芩的嫩茎
及叶经干燥后在我国北方各省及云南部分地区可

做茶饮用,是我国民间的别样茶之一^[2],应用历史近
千年,具有清热燥湿、泻火解毒、促消化、消炎等作
用,有“黄金茶”之美称^[3]。研究表明,黄芩的茎和叶
具有丰富的黄酮类、酚酸类资源性化学成分^[3],具有
抗病毒、抗炎、抗氧化、保护心肌缺血及免疫调节等
显著药理活性和保健功能^[4],已用于临床的黄芩茎
叶解毒胶囊对上呼吸道感染具有良好的疗效。黄
芩的茎和叶化学组成药理作用与根相似,提示黄芩
茎叶可能对COVID-19具有潜在的治疗作用。中药
等药物通过多成分、多靶点及多途径协同作用于机
体,最终形成其独特的药理作用和临床疗效。本研
究首次采用超高效液相色谱(Ultra High
Performance Liquid Chromatography, UPLC)同时对
不同产地黄芩茎叶中多种黄酮类、酚酸类化学成
分进行分析与评价,通过网络药理学及分子对接技术
探究上述成分与COVID-19的关联关系及潜在作用
机制,为黄芩地上部分的资源化利用及COVID-19
的防治提供一定的思路与参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏
实验设备有限公司;PMB53 型艾德姆水分测定仪,

南京温诺仪器设备有限公司;800Y型高速中药材粉碎机,永康市铂欧仪器有限公司;ML204/02、MS205型电子天平,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;Milli-Q超纯水制备仪,美国Milli-pore公司;KQ-250E型超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;Anke GL-16GII型离心机,上海安亭科学仪器厂;Waters ACQUITY UPLC系统、Empower数据处理系统,美国Waters公司。

1.2 材料

对照品咖啡酸(批号KFS20180518)、对香豆酸(批号DXDS20180323)、阿魏酸(批号AWS20180317)、木犀草苷(批号MXCG20180216)、野黄芩苷(批号YHQG20180623)、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷(批号QCSTG20180119)、黄芩苷(批号HQG20180203)、木犀草素(批号MXCS20180317)、汉黄芩苷(批号HHQG20180517)、芹菜素(批号20171123)、黄芩素(批号HQS20171107)、汉黄芩素(批号20180419)均购自南京春秋生物工程技术有限公司。色谱纯乙腈、甲醇和甲酸均购自德国Merck公司。超纯水由Milli-Q超纯水制备仪制备。其他化学试剂均为分析纯均购自南京化学试剂股份有限公司。

11批不同产地黄芩幼嫩带叶茎尖样品,经南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心主任段金廛教授鉴定为唇形科植物黄芩*S. baicalensis* Georgi的茎叶,均置于90℃条件烘干^[5],含水率降低到12%左右停止,取出,粉碎,过50目筛,低温储藏备用,样品信息详见表1。

1.3 数据库及软件

中药系统药理学技术平台(TCMSP, <http://tcmbspw.com/tcmbsp.php>); UniProt (<https://uniport.org/>); STRING (<https://string-db.org/>); GeneCards (<http://www.genecards.org/>); NCBI、Pubchem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); GO、KEGG (<http://www.bioconductor.org/>);

RCSB(<https://www.rcsb.org/>); Cytoscape 3.7.0; Venny 2.1; Chem3D 14.0; AutoDock Tools 1.5.6; PyMOL 1.8。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

准确称定对照品咖啡酸10.123 mg、对香豆酸8.241 mg、阿魏酸8.526 mg、木犀草苷12.963 mg、野黄芩苷51.064 mg、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷12.122 mg、黄芩苷14.440 mg、木犀草素8.362 mg、汉黄芩苷13.523 mg、芹菜素17.126 mg、黄芩素11.245 mg、汉黄芩素12.243 mg,分别置于2 mL量瓶中,加入甲醇(色谱级)并定容,得到单一对照品溶液。准确量取野黄芩苷单一对照品溶液1 mL,其余各0.5 mL,置10 mL量瓶中,加入甲醇(色谱级)并定容,得到咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、木犀草苷、野黄芩苷、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、黄芩苷、木犀草素、汉黄芩苷、芹菜素、黄芩素、汉黄芩素质量浓度分别为0.253、0.206、0.213、0.324、2.553、0.303、0.361、0.209、0.338、0.428、0.281、0.306 mg/L的混合对照品溶液,稀释备用。

2.2 供试品溶液的制备

准确称取11批样品粉末0.5 g,并置于100 mL具塞锥形瓶中,准确移取体积分数为60%的乙醇溶液40 mL,常温下25℃超声提取40 min,放冷后称质量,加体积分数为60%乙醇补足质量。取上清,13 000 r/min离心10 min后,通过0.22 μ m滤膜,即得供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相为体积分数为0.1%的甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱: 0~1 min, 5% A; 1~3 min, 5%~15% A; 3~11 min, 15%~50% A; 11~12 min, 50%~95% A; 12~13 min, 95%~5% A; 13~14 min, 5% A。体积流量0.4 mL/min, 柱温30℃, 进样量2 μ L, 检测波长254 nm。UPLC色谱图见图1。

表1 样品信息

Table 1 Samples from different regions

编号	产地	采集时间	含水率/%	编号	产地	采集时间	含水率/%
S1	河北安国	2019-07	11.83	S7	北京门头沟	2019-07	12.32
S2	河北承德	2019-07	12.22	S8	黑龙江加格达奇	2019-07	10.76
S3	河北邯郸	2019-07	12.54	S9	内蒙古赤峰	2019-07	11.65
S4	山西运城	2019-07	10.87	S10	山东济南	2019-06	11.49
S5	山西大同	2019-07	11.35	S11	江苏南京	2016-06	11.86
S6	陕西商洛	2019-07	12.09				

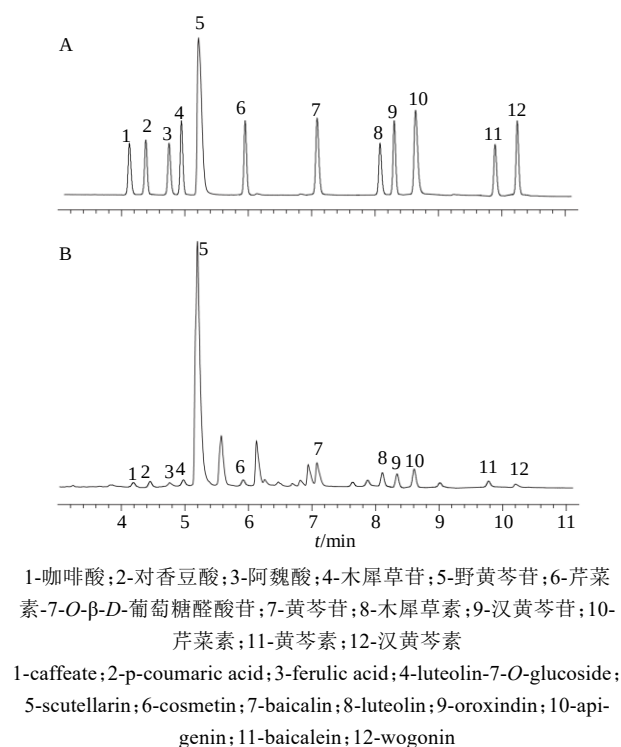


图1 黄芩茎叶对照品 (A) 和供试品 (B) UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatogram of reference solution (A) and test solution (B)

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围考察 准确移取一系列混合对照品溶液,再按“2.3”项要求进样,记录12种化学成分色谱峰峰面积。以标准品浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),得出标准曲线,依据信噪比计算检测限(LOD)、定量限(LOQ),结果见表2。

2.4.2 精密度试验 准确移取对照品溶液2 μL ,再按“2.4”项条件,于1 d内连续进样6次及连续3 d内重复进样6次,记录12种化学成分峰面积,计算12种化学成分的相对标准偏差(RSD),结果见表3,可知本方法精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 准确称取样品(S1)6份制备供试品溶液,再按“2.4”项条件在0、3、6、9、12、24 h进样,记录12种化学成分峰面积,计算12种化学成分的RSD值,结果见表3,可知本方法稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 准确称取样品(S1)6份制备供试品溶液,再按“2.4”项条件连续进样,记录12种化学成分峰面积,计算12种化学成分质量分数的RSD值,结果见表3,可知本方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 准确称取样品(S1)0.25 g,精密加入“2.1”项单一对照品溶液咖啡酸8.8 μL 、对香豆酸6.0 μL 、阿魏酸5.3 μL 、木犀草苷5.1 μL 、野黄芩苷246.0 μL 、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷5.0 μL 、黄芩苷66.6 μL 、木犀草素94.1 μL 、汉黄芩苷14.7 μL 、芹菜素18.5 μL 、黄芩素11.4 μL 、汉黄芩素3.9 μL ,制备供试品溶液,平行6份,再按“2.4”项条件进样,记录12种指标成分峰面积,计算加样回收率,结果见表3。

2.5 样品测定

制备所有样品供试品溶液,按照“2.4”项条件进样,记录12种化学成分峰面积,计算样品中12种化学成分含量(扣除水分,按干燥品计算),结果见表4。11批样品化学均含有咖啡酸、对香豆酸、阿魏

表2 线性范围、LOD、LOQ

Table 2 Calibration curves, LOD, and LOQ

TCMSP 编号	化合物	标准曲线	r^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
MOL000414	咖啡酸	$Y=2.313\times 10^5 X+113.7$	0.999 7	0.127~253.000	32.17	109.09
MOL000771	对香豆酸	$Y=1.776\times 10^5 X+213.6$	0.999 3	0.103~206.000	16.28	49.67
MOL002665	阿魏酸	$Y=6.204\times 10^4 X+23.7$	0.999 1	0.107~213.000	39.24	123.34
MOL000009	木犀草苷	$Y=2.261\times 10^7 X+4\ 954.3$	0.999 2	0.162~324.000	14.67	43.55
MOL002931	野黄芩苷	$Y=1.396\times 10^7 X+51\ 491.3$	0.999 9	1.277~2\ 553.000	13.66	41.81
MOL000007	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	$Y=2.661\times 10^7 X+236.4$	0.999 3	0.152~303.000	21.32	66.13
MOL002935	黄芩苷	$Y=3.116\times 10^7 X+3\ 789.3$	0.999 6	0.181~361.000	11.38	40.05
MOL000006	木犀草素	$Y=8.078\times 10^5 X+1\ 534.6$	0.999 7	0.105~209.000	19.72	60.83
MOL013068	汉黄芩苷	$Y=3.674\times 10^7 X-1\ 644.1$	0.999 8	0.169~338.000	16.32	50.83
MOL000008	芹菜素	$Y=3.539\times 10^5 X+394.3$	0.999 4	0.214~428.000	18.34	57.21
MOL002714	黄芩素	$Y=7.337\times 10^7 X-835.9$	0.999 9	0.141~281.000	12.82	35.09
MOL000173	汉黄芩素	$Y=5.073\times 10^5 X+398.3$	0.999 8	0.530~306.000	11.87	34.56

表3 12种成分精密度、重复性、稳定性及加样回收率试验结果 ($n=6$)

Table 3 Precision, repeatability, stability and recovery of 12 kinds of references ($n=6$)

化合物	精密度RSD/%		重复性 RSD/%	稳定性 RSD/%	加样回收率	
	日内	日间			平均值/%	RSD/%
咖啡酸	1.44	1.08	2.35	1.91	99.98	1.22
对香豆酸	1.62	1.93	2.16	2.78	99.08	1.61
阿魏酸	1.07	1.36	2.63	2.46	99.50	2.72
木犀草苷	1.93	2.43	1.04	2.74	101.66	1.32
野黄芩苷	1.69	1.35	2.57	1.43	99.81	2.34
芹菜素-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖醛酸苷	1.70	2.44	1.10	1.50	99.10	2.52
黄芩苷	2.54	1.51	1.65	2.27	99.22	2.70
木犀草素	1.14	2.40	2.94	1.43	98.78	2.24
汉黄芩苷	1.67	1.45	1.32	2.09	99.70	2.93
芹菜素	2.05	2.99	1.19	1.56	100.00	2.76
黄芩素	2.22	2.89	1.82	2.79	99.30	2.86
汉黄芩素	1.14	1.13	1.07	2.55	101.69	2.82

表4 11批样品中12种化学成分含量测定结果 ($n=3$)

Table 4 Contents of 12 investigated compounds in samples ($n=3$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)											
	咖啡酸	对香豆酸	阿魏酸	木犀草苷	野黄芩苷	芹菜素-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖醛酸苷	黄芩苷	木犀草素	汉黄芩苷	芹菜素	黄芩素	汉黄芩素
S1	0.201 3	0.111 7	0.102 8	0.149 4	28.489 5	0.137 5	2.181 3	1.784 1	0.451 2	0.718 3	0.291 3	0.108 9
S2	0.206 9	0.107 5	0.122 4	0.160 2	30.211 5	0.151 7	1.529 9	1.662 8	0.787 1	0.700 5	0.230 0	0.228 2
S3	0.290 5	0.116 7	0.073 5	0.235 5	26.191 3	0.162 1	0.996 8	1.446 9	0.607 1	0.740 6	0.442 5	0.090 6
S4	0.168 4	0.160 4	0.108 5	0.180 2	23.186 7	0.138 4	0.747 0	1.624 8	0.361 5	1.244 5	0.452 1	0.162 3
S5	0.200 7	0.231 0	0.098 0	0.233 1	41.063 1	0.132 4	2.734 1	1.183 1	0.768 2	1.348 3	0.203 8	0.143 1
S6	0.126 8	0.182 4	0.147 3	0.269 6	34.492 7	0.179 2	1.945 2	0.879 1	0.461 5	0.733 7	0.238 7	0.175 7
S7	0.177 7	0.103 8	0.092 2	0.235 5	24.715 7	0.177 3	1.032 6	1.238 0	0.390 3	0.795 7	0.446 7	0.137 8
S8	0.219 8	0.248 1	0.088 5	0.133 7	27.817 5	0.174 2	1.211 7	1.399 6	0.727 9	1.352 4	0.406 2	0.251 4
S9	0.170 4	0.214 0	0.119 0	0.263 3	44.894 5	0.181 8	1.161 9	1.196 6	0.378 5	1.321 9	0.182 6	0.193 8
S10	0.136 4	0.116 2	0.137 7	0.231 7	23.946 1	0.100 9	0.631 6	0.809 8	0.795 2	0.655 1	0.313 8	0.105 1
S11	0.101 0	0.129 8	0.087 3	0.241 7	27.721 2	0.099 4	0.805 0	0.800 4	0.402 5	1.160 1	0.122 4	0.116 7

酸、木犀草苷、野黄芩苷、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、黄芩苷、木犀草素、汉黄芩苷、芹菜素、黄芩素、汉黄芩素,但含量存在差异。野黄芩苷为黄芩茎叶中含量最高的成分,其次为黄芩苷、木犀草素、芹菜素。

2.6 主成分分析

为进一步研究不同产地样品与12种化学成分之间的关系,采用SPSS 19.0统计软件对含量测定结果进行主成分分析,结果见表5。由表5可知,前3个主成分特征值均大于1,即前3个主成分在反映产地与12种化学成分的相互关系中发挥主导作用;前3个主成分的累计贡献率为64.554%,能够全面客观的反映不同产地样品和12种化学成分

表5 主成分的特征值及贡献率

Table 5 Eigenvalues and total variance explained of extracted components

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	3.210	26.747	26.747
2	2.983	24.856	51.603
3	1.554	12.951	64.554

之间的内在联系,故本研究选取前3个主成分进行分析,得分图见图2。河北S1、S2和S3以及山西S4、S5聚集在一起,其余产地样品较分散,提示相同产地的黄芩茎叶化学成分相似度较高,不同产地黄芩茎叶化学成分相似度差异较大,产地会对黄芩茎叶内在品质产生影响。

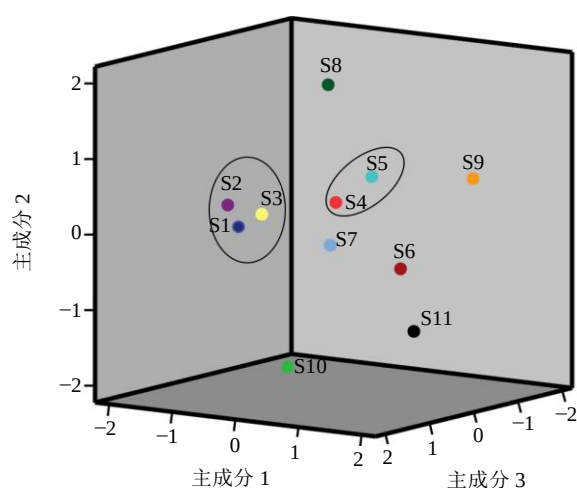


图2 11批样品主成分得分图
Fig. 2 PCA diagram of samples

2.7 黄芩茎叶12种化学成分作用靶点获取

采用TCMSP平台,以12种化学成分的名称为关键词获取黄芩茎叶的作用靶点,将作用靶点信息输入UniPort数据库从而获取靶点的标准名称,黄芩茎叶中12种化学成分共有131个作用靶点,提示黄芩茎叶中黄酮类、酚酸类资源化学成分可通过多种靶点对机体产生作用。

2.8 黄芩茎叶治疗COVID-19的潜在靶点

使用Venny 2.1绘图软件,将“2.7”项靶点与COVID-19疾病靶点进行映射,获得30个潜在治疗靶点,表明黄芩茎叶可通过多个靶点发挥治疗COVID-19的作用,结果见图3和表6。在GeneCards和NCBI数据库中以“Novel coronavirus”为关键词(NCBI中设置物种为“Homo sapiens”)检索COVID-19相关基因,去除重复共获得352个COVID-19相关靶点(GeneCards数据库350个,NCBI数据库48个)。

2.9 药物-化学成分-靶点-疾病网络

将药物和疾病相映射得到的30个靶点信息导入Cytoscape 3.7.0软件进行可视化处理,建立药物-

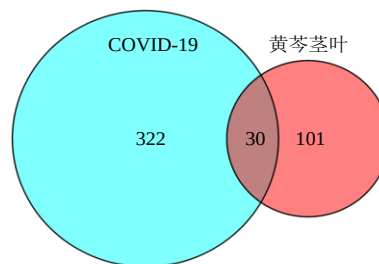


图3 黄芩茎叶治疗COVID-19靶点韦恩图
Fig. 3 Venn diagram of COVID-19 targets of *S. baicalensis* stem-leaf

化学成分-靶点-疾病网络。其中,“节点”表示化学成分和作用靶点,“边”表示二者之间的联系。并对得到的作用网络进行网络拓扑学分析,以节点度值(degree)和中介中心度值(betweenness centrality)来反应“节点”的重要程度,度值和中介中心度值与“节点”的重要程度呈正相关。如图4所示,此网络有42个节点,110条边,其中外圈为作用靶点,内圈为化学成分。网络拓扑学分析结果显示,该网络节点的平均度值为5.238,大于平均度值的节点有9个;平均中介中心度为0.029,大于平均中介中心度平均值的节点有8个。根据节点度值、中介中心度等网络拓扑学特征进行核心节点的筛选,芹菜素、木犀草素、汉黄芩素、黄芩素和PTGS2、PTGS1、CASP3在药物-化学成分-靶点-疾病网络中具有重要作用,提示这些节点是黄芩茎叶防治COVID-19的关键成分或靶点,见表7。

2.10 黄芩茎叶治疗COVID-19潜在靶点PPI网络

蛋白质相互作用是生物分子网络的基本单元,与生理病理过程密切相关,故本研究从PPI层面探讨黄芩茎叶与COVID-19潜在的联系与作用机制。将药物和疾病相映射得到的30个靶点信息导入STRING数据库获取靶点之间的相互作用,并将数据导入Cytoscape 3.7.0得到图5,包含29个节点和268条边。节点越大、颜色越深表明度值越大。靶点的平均度值为18.483,超过平均度值的靶点有18

表6 黄芩茎叶治疗COVID-19靶点

Table 6 COVID-19 targets of *S. baicalensis* stem-leaf

序号	靶点	序号	靶点	序号	靶点	序号	靶点	序号	靶点
1	PTGS1	7	BCL2	13	MCL1	19	FCER2	25	IL6
2	PTGS2	8	FOS	14	IL2	20	IL13	26	CCL2
3	NOS3	9	BAX	15	SERPINE1	21	APOD	27	CXCL8
4	BCL2L1	10	RB1	16	IFNG	22	NOS2	28	EGFR
5	CASP3	11	HMOX1	17	IL4	23	PPARG	29	MAPK1
6	RELA	12	ICAM1	18	CD40LG	24	MAPK14	30	IL10

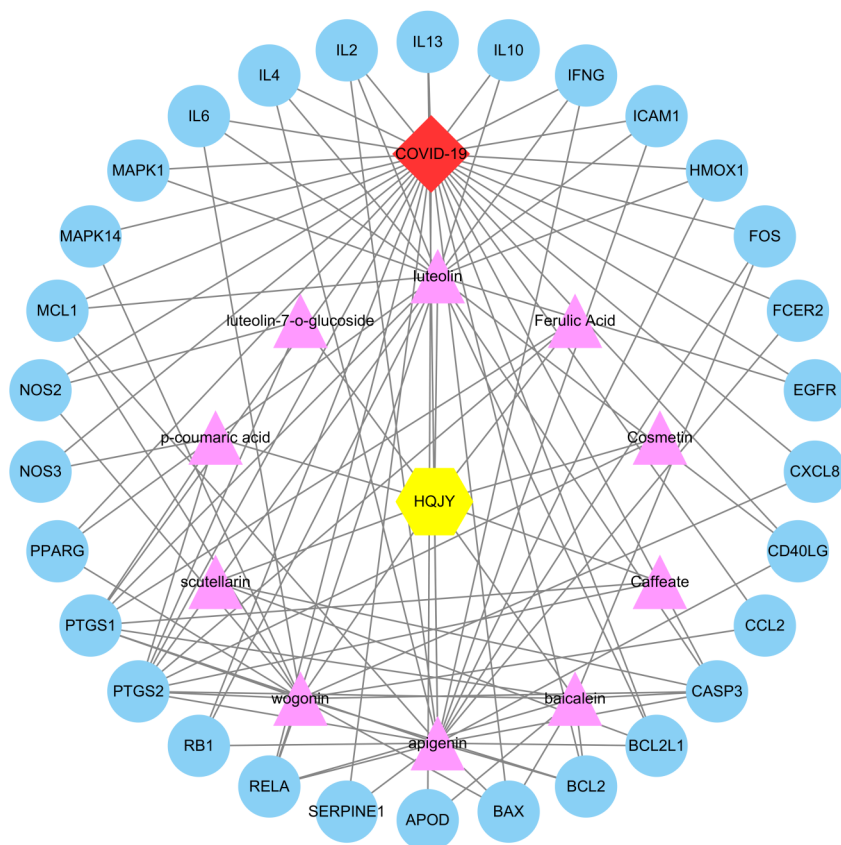


图4 药物-化学成分-靶点-疾病网络

Fig. 4 Drug-compound components-targets-disease network

表7 网络关键节点及其拓扑学特征

Table 7 Key nodes of network and its topology features

节点名称	节点类型	节点度值	中介中心度值
COVID-19	疾病	30	0.428
芹菜素	化学成分	20	0.152
木犀草素	化学成分	19	0.140
汉黄芩素	化学成分	14	0.083
黄芩茎叶	药物	10	0.086
PTGS2	作用靶点	10	0.103
黄芩素	化学成分	9	0.030
CASP3	作用靶点	6	0.026

个。由图5可知, CASP3、IL-10、MAPK1、PTGS2、CXCL8、IL-6、CCL2、IL-4等度值显著高于其余靶点,在PPI网络中起着桥梁作用,可能是黄芩茎叶防治COVID-19的关键作用靶点。

2.11 GO功能和KEGG通路富集分析

将药物和疾病相映射得到的30个靶点的编码基因利用R语言导入Bioconductor生物信息软件包,以 $P < 0.05$ 进行GO、KEGG分析,对功能特点可视化处理,获取黄芩茎叶与COVID-19潜在关联关系与作用机制的生物功能注释及主要通路。GO富

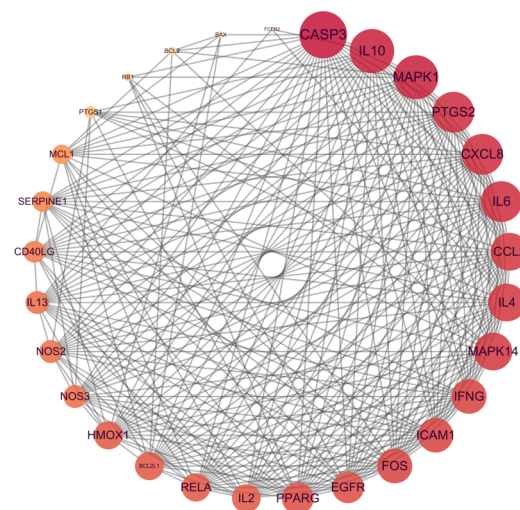


图5 黄芩茎叶与COVID-19交集靶点PPI网络

Fig. 5 PPI network of *S. baicalensis* stem-leaf and COVID-19 intersection targets

集分析分3个模块,分别为生物学过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF),本研究按照基因富集数量及 P 值综合排序,并利用R语言绘制条形图(各取前20),结果见图6。排名越靠前,黄芩茎叶越有可能通过这些生物学途径对COVID-19产生

作用。由图6可知,黄芩茎叶可通过调节氧化应激反应、活性氧反应、炎症反应等生物过程,质膜、细胞器膜、RNA聚合酶II转录因子等细胞组成,细胞因子及受体活性、血红素结合、氧化还原酶活性等分子功能对COVID-19产生作用。

KEGG通路分析共获得127个条目,具有显著意义的有108个条目($P < 0.01$),按照基因富集数量及 P 值综合排序,并利用R语言绘制条形图(取前20),结果见图7。通路富集结果排名越靠前,黄芩

茎叶越有可能通过这些通路作用于机体。由图7可知,作用靶点显著富集在IL-17信号通路、糖尿病并发症AGE-RAGE信号通路、HIF-1信号通路、T细胞受体信号通路、TNF信号通路、JAK-STAT信号通路等通路上。

2.12 黄芩茎叶化学成分与SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2复合物分子对接

在RCSB数据库中下载ACE2蛋白酶结构域与新型冠状病毒S蛋白受体结合结构域的复合物PDB

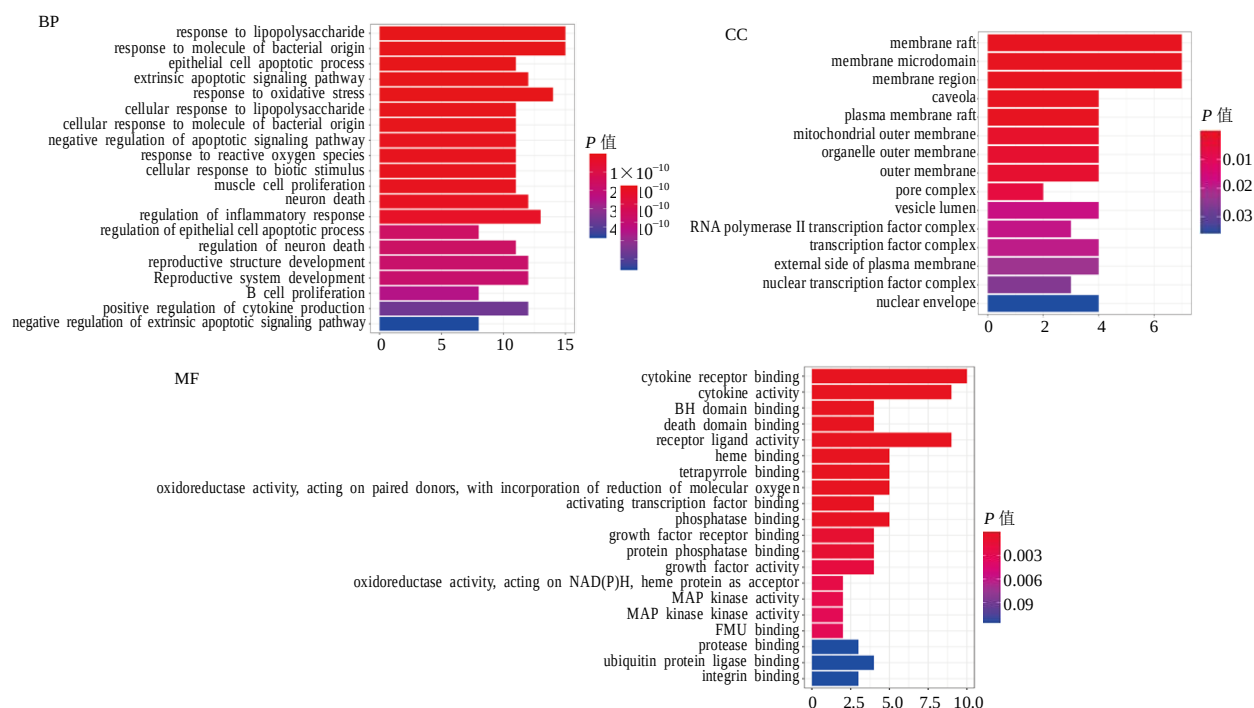


图6 GO功能分析结果

Fig. 6 GO enrichment analysis of key targets

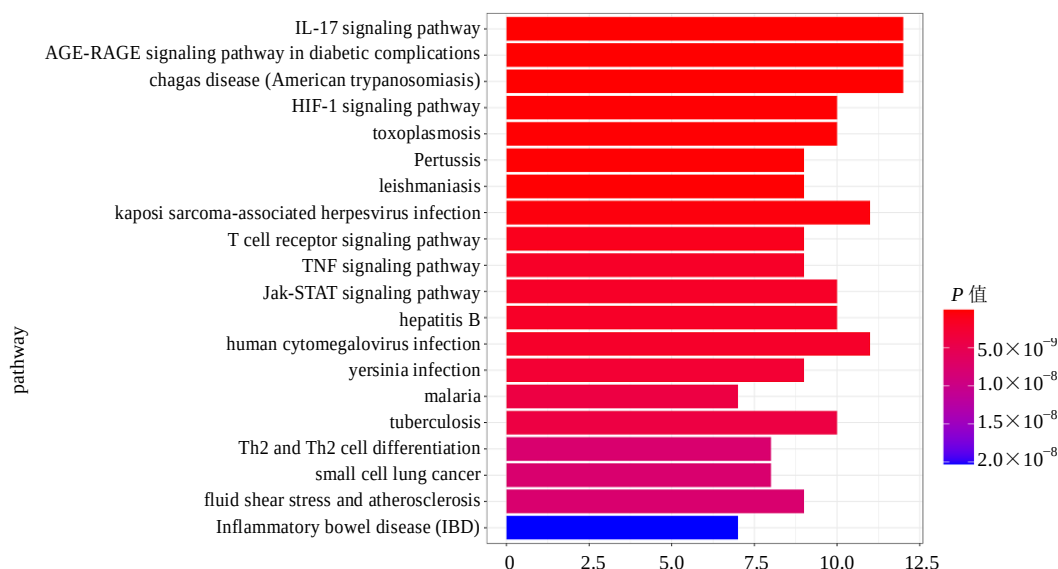


图7 KEGG通路富集分析结果

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of key targets

文件(SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2, PDB ID: 6lzc)导入PyMOL,删除水分子,添加氢。在Pubchem数据库中下载药物-化学成分-靶点-疾病网络中化学成分及4种临床用于治疗COVID-19药物结构,导入Chem3D转化成PDB格式。将以上化合物导入AutoDock Tools 1.5.6程序,添加原子电荷,分配原子类型,所有柔性键均默认可旋转,保存为pdbqt格式,作为对接配体。运行AutoDock Vina进行分子对接。选取打分最高(affinity数值最低)的构象作为对接构象,利用PyMOL程序对对接构象进行可视化分析。每种活性成分对接结果几种结合构象

表8 10种化学成分和4种化学药的结合能

Table 8 Binding energy values of 10 ingredients and four recommend drugs

化合物	CAS号	相对分子质量	化学式	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
木犀草素	491-70-3	286.24	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-6.6
芹菜素	520-36-5	270.24	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-6.2
黄芩素	491-67-8	270.24	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-6.0
野黄芩苷	27740-01-8	462.40	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	-5.8
木犀草苷	5373-11-5	448.40	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-5.7
芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	578-74-5	432.40	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-5.7
汉黄芩素	632-85-9	284.26	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-5.5
咖啡酸	331-39-5	180.16	C ₉ H ₈ O ₄	-5.3
利巴韦林	36791-04-5	244.20	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅	-5.3
阿魏酸	1135-24-6	194.18	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-5.1
对香豆酸	501-98-4	164.16	C ₉ H ₈ O ₃	-5.1
磷酸氯喹	50-63-5	515.90	C ₁₈ H ₃₂ ClN ₃ O ₈ P ₂	-4.3
利托那韦	155213-67-5	720.90	C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂	-3.8
洛匹那韦	192725-17-0	628.80	C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅	-3.6

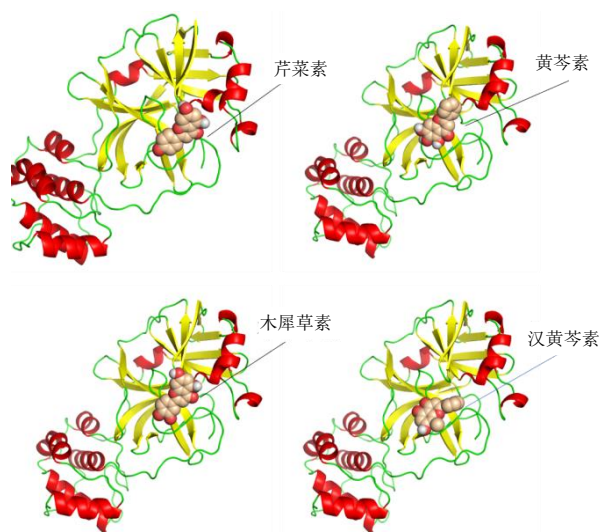


图8 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2复合物与芹菜素、黄芩素、木犀草素和汉黄芩素的相互作用

Fig. 8 Diagrams of interaction between SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 compound and apigenin, baicalein, luteolin and wogonin

中,选取结合能较低且构象较好的结果作为分子对接结果,结合能越小说明受体配体之间亲和力越大,结果见表8和图8。由表8可知,药物-化学成分-靶点-疾病网络中化学成分的结合能均小于-5 kJ/mol,即与SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2均有较好的结合活性。

3 讨论

黄芩是我国常用清热药,在COVID-19的中医药防治中发挥了重要作用。多年生植物黄芩在我国的栽培面积巨大,每年均会产生生物量数倍于根的黄芩地上部分,因此造成了严重的资源浪费与生态等问题。黄芩茶由黄芩的嫩茎及叶制成,是我国

民间的别样茶之一,保健效果明显,在我国部分地区十分流行^[2]。研究表明,黄芩的茎和叶资源性化学成分类型与根类似且含量丰富,药理作用明显,具有巨大的开发潜力,以黄芩茎叶为原料的黄芩茎叶解毒胶囊在中医临床上已被广泛用于治疗上呼吸道感染等相关疾病^[3-4]。

目前关于黄芩茎叶化学成分的研究多集中在少数几种黄酮类成分上,鲜有黄芩茎叶中具有明显生物活性的酚酸类成分的定性定量研究。故本研究在前期基础上系统考察黄芩茎叶的提取条件(水提、不同比例醇提、不同超声时间、不同回流时间)、流动相系统(乙腈-甲酸水、乙腈-磷酸水、甲醇-甲酸水、甲醇-磷酸水)、不同梯度洗脱程序等最终建立不同产地黄芩茎叶中的9种黄酮类、3种酚酸类成分的UPLC快速分析方法。结果发现,不同产地黄芩茎叶中均含有丰富的黄酮类、酚酸类资源化学成分,但含量差异较大,野黄芩苷为黄芩茎叶中含量最高

的成分;相同产地黄芩茎叶化学成分相似度较高,不同产地黄芩茎叶化学成分相似度较低,提示产地生态环境诸多生态因子能显著影响黄芩茎和叶中资源性化学成分形成和积累从而造成品质的差异。本研究建立的UPLC方法可对简单快速、全面可靠的对不同产地黄芩茎叶进行评价,可为黄芩茎叶质量控制、资源综合利用提供思路,亦为黄芩植物其他器官或同属药材成分定性定量提供有益参考。

本研究利用网络药理学方法构建药物-化学成分-靶点-疾病网络探讨黄芩茎叶与COVID-19的关联及潜在作用机制,得到10个化学成分,30个潜在靶点和127条通路。在10个化学成分中,芹菜素、木犀草素、汉黄芩素、黄芩素在网络中具有重要作用。据报道,芹菜素具有抗炎、抗氧化、免疫调节等药理作用,对脑组织氧化应激、慢性肾衰竭、肾急性缺血再灌注损伤等具有保护作用,亦可通过抑制NF- κ B并降低炎症细胞因子水平,对急性肺损伤产生保护作用^[6-7]。木犀草素可通过抗氧化应激和COX-2信号通路减轻气道炎症,并能作用于丝裂原活化蛋白激酶/NF- κ B通路保护心肌细胞缺血损伤,亦能通过抑制细胞凋亡及降低炎症因子分泌,抑制71型肠道病毒感染,发挥抗病毒作用^[8-9]。汉黄芩素可抑制流感病毒感染肺泡巨噬细胞NF- κ B p65的核转位及表达,减轻病毒感染后的过度免疫反应减轻肺组织损伤,亦可抑制RIPK1对急性肾损伤产生保护作用^[10]。黄芩素具有解热和广泛的抗病毒作用,对RNA、DNA病毒均有良好的抗感染作用,可通过抑制p38MAPK信号通路,对急性胰腺炎引发的肺组织损伤具有保护作用,亦能抑制心肌细胞氧化应激和凋亡及心肌坏死对心脏起到保护作用^[11-12]。因此,黄芩茎叶中丰富的黄酮类、酚酸类化学成分具有抗病毒、抗炎、抗氧化、免疫调节等作用,可对SARS-CoV-2产生直接的预防和抑制作用,也可能对COVID-19引起的炎症反应及肺损伤、肾损伤等器官和功能损伤具有潜在的防治作用。

在30个黄芩茎叶与COVID-19疾病相交集的靶点中,PTGS2、PTGS1、CASP3具有重要地位。PTGS2又称环氧合酶2(COX-2),COX-2主要存在于血管、胃、肾等组织中,其在正常组织细胞内的活性极低,当细胞受到炎症等刺激时,其在炎症细胞中的表达水平可迅速升高,引起炎症部位PEG2、PGI2和PGE1含量的增加,导致炎症反应和组织损伤。PTGS1又称环氧合酶1(COX-1),其功能是促进生理性PGs的合成,对机体胃肠道、肾脏等部位细

胞的正常生理活动具有重要意义。CASP3(半胱天冬氨酸蛋白酶3)与机体因细胞凋亡紊乱而引起的肿瘤以及自身免疫性疾病的发生有联系作用^[13]。因此,黄芩茎叶中丰富的黄酮类、酚酸类化学成分可能通过作用于PTGS2、PTGS1、CASP3等靶点对COVID-19造成的免疫系统紊乱及炎症反应发挥潜在的调节作用。

IL-10、IL-6、IL-4等靶点在PPI网络中起着桥梁作用,可能是黄芩茎叶治疗COVID-19的关键作用靶点。据报道,IL-6(白细胞介素-6)是引发炎症风暴的关键细胞因子,阻断IL-6与其受体的结合可以抑制炎症风暴,从而达到控制病情的效果^[14]。COVID-19患者的血浆检测中,IL-6、IL-10(白细胞介素-10)和IL-4(白细胞介素-4)等细胞因子水平均高于健康的成年人,重症COVID-19患者的IL-6、IL-10水平也较轻症患者高^[15],在一定程度上佐证本研究成果。

GO功能富集分析发现,黄芩茎叶可通过调节氧化应激反应、活性氧反应、氧化还原酶活性、炎症反应、RNA聚合酶II转录因子、细胞因子及受体活性、血红素结合等诸多生物学过程及功能发挥对COVID-19的防治作用。细胞因子可分为肿瘤坏死因子和趋化性细胞因子等,前者在炎症性肠病、类风湿性关节炎、心血管疾病等过程具有重要介质作用,后者的表达的能介导免疫细胞迁移,进而诱发自身免疫性疾病或慢性炎症^[16],故黄芩茎叶可能通过调节细胞因子活性等功能对COVID-19导致的免疫系统紊乱和炎症反应发挥作用。血红素在肺组织中与氧充分结合,在体内其他部分则可以充分地释放所携带的氧分子,从而发挥运载、贮藏氧的功能^[17],提示黄芩茎叶可干预血红素结合,对COVID-19患者可能出现呼吸困难、低氧血症,甚至急性呼吸窘迫综合征具有潜在的调节作用。SARS-CoV-2属RNA病毒,其S蛋白与人体细胞膜ACE2受体结合进入细胞,借助胞内翻译机制不断复制,进而感染更多细胞,提示黄芩茎叶可能作用于RNA聚合酶影响SARS-CoV-2的转录翻译潜在,从而获得抗SARS-CoV-2作用。

KEGG通路富集发现,在靶点富集的前20条通路中,3条通路与病毒感染有关,包括疱疹病毒、乙肝病毒、人巨细胞病毒,2条通路与肺部疾病有关,包括肺结核、小细胞肺癌,1条通路与炎肠性疾病有关,提示黄芩茎叶可能具有抗病毒和抗炎作用及可作用于肺发挥作用。靶点显著富集在IL-17信号通

路、糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、HIF-1 信号通路、T 细胞受体信号通路和 TNF 信号通路等通路上。AGE(晚期糖基化终产物)与 RAGE(糖基化终末产物受体)可激活 NADPH 氧化酶引起氧化应激活性氧,造成氧化损伤、血管收缩,亦促进促炎细胞因子、生长因子的表达与释放,引起慢性细胞活化与组织损伤。AGE-RAGE 信号通路可刺激血管紧张素 II 的产生,AGE 浓度的增高可促进血管紧张素 II 受体的表达^[18]。IL-17(白细胞介素-17)是有效的活性炎症因子,家族中 IL-17 和 IL-17F 在 Th17 细胞免疫中具有重要作用,广泛参与多种自身免疫性疾病,如慢性阻塞性肺疾病、溃疡性结肠炎等^[19]。HIF-1(缺氧诱导因子-1)由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基组成,是缺氧应激的关键因子,介导低氧信号,调控细胞产生多种缺氧代偿反应^[20]。T 细胞受体在 T 细胞的功能和免疫突触的形成中起关键作用。TNF(肿瘤坏死因子)有 TNF- α 、TNF- β 两种类型,可促进促炎因子的表达,参与全身炎症反应,亦有抗感染效应,阻止病毒早期蛋白质的合成,进而抑制病毒复制和杀伤病毒感染细胞^[21]。因此,黄芩茎叶可通过 AGE-RAGE、IL-17、HIF-1、T 细胞受体和 TNF 信号通路等多种信号通路发挥免疫调节、抗氧化、抗缺氧、抗炎、抗病毒等作用,对 COVID-19 导致的免疫系统紊乱、炎症、缺氧等具有潜在作用。

对网络中的 10 种化学成分与 COVID-19 治疗药物的潜在靶点(SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2)进行分子对接发现,10 种化学成分与潜在靶点均有较好的结合活性,提示这 10 种成分具有潜在的抗 SARS-CoV-2 活性。木犀草素、芹菜素、黄芩素、野黄芩苷、木犀草苷、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩素、咖啡酸的结合活性优于诊疗方案中 4 种 COVID-19 治药物,预测这 8 种成分具有潜在的 COVID-19 治疗作用。

综上,本研究采用网络药理学方法对黄芩茎叶防治 COVID-19 的化学成分、作用靶点、通路进行了系统分析,并结合分子对接技术将黄芩茎叶中的化学成分与 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 的结合能进行了探讨。从分子水平阐述了黄芩茎叶中黄芩茎叶治疗 COVID-19 多成分、多靶点、多途径的作用机制,并证明了黄芩茎叶中多种化学成分具有潜在的抗 SARS-CoV-2 活性和 COVID-19 治疗作用,提示黄芩茎叶、黄芩茎叶解毒胶囊和由黄芩茎叶制得的黄芩茶可用于 COVID-19 的防治中,黄芩茎叶亦可作为原料提取用于治疗 COVID-19 的活性成分,研

究结果可为黄芩防治 COVID-19 作用机制提供一定的理论基础与科学依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 韩碧群, 彭 勇, 肖培根. 中国别样茶的整理研究 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(4): 259-269.
- [3] 严宝飞. 黄芩茎叶资源化学与新资源药材质量评价研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [4] 萨其儿, 吴香杰. 黄芩茎叶的药理作用研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(6): 51-55.
- [5] 李永杰, 李 琳, 刘容秀, 等. 不同炒制温度和时长对黄芩茎叶化学成分影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(7): 70-73.
- [6] 赵粉线, 石 影, 郑 爱, 等. 芹菜素对丙烯腈染毒大鼠脑组织氧化应激及炎症反应的影响 [J]. 毒理学杂志, 2019, 33(4): 269-273.
- [7] 杨 杰. 芹菜素对腺嘌呤所致慢性肾衰竭大鼠肾功能、血流动力学及血脂的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(23): 2523-2527.
- [8] 邹 华, 王 颖, 秦晓宇, 等. 木犀草素通过抗氧化应激和抑制 COX-2 信号通路抑制哮喘小鼠气道炎症 [J]. 解剖科学进展, 2019, 25(6): 634-636.
- [9] 严小勇, 李 祥, 王晓丽, 等. 木犀草素对肠道病毒 71 型感染细胞的影响 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2016, 26(6): 488-491.
- [10] Li H D, Chen X, Huang H M, et al. Wogonin attenuates inflammation by activating PPAR- γ in alcoholic liver disease [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 95-106.
- [11] 姜茗宸, 汪受传, 徐秋月. 黄芩素抗病毒作用研究 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(7): 753-756.
- [12] Wang Y, Yue LL, Zhang L, et al. Baicalein suppresses EGF-induced proliferation and migration of glioma cells via EGFR/Akt signaling pathways [J]. J Clin Exp Med 2019, 12(5): 6335-6346.
- [13] 张静晓, 刘晓洁, 杨 春, 等. 几种天然产物与 CASP3 靶点的相互作用机制探索 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(11): 1824-1828.
- [14] 孙 健, 沈巨信. 炎症及细胞自噬与急性肺损伤关系的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(17): 2163-2168.
- [15] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. Lancet, 2020, 395(10223): 497-506.
- [16] 刘 嘉, 严宝飞, 曾明月, 等. 黄芩-金银花药对治疗新型冠状病毒肺炎潜在作用机制的网络药理学研究 [J]. 世

- 界中医药, 2020, 15(4): 502-511.
- [17] 王丹侠, 崔世勇. 血红素的应用分析研究进展 [J]. 上海预防医学杂志, 2002, (5): 219-221.
- [18] 杨超茅, 杨志新, 马晓玲. AGEs-RAGE 信号通路在糖尿病肾病中的作用机制及中医药研究进展 [J]. 中医学报, 2019, 34(9): 1864-1868.
- [19] Jian L, George L, Leilei C, et al. Interleukin 23 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-Kappa B induced matrix metalloproteinase 9 expression [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46264.
- [20] 杨梦思, 周娜, 王志钢, 等. 转录因子 HIF-1 α 及其信号通路在疾病发生中的作用研究进展 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 8-13.
- [21] 张悦, 周冬梅, 李伟, 等. 肿瘤坏死因子- α 在糖尿病痛性神经病变患者中的表达及其意义 [J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(1): 36-40.