

基于网络药理学和分子对接技术清咳平喘颗粒治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)分子机制研究

孙宝迪¹, 夏 斌¹, 俞燕露¹, 史芸轩², 邵旦兵^{1*}

1. 南京医科大学附属逸夫医院, 江苏 南京 210001

2. 山东中医药大学 健康学院, 山东 济南 250355

摘要: 目的 利用网络药理学技术探讨清咳平喘颗粒治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制。方法 使用TCMSP、Swiss Target Prediction等数据库预测清咳平喘颗粒的主要成分和其作用靶点, 再与CTD、GeneCards数据库得到的COVID-19的疾病靶点交集整合, 获得清咳平喘颗粒治疗COVID-19的潜在靶点。借助String平台绘制蛋白质相互作用(PPI)网络及筛选核心靶点, 并开展基因本体(GO)注释功能与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。依托Cytoscape软件绘制“成分-靶点-通路”的网络图。采用Autodock分子对接技术将关键靶点与清咳平喘颗粒中关键成分进行验证。结果 共获得261个药物-疾病共同靶点, 包括TNF、IL6、ALB、AKT1、VEGFA在内的91个核心靶点。GO富集分析、KEGG富集分析分别共得到条目1508个、152个, 涵盖Toll-like receptor (TLR) 信号通路、IL-17信号通路和HIF-1信号通路等。分子对接结果显示, 麻黄碱、苦杏仁苷是清咳平喘颗粒抗COVID-19主要活性成分。结论 运用网络药理学得到了清咳平喘颗粒抗COVID-19的作用靶点和通路, 为进一步探讨清咳平喘颗粒治疗COVID-19的作用机制提供依据。

关键词: 清咳平喘颗粒; COVID-19; 网络药理学; 分子对接; 麻黄碱; 苦杏仁苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 10-2116-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.10.007

Study of molecular mechanisms of Qingke Pingchuan Granule in treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking method

SUN Baodi¹, XIA Bin¹, YU Yanlu¹, SHI Yunxuan², SHAO Danbing¹

1. Sir Run Run Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210001, China

2. School of Health, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Qingke Pingchuan Granule in treatment of COVID-19. **Methods** TCMSP, Swiss Target Prediction and other databases were used to predict the main components and targets of Qingke Pingchuan Granules. Then, it was comprehensive with the disease targets of COVID-19 obtained from CTD and GeneCards databases to obtain the potential targets of Qingke Pingchuan Granules in treatment of COVID-19. PPI network was mapped with String platform and core targets were screened, and enrichment analysis of GO function and KEGG pathway was carried out. Cytoscape software was used to map the component-Target-pathway network. The key targets with the key components Qingke Pingchuan granules was verified by adopting the Autodock molecular docking technology. **Results** A total of 261 drug-disease common targets were obtained, including 91 core targets including TNF, IL6, ALB, AKT1, and VEGFA. A total of 1508 and 152 items were obtained by GO and KEGG enrichment analysis, respectively, covering Toll-like signaling pathway, IL-17 signaling pathway and HIF-1 signaling pathway. Molecular docking results showed that ephedrine and amygdalin were the main active components of Qingke Pingchuan Granules against COVID-19. **Conclusion** The target and pathway of COVID-19, which provides a realistic basis for further exploring the mechanism of the treatment of COVID-19.

Key words: Qingke Pingchuan Granule; COVID-19; network pharmacology; molecular docking; ephedrine; amygdalin

收稿日期: 2023-06-08

基金项目: 南京医科大学科技发展基金项目(NMUB20220054)

第一作者: 孙宝迪(1986—),男,副主任医师,研究方向为中毒、创伤。E-mail:Sunbaodi321@163.com

*通信作者: 邵旦兵,主任医师,研究方向为中毒、创伤。E-mail:yenosdb@aliyun.com

从2019年开始,由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)所引起的急性呼吸道传染病新型冠状病毒肺炎(COVID-19)在世界范围内广泛流行,已严重危及到全人类的生命健康问题,此公共卫生事件引起了全球的高度关注^[1]。根据国家卫生健康委员会及中医药管理局最新发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第10版)》,SARS-CoV-2在人群传播过程中基因的不稳定性易使其发生突变,现传播速度快、逃脱能力强的奥密克戎(Omicron)变异株逐步成为绝对优势流行株,但致病力明显减弱^[2]。咳嗽是COVID-19在感染急性期的主要表现症状,并且持续存在于感染后阶段。咳嗽不仅给患者带来痛苦,还增加了通过呼吸道传播的风险^[3]。特别是在COVID-19大流行期间,咳嗽患者可能会受到污名化,甚至导致社会孤立^[4]。寻求控制COVID-19相关咳嗽的治疗手段有助于防止疾病传播,并消除其带来的社会压力。

COVID-19中医辨证属“瘟疫”范畴,其病理核心为“湿毒”,病位在肺,病机特点为“湿、毒、瘀、闭”^[5]。在COVID-19大流行期间,中医药在疾病治疗中发挥了巨大的作用^[6]。中医药治疗SARS-CoV-2感染有其独特优势,在改善患者症状、减少转重率、改善预后等方面有显著成效。清咳平喘颗粒是在经方“麻杏石甘汤”的基础上加上金荞麦、鱼腥草、矮地茶、川贝母、枇杷叶、紫苏子等共由10味中药而形成的中药复方制剂。临床研究显示^[6]清咳平喘颗粒用于轻型、普通型新型冠状病毒感染患者的疗效显著,能明显改善患者日间及夜间咳嗽症状,提高患者感染期间的生活质量。此外该复方先后被纳入《新冠肺炎感染者居家中医药健康管理专家共识》《新冠病毒感染防治“两保一稳”清单》,推荐用于COVID-19成人及儿童咳嗽的治疗。然而,清肺平喘颗粒治疗COVID-19的潜在作用机制尚未明确,仍需进行深入研究。

网络药理学是以系统生物学理论为基础的一门新兴学科,它通过分析生物系统的网络,选择特定的信号节点来设计多靶点药物分子,可构建药物、成分、靶点、疾病之间的关联性,目前被越来越多地用于中医药研究^[7]。分子对接是一种基于受体特性以及受体与药物分子之间相互作用的药物设计方法,是一种可以预测中药单体与疾病靶点结合模式、亲和力的理论模拟方法。本研究采用网络药理学方法,探讨清咳平喘颗粒治疗COVID-19的有效活性成分、关键作用靶点及相关信号通路,并将

关键中药单体与COVID-19关键靶点进行分子对接验证,旨在阐明清咳平喘颗粒抗COVID-19的作用机制,为其防治COVID-19及后期的深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 清咳平喘颗粒化合物分析库的建立和数据分析

中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmbspw.com/>),以清咳平喘颗粒中9味中药(矮地茶、川贝母、金荞麦、苦杏仁、麻黄、枇杷叶、鱼腥草、炙甘草、紫苏子,组方中石膏除外)为检索词,收集清咳平喘颗粒药材组方成分并下载。结合文献及《中国药典》,确定清咳平喘颗粒成分。所有成分需满足以下条件:①成分可在TCMSP中检索;②中国药典(2020年版)中规定的药材的指标成分;③有文献明确记载的活性成分。

1.2 活性组分筛选及靶点收集

本研究基于药物的吸收、分布、代谢、排泄(ADME)模型,通过TCMSP数据库获得化学成分的口服生物利用度(OB)和类药性(DL)信息,从“1.1”项建立的清咳平喘颗粒化合物分析库中筛选 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 的活性成分及其对应的蛋白靶点^[8]。同时将筛选出的清咳平喘颗粒活性成分导入SwissTargetPredictor与PharmMapper数据库搜索药物潜在靶点,合并去重所有的靶点,作为清咳平喘颗粒活性成分的作用靶点。通过UniProt数据库^[9](<https://www.uniprot.org/>)中UniProtKB搜索功能检索蛋白靶点ID及基因名,获得清咳平喘颗粒相关靶点信息。

1.3 COVID-19靶点的筛选

在CTD数据库(<http://ctdbase.org/>)中,Keyword Search选择Disease,以关键词“COVID-19”进行搜索,保留在gene项下Direct Evidence项中有“M”(疾病的生物标志物或在病因中起作用的靶点)和“T”(疾病治疗靶点)标记的靶点。基于GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>),以关键词“COVID-19”进行检索,保留InferenceScore ≥ 0.8 的靶点。将2个数据库中检索到的靶点合并去重,得到COVID-19疾病相关靶点。

1.4 蛋白质相互作用(PPI)网络构建与分析

将清咳平喘颗粒活性成分靶点与COVID-19疾病相关靶点合并取交集,通过实例搜索工具STRING将疾病及药物的交集靶点进行PPI网络分析,选择Organisms为Homo sapiens,设置minimum

required interaction score 为 medium confidence (0.400), 将该网络导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化处理, 运用其中的插件“Network Analyzer”计算节点度值(degree), 以其为指标, 筛选出清咳平喘颗粒抗 COVID-19 的关键靶点。

1.5 靶点的基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

为了揭示清咳平喘颗粒在抗 COVID-19 中的 GO 和 KEGG 过程, 借助 DAVID 6.8^[10](<http://David.abcc.ncifcrf.gov/>)对核心基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, 将所得结果进行可视化处理。

1.6 “化合物-靶点-通路”网络的构建

采用 Cytoscape 3.7.2 关联化合物、关键靶点以及富集通路, 构建“化合物-靶点-通路”网络, 并进行拓扑学参数分析。

1.7 分子对接验证

为验证核心靶点与清咳平喘颗粒化合物之间作用的可信度, 选取“1.6”项建立的化合物-靶点-通路中 degree 值排名前 5 的核心靶点、清咳平喘颗粒中 degree 值排名前 5 的活性成分进行分子对接验证。从 RSCB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取排名前 5 的核心蛋白, 下载 PDB 格式文件, 通过

Pymol 软件对上述蛋白进行去除结晶水和小分子等处理。从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载化合物结构的 2D 结构文件(SDF 格式), 采用 ChemDraw 软件转化成“*mol2”格式。通过 AutoDockTools 1.5.6 软件处理蛋白靶点与小分子化合物并将其转化为 pdbqt 格式, 运用 Vina 1.5.6 进行分子对接。同时, 对接结果通过 Pymol 软件进行可视化分析。

2 结果

2.1 活性组分的筛选

通过 TCMSP 检索到清咳平喘颗粒中所含化学成分共 1 555 个, 其中矮地茶 193 个、川贝母 63 个、金荞麦 61 个、苦杏仁 113 个、麻黄 363 个、枇杷叶 304 个、鱼腥草 50 个、炙甘草 280 个、紫苏子 128 个。矿物药石膏的主要成分为二水合硫酸钙, 未被收录。以 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 为阈值, 对 1 555 个成分进行筛选, 最终确定清咳平喘颗粒活性成分 144 个, 其中矮地茶 13 个、川贝母 9 个、金荞麦 12 个、苦杏仁 17 个、麻黄 22 个、枇杷叶 13 个、鱼腥草 5 个、炙甘草 73 个、紫苏子 15 个, 其中 36 个成分是共有成分。以上 9 味药材, 每种药材选择有代表性的 5 个成分, 具体信息见表 1。

表 1 清咳平喘颗粒代表性成分信息

Table 1 Information of constituents from Qingke Pingchuan Granules

化合物	英文名称	CAS 号	相对分子质量	OB/%	DL	归属药材
三萜类皂苷	triterpenoids	932018-37-6	472.78	34.11	0.63	矮地茶
酸金牛酮	rapanone	573-40-0	322.49	34.15	0.24	矮地茶
绵马素	aspidin	584-28-1	460.77	34.74	0.60	矮地茶
山柰酚	kaempferol	520-18-3	286.25	41.88	0.24	矮地茶、麻黄、枇杷叶、鱼腥草、炙甘草
槲皮素	quercetin	117-39-5	302.25	46.43	0.28	矮地茶、金荞麦、麻黄、枇杷叶、鱼腥草
贝母辛	triterpenoids	19773-24-1	472.78	34.11	0.63	川贝母
环贝母碱	rapanone	4449-51-8	322.49	34.15	0.24	川贝母
异浙贝甲素	aspidin	23496-43-7	460.77	34.74	0.60	川贝母
贝母素乙	kaempferol	18059-10-4	286.25	41.88	0.24	川贝母
浙贝丙素	quercetin	143120-47-2	302.25	46.43	0.28	川贝母
异鼠李素	isorhamnetin	480-19-3	316.28	49.6	0.31	金荞麦
原花青素 B1	procyanidin B1	20315-25-7	578.56	67.87	0.66	金荞麦
木犀草素	luteolin	491-70-3	286.25	36.16	0.25	金荞麦、紫苏子
(-)-儿茶素	(-)-catechin	18829-70-4	290.29	49.68	0.24	金荞麦
豆甾醇	stigmasterol	83-48-7	412.77	43.83	0.76	苦杏仁
胆固醇	cholesterol	57-88-5	386.73	37.87	0.68	苦杏仁
儿茶素	cianidanol	154-23-4	290.29	54.83	0.24	苦杏仁、麻黄
甘草酚	glycyrol	23013-84-5	366.39	90.78	0.67	苦杏仁、炙甘草
甘草苷	liquiritin	551-15-5	418.43	65.69	0.74	苦杏仁
香叶木素	diosmetin	520-34-3	300.28	31.14	0.27	麻黄
柚皮素	naringenin	480-41-1	272.27	59.29	0.21	麻黄、炙甘草

续表1

化合物	英文名称	CAS 号	相对分子质量	OB/%	DL	归属药材
异鼠李素	isorhamnetin	480-19-3	316.28	49.6	0.31	枇杷叶
白桦脂酸	betulinic acid	472-15-1	456.78	55.38	0.78	枇杷叶
鞣花酸	ellagic acid	476-66-4	302.2	43.06	0.43	枇杷叶
异热马酮	digipurpurogenin II	4644-99-9	348.53	39.97	0.51	鱼腥草
菠菜甾醇	alpha-spinasterol	481-18-5	412.77	42.98	0.76	鱼腥草
甘草素	liquiritigenin	578-86-9	256.27	32.76	0.18	炙甘草
甘草酮	licoricone	51847-92-8	382.44	63.58	0.47	炙甘草
花生四烯酸	arachidonic acid	506-32-1	304.52	45.57	0.2	紫苏子
β -胡萝卜素	beta-carotene	7235-40-7	536.96	37.18	0.58	紫苏子
α 菠菜甾醇	alpha-spinasterol	481-18-5	412.77	42.98	0.76	紫苏子
菜油甾醇	campesterol	474-62-4	400.76	37.58	0.71	紫苏子
二水合硫酸钙	two hydrated calcium sulfate	10101-41-4	172.00	—	—	石膏

2.2 清咳平喘颗粒靶点与 COVID-19 疾病靶点分析

通过 SwissTargetPredicton 与 Phrammapper 数据库检索并合并清咳平喘颗粒的作用靶点,共得到作用靶点 1 337 个。同时,在 GeneCards 与 DisGeNET 疾病靶点数据库检索 COVID-19 相关靶点,共得到相关靶点 1 702 个。将 COVID-19 相关疾病靶点与清咳平喘颗粒作用靶点导入 Venny2.1.0 软件,获得共有靶点 261 个,见图 1。

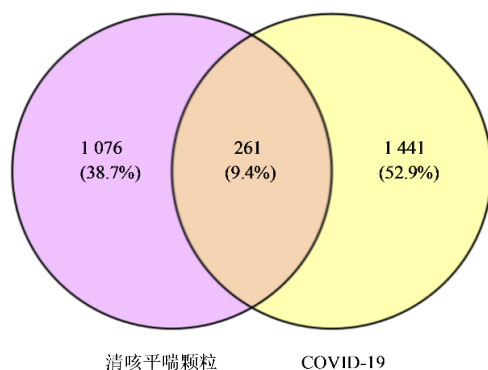


图1 活性成分靶点与 COVID-19 疾病靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of targets of active constituents and COVID-19 related targets

2.3 PPI 网络构建与分析

将筛选出的 261 个共有靶点借助 STRING 数据库构建 PPI 网络,平均 degree 值等于 28.0,将结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件,利用拓扑分析插件 CytoNCA 限定 degree > 28.0,设置节点的大小、颜色、透明度随 degree 值的变化而变化,构建 PPI 网络图,见图 2。选取 Degree 值大于平均数的靶点作为核心靶点,共计 91 个。其中节点颜色越深代表 Degree 值越大,结果表明, TNF、IL6、ALB、AKT1、

VEGFA 等靶点处于网络核心位置,提示其可能是清咳平喘颗粒治疗 COVID-19 引起的咳嗽的核心靶点。

2.4 GO 与 KEGG 分析

在 DAVID 数据库中对上述 91 个关键交集靶点进行 GO 功能富集分析,其中 GO 分析包含 3 个子项,分别为生物学过程(BP)、细胞组分(CC)与分子功能(MF)。上述 91 个关键靶点共计涉及 1 011 个 BP, 199 个 CC 及 298 个 MF。主要的 GO 二级注释见图 3-A,在 BP 层面,上述关键靶点主要参与免疫应答、细胞激活等;在 CC 层面,上述关键靶点主要定位于内膜系统、细胞质等;MF 分析显示,上述关键靶点主要涉及催化活性、药物结合等。此外,利用 DAVID 平台对 91 个关键靶点进行 KEGG 通路分析富集到 152 条 KEGG 通路,排名前 15 的 KEGG 通路见图 3-B,主要涉及 TLR、IL-17、HIF-1 等信号通路。上述结果提示,TLR、IL-17 和 HIF-1 信号通路可能是清咳平喘颗粒治疗 COVID-19 的核心通路。

2.5 “化合物-靶点-通路”网络的构建

选择 KEGG 分析中排名前 15 个通路里富集到的靶点,与这些靶点对接的化合物以及 15 条通路导入 Cytoscape 3.7.2 软件,构建“化合物-靶点-通路”网络,见图 4,并进行拓扑学参数分析。对应的 99 个清咳平喘颗粒成分参与网络调控,麻黄碱、苦杏仁苷、甘草酚、酸藤子醌、甘草宁 G 为 degree 值排名前 5 的化合物,提示麻黄碱、苦杏仁苷等化合物可能是清咳平喘颗粒治疗 COVID-19 所引起咳嗽的关键化合物。此外,TLR、IL-17、HIF-1 等信号通路主要参与清咳平喘颗粒治疗 COVID-19 的过程。本实验结果体现了中药复方通过“多成分-多靶点-多途径”治疗疾病的特点。

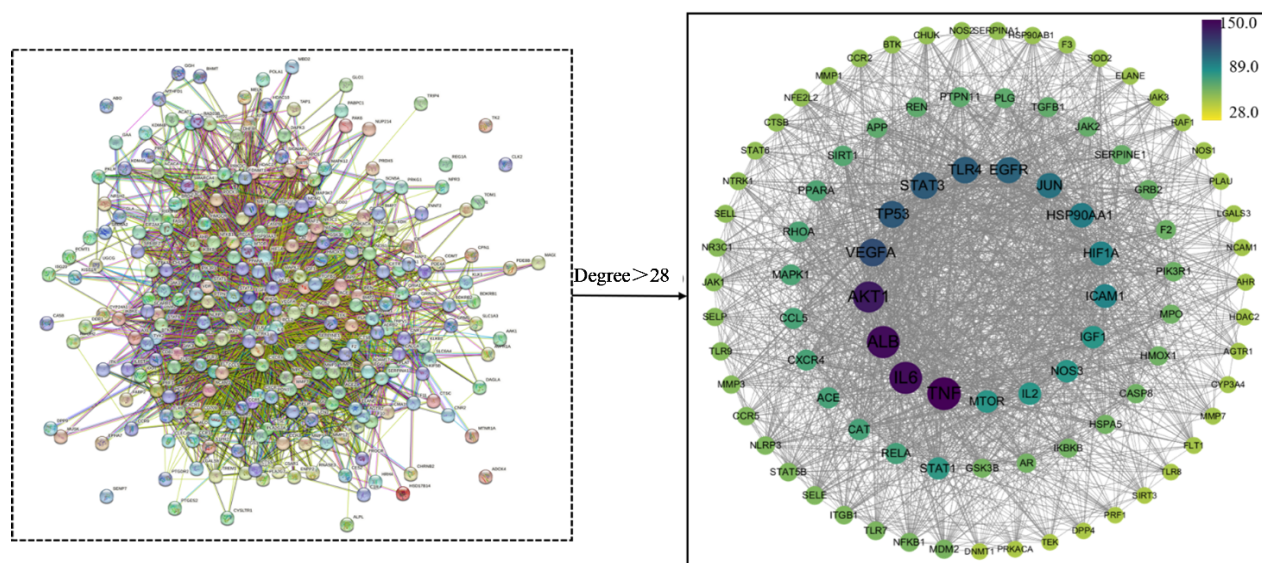


图2 交集靶点及核心靶点 PPI 网络

Fig. 2 PPI network diagram of common target and core targets

2.6 分子对接验证

为了进一步探讨清咳平喘颗粒活性成分与 COVID-19 靶点的结合模式,将“化合物-靶点-通路”网络中 degree 值排名前 5 的成分(麻黄碱、苦杏仁苷、甘草酚、酸藤子醌、甘草宁 G)与排名前 5 的共有靶点[TNF(PDB ID: 7JRA)、IL6(PDB ID: 4CNI)、ALB(PDB ID: 1GNI)、AKT1(PDB ID: 7NH4)、VEGFA(PDB ID: 5O4E)]进行对接,选择对接得分排名最高的化合物,与排名前 5 的共有靶点的分子对接结构进行构象叠合分析。如图 5 所示,5 个化合物均能较好地占据蛋白靶点的特异性结合口袋,三维构象上存在高度契合匹配现象。其中麻黄碱结构中的羟基与 TNF 的氨基酸残基 GLY-224 等之间形成氢键;苦杏仁苷结构中的羟基与 IL6 的氨基酸残基 LEU-177 等之间形成氢键;麻黄碱结构中的羟基与 ALB 的氨基酸残基 LEU-115 之间形成氢键;苦杏仁苷结构中的 2-苯基色原酮母核与 AKT1 的氨基酸残基 ASP-44 等之间形成氢键;麻黄碱结构中的羟基与 VEGFA 的氨基酸残基 ILE-253 之间形成氢键。对接得分的详细结合信息见表 2。

3 讨论

COVID-19 对社会经济建设和国民生命健康都带来了难以估量的损失^[1],自 2019 年 12 月 COVID-19 暴发以来,全球已有 275 233 892 人感染,病死率约为 2%^[12],尤其是一些老年兼有基础疾病的患者死亡风险大幅增加^[13-14],给人民群众带来巨大的经济负担及情感伤害。此外,SARs-CoV-2 毒株的高度变

异性为特效药的研制带来极大的挑战,目前所推荐的瑞德西韦、巴瑞替尼临床获益依然有限^[15]。因此,相较单一的化学药治疗,中医药在治疗 COVID-19 中发挥了巨大的作用^[16-17],针对突变的病毒采用辨证施治的治疗原则,根据患者个体情况进行加减化裁,实现一人一方^[18-19],临床疗效显著。清咳平喘颗粒是在经方“麻杏石甘汤”的基础上化裁而来的中成药制剂,其治疗 COVID-19 的有效性已得到临床证实,但由于多成分、多靶点的特点,其治疗 COVID-19 的药效物质基础及作用机制难以被系统揭示。因此,借助网络药理学及分子对接技术研究清咳平喘颗粒抗 COVID-19 的作用机制,可为该药的临床应用进一步提供证据支撑,对于 COVID-19 患者的指导用药也具有重要意义。

发热、咳嗽是 COVID-19 的早期临床表现,而咳嗽在阳性患者转阴后仍会持续较长时间,咳嗽的强烈程度以及持续性严重影响患者的生活质量。“化合物-靶点-通路”网络表明,麻黄碱、苦杏仁苷等中药单体是清咳平喘颗粒中抗 COVID-19 的主要药效成分。研究表明,麻黄在抗炎、解热、镇痛方面具有显著疗效^[20],麻黄碱是麻黄中发挥平喘作用的主要成分,可通过直接松弛平滑肌,发挥拟肾上腺素作用,抑制过敏性介质的释放,从而发挥平喘疗效^[21]。同样,苦杏仁中的苦杏仁苷亦具有止嗽平喘之效。研究显示苦杏仁苷在肺组织中呈高表达,且对支气管平滑肌细胞的抑制作用随浓度的增加而增强^[22-23]。此外,还有研究发现麻黄和杏仁的配伍比

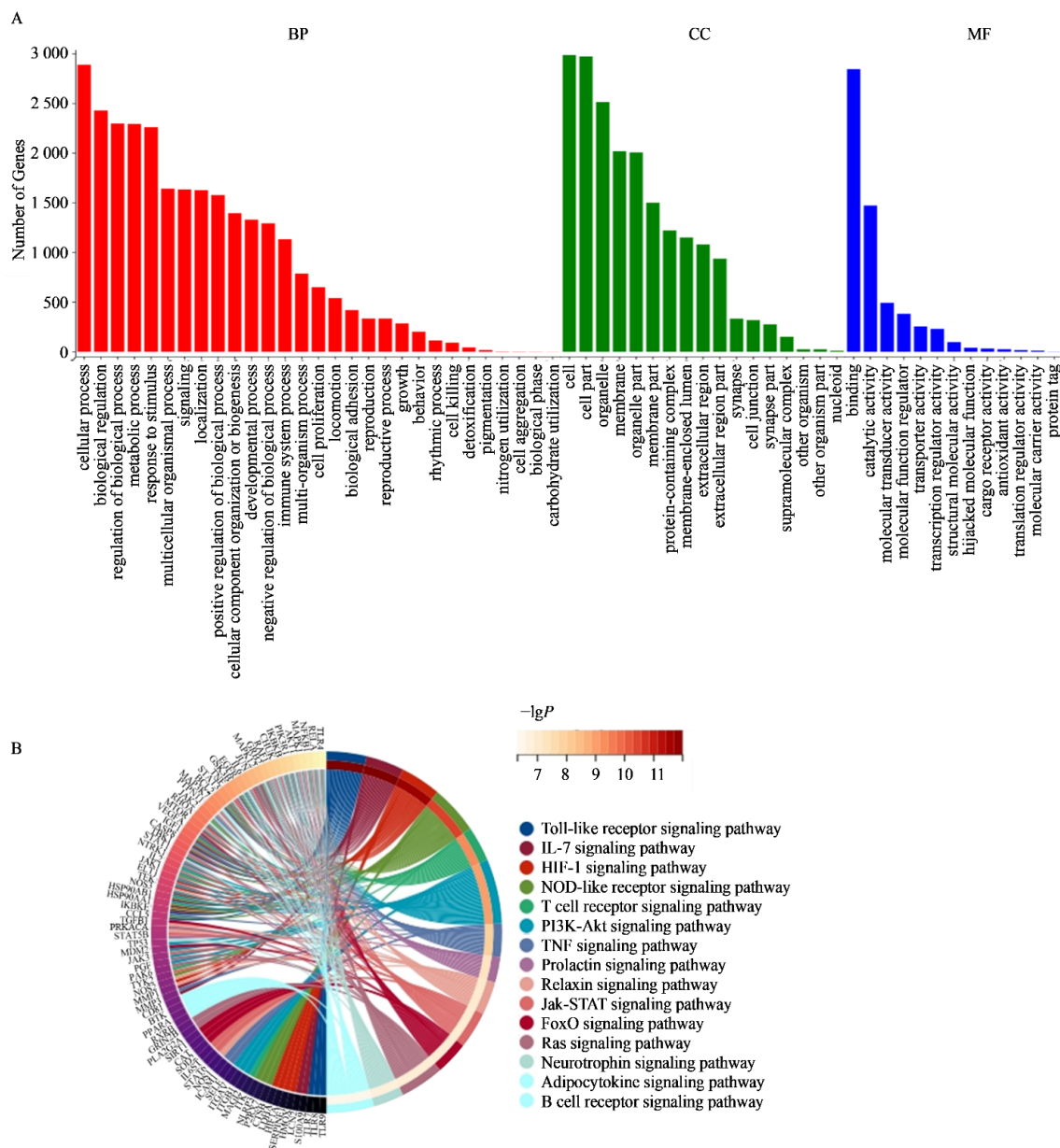


图3 GO富集分析(A)与KEGG通路富集分析(B)
Fig. 3 Enrichment analysis diagram of GO (A) and KEGG pathway (B)

例为2:1时可最大程度减少炎症因子的分泌,而介导咳嗽的重要诱因是炎症因子,因此以2:1配伍的麻黄和杏仁具有最好的止咳效果^[24]。值得注意的是,清咳平喘颗粒中的石膏为含水硫酸钙($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)的矿石,亦是方剂中的重要成分,且生石膏具有清热泻火、除烦止渴之功。有学者认为,石膏中钙盐是其退热作用的有效成分。综上,麻黄碱、苦杏仁苷可能是清咳平喘颗粒在新冠病毒感染期间发挥止咳、平喘作用的主要药效成分,而硫酸钙则是清咳平喘颗粒发挥退热作用的主要成分。

PPI网络分析结果显示TNF、IL6、ALB、AKT1和VEGFA是清咳平喘颗粒抗COVID-19的重要靶

点之一。研究显示肺组织的损伤程度与TNF和IL-6等炎症因子的产生密切相关^[25]。肿瘤坏死因子(TNF)是一种炎症细胞因子,具有广泛的生物学活性,可促进炎症细胞聚集和其他炎症因子释放,参与防御细菌、病毒和寄生虫的感染,提高组织修复功能,以及诱发肿瘤细胞的凋亡等。研究显示哮喘、多发性硬化症、败血性休克、恶质病等疾病的引发都与TNF相关^[26-27]。白细胞介素6(IL-6)是一种具有多种效用的细胞因子,在免疫应答中扮演重要角色,可通过膜结合IL6受体和可溶性IL6受体发出信号^[28]。IL-6在感染、肿瘤和炎症反应中发挥关键作用,对疾病进程和临床结局产生重要影响^[29]。IL-6的释放与

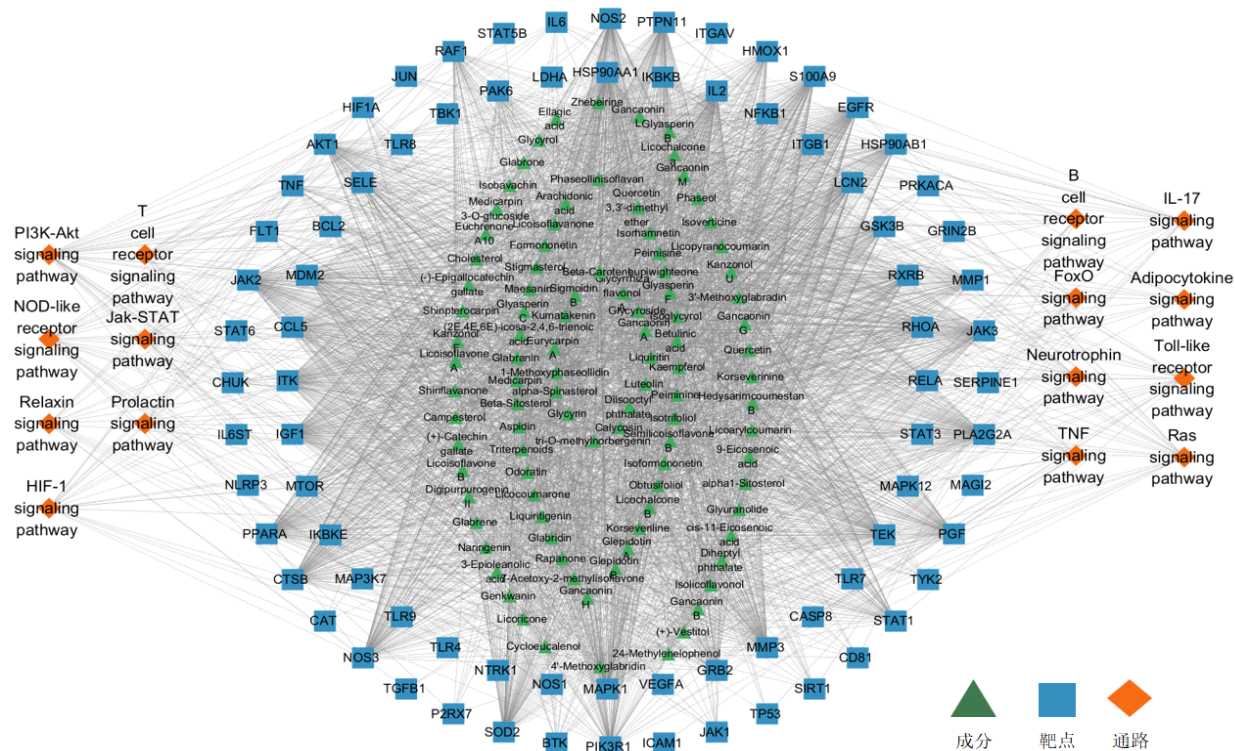


图4 “活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 4 “Active ingredients-key targets-pathway” network

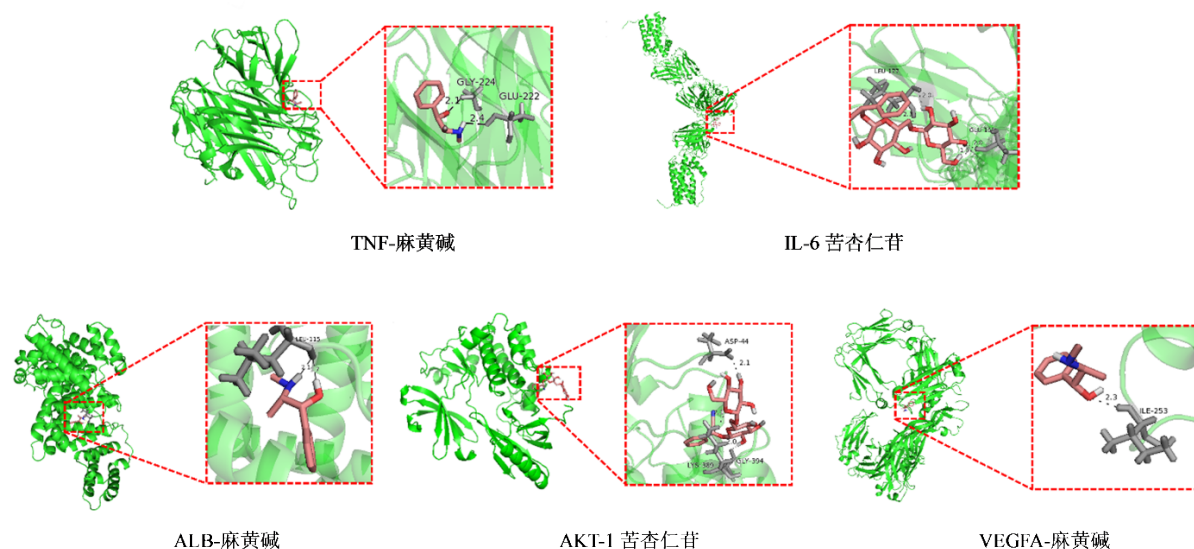


图5 5个共有靶点与对接得分最高化合物的结合模式分析

Fig. 5 Analysis of the binding patterns of the 5 shared-targets to compounds with the highest docking scores

TNF- α 有关,且TNF- α 、IL-6水平与肺炎咳嗽的严重程度呈正相关,是导致炎症反应加剧而引起气道高反应性发生的重要原因^[30]。当肺部炎症发生时,TNF- α 、IL-6、RAGE水平上升,并在炎症得到缓解时逐渐恢复至正常水平^[31],与此同时,TNF- α 、IL-6等炎性细胞因子的产生亦会引发气道的各种炎症反应而造成严重的干咳^[32]。因此TNF和IL6可能是清

咳平喘颗粒在抗新冠病毒感染期间治疗咳嗽的重要靶点之一。

GO及KEGG通路富集分析表明,清咳平喘颗粒治疗COVID-19的关键通路涉及Toll样受体信号通路、IL-17信号通路及HIF-1信号通路。Toll样受体(TLR)能够识别病毒颗粒并激活先天免疫系统发挥保护机体作用。TLR通路的激活导致促炎细胞

表2 5个共有靶点与对接得分最高化合物的结合信息

Table 2 Binding information of five common-targets to compounds with the highest docking scores

靶点	化合物	化学键类型	氨基酸残基	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
TNF	麻黄碱	氢键	GLY-224、GLU-222	-26.44
IL6	苦杏仁苷	氢键	LEU-177、GLU-161	-23.10
ALB	麻黄碱	氢键	LEU-115	-27.91
AKT1	苦杏仁苷	氢键	GY ASP-44Y-394、LYS-389	-23.43
VEGFA	麻黄碱	氢键	ILE-253	-25.23

因子的分泌,如 IL-6、TNF α 以及 1 型干扰素^[33]。TLR7/8 是 X 染色体上的串联复制基因,位于核内体膜上,识别 ssRNA 和合成的低聚核糖核苷酸,可能参与了 SARS-CoV-2 基因组的识别^[34]。TLR7 在单核巨噬细胞和 DC 上表达,其激活导致 IL-1、IL-6、单核细胞趋化蛋白 1、MIP 1A、TNF α 和 1 型 IFN 的产生^[35]。在 COVID-19 患者中,TLR7/8 的激活可诱导机体强烈的促炎反应,导致急性肺损伤^[36]。此外,TLR2/6/9 激动剂还可激活先天免疫细胞和肺上皮细胞,产生各种抗感染因子^[37]。脂多糖诱导的急性肺损伤患者主要因其 IL-17 信号通路被活化,激活的 IL-17 可通过细胞外信号调节酶 (ERK1/2) 及 NF- κ B 信号通路导致疾病^[38]。HIF-1 α 和促炎细胞因子在患者感染的细胞中被诱导,SARS-CoV-2 ORF3 引起线粒体损伤和 Mito-ROS 的产生,从而促进 HIF-1 α 信号通路的表达,从而促进 SARS-CoV-2 感染和细胞因子的产生。总的来说,在 SARS-CoV-2 感染期间,ORF3a 诱导 HIF-1 α ,HIF-1 α 反过来加重病毒感染和炎症反应。因此,HIF-1 α 在促进 SARS-CoV-2 感染和诱导 COVID-19 促炎反应中发挥重要作用^[39],因此,清咳平喘颗粒可通过调控 Toll 样受体信号通路、IL-17 信号通路及 HIF-1 信号通路来调节机体免疫反应和抑制机体的炎症反应,预防炎症导致的急性肺损伤来抵抗 COVID-19。

分子对接结果表明,麻黄碱以及苦杏仁苷对于蛋白靶点 TNF、IL6、ALB、AKT1 和 VEGFA 具有较好的结合作用,可能是潜在的活性成分,部分验证了上述网络药理学的筛选结果。但由于疾病的特殊性以及网络药理学的局限性,本研究结果还需要进一步实验研究及临床应用来验证。

本研究通过网络药理学技术对清咳平喘颗粒抗 COVID-19 及改善感染期间的临床症状进行作用机制探究,得到清咳平喘颗粒涉及多成分、多靶点、多通路参与治疗 COVID-19,从而缓解 COVID-19 时期高热、咳嗽、气喘、咽痛等症状。其中麻黄碱、苦

杏仁苷可能是其发挥止咳、平喘作用的主要成分,并主要通过作用于 TNF、IL6、ALB、AKT1 和 VEGFA 等核心靶点,调控 Toll 样受体信号通路、IL-17 信号通路及 HIF-1 信号通等发挥免疫调节及抗炎作用。该研究在阐明清咳平喘颗粒治疗 COVID-19 的作用机制方面具有一定的理论现实依据,可为后期深入实验研究来进一步探讨和挖掘清咳平喘颗粒治疗 COVID-19 的复杂作用机制奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 马宇博,贾婷婷,张瑞芬,等.新冠肺炎中医药诊疗思考[J/OL]. (2023-01-10) [2023-05-25]. 中华中医药学刊, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20230109.1601.001.html>.
Ma Y B, Jia T T, Zhang R F, et al. Thoughts on TCM diagnosis and treatment of COVID-19 [J/OL]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023: 1-12. (2023-01-10) [2023-05-25]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20230109.1601.001.html>.
- [2] 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(试行第十版)»[EB/OL]. (2023-01-06) [2023-05-25]. <http://www.nhc.gov.cn/ylyjs/pqt/202301/32de5b2ff9bf4eaa88e75bdf7223a65a.shtml>.
National Health Commission of the People's Republic of China. Diagnosis and Treatment Plan for novel coronavirus Pneumonia (Tenth Edition on Trial) [EB/OL]. (2023-01-06) [2023-05-25]. <http://www.nhc.gov.cn/ylyjs/pqt/202301/32de5b2ff9bf4eaa88e75bdf7223a65a.shtml>.
- [3] Dhand R, Li J E. Coughs and sneezes: Their role in transmission of respiratory viral infections, including SARS-CoV-2 [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2020, 202 (5): 651-659.
- [4] Hulme K, Dogan S, Parker S M, et al. 'Chronic cough, cause unknown': A qualitative study of patient perspectives of chronic refractory cough [J]. J Health Psychol, 2019, 24(6): 707-716.

- [5] 王玉光, 齐文升, 马家驹, 等. 新型冠状病毒肺炎中医临床特征与辨证治疗初探 [J]. 中医杂志, 2020, 61(4): 281-285.
Wang Y G, Qi W S, Ma J J, et al. Clinical features and syndrome differentiation of novel coronavirus pneumonia in traditional Chinese medicine [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(4): 281-285.
- [6] 赵张燕, 颜萱, 徐萍, 等. 清咳平喘颗粒治疗轻型、普通型新型冠状病毒感染的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(2): 437-441.
Zhao Z Y, Yan X, Xu P, et al. Clinical study of Qingke Pingchuan Granules in treatment of light and common type of novel coronavirus infection [J]. Drugs Clin, 2023, 38(2): 437-441.
- [7] 洪盛威, 杨尧, 徐丁林, 等. 基于系统药理学方法探究荆花胃康胶丸干预幽门螺杆菌所致炎症反应机制 [J]. 安徽科技学院学报, 2021, 35(2): 57-66.
Hong S W, Yang Y, Xu D L, et al. Systematic pharmacological methodology-based investigation on interventional mechanism of jinghua Weikang capsule protecting against *Helicobacter pylori*-induced inflammatory responses [J]. J Anhui Sci Technol Univ, 2021, 35(2): 57-66.
- [8] 谢平, 王晨情, 叶雅惠, 等. 基于网络药理学及分子对接虚拟筛选疏风解毒胶囊治疗新冠病毒肺炎(COVID-19)活性成分研究 [J]. 药学研究, 2021, 40(9): 590-597, 604.
Xie P, Wang C Q, Ye Y H, et al. Virtual screening of the active ingredients of Shufeng Jiedu Capsule for COVID-19 based on molecular docking and network pharmacology [J]. J Pharm Res, 2021, 40(9): 590-597, 604.
- [9] The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D158-D169.
- [10] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 44-57.
- [11] 付小宇, 张新雪, 赵宗江. 基于中医情志疗法探讨新冠肺炎疫期的心理调适方法 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13): 39-44.
Fu X Y, Zhang X X, Zhao Z J. Psychological adjustment during outbreak of COVID-19 based on traditional Chinese medicine emotion therapy [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(13): 39-44.
- [12] World Health Organization. Novel coronavirus(COVID-19) [EB/OL]. (2022-07-04). [2023-05-25]. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- [13] Gasmi A, Peana M, Pivina L, et al. Interrelations between COVID-19 and other disorders [J]. Clin Immunol, 2021, 224: 108651.
- [14] 陈波, 费宇, 李玟, 等. 重症新型冠状病毒肺炎患者死亡风险因素研究 [J]. 现代预防医学, 2022, 49(15): 2856-2860.
Chen B, Fei Y, Li Wen, et al. Risk factors for mortality of severely ill patients with COVID-19 [J]. Mod Prev Med, 2022, 49(15): 2856-2860.
- [15] 郑楠, 赵明, 田晓鑫, 等. 全球新型冠状病毒疫苗及治疗药物研发现状与趋势 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31(1): 69-76.
Zheng N, Zhao M, Tian X X, et al. Global research and development of COVID-19 vaccine and therapeutics: Status and trend [J]. Chin J N Drugs, 2022, 31(1): 69-76.
- [16] 杨倩, 孙勤国, 江波, 等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎重症患者的回顾性临床研究 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2050-2054.
Yang Q, Sun Q G, Jiang B, et al. Retrospective clinical study on treatment of COVID-19 patients with integrated traditional Chinese and western medicine [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2020, 51(8): 2050-2054.
- [17] 胡进, 张欢, 陈辉, 等. 361例新型冠状病毒肺炎患者中药治疗用药规律分析 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(9): 1685-1692.
Hu J, Zhang H, Chen H, et al. Analysis on medication rules of 361 patients of COVID-19 treated by traditional Chinese medicine [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(9): 1685-1692.
- [18] 王诗恒, 秦培洁, 张凤霞, 等. 莲花清瘟联合西医常规治疗新型冠状病毒肺炎系统评价的再评价 [J]. 中草药, 2022, 53(8): 2460-2469.
Wang S H, Qian P H, Zhang F X, et al. Lianhua Qingwen combined with conventional western medicine in treatment of COVID-19: An overview of systematic reviews [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(8): 2460-2469.
- [19] 尤焱南, 严花, 汪受传, 等. 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)中医药治疗策略 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(4): 613-619.
You Y N, Yan H, Wang C S, et al. Therapeutic strategy of traditional Chinese medicine for COVID-19 [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(4): 613-619.
- [20] 赵云生, 谢丽霞, 毛福英, 等. 基于平喘生物效价的麻黄品质评价研究 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3695-3703.
Zhao Y S, Xie L X, Mao F Y, et al. Antiasthma biological potency applied for Ephedra Herba quality evaluation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(24): 3695-3703.
- [21] 李佳莲, 方磊, 张永清, 等. 麻黄的化学成分和药理活性的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(7): 21-27.

- Li J L, Fang L, Zhang Y Q, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Ephedra sinica* [J]. Mod Chin Med, 2012, 14(7): 21-27.
- [22] 杨玉妃, 谢冰晶, 黄瑞林. 大鼠口服苦杏仁苷组织分布和血浆药物代谢动力学研究 [J]. 按摩与康复医学, 2021, 12(4): 91-93, 90.
- Yang Y F, Xie B J, Huang R L. Tissue distribution and plasma pharmacokinetics of amygdalin in rats after oral administration [J]. Chin Manip Rehabil Med, 2021, 12(4): 91-93, 90.
- [23] 甘露. 大鼠 pEGFP-N1-BK β 真核表达载体的构建及苦杏仁苷对支气管平滑肌细胞增殖的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- Gan L. Construction of pEGFP-N1-BK β , fusion gene vector and research of amygdalin on smooth muscle cell proliferation [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2007.
- [24] 刘小红, 杨宗利. 麻黄杏仁不同配伍比例止咳平喘的效果研究 [J]. 临床医学研究与实践, 2019, 4(22): 8-9, 12.
- Liu X H, Yang Z L. Study on antitussive and antiasthmatic effects of different compatibility ratio of ephedra and almond [J]. Clin Res Pract, 2019, 4(22): 8-9, 12.
- [25] Yu M, Wang Q N, Qi W B, et al. Expression of inflammation-related genes in the lung of BALB/c mice response to H7N9 influenza A virus with different pathogenicity [J]. Med Microbiol Immunol, 2016, 205(5): 501-509.
- [26] 徐叶青, 刘菲焱, 黄海华, 等. 肿瘤坏死因子小分子抑制剂的作用机理 [J]. 现代盐化工, 2021, 48(3): 39-40.
- Xu Y Q, Liu F Y, Huang H H, et al. Mechanism of small molecule inhibitors of tumor necrosis factor [J]. Mod Salt Chem Ind, 2021, 48(3): 39-40.
- [27] 李勃, 梁璇, 鲁莹, 等. 抗 TNF- α 药物治疗抑郁症的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(7): 1334-1339.
- Li B, Liang X, Lu Y, et al. Research progress of anti-TNF- α drugs in depression [J]. Chin J Pathophysiol, 2022, 38(7): 1334-1339.
- [28] Malysch T, Reinhold J M, Becker C A, et al. *In vivo* immunomodulation of IL6 signaling in a murine multiple trauma model [J]. Immunol Res, 2023, 71(2): 164-172.
- [29] 郭美君, 李昊, 杜珊珊, 等. 白细胞介素 6 和病毒感染与免疫 [J]. 病毒学报, 2023, 39(1): 287-294.
- Guo M J, Li H, Du S S, et al. Interleukin-6, virus infection and immunity [J]. Chin J Virol, 2023, 39(1): 287-294.
- [30] 唐贤豪, 张徐非, 张进兴, 等. 加味喉科六味汤对上气道咳嗽综合征大鼠血清 IL-6、IL-8、TNF- α 的影响 [J]. 中国中医药科技, 2019, 26(5): 666-669.
- Tang X H, Zhang X F, Zhang J X, et al. Effect of Jiawei Houke Liuwei Tang (加味喉科六味汤) on serum IL-6, IL-8 and TNF- α levels in rats with upper airway cough syndrome [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2019, 26(5): 666-669.
- [31] 刘静. 宣肺泄热汤内服外敷对肺炎咳嗽患儿中医证候及炎症反应的影响 [J]. 光明中医, 2022, 37(21): 3861-3864.
- Liu J. Effect of Xuanfei xiere decoction on TCM syndrome and inflammatory reaction in children with pneumonia and cough [J]. Guangming J Chin Med, 2022, 37(21): 3861-3864.
- [32] 周琼, 骆天炯. 感染后咳嗽发病机制的研究进展 [J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2018, 11(3): 373-376.
- Zhou Q, Luo T J. Progress in the pathogenesis of PIC [J]. Chin J Lung Dis Electron Ed, 2018, 11(3): 373-376.
- [33] Khanmohammadi S, Rezaei N. Role of toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19 [J]. J Med Virol, 2021, 93(5): 2735-2739.
- [34] Groot N G, Bontrop R E. COVID-19 pandemic: Is a gender-defined dosage effect responsible for the high mortality rate among males? [J]. Immunogenetics, 2020, 72(5): 275-277.
- [35] Yazdanpanah F, Hamblin M R, Rezaei N. The immune system and COVID-19: Friend or foe? [J]. Life Sci, 2020, 256: 117900.
- [36] Moreno-Eutimio M A, López-Macías C, Pastelin-Palacios R. Bioinformatic analysis and identification of single-stranded RNA sequences recognized by TLR7/8 in the SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV genomes [J]. Microbes Infect, 2020, 22(4/5): 226-229.
- [37] Florindo H F, Kleiner R, Vaskovich-Koubi D, et al. Immune-mediated approaches against COVID-19 [J]. Nat Nanotechnol, 2020, 15(8): 630-645.
- [38] 丁琦. IL-17 在脂多糖诱导的急性肺损伤中的作用及机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
- Ding Q. Role and mechanism of IL-17 in LPS-induced acute lung injury [D]. Suzhou: Soochow University, 2017.
- [39] Tian M F, Liu W Y, Li X, et al. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19 [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 308.