

基于网络药理学与分子对接的加减香砂六君子汤治疗新型冠状病毒肺炎恢复期肺脾气虚证的机制研究

冯娟¹, 闫奎坡^{2*}, 朱翠玲², 孙彦琴², 徐亚洲², 郭雨晴¹, 张笑笑¹, 李铖¹

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450000

2. 河南中医药大学第一附属医院心脏中心, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 探讨加减香砂六君子汤治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)恢复期肺脾气虚证的作用机制。方法 利用TCMSP数据库筛选中药活性成分和靶点, 利用Gendcars、OMIM数据库筛选疾病靶点, STRING平台对靶点进行PPI网络构建, 并进行GO和KEGG分析, 利用Cytoscape 3.7.2软件构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络图, 然后通过拓扑学参数分析获得加减香砂六君子汤主要活性成分和靶点, 最后将主要活性成分与靶点进行分子对接验证。结果 得到槲皮素、木犀草素、山柰酚、柚皮素等115个活性成分, PTGS2、NOS2、PPARG、PTGS1、MAPK14等48个靶点, 主要涉及IL-17、TNF、T细胞受体、MAPK、VEGF等155条通路。分子对接显示, 槲皮素、木犀草素、山柰酚、柚皮素与3CL水解酶、ACE2、PTGS2具有较好的结合活性, 与第七版推荐抗病毒药物结合能相近。结论 加减香砂六君子汤活性成分可通过与3CL水解酶、ACE2、PTGS2结合, 调控IL-17、TNF、T细胞受体、MAPK、VEGF等信号通路来抑制炎症反应, 调节机体免疫, 减轻肺损伤, 促进细胞生长分化和肺血管生成, 从而改善患者症状, 促进恢复期患者康复, 提高机体免疫力, 降低疾病复发或再感染的风险。

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 加减香砂六君子汤; 恢复期; 肺脾气虚证; SARS-CoV-2 3CL水解酶; 血管紧张素转化酶II; 前列腺素内过氧化物合酶2 (PTGS2); 网络药理学; 分子对接; 槲皮素; 木犀草素; 山柰酚; 柚皮素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 09-1673-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.09.002

Mechanism of modified Xiangsha Liujunzi Decoction on COVID-19 with lung and spleen Qi deficiency syndrome in recovery period based on network pharmacology and molecular docking

FENG Juan¹, YAN Kuipo², ZHU Cuiling², SUN Yanqin², XU Yazhou², GUO Yuqing¹, ZHANG Xiaoxiao¹, LI Cheng¹

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of modified Xiangsha Liujunzi Decoction on COVID-19 with lung and spleen Qi deficiency syndrome in recovery period. **Methods** This study searched TCMSP database for the active components and targets, searched Gendcars and OMIM databases for disease targets, used STRING and Cytoscape 3.7.2 to build PPI and "drug-ingredient-target-disease" network diagram, performed GO and KEGG analysis. Main active components and targets were then obtained by calculating topological parameters. Finally, main active components and targets were identified by molecular docking. **Result** 115 active components including quercetin, luteolin, kaempferol, naringenin, and 48 targets including PTGS2, NOS2, PPARG, PTGS1, MAPK14 were predicted. IL-17, TNF, T cell receptor, MAPK, VEGF signal pathways were involved. Active components have good binding activity with 3CL hydrolase, ACE2, PTGS2. **Conclusion** Binding with 3CL hydrolase, ACE2, PTGS2, modified Xiangsha

收稿日期: 2020-04-17

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81303073); 河南省科技攻关项目(92102310161; 182102310291); 河南省中医药科学研究专项(20-21ZY1015; 20-21ZY2004)

第一作者: 冯娟(1993—), 女, 河南中医药大学硕士研究生, 主要研究中医药防治心血管疾病。E-mail: 2903614752@qq.com

*通信作者: 闫奎坡(1982—), 男, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究中西医结合对心血管疾病的预防和治疗。

Tel: (0371)66263102 E-mail: ykp19821122@163.com

LiuJunzi Decoction regulate IL-17, TNF, T cell receptor, MAPK, VEGF pathways to inhibit inflammatory response, regulate body immunity, reduce lung injury, promote cell growth and differentiation and pulmonary angiogenesis, improve the symptoms of patients, promote the recovery of patients, improve the body immunity, reduce the risk of disease recurrence or reinfection.

Key words: COVID-19; modified Xiangsha LiuJunzi Decoction; recovery period; lung and spleen Qi deficiency syndrome; SARS-CoV-2 3CL hydrolase; ACE2; PTGS2; network pharmacology; molecular docking; quercetin; luteolin; kaempferol; naringenin

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)是由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的急性呼吸道传染病,主要经呼吸道飞沫和密切接触传播,以发热、干咳、乏力为主要表现,其传染性强,疫情已在全世界蔓延,作为突发的公共卫生事件,引起全世界的重视^[1]。2020年1月20日被国家卫生健康委员会纳入传染病防治法乙类传染病,实行甲类管理。国家卫生健康委员会、中医药管理局及各地主管部门迅速对疫情做出积极的应对措施,先后制定了7版《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》(以下简称第一~七版),从更新的诊疗方案可以看出,中医药在COVID-19的治疗上由开始的参与者到后来的主力军,都体现了国家对中医药的重视。目前COVID-19疫情蔓延得到了一定控制,但COVID-19的治疗暂无特效治疗药物,大量抗病毒和激素药物应用后,患者有着不同程度的肺功能损伤、间质性肺炎、肺纤维化等病理改变^[2],出院后易出现再次感染的可能,“瘥后防复”尤为重要。因此,目前的治疗方案已不能满足恢复期庞大的人群的治疗需求,从第四版开始,中医诊疗部分首次增加了对恢复期患者肺脾气虚证的辨证分型及推荐用药,第六版在第四、五版基础上对恢复期患者增加了气阴两虚证型的辨治,弥补了目前中西医对恢复期患者治疗的空白和不足,充分体现了国家相关部门和医护人员对恢复期患者治疗的高度重视。第六、七版对恢复期肺脾气虚证患者推荐处方(原方:法半夏9g、陈皮10g、党参15g、炙黄芪30g、炒白术10g、茯苓15g、藿香10g、砂仁6g(后下)、甘草6g),由香砂六君子汤化裁而成(以下简称加减香砂六君子汤),具有多成分、多靶点、多途径的调控作用,但目前其药效物质基础和分子作用机制尚未明确。中药网络药理学的发展从分子网络环境下促进了中医药的发展,通过整合计算机虚拟计算、高通量组学分析及网络数据库查找等方法,构建生物分子网络,系统阐述中药及复方的药效基础和分子作用机制。分子对接技术可预测受体与中药活性分子间的相互作用方式、结合能及稳定性,可作为药物设计、研发的重要手段。SARS-CoV-2 3CL水解酶是参与SARS-

CoV-2复制的主要蛋白酶,现已作为SARS-CoV-2的药物靶点^[3]。ACE2是SARS-CoV-2侵袭人体宿主细胞的受体,83%来源于肺泡上皮II型细胞^[4]。研究发现^[5],ACE2与SARS-CoV-2的亲合力是SARS-CoV的10~20倍,提高了SARS-CoV-2的传播能力,成为COVID-19治疗药物筛选的重要靶点。因此,为临床恢复期患者治疗需要,本研究利用计算机模拟技术初步探讨加减香砂六君子汤用于COVID-19恢复期治疗的作用机制,并利用分子对接技术将主要活性成分与SARS-CoV-2 3CL水解酶、ACE2及筛选出的核心靶蛋白进行分子对接,从分子层面进一步阐述中药小分子的作用机制,为指导恢复期患者的治疗,促进患者康复及药物推广和临床应用提供进一步的借鉴,以助疫情控制。

1 材料与方法

1.1 中药活性成分及靶点的收集

通过中药系统药理数据库和分析平台TCMSP(<http://tcmssp.com/tcmssp.php>),以各单味药的标准中文名称或拉丁文为检索词,以口服利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18为筛选条件进行中药活性成分和靶点的筛选,并保存到Excel中,构建中药活性成分-靶点数据集。

1.2 靶点-标准基因名的转换

通过Uniprot平台(<https://www.uniprot.org/>)查询靶点的标准基因名,进行靶点-标准基因名转换。

1.3 疾病靶点的收集

通过关键词(Novel coronavirus、SARS-CoV-2、2019-Novel Coronavrius、Novel coronavirus pneumonia、NCP、COVID-19、nCoV-19)检索孟德尔人类遗传数据库OMIM(<https://www.omim.org/>)和GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库及查阅文献筛选出COVID-19相关疾病靶点,合并相关数据库,剔除重复靶点,保存在Excel中,构建疾病靶点信息数据集。

1.4 药物与疾病共有靶点的映射

通过Venny(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)绘图软件,将药物靶点与疾病靶点进行映射,获得加减香砂六君子汤治疗COVID-

19的靶点。

1.5 网络图的构建及拓扑学分析

将“1.2”和“1.4”项所收集的潜在靶点和药物疾病作用靶点,利用 Cytoscape3.7.2 软件构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络图。运用 NetworkAnalyzer 工具进行拓扑学分析,得到主要活性成分和核心靶点。本研究基于以下参数:平均最短路径(average shortest path length, ASPL)、介数中心性(betweenness centrality, BC)、中心接近度(closeness centrality, CC)、聚类系数(clustering coefficient, CC)、网络度(degree)评估节点在网络图中重要程度。

1.6 PPI网络构建

为进一步挖掘药物疾病作用靶点间相互作用关系,将“1.4”项获得的靶点导入 STRING 网络平台(<https://string-db.org/>),将蛋白种类定义为“Homo sapiens”,置信度>0.9为条件进行筛选,隐藏离散节点,构建 PPI 网络图,并保存为 TSV 格式文件,利用 R 软件对靶点的节点进行统计分析,并以柱状图形式呈现可视化。

1.7 GO和KEGG分析

将药物疾病作用靶点输入到 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),将蛋白种类定义为“Homo sapiens”,选择(biological process, BP)、细胞学组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)3个模块进行 GO 分析。利用 Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/about/>)数据库将药物疾病作用靶点转换成标准名称,利用 R 软件查找每个基因功能,进行 KEGG 分析,以 $P < 0.05$, $q < 0.05$ 进行过滤,并用气泡图和通路图进行可视化呈现。

1.8 分子对接

检索 RSCB PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)并下载 SARS-CoV-2 3CL 水解酶(PDB ID:6M2N)、血管紧张素转化酶 II(PDB ID:1R4L)和 PTGS2(PDB ID:1ALU)靶蛋白的 3D 结构,保存为 PDB 格式文件。从 PubChem 数据库检索中药活性成分的 2D 结构,并利用 ChemDraw 软件绘制其 3D 结构,进行能量优化,保存为 mol2 格式文件。利用 PyMOL 软件对蛋白进行去水、去磷酸根等无关离子,并进行靶蛋白受体和配体拆分,提取配体小分子,将预处理后的靶蛋白和原始配体保存为 PDB 格式文件。利用 AutoDockTools 软件设置 Grid Box 和盒子大小,寻找蛋白活性位点(活性口

袋)参数,并将活性小分子、预处理后的靶蛋白和原始配体转换成 pdbqt 格式文件,运行 AutoDockVina 软件对活性小分子和靶蛋白进行分子对接,最后运用 PyMOL 软件将对接结果进行可视化分析。

2 结果

2.1 中药活性成分和靶点

得到 194 个活性成分,半夏 13 个,陈皮 5 个,党参 21 个,白术 7 个,茯苓 15 个,藿香 11 个,砂仁 10 个,黄芪 20 个,甘草 92 个;得到 3 083 个中药靶点,通过 Uniprot 数据库进行基因名转换后,得到标准基因名 821 个,其中半夏 74 个,陈皮 55 个,党参 91 个,白术 15 个,茯苓 17 个,藿香 150 个,砂仁 40 个,黄芪 180 个,甘草 199 个,剔除重复靶点后得到 237 个中药靶点。

2.2 疾病相关靶点及药物与疾病共有靶点的映射

获得 352 个 COVID-19 相关靶点。将药物靶点与疾病靶点进行映射取交集,获得加减香砂六君子汤治疗 COVID-19 恢复期的潜在靶点 48 个,利用 Venny 2.1 绘图软件制作 Venn 图,见图 1。

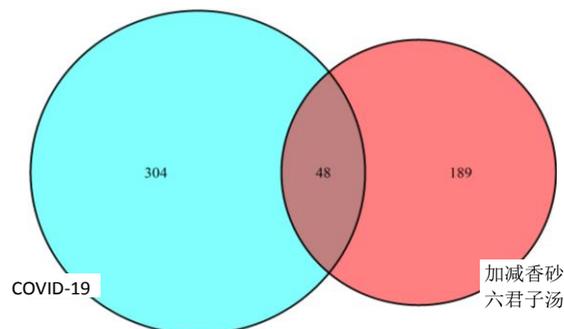


图1 潜在靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of potential targets

2.3 网络图的构建及拓扑学分析

通过脚本运行将药物潜在靶点与疾病药物作用靶点进行整合,去除无交联部分,找到二者关联的靶点及对应的活性成分,获得药物、活性成分、靶点、疾病网络关系,输入到 Sytoscape 3.7.2 软件中,构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络图,红色代表疾病,绿色代表药物,紫色代表活性成分,黄色代表靶点,见图 2。共得到 48 个靶点和 115 个中药活性成分(甘草活性成分太多,故表中只列出甘草与其它药物共有活性成分)。其中白术 3 个,半夏 9 个,陈皮 4 个,党参 7 个,茯苓 1 个,黄芪 13 个,藿香 6 个,砂仁 2 个,甘草 83 个。13 个中药活性成分为药物间共有,豆甾醇(stigmasterol)为半夏、党参、砂仁共有,

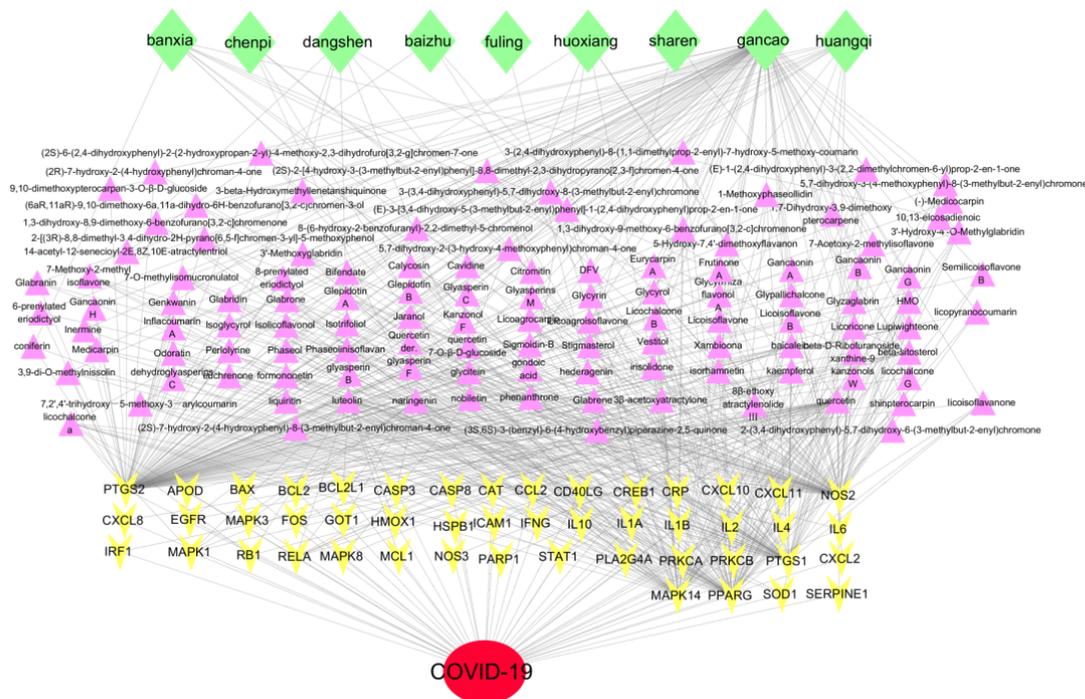


图2 “药物-成分-靶点-疾病”网络图

Fig. 2 “drug-ingredient-target-disease” network diagram

7-methoxy-2-methyl isoflavone为党参、甘草共有, 柚皮素(naringenin)为甘草、陈皮共有, 芒柄花素(formononetin)、异鼠李素(isorhamnetin)、华良姜素(jaranol)、毛蕊异黄酮(calycosin)、山柰酚(kaempferol)为甘草、黄芪共有, 蛇床子素(hederagenin)为黄芪、茯苓共有, 槲皮

素(querctetin)为黄芪、藿香共有, β-谷甾醇(β-sitosterol)为半夏、砂仁共有, 见表1。拓扑学参数degree越大, 说明节点在网络图中作用越大, 得到槲皮素、木犀草素、山柰酚、柚皮素等主要活性成分和PTGS2核心靶点, 部分拓扑学参数(degree前30的节点), 见表2。

表1 药物-活性成分-靶点基本信息

Table 1 Information of drug-active ingredient-target

药物	活性成分	靶点基因
白术	14-acetyl-12-senecioid-2E, 8Z, 10E-atractylentriol 3β-acetoxyatractylone 8β-ethoxy atractylenolide III	PTGS2
半夏	cavidine baicalein beta-sitosterol Stigmasterol gondoic acid coniferin 10, 13-eicosadienoic (3S, 6S)-3-(benzyl)-6-(4-hydroxybenzyl) piperazine-2, 5-quinone beta-D-ribofuranoside, xanthine-9	PTGS1、PTGS2 PTGS1、RELA、BCL2、FOS、BAX、CASP3、APOD PTGS1、PTGS2、BCL2、BAX、CASP3、CASP8、PRKCA PTGS1、PTGS2 PTGS1 PPARG、PTGS2 PTGS1 PTGS2
陈皮	naringenin 5, 7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one citromitin nobiletin	PTGS1、PTGS2、RELA、BCL2、MAPK3、MAPK1、CASP3、SOD1、CAT、PPARG、GOT1 PTGS1、PTGS2 PTGS2 NOS2、PTGS1、PPARG、PTGS2、BCL2、BAX、MAPK8、CREB1、PLA2G4A
党参	perlolyrine	PTGS2

续表1

药物	活性成分	靶点基因
	7-methoxy-2-methyl isoflavone	NOS2、PTGS1、PPARG、PTGS2、MAPK14
	frutinone A	PTGS1、PPARG、PTGS2
	luteolin	PTGS1、PTGS2、RELA、EGFR、BCL2L1、MAPK1、IL10、RB1、IL6、CASP3、PPARG、HMOX1、ICAM1、MCL1、IL2、IFNG、IL4、CD40LG
	stigmaterol	PTGS1、PTGS2
	3-β-hydroxymethyllenentanshiquinone	PTGS2
	glycitein	PTGS1、PPARG、PTGS2、MAPK14、NOS2
茯苓	hederagenin	PTGS2
甘草	jaranol	NOS2、PTGS1、PTGS2
	isorhamnetin	NOS2、PTGS1、PPARG、PTGS2、MAPK14、RELA
	7-methoxy-2-methyl isoflavone	NOS2、PTGS1、PPARG、PTGS2、MAPK14
	formononetin	NOS2
	calycosin	PTGS1、PPARG、PTGS2、MAPK14
	kaempferol	NOS2、PTGS1、PPARG、PTGS2、RELA、BCL2、BAX、CASP3、MAPK8、STAT1、HMOX1、ICAM1
	naringenin	PTGS1、PTGS2、RELA、BCL2、MAPK3、MAPK1、CASP3、SOD1、CAT、PPARG、GOT1
黄芪	jaranol	NOS2、PTGS1、PTGS2
	hederagenin	PTGS1、PTGS2
	isorhamnetin	NOS2、PTGS1、PPARG、PTGS2、MAPK14、RELA
	3,9-di-O-methylnisosolin	NOS2、PTGS1、PTGS2
	7-O-methylisomucronulatol	NOS2、PTGS1、PPARG、PTGS2、MAPK14
	9,10-dimethoxypterocarp-3-O-β-D-glucoside	PTGS2
	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurand[3,2-c]chromen-3-ol	NOS2、PTGS1、PTGS2
	bifendate	PTGS2、PTGS1
	formononetin	NOS2、PPARG、PTGS2、MAPK14、PTGS1、PPARG、IL4
	calycosin	NOS2、PPARG、PTGS2、MAPK14、PTGS1
	kaempferol	NOS2、PPARG、PTGS2、RELA、BCL2、BAX、PTGS1、CASP3、MAPK8、STAT1、PPARG、HMOX1、ICAM1
	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	PTGS2
	quercetin	PTGS1、PPARG、PTGS2、RELA、BCL2、BCL2L1、FOS、BAX、MAPK1、RB1、IL6、CASP3、CASP8、SOD1、PRKCA、STAT1、HMOX1、ICAM1、IL1B、CCL2、CXCL8、PRKCB、NOS3、HSPB1、IL2、SERPINE1、IFNG、IL1A、PARP1、CXCL11、CXCL2、CRP、CXCL10
藿香	genkwanin	NOS2、PTGS1、PTGS2
	5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanon	PTGS1、PTGS2
	irisolidone	NOS2、PTGS1、PPARG、PTGS2、MAPK14、RELA、MAPK1、IL1B
	phenanthrone	PTGS1、PTGS2
	quercetin 7-O-β-D-glucoside	PTGS1、PPARG、PTGS2
	quercetin	PTGS1、PPARG、PTGS2、RELA、EGFR、BCL2、BCL2L1、FOS、BAX、MAPK1、IL10、RB1、IL6、CASP3、CASP8、SOD1、PRKCA、STAT1、PPARG、HMOX1、ICAM1、IL1B、CCL2、CXCL8、PRKCB、NOS3、HSPB1、IL2、SERPINE1、IFNG、IL1A、PARP1、CXCL11、CXCL2、CRP、CXCL10、CD40LG、IRF1
砂仁	beta-sitosterol	PTGS1、PTGS2、BCL2、BAX、CASP3、CASP8、PRKCA
	Stigmaterol	PTGS1、PTGS2

2.4 PPI网络构建

将48个靶点导入STRING平台,进行PPI网络构建,节点代表靶点,边代表靶点间相互作用关系,线条多少代表靶点间相互关联的强度(degree),degree值越大,说明靶点相互作用越突出,将degree值前30的靶点以柱状图的形式呈现,见图3、4。

2.5 GO和KEGG分析

利用DAVID数据库对48个靶点进行GO分析,主要涉及细胞凋亡调控、细胞程序性死亡调控、细胞死亡调控、对有机物的反应等230个BP,胞浆、胞外区、细胞外间隙等34个CC,细胞因子活性、脂质结合、酶结合、蛋白激酶活性等45个MF,BP、CC、MF基因富集数量前10的条目详见表3。KEGG富

表2 网络图中节点拓扑学参数

Table 2 Topological parameters of nodes in network diagram

种类	名称	介数中心性	网络度
靶点基因	PTGS2	0.39 462 857	112
药物	gancao	0.11 324 168	83
靶点基因	NOS2	0.08 236 887	73
靶点基因	PPARG	0.10 499 718	71
靶点基因	PTGS1	0.12 230 858	62
靶点基因	MAPK14	0.03 776 359	51
disease	COVID-19	0.19 009 571	48
化合物	quercetin	0.13 208 851	40
化合物	luteolin	0.03 373 727	19
化合物	kaempferol	0.01 901 345	14
药物	huangqi	0.00 673 732	13
化合物	naringenin	0.02 448 543	13
化合物	licochalcone a	0.00 738 242	10
化合物	nobiletin	0.01 692 097	10
化合物	irisolidone	0.00 762 516	9
化合物	beta-sitosterol	0.01 452 745	9
化合物	baicalein	0.00 998 416	9
药物	banxia	0.00 279 338	9
靶点基因	RELA	0.00 304 342	9
化合物	formononetin	0.00 504 217	8
化合物	isorhamnetin	0.00 266 401	8
靶点基因	BCL2	0.00 305 476	8
化合物	calycosin	0.00 149 789	7
化合物	7-methoxy-2-methyl isoflavone	0.00 299 510	7
药物	dangshen	0.00 162 459	7
靶点基因	CASP3	0.00 247 287	7
药物	huoxiang	0.00 174 380	6
化合物	7-O-methylisomucronulatol	0.00 116 776	6
化合物	odoratin	0.00 055 600	6
化合物	licoagrocarpin	0.00 055 600	6

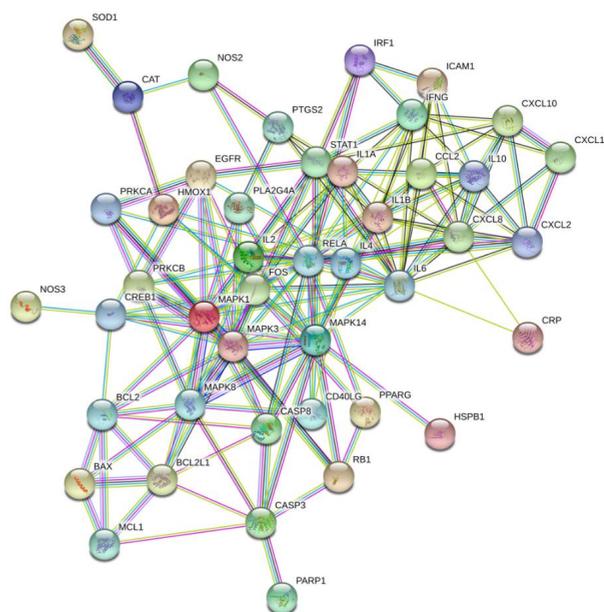


图3 PPI网络图

Fig. 3 PPI network diagram

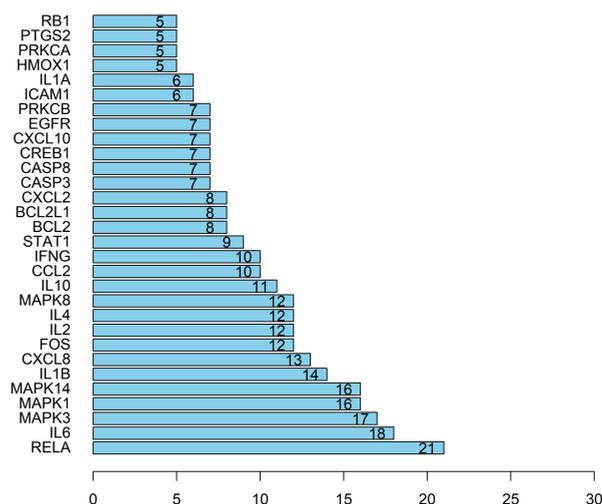


图4 前30靶点柱状图

Fig. 4 Top 30 targets histogram

集分析,共得到155条信号通路,将前20条通路以气泡图进行可视化分析,气泡图横轴代表基因比例,纵轴代表通路,气泡面积代表基因数,颜色代表P值的大小,P值越小(颜色越红)说明富集程度高。从气泡图看出,加减香砂六君子汤治疗COVID-19可能与IL-17信号通路(IL-17 signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号途径(TNF signaling pathway)、甲型流感(Influenza A)、Th17细胞分化(Th17 cell differentiation)等有关,主要与病毒感染、炎症反应、机体免疫、细胞生长分化和创伤愈合等相关,见图5。为了呈现靶点在通路中关键调节作用,构建

KEGG通路图,以IL-17、T细胞受体和VEGF信号通路为代表呈现,见图6~8。

2.6 分子对接结果

将加减香砂六君子汤主要活性成分及第七版推荐的抗病毒药物与SARS-CoV-2 3CL水解酶、ACE2、PTGS2靶蛋白进行分子对接,配体与受体结合能越低,构象越稳定,发生作用可能性越大,结果显示,加减香砂六君子汤主要活性成分与COVID-19治疗药物潜在靶点具有较好的结合活性,分子构象结合稳定,与第七版推荐抗病毒药物结合能相近。见表4和图9。

表3 GO分析结果
Table 3 Results of GO analysis

GO	条目	数量	基因
BP	regulation of apoptosis	29	CCL2、MCL1、PTGS2、BCL2L1、IL10、CASP3、HMOX1、BCL2、CASP8、IFNG、IL1B、NOS3、CAT、IL1A、IL4、EGFR、PRKCA、IL6、CREB1、RELA、STAT1、SOD1、MAPK1、PLA2G4A、CD40LG、BAX、HSPB1、MAPK8、IL-2
	regulation of programmed cell death	29	CCL2、MCL1、PTGS2、BCL2L1、IL10、CASP3、HMOX1、BCL2、CASP8、IFNG、IL1B、NOS3、CAT、IL1A、IL4、EGFR、PRKCA、IL6、CREB1、RELA、STAT1、SOD1、MAPK1、PLA2G4A、CD40LG、BAX、HSPB1、MAPK8、IL2
	regulation of cell death	29	CCL2、MCL1、PTGS2、BCL2L1、IL10、CASP3、HMOX1、BCL2、CASP8、IFNG、IL1B、NOS3、CAT、IL1A、IL4、EGFR、PRKCA、IL6、CREB1、RELA、STAT1、SOD1、MAPK1、PLA2G4A、CD40LG、BAX、HSPB1、MAPK8、IL2
	response to organic substance	28	CCL2、MCL1、PTGS2、PPARG、PTGS1、BCL2L1、IL10、FOS、CASP3、GOT1、HMOX1、BCL2、CASP8、IFNG、IL1B、NOS3、EGFR、PRKCA、IL6、RELA、CREB1、STAT1、SOD1、MAPK1、PLA2G4A、MAPK14、HSPB1、PARP1
	regulation of cell proliferation	27	CCL2、PTGS2、PPARG、PTGS1、BCL2L1、IL10、CXCL10、CASP3、HMOX1、BCL2、SERPINE1、IFNG、IL1B、NOS3、NOS2、IL1A、IL4、EGFR、PRKCA、IL6、RELA、RB1、STAT1、MAPK1、PLA2G4A、BAX、IL2
	negative regulation of apoptosis	21	EGFR、IL4、IL6、CCL2、MCL1、RELA、BCL2L1、SOD1、IL10、CASP3、CD40LG、HMOX1、BAX、BCL2、IL1B、HSPB1、NOS3、MAPK8、CAT、IL1A、IL2
	negative regulation of programmed cell death	21	EGFR、IL4、IL6、CCL2、MCL1、RELA、BCL2L1、SOD1、IL10、CASP3、CD40LG、HMOX1、BAX、BCL2、IL1B、HSPB1、NOS3、MAPK8、CAT、IL1A、IL2
	negative regulation of cell death	21	EGFR、IL4、IL6、CCL2、MCL1、RELA、BCL2L1、SOD1、IL10、CASP3、CD40LG、HMOX1、BAX、BCL2、IL1B、HSPB1、NOS3、MAPK8、CAT、IL1A、IL2
	homeostatic process	21	PRKCA、IL6、CCL2、MCL1、PPARG、RB1、BCL2L1、SOD1、PRKCB、CASP3、PLA2G4A、GOT1、HMOX1、BAX、BCL2、IFNG、SERPINE1、IL1B、PARP1、IL1A、IL2
	response to hormone stimulus	19	PRKCA、IL6、CCL2、PTGS2、RELA、PPARG、PTGS1、BCL2L1、STAT1、IL10、MAPK1、FOS、PLA2G4A、GOT1、HMOX1、BCL2、IL1B、NOS3、PARP1
CC	cytosol	20	PRKCA、RELA、PPARG、BCL2L1、SOD1、PRKCB、MAPK1、PLA2G4A、CASP3、GOT1、HMOX1、MAPK14、BAX、BCL2、MAPK3、CASP8、NOS3、MAPK8、NOS2、CAT
	extracellular region	19	EGFR、IL4、ICAM1、IL6、CCL2、CRP、CXCL2、SOD1、CXCL11、IL10、CXCL10、APOD、CD40LG、HMOX1、IFNG、SERPINE1、IL1B、IL1A、IL2
	extracellular space	18	EGFR、IL4、ICAM1、IL6、CCL2、CRP、CXCL2、SOD1、CXCL11、IL10、CXCL10、APOD、CD40LG、HMOX1、IFNG、IL1B、IL1A、IL2
	extracellular region part	18	EGFR、IL4、ICAM1、IL6、CCL2、CRP、CXCL2、SOD1、CXCL11、IL10、CXCL10、APOD、CD40LG、HMOX1、IFNG、IL1B、IL1A、IL2
	membrane-enclosed lumen	18	PTGS2、MCL1、CREB1、RELA、RB1、SOD1、STAT1、FOS、MAPK1、CASP3、HMOX1、MAPK14、MAPK3、CASP8、NOS3、MAPK8、CAT、PARP1
	intracellular organelle lumen	17	PTGS2、MCL1、CREB1、RELA、RB1、STAT1、SOD1、FOS、MAPK1、CASP3、HMOX1、MAPK14、MAPK3、CASP8、NOS3、MAPK8、PARP1
	organelle lumen	17	PTGS2、MCL1、CREB1、RELA、RB1、STAT1、SOD1、FOS、MAPK1、CASP3、HMOX1、MAPK14、MAPK3、CASP8、NOS3、MAPK8、PARP1
	cell fraction	15	PRKCA、PTGS2、PTGS1、CXCL2、FOS、MAPK1、PLA2G4A、GOT1、CD40LG、HMOX1、BAX、BCL2、SERPINE1、HSPB1、NOS3
	nuclear lumen	15	MCL1、RELA、CREB1、RB1、STAT1、FOS、MAPK1、CASP3、HMOX1、MAPK14、MAPK3、CASP8、NOS3、MAPK8、PARP1
	nucleoplasm	11	MAPK1、FOS、CASP3、MCL1、RELA、MAPK14、CREB1、MAPK3、MAPK8、RB1、PARP1
MF	cytokine activity	12	IL4、IL6、CCL2、CD40LG、CXCL2、IFNG、IL1B、CXCL11、IL10、IL1A、IL2、CXCL10
	protein dimerization activity	11	EGFR、FOS、MCL1、BCL2、CREB1、BAX、PPARG、NOS2、BCL2L1、CAT、SOD1
	identical protein binding	11	EGFR、RELA、BCL2、BAX、CASP8、HSPB1、NOS2、BCL2L1、CAT、SOD1、PARP1
	lipid binding	8	PRKCA、PTGS2、APOD、BAX、PTGS1、PPARG、PRKCB、IL2
	enzyme binding	8	EGFR、MAPK1、RELA、HMOX1、BCL2、SERPINE1、RB1、SOD1
	protein kinase activity	8	PRKCA、EGFR、MAPK1、CCL2、MAPK14、MAPK3、MAPK8、PRKCB
	protein heterodimerization activity	7	EGFR、FOS、MCL1、BCL2、BAX、PPARG、BCL2L1
	protein serine/threonine kinase activity	7	PRKCA、EGFR、MAPK1、MAPK14、MAPK3、MAPK8、PRKCB
	heme binding	6	PTGS2、HMOX1、PTGS1、NOS3、NOS2、CAT
	tetrapyrrole binding	6	PTGS2、HMOX1、PTGS1、NOS3、NOS2、CAT

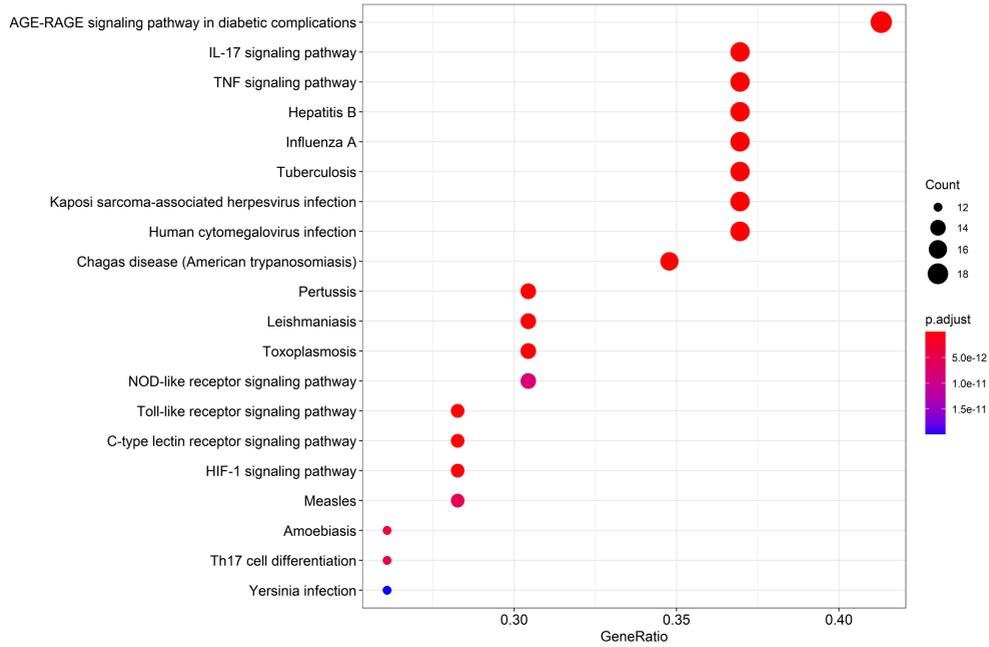


图5 KEGG富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble diagram of KEGG enrichment analysis

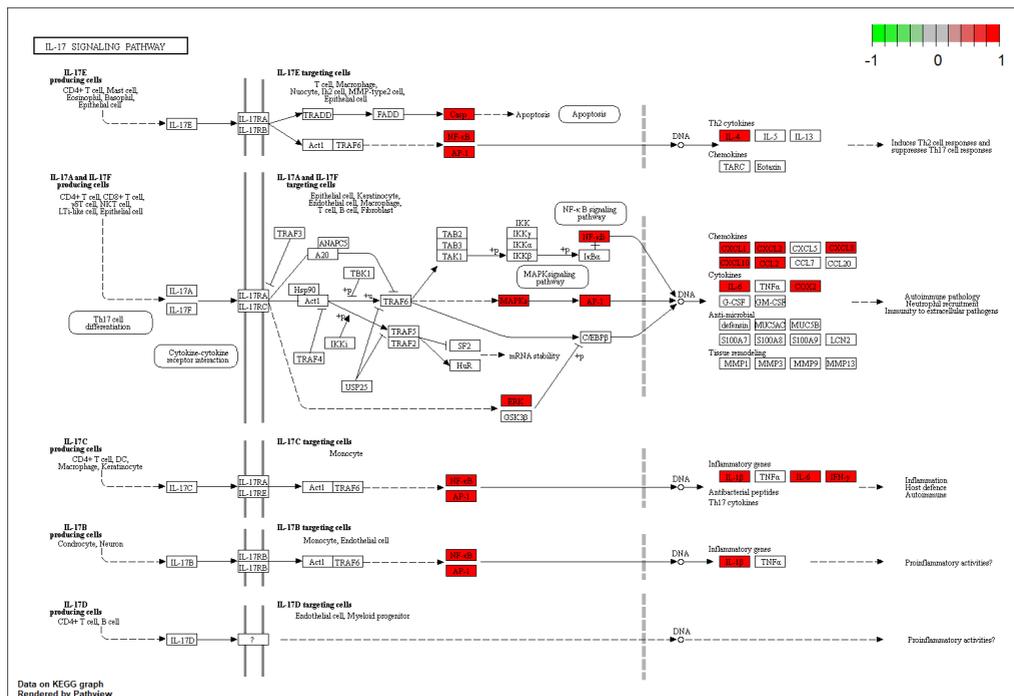


图6 IL-17信号通路图

Fig. 6 IL-17 signal pathways diagram

3 讨论

目前,我国 COVID-19 疫情得到一定遏制,但是,解除隔离和治愈出院患者越来越多,改善恢复期患者的症状、提高患者肺功能和生活质量已成为急需解决的问题,应恢复期庞大人群治疗需求,2月22日,国家卫生健康委员会、国家中医药管理局正式印发《新型冠状病毒肺炎恢复期中医康复指导建

议(试行)》,为恢复期患者提供进一步的康复指导,再次强调了中医药在恢复期患者诊疗中的积极作用。COVID-19 属于中医学“肺系疫病”范畴,乃是“疫戾”之气侵犯机体,正邪交争的结果。总的病机为疫毒外侵,肺经受邪,正气亏虚,其病位主要在肺脾,以肺脏和免疫系统损伤为主,同时又继发其它脏器损伤。根据武汉市的气候环境特点,此次疫

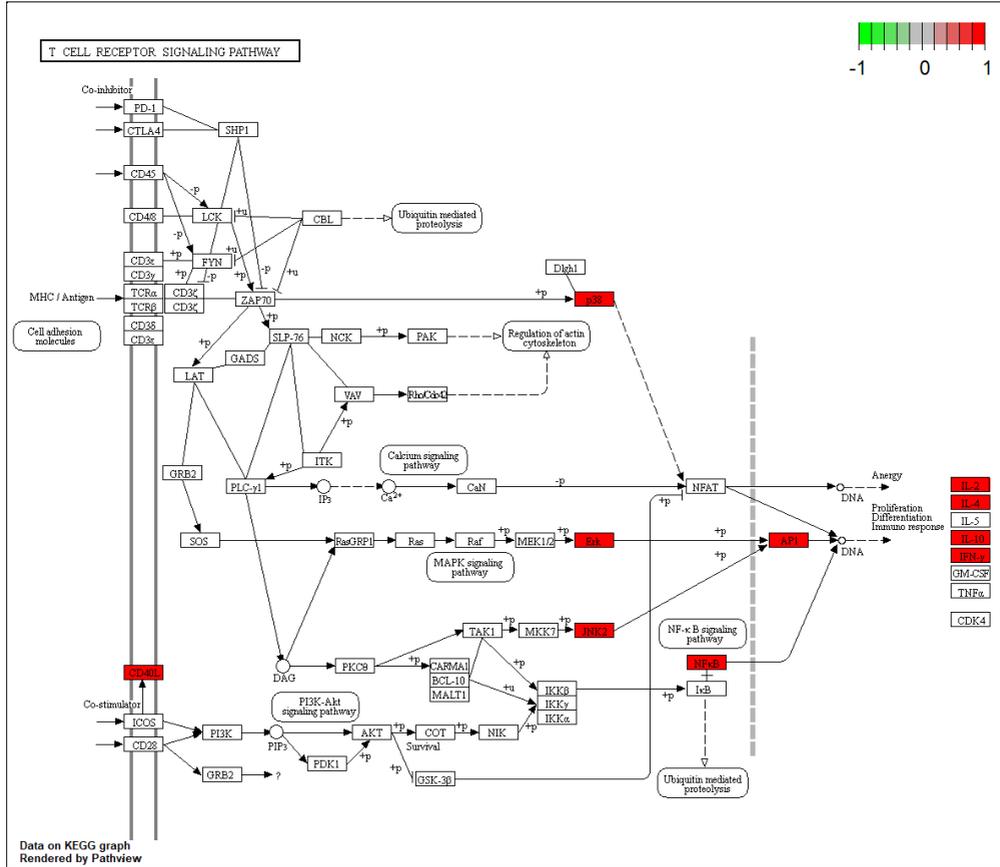


图7 T细胞受体信号通路图
Fig. 7 T cell receptor signal pathways diagram

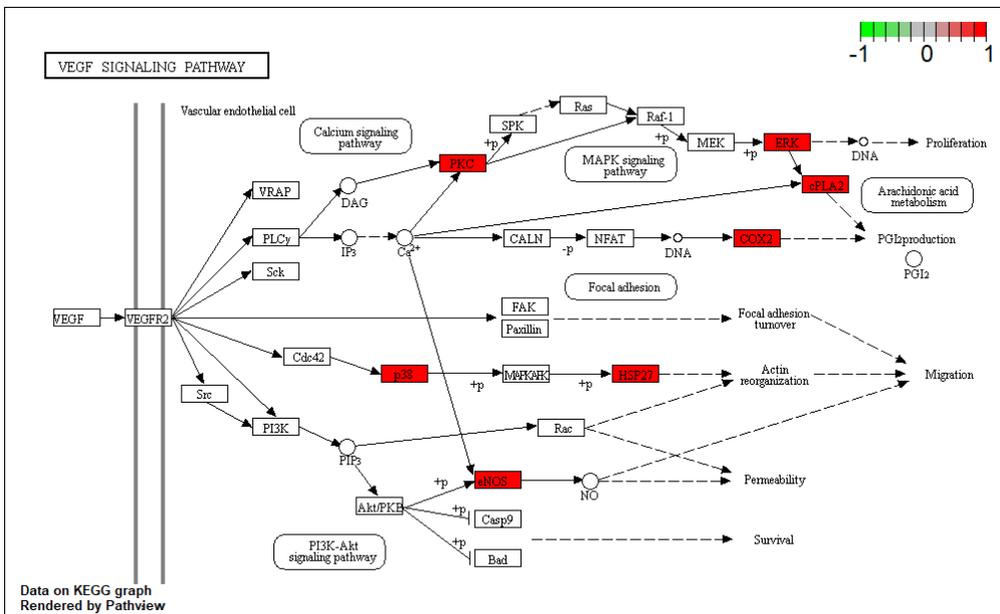


图8 VEGF信号通路图
Fig. 8 VEGF signal pathways diagram

情病邪主要以湿毒为患,有袭表、阻肺、困脾的临床表现。湿为阴邪,常夹杂其它邪气(SARS-CoV-2)伤人,伤及人体阳气,结合湿邪黏滞重浊的特点,病情多缠绵难愈。早期疫毒侵害人体,以邪气盛为

主,恢复期正气亏虚,正虚邪恋,这也是SARS-CoV-2致病潜伏期长,病程复杂多变的表现。中医学“整体观念”从人体正气(内因)和致病邪气(外因)出发,根据患者临床特点,对恢复期患者进行辨证论

表4 分子对接结果
Table 4 Molecular docking result

化合物	英文名称	分子式	相对分子质量	CAS	结合能/(kJ·mol ⁻¹)		
					3CL水解酶	ACE2	PTGS2
木犀草素	luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	491-70-3	-32.64	-33.89	-35.15
山柰酚	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	520-18-3	-30.54	-35.15	-34.73
槲皮素	quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	117-39-5	-30.12	-36.40	-34.31
柚皮素	naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.25	93602-28-9	-29.71	-32.64	-33.90
甘草查尔酮A	licochalcone A	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	338.40	58749-22-7	-30.12	-34.31	-23.85
川陈皮素	nobiletin	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	402.39	478-01-3	-28.03	-33.05	-22.18
黄芩素	baicalein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24	491-67-8	-29.29	-35.15	-34.73
异鼠李素	isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.26	480-19-3	-28.45	-35.98	-33.90
洛匹那韦	lopinavir	C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅	628.80	192725-17-0	-31.80	-40.17	-22.59
利巴韦林	ribavirin	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅	244.21	36791-04-5	-25.10	-28.45	-23.85
利托那韦	ritonavir	C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂	720.96	155213-67-5	-25.96	-36.40	-25.52
磷酸氯喹	chloroquine phosphate	C ₁₈ H ₃₂ ClN ₃ O ₃ P ₂	515.87	50-63-5	-23.03	-28.03	-22.59
阿比多尔	arbidol	C ₂₂ H ₂₅ BrN ₂ O ₃ ·HCl·H ₂ O	531.89	131707-23-8	-24.27	-31.80	-23.43

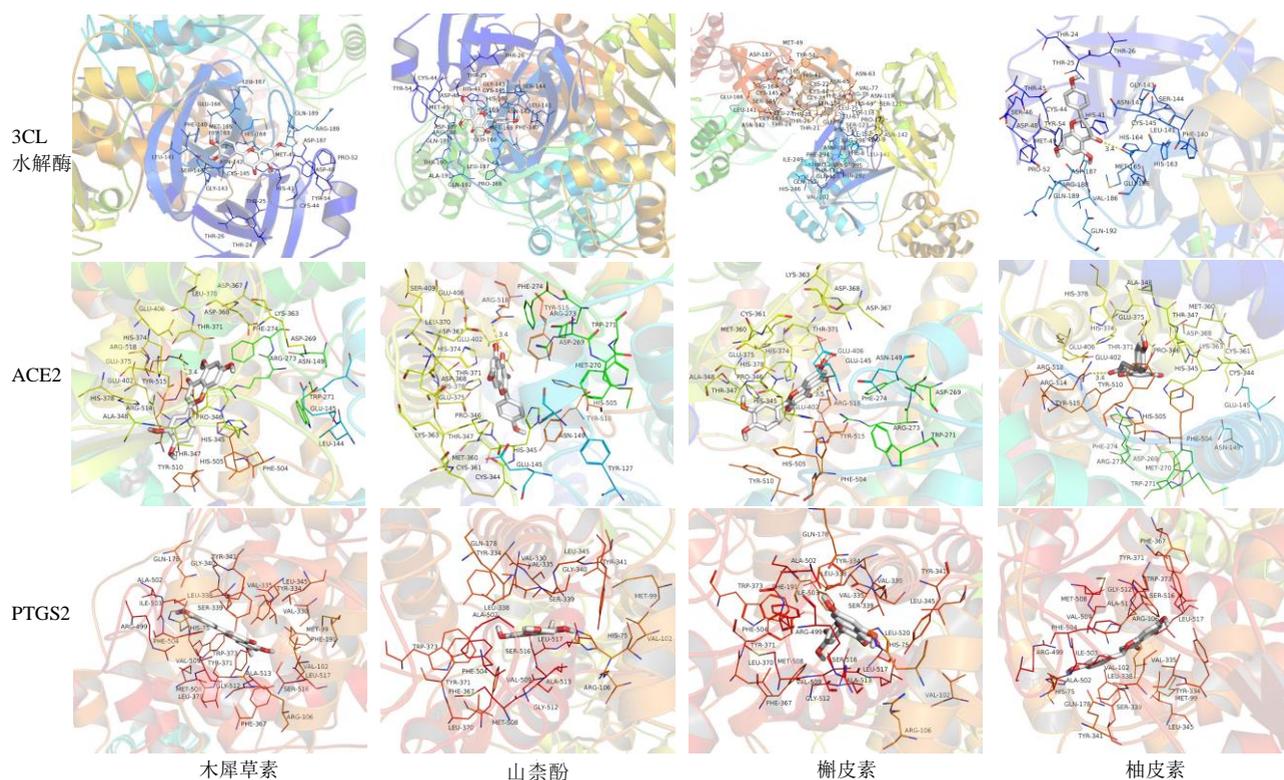


图9 主要活性成分与靶蛋白分子对接模式图

Fig. 9 Docking pattern of main active components and target proteins

治,并取得了显著疗效。恢复期属于正虚邪恋阶段,肺主表,肺为娇脏,外邪从三表(腠理、呼吸道、消化道)侵袭机体,最先侵犯肺脏,肺的宣发肃降失常,机体气化不利,脾为中土,喜燥恶润,湿毒疫邪更易伤及脾气、脾阳,湿邪困阻脾胃,阻肺困脾,由肺及脾,肺脾两脏又为母子关系,子病及母,子盗母

气,肺气虚则不能助脾运化,肺脾之气更伤,日久出现肺脾气虚证,临床上少数病情较重的患者,晚期可发展为肺脏痿废不用,肺脾气虚证,故COVID-19恢复期在脏腑上以肺脾气虚为主。脾为后天之本,气血生化之源,脾主运化,运化水谷精微,因此,在恢复期的治疗中,当以调护脾胃,助运化为主,使三

焦得通, 气血得生, 同时兼顾肺、心。推荐处方加减香砂六君子汤由半夏、陈皮、党参、黄芪、白术、茯苓、藿香、砂仁、甘草9味中药组成, 方中以党参益气健脾, 黄芪补肺固表, 二者合用大补肺脾之气; 半夏、陈皮燥湿化痰, 白术、茯苓健脾除湿; 藿香、砂仁芳香醒脾, 辟秽化浊祛湿, 可清胃肠道之余邪。全方标本兼顾, 具有健脾益肺, 培土生金的作用。

本研究基于网络药理学与分子对接研究加减香砂六君子汤治疗 COVID-19 恢复期肺脾气虚证的机制, 共得到槲皮素、木犀草素、山柰酚、柚皮素、异鼠李素、黄芩素等 115 个活性成分, 其中甘草的活性成分最多, 13 个活性成分为药物间共有成分, 说明中药间有着相互作用和联系。研究表明^[6], 木犀草素具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗菌和抗癌的作用; 槲皮素通过 TGF- β 1 信号通路抑制“上皮-间质转化”来减轻肺纤维化^[7], 抑制巨噬细胞诱发的炎症风暴和氧化应激、祛痰止咳、抗氧化和组织修复的作用^[8]; 山柰酚抑制 IL-6、TNF- α 等炎症因子的释放, 减轻氧化应激反应对肺脏的损伤^[9]; 异鼠李素降低血清和肺组织中促炎细胞因子的水平^[10]。本研究结果与目前报道加减香砂六君子汤多种活性成分在炎症反应, 免疫调节相关研究相一致。得到 PTGS2、NOS2、PPARG、PTGS1、MAPK14 等 48 个靶蛋白, 对这些靶蛋白进行功能富集分析, 其功能主要富集在生物信号传导、趋化因子、细胞因子和受体相互作用上, 参与病毒感染、炎症反应、机体免疫、细胞生长分化、血管重建和创伤愈合等生物学过程。研究表明^[11], PTGS2、PTGS1 等靶点在炎症的治疗及 RNA 病毒的复制过程中发挥作用。

KEGG 富集分析显示, CASP3、IL10、IL6、IL2、IFNG、IL4 等多个蛋白靶点主要富集在 IL-17 和 TNF 信号通路上, COVID-19 患者在恢复期有着不同程度的肺功能损伤、肺纤维化改变, IL-17 是 Th17 细胞分泌的细胞因子, 能够促进 TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子的表达, 通过调控 IL-17 和 TNF 信号通路抑制炎症反应, 减少炎性渗出, 保护肺组织^[12]。COVID-19 患者恢复期会出现脾脏缩小的病理改变, 脾脏和脾门淋巴结淋巴细胞显著减少, CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞减少, 同时大量糖皮质激素的应用也会出现免疫抑制的情况, 甚者患者会出现急性免疫功能缺陷, 增加了细菌感染、病毒清除延迟和再感染的风险。FOS、MAPK3、MAPK1、MAPK8、MAPK14 等靶点基因通过调控 T 细胞受体、辅助性 T 细胞 (Th1、Th2、Th17 细胞分化) 信号通路参与机体免疫应答^[13], 提高恢

复期患者自身免疫功能, 促进疾病康复, 降低再感染的风险。PTGS2、PRKCA、MMAPK1、MAPK14 等基因蛋白通过调控血管内皮生长因子 (VEGF) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路, 参与细胞的生长分化和血管的生成, 从而促进损伤肺组织的修复和肺血管的再生^[14]。其次, 加减香砂六君子汤通过基因调控病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用信号通路, 可能会影响病毒蛋白与细胞受体之间结合, 从而起到抗病毒的作用。分子对接结果显示, 加减香砂六君子汤主要活性成分与 COVID-19 治疗药物潜在靶点具有较好的结合活性, 分子构象结合稳定, 进一步验证了加减香砂六君子汤可通过与 3CL 水解酶、ACE2、PTGS2 靶蛋白结合起到抗 COVID-19 的作用。

加减香砂六君子汤在 COVID-19 恢复期患者治疗中具有多成分、多靶点、多通路的调控特点, 初步预测出槲皮素、木犀草素、山柰酚、柚皮素等活性成分, 通过与 3CL 水解酶、ACE2、PTGS2 靶蛋白结合, 调控 IL-17、TNF、T 细胞受体、Th1、Th2、Th17 细胞分化、VEGF 和 MAPK 等信号通路来抑制炎症反应、调节机体免疫、促进细胞生长分化和肺血管生成, 减轻肺损伤, 从而改善患者症状, 促进患者康复, 提高机体免疫力, 防止疾病复发或再感染的风险。本研究通过计算机模拟技术初步探讨加减香砂六君子汤治疗 COVID-19 的作用机制, 受临床药物炮制、个体差异等影响, 需要后续的实验研究进一步验证。

参考文献

- [1] Ryu S, Chun B C. Korean Society of Epidemiology - nCoV Task Force Team. An interim review of the epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus [J]. *Epidemiol Health*, 2020, 42: e2020006. DOI:10.4178/epih.e2020006.
- [2] Pan Y, Guan H, Zhou S, et al. Initial CT findings and temporal changes in patients with the novel coronavirus pneumonia (2019-nCoV): a study of 63 patients in Wuhan, China [J]. *Eur Radiol*, 2020, 30: 3306-3309.
- [3] Chen Y W, Yiu C 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.
- [4] Zhang H B, Penninger J M, Li Y M, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target [J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46(4): 586-590.

- [5] Wrapp D, Wang N S, Corbett K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. bioRxiv, 2020: 2020.02.11.944462.
- [6] Barreca D, Mandalari G, Calderaro A, et al. Citrus flavones: an update on sources, biological functions, and health promoting properties [J]. Plants, 2020, 9(3): E288.
- [7] Park Y J, Bang I J, Jeong M H, et al. Effects of β -Sitosterol from corn silk on TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in lung alveolar epithelial cells [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(35): 9789-9795.
- [8] Tang J, Diao P, Shu X H, et al. Quercetin and quercitrin attenuates the inflammatory response and oxidative stress in LPS-induced RAW_{264.7} cells: *in vitro* assessment and a theoretical model [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 7039802.
- [9] Yang C, Yang W, He Z, et al. Kaempferol improves lung ischemia-reperfusion injury via antiinflammation and antioxidative stress regulated by SIRT1/HMGB1/NF- κ B axis [J]. Front Pharmacol, 2020, 10: 1635.
- [10] Chauhan A K, Kim J, Lee Y, et al. Isorhamnetin has potential for the treatment of *Escherichia coli*-induced Sepsis [J]. Molecules, 2019, 24(21): E3984.
- [11] 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]. Biomedicine Pharmacother, 2020, 125: 109900.
- [12] McGeachy M J, Cua D J, Gaffen S L. The IL-17 family of cytokines in health and disease [J]. Immunity, 2019, 50(4): 892-906.
- [13] Qian Z H, Zhang Z L, Wang Y Y. T cell receptor signaling pathway and cytokine-cytokine receptor interaction affect the rehabilitation process after respiratory syncytial virus infection [J]. PeerJ, 2019, 7: e7089.
- [14] Lin C K, Lin Y H, Huang T C, et al. VEGF mediates fat embolism-induced acute lung injury via VEGF receptor 2 and the MAPK cascade [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11713.
- [15] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版) [EB/OL]. (2020-03-03) [2020-03-04]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [16] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版) [EB/OL]. (2020-02-18) [2020-02-19]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>.
- [17] 国家卫生健康委办公厅, 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(试行第四版)的通知 [EB/OL]. (2020-01-17) [2020-02-26]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/4294563ed35b43209b31739bd0785e67.shtml>.
- [18] 国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒肺炎恢复期中医康复指导建议(试行)的通知 [EB/OL]. (2020-02-22) [2020-02-26]. <http://yzs.satcm.gov.cn/zhengcwenjian/2020-02-23/13319.html>.