

基于高通量分子对接虚拟筛选 SARS-CoV-2 3CL 水解酶中药小分子抑制剂及抗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的中药及其复方预测

马青云¹, 刘辰¹, 杜海涛¹, 张贵晟², 闫滨^{1,4}, 孙启慧^{1,4}, 刘孝云^{3,4}, 齐冬梅³, 杨勇^{3,4*}, 容蓉^{1,4*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学理工学院, 山东 济南 250355

3. 山东中医药大学实验中心, 山东 济南 250355

4. 山东省高校中医药抗病毒协同创新中心, 山东 济南 250355

摘要:目的 基于中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP, 运用计算机虚拟筛选技术寻找新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 3CL 水解酶的中药小分子抑制剂, 推测潜在抗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 中药及中药复方。方法 以 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白为靶点, 利用 Autodock Vina 软件和 Python 脚本实现高通量分子对接, 结合 “ADME-Lipinski” 规则进行再次筛选, 以优选活性成分, 推测关键中药及复方。基于网络药理学角度, 构建成分-靶点-通路网络, 推测核心药对的作用机制。结果 以 SARS-CoV-2 原配体为阳性对照, 筛选出 66 个药动学性质良好的天然小分子抑制剂, 优选出 12 味中药单味药, 2 个中药药对甘草-桑白皮和金银花-连翘, 以及桑菊饮、桑菊饮合银翘散加减等 12 个中药处方作为抗 SARS-CoV-2 的候选方案。结论 基于高通量分子对接技术虚拟筛选 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的中药小分子抑制剂及中药, 结合网络药理学分析潜在分子机制, 为中药抗击 SARS-CoV-2 提供了科学指导与理论依据。

关键词: 分子对接; 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 3CL 水解酶; 中药小分子抑制剂; 网络药理学; 甘草-桑白皮; 金银花-连翘

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)06-1397-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.004

Virtual screening of small molecular inhibitors of SARS-CoV-2 3CL hydrolase based on high-throughput molecular docking and prediction of Chinese materia medica and its compound against COVID-19

MA Qing-yun¹, LIU Chen¹, DU Hai-tao¹, ZHANG Gui-sheng², YAN Bin^{1,4}, SUN Qi-hui^{1,4}, LIU Xiao-yun^{3,4}, QI Dong-mei³, YANG Yong^{3,4}, RONG Rong^{1,4}

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

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

3. Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

4. Collaborative Innovation Center for Antiviral Traditional Chinese Medicine in Shandong Province, Jinan, 250355, China

Abstract: Objective Based on the systematic pharmacological database of traditional Chinese medicine (TCM) and the analysis platform TCMSP, the computer virtual screening technique was used to screen the small molecule inhibitors of SARS-CoV-2 3CL hydrolase from Chinese materia medica (CMM), and speculate the potential anti-COVID-19 novel coronavirus pneumonia TCMs and its compounds. **Methods** SARS-CoV-2 3CL hydrolase protein was targeted in this study. Autodock Vina software and Python script were used to realize high-throughput molecular docking. Combined with “ADME-Lipinski” rules, the re-screening was carried out to optimize the active ingredients and speculate the key TCMs and compound prescriptions. Based on the perspective of network pharmacology, a component-target-pathway network was constructed to infer the mechanism of action of core drug pairs. **Results**

收稿日期: 2020-02-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873220); 国家自然科学基金资助项目 (81774167); 山东省重点研发计划 (2018CXGC1307)

作者简介: 马青云 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为天然药物化学成分及化学分析。Tel: 17862968533 E-mail: 315843193@qq.com

*通信作者 杨勇 Tel: 13953102044 E-mail: yy7204@163.com

容蓉 Tel: 13869196006 E-mail: rosierong@163.com

Taking the reference ligand as positive control, 66 natural micromolecule compounds with good pharmacokinetic properties were obtained. Twelve single TCMs, two Chinese medicine pairs of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Mori Cortex* and *Lonicerae Japonicae Flos-Forsythiae Fructus*, and 12 TCM prescriptions including Sangju Drink and modified Sangju Drink and Yinqiao Powder were selected as candidate schemes to fight against novel coronavirus pneumonia. **Conclusion** This study is based on high-throughput molecular docking technology to virtually screen small molecule inhibitors of SARS-CoV-2 3CL hydrolase of CMM and Chinese medicines, innovatively analyze the potential molecular mechanism in combination with network pharmacology, and provide scientific guidance and theoretical basis for TCM to resist novel coronavirus pneumonia.

Key words: molecular docking; SARS-CoV-2; COVID-19; 3CL hydrolase; small molecule inhibitor of CMM; network pharmacology; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Mori Cortex*; *Lonicerae Japonicae Flos-Forsythiae Fructus*

2019 年 12 月以来, 新型冠状病毒肺炎在湖北武汉突然爆发, 并迅速扩散; 很快世界卫生组织将此列为国际关注的突发公共卫生事件, 反映了此次疫情的严重性。世界卫生组织 2 月 11 日宣布, 将新型冠状病毒肺炎命名为“COVID-19”(corona virus disease 2019)。与此同时, 国际病毒分类委员会及时做出响应, 将新型冠状病毒命名为“SARS-CoV-2”^[1]。据国家卫生健康委员会发布, SARS-CoV-2 主要的传播途径是呼吸道飞沫传播和接触传播, 传播速度快, 传染性极强, 潜伏期较长, 感染后可引起严重的呼吸道疾病^[2]。目前, 临床尚无抗 SARS-CoV-2 感染的特异、有效的治疗方案, 多数治疗药物的选择都来自于以往 SARS 等感染的临床治疗经验^[3]。SARS-CoV-2 3CL 水解酶作为一种半胱氨酸水解酶, 是冠状病毒的主要蛋白酶之一, 在病毒的复制过程中起重要作用, 因其基因具有高度的保守性, 可作为药物设计的关键靶标^[4]。因此寻找 SARS-CoV-2 3CL 水解酶抑制剂, 可为抗 COVID-19 提供更为有效的途径。

中医药学是我国传统医学的特色, 也是我国优秀传统文化的重要组成部分。针对此次爆发的 COVID-19, 国家卫生健康委员会发布了《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行)》, 目前已发布了第七版, 且多省市制定了相应的中医药治疗方案。除此之外, 一些具有抗病毒作用的中成药, 如连花清瘟胶囊、抗病毒口服液、金花清感颗粒、藿香正气水、热毒宁注射液、清瘟败毒散、双黄连口服液等也都包含在推荐预防和治疗药物中。中药单味药以及中药复方的“多靶点、多效应”的整体治疗特点使其在某些疾病的治疗方面具备一定的优势和潜力。由于活性物质基础和作用机制不明确, 使抗 SARS-CoV-2 的中药复方及制剂在发现、使用和推广等方面都受到了很大的限制。

分子对接是指利用计算机模拟将配体与受体蛋白相结合, 再通过计算物理化学参数来预测两者的

结合模式及亲和力, 其作为一种结合了物理化学原理和科学计算算法的新兴研究方法, 为探究中药药效物质基础和作用机制提供了可行策略, 推动了中医药的现代化进程^[5]。网络药理学是以系统生物学和生物信息学为基础, 实现新药设计和药物作用机制挖掘的学科。借助网络药理学对药物、靶点和途径的相互作用网络进行分析, 可以更好地了解中药多组分、多靶点和多途径的作用特点, 阐明中药与人体的相互作用。本研究以优选的核心中药药对“甘草-桑白皮”为研究对象, 探讨该药对的主要活性成分可能参与的分子机制与作用通路。

1 材料与方法

1.1 小分子数据库的建立

TCMSP 数据库是世界上最大的非商业中药分子数据库之一^[6]。本研究基于 TCMSP 数据库, 将 483 种中药及 12 541 个化合物纳入研究, 下载化合物三维结构的 MOL2 格式文件, 建立分子对接技术虚拟筛选的小分子数据库。

1.2 分子对接

通过 Raccoon 软件准备小分子配体。对小分子进行加氢、加电荷、移除非极性氢、删除孤对电子以及建立特殊可旋转键等操作, 并将 MOL2 格式文件转化为对接必备的 PDBQT 结构文件^[7]。SARS-CoV-2 3CL 水解酶(PDB 6LU7)的 X 射线晶体结构由上海科技大学饶子和/杨海涛课题组提供, 利用 AutodockTools 软件对蛋白进行对接预处理, 添加氢原子, 删除水溶剂。分子对接的 grid box 设定为以 SARS-CoV-2 3CL 水解酶原配体为中心的周围所有残基。使用 Autodock Vina 和 Python 脚本完成高通量分子对接, 以 SARS-CoV-2 3CL 水解酶与原配体对接结果为阳性对照, 根据每个化合物的最优结合能(affinity)进行排序, 并绘图分析关键活性成分和 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的相互作用。

1.3 SARS-CoV-2 3CL 水解酶小分子抑制剂数据库的建立

使用 pymol 软件抽取 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的原配体, 保存为 PDBQT 格式。利用 Autodock Vina 软件返回对接, 结果显示原配体成功对接到靶蛋白的活性中心, 并且其 RMSD 值小于 0.2 nm, 表明对接参数设置合理。将靶蛋白与原配体的对接结果为阳性对照, 通过 Autodock Vina 和 Python 脚本实现 12 541 个小分子化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的高通量分子对接, 提取最优结合能小于原配体 (-31.38 kJ/mol) 的潜在活性成分, 并结合原配体相对分子质量 (684.82) 及其体积, 去除可能存在非特异性结合的成分进行初步筛选, 建立 SARS-CoV-2 3CL 水解酶中药小分子数据库。

1.4 基于 ADME 和 Lipinski 规则评估

“ADME”指机体对外源化学物质的吸收 (absorption)、分布 (distribution)、代谢 (metabolism) 及排泄 (excretion) 过程, ADME 性质是筛选供进一步开发的候选药物的重要指标^[8], 临床上常以口服生物利用度 (OB) $\geq 20\%$, 类药性 (DL) ≥ 0.18 作为药物筛选标准。Lipinski 规则类药性分析是指基于 Lipinski 规则对化合物数据库进行筛选, 滤去不符合规则的化合物, 从而节省人力、财力和物力, 提高药物开发效率。经典的 Lipinski 规则被称为“Lipinski 类药五规则”, 包括相对分子质量 (M_w) < 500 、脂水分配系数 ($\text{clog}P$) < 5 、氢键给体数目 (Hdon) < 5 、氢键受体数目 (Hacc) < 10 、化合物中可旋转键数量 (RBN) ≤ 10 个^[9]。但经过长期实践发现, “Lipinski 类药五规则”在使用上有很大的局限性, 因此五规则现已逐步简化为四规则和三规则。本研究基于 ADME 参数和去掉 Hacc 和 RBN 限制的 Lipinski 规则对小分子抑制剂数据库的活性成分进一步筛选, 寻找药动学性质和生物利用度良好的化合物, 以期减少阴性结果出现的概率, 从结构和性质角度过滤成药性较低的化合物, 为后续研究提供参考方向, 提高筛选效率。

1.5 抗 COVID-19 中药优选及复方预测

依据以上筛选结果, 推测抗 COVID-19 中药, 并基于多地市制定的中医药治疗方案, 根据活性中药在各处方中的分布个数, 预测并优选中药复方。

1.6 网络药理学预测核心药对的分子机制

1.6.1 活性成分靶点预测 将药对主要活性成分的 Canonical SMILES 结构导入 Swiss Target Prediction 服务器^[10], 基于已知配体与活性分子的二维/三维结

构相似性原理预测潜在靶点, 筛选 probability > 0 的靶点, 将潜在靶点进一步映射到 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 数据库, 并转换为官方名称 (official gene symbol)。

1.6.2 GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析 将预测核心药对有效成分的潜在靶点提交到生物信息学数据库 DAVID 6.8 进行 GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析^[11], 以探讨预测核心药对的潜在分子机制。

1.6.3 成分-靶点-通路网络的构建 将预测核心药对中的活性成分、潜在靶点以及相关通路信息导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 以构建成分-靶点-通路网络, 阐释其多效协同的作用特点。

2 结果

2.1 SARS-CoV-2 3CL 水解酶中药小分子抑制剂数据库的建立

分子对接结果显示, 原配体的最优结合能为 -31.38 kJ/mol, 该配体与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的相互作用模式如图 1 所示, 其与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶两者之间的主要作用力是氢键与疏水相互作用, 配体的羰基及酰胺结构与氨基酸残基 HIS 41、CYS 145、GLN 189 以及 ASN 142 之间形成氢键, 与 LEU 27 和 PRO 168 形成疏水相互作用。经比对, 共计 2 531 个中药小分子化合物的最优结合能小于阳性对照。为了尽量降低假阳性结果出现的概率, 本研究首先根据原配体 M_w 及分子体积, 去除可能存在非特异性结合的成分, 以校正结合强度, 并将中药小分子化合物的最优结合能与目前临床推荐化学药物进行对比, 适当提高筛选标准, 部分结果见表 1。其中, 洛匹那韦最优结合能在 4 个临床推荐化学药中最低, 为 -33.89 kJ/mol, 于是收集最优结合能小于该药物的潜在活性成分, 初步建立 SARS-CoV-2 3CL 水解酶中药小分子抑制剂数据库。初筛结果显示, 593 个潜在活性成分最优结合能小于 -33.89 kJ/mol, 平均结合能为 -35.98 kJ/mol, 表明这些化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶结合能力较强。其中苯丙素类成分南茛菪素 (wikstrocin, 结合能 -43.51 kJ/mol) 与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶结合活性最强, 来源于了哥王根; 其次是黄酮类成分穗花双黄酮 (amentoflavone, 结合能 -41.00 kJ/mol), 来源于连翘、银杏叶、马勃等 12 味中药, 这些中药中有将近 1/2 属于清热解毒药; 再次是生物碱类成分 bisindigotin (结合能 -40.58 kJ/mol), 来源于蓼大青叶和青黛。这些活性小分子与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的相互作用见图 2。由图 2-b 可见, 南茛

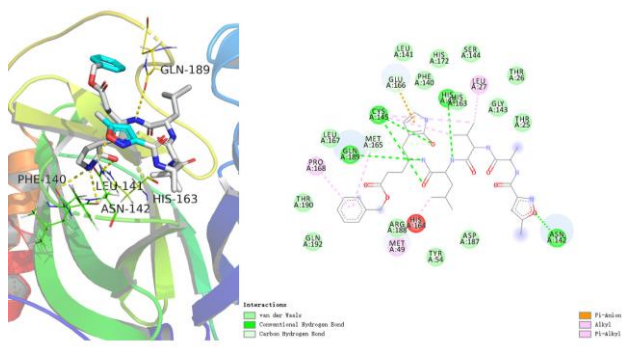


图1 SARS-CoV-2 3CL 水解酶与原配体的二维及三维分子对接模式

Fig. 1 2D and 3D molecular docking patterns of SARS-CoV-2 3CL hydrolase with proto ligand

表 1 代表性成分及临床推荐化学药物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的结合能

Table 1 Representative components and binding energy of clinically recommended chemicals to SARS-CoV-2 3CL hydrolase

化合物	化学式	相对分子质量	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
阳性对照	C ₃₅ H ₅₂ N ₆ O ₈	684.82	-31.38
南茛菪素	C ₂₇ H ₁₄ O ₉	482.41	-43.51
穗花双黄酮	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	538.48	-41.00
bisindigotin	C ₃₂ H ₁₈ N ₄ O ₂	490.54	-40.58
洛匹那韦	C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅	628.80	-33.89
利托那韦	C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂	720.94	-32.64
瑞德西韦	C ₂₇ H ₃₅ N ₆ O ₈ P	602.58	-33.47
氯喹	C ₁₅ H ₃₅ ClN ₃ O ₃ P ₂	515.86	-24.27

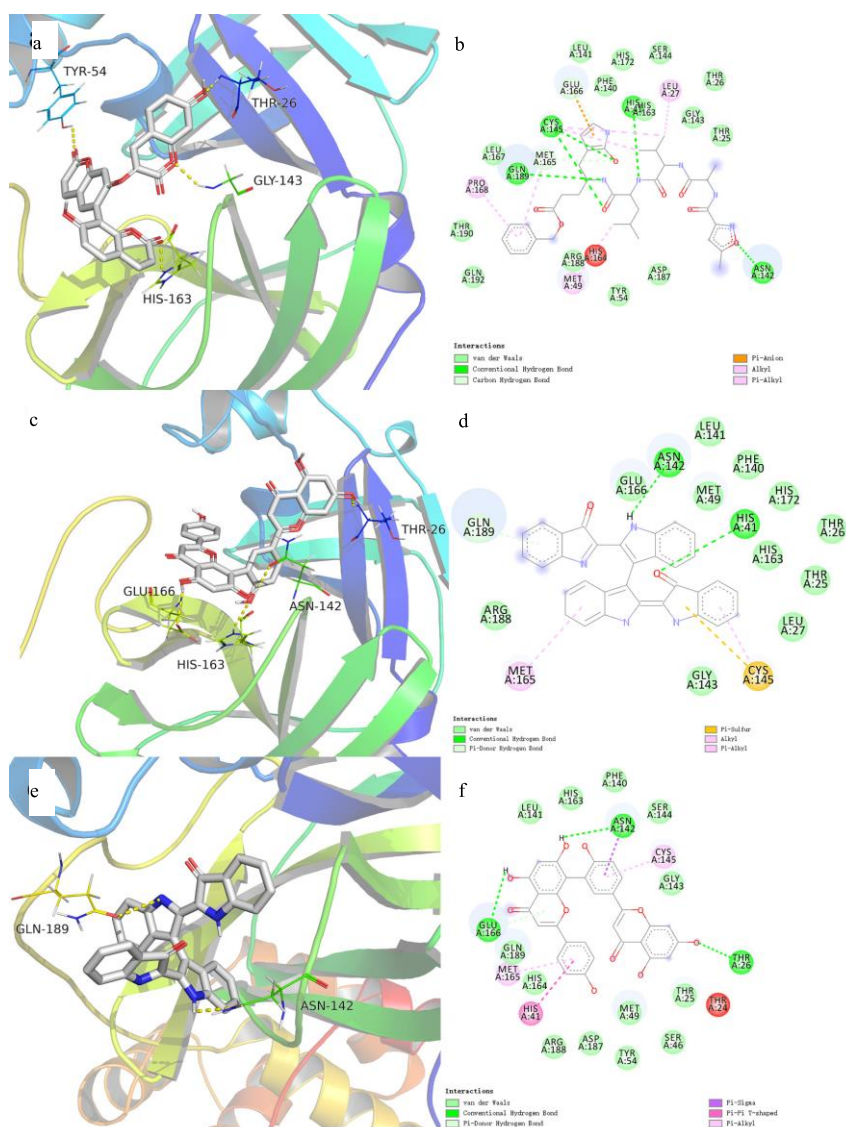


图2 SARS-CoV-2 3CL 水解酶与南茛菪素 (a、b)、穗花双黄酮 (c、d) 和 bisindigotin (e、f) 的二维及三维分子对接模式
Fig.2 2D and 3D molecular docking patterns of SARS-CoV-2 3CL hydrolase with wikstroemin (a, b), amentoflavone (c, d), and bisindigotin (e, f)

素内酯环上的羰基和酚羟基与靶蛋白之间形成 5 个氢键，其中包括关键残基 CYS 145、GLN 189 等，其内酯环结构还与 MET 49、MET 165 残基之间形成疏水相互作用；据图 2-d 显示，穗花双黄酮的酚羟基与关键残基 ASN 142 之间形成氢键及 π - σ 超共轭体系，与 MET 165、CYS145 以及之间形成疏水相互作用；据图 2-f 可见，bisindigotin 环状结构上的羰基和氨基与靶蛋白之间形成 2 个氢键，其中包括关键残基 ASN 142 等，其苯环结构与 MET 165、CYS 145 之间形成疏水相互作用。据统计，593 个活性成分广泛分布于 298 味中药当中，约占本次中药研究总数的 3/5 (61.7%)。298 味潜在抗病毒中药中，66 味属清热解毒药 (22.1%)，其中具有代表性的中药有连翘、金银花；31 味属止咳平喘药 (10.4%)，代表性中药有银杏叶、桑白皮；22 味属活血祛瘀药 (7.4%)，代表性中药有丹参、王不留行；18 味属利水渗湿药 (6.0%)，代表性中药有地耳草、通草；17 味属辛凉解表药 (5.7%)，代表性中药有麻黄、葛花。该结果充分体现了中药多成分多靶点作用机制的复杂性与中药药理作用的多效性和广泛性。

如图 3 所示，本研究对活性成分分布排名前 15 的中药进行进一步分析，在这些中药当中，4 味中药属于清热解毒药，包括连翘 (20 个，7.9%)、积雪草 (13 个，5.1%)、金银花 (12 个，4.7%) 及荷叶 (12 个，4.7%)；4 味中药属于止咳平喘药，包括桑白皮 (37 个，14.6%)、银杏叶 (24 个，9.5%)、洋金花 (14 个，5.5%) 以及枇杷叶 (14 个，5.5%)；3 味属于辛凉解表药，包括菊花 (16 个，6.3%)、桑叶 (11 个，4.4%) 及柴胡 (10 个，4.0%)；2 味

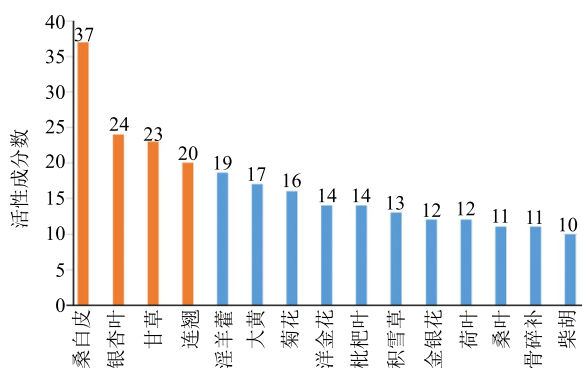


图 3 活性成分分布排名前 15 位的中药

Fig. 3 Top 15 Chinese materia medica with active components distribution

中药属于补阳药，包括淫羊藿 (19 个，7.5%) 和骨碎补 (11 个，4.4%)；其他 2 味中药为甘草 (23 个，9.1%) 和大黄 (17 个，6.7%)，分别属补气药以及攻下药。

2.2 ADME-Lipinski 规则筛选结果

本研究基于 ADME 参数和 Lipinski 规则，对小分子抑制剂数据库的潜在活性成分进一步筛选，共获得 66 个药动学性质和生物利用度良好的化合物，可作为候选中药小分子抑制剂，为后续实验研究提供理论依据。如图 4 所示，这些化合物根据结构可分为 6 大类，包括黄酮类 (22 个)、生物碱类 (17 个)、萜类 (10 个)、苯丙素类 (7 个)、甾体类 (4 个) 以及其他类 (6 个)。所有小分子中以黄酮类和生物碱类成分居多。

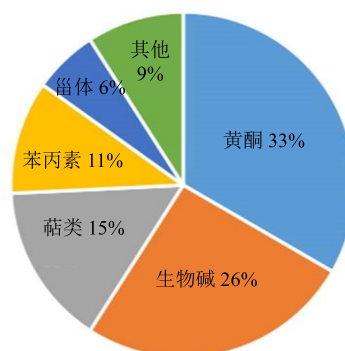


图 4 不同结构类型成分占比

Fig. 4 Proportion of components with different structure types

2.3 中药优选及复方预测

依据活性成分分布排名靠前的中药以及 ADME 参数和 Lipinski 规则筛选结果，结合文献检索进一步分析。其中，桑白皮、甘草、淫羊藿、银杏叶、连翘、牛膝、大黄、菊花、余甘子、积雪草、金银花以及丹参 12 味中药此前均有大量文献证实具有潜在的抗病毒疗效^[12-30]，优选为抗 COVID-19 候选中药。在这些优选中药当中，甘草、桑白皮为活性成分分布最多的中药，优选为本研究预测中药药对，含甘草-桑白皮药对的复方定喘汤曾被报道具有抗呼吸道合胞病毒 (RSV) 疗效^[31-33]；金银花-连翘为常见中药药对，曾被报道具有抗 RSV 以及抗流感病毒作用^[34-35]。此外，本研究基于多省市制定的中医药治疗方案，统计活性中药分布个数 ≥ 3 的中药处方及复方制剂，预测并优选中药复方，见表 2 (排名不分先后)。综上所述，根据本研究筛选

表 2 预测活性中药分布个数≥3 的中药处方及复方制剂

Table 2 Chinese materia medica prescription and compound preparation with active Chinese materia medica distribution number ≥ 3

序号	名称	处方	活性中药个数	出处
1	桑菊饮	桑叶、菊花、桔梗、苦杏仁、连翘、芦根、甘草、薄荷、金银花、淡竹叶、荆芥、淡豆豉	4	湖南省新型冠状病毒感染的肺炎中医诊疗方案（试行第三版）
2	桑菊饮合银翘散加减	桑叶、菊花、杏仁、金银花、连翘、牛蒡子、甘草	4	四川省新型冠状病毒感染的肺炎中医药防控技术指南
3	麻杏石甘汤合银翘散加减	蜜麻黄、杏仁、石膏、桑白皮、金银花、连翘、黄芩、浙贝母、生甘草	4	四川省新型冠状病毒感染的肺炎中医药防控技术指南
4	银翘散加减	金银花、连翘、荆芥、薄荷、甘草、板蓝根、桑白皮、芦根	4	湖南省新型冠状病毒感染的肺炎中医诊疗方案（试行第三版）
5	连花清瘟制剂	连翘、金银花、麻黄（炙）、苦杏仁（炒）、石膏、板蓝根、绵马贯众、鱼腥草、广藿香、大黄、红景天、薄荷脑、甘草	4	新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案（试行）第四版至第七版
6	麻杏苈甘汤加味	麻黄、杏仁、薏苡仁、生甘草、柴胡、黄芩、连翘、贯众、大青叶、牛蒡子、苍术、草果	3	江西省新型冠状病毒感染的肺炎中医防治方案（试行）
7	麻杏石甘汤加味	麻黄、杏仁、石膏、生甘草、金银花、连翘、大青叶、黄芩、浙贝、苍术、滑石、藿香	3	江西省新型冠状病毒感染的肺炎中医防治方案（试行）
8	银翘散合麻杏甘石汤加减	连翘、金银花、桔梗、薄荷（后下）、牛蒡子、竹叶、芦根、淡豆豉、麻黄、生石膏（先煎）、杏仁、柴胡、蝉蜕、生甘草	3	陕西省新型冠状病毒感染的肺炎中医治疗方案（试行第一版）
9	流感 2 号（银翘散加清瘟败毒散加减）	金银花、连翘、荆芥、牛蒡子、薄荷、生甘草、淡竹叶、芦根、黄连	3	防控指挥部医疗救治组印发《关于在新型冠状病毒感染的肺炎中医药治疗中推荐使用中药协定方的通知》
10	金花清感颗粒	金银花、石膏、麻黄（蜜炙）、苦杏仁、黄芩、连翘、浙贝母、知母、牛蒡子、青蒿、薄荷、甘草	3	新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案（试行）第四版至第七版
11	疏风解毒制剂	虎杖、连翘、板蓝根、柴胡、败酱草、马鞭草、芦根、甘草	3	新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案（试行）第四版至第七版
12	银马解毒颗粒	甘草、金银花、马齿苋、车前草、大黄	3	四川省新型冠状病毒感染的肺炎中医药防控技术指南

结果，优选出甘草、桑白皮等 12 味单味药，桑菊饮、桑菊饮合银翘散加减等 12 个中药处方作为抗击 SARS-CoV-2 的候选方案，为后续研究提供一定参考。

2.4 甘草-桑白皮药对潜在靶点的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路注释分析

将甘草-桑白皮药对中的 13 个药动学性质良好的活性成分的 Canonical SMILES 结构导入 Swiss Target Prediction 服务器，共获得 321 个潜在靶点。将这些靶点导入 DAVID 6.8 数据库进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路注释分析。其中，GO 富集分析包括 3 个分支，即生物过程（BP）、分子功能（MF）以及细胞组分（CC）。图 5 列出了潜在靶点的 GO 富集分析结果。其中，在生物过程层面，预测靶点主要参与蛋白质磷酸化（protein phosphorylation）和信号转导（signal transduction）；在细胞组分层面，plasma membrane 和 cytosol 所占比例较大；在分子

功能层面，与 binding（protein、ATP）和 activity（protein kinase、protein serine/threonine kinase）关系较为紧密。

通过 KEGG 通路注释分析甘草-桑白皮药对核心成分抗 COVID-19 可能参与的通路（图 6）。分析结果发现，321 个潜在靶点参与的信号通路有 pathways in cancer、PI3K-Akt signaling pathway、neuroactive ligand-receptor interaction、Ras signaling pathway、viral carcinogenesis 等 101 条。其中，PI3K-Akt、Ras、MAPK 信号通路与肺癌、肺纤维化以及气道炎症等肺部疾病密切相关^[36-42]，表明甘草-桑白皮药对核心成分可能主要作用于这些通路，从而起到抗 COVID-19 的作用。图 6 列举了排名前 10 的相关通路。

2.5 成分-靶点-通路网络构建

为阐释甘草-桑白皮药对多成分-多靶点-多通路

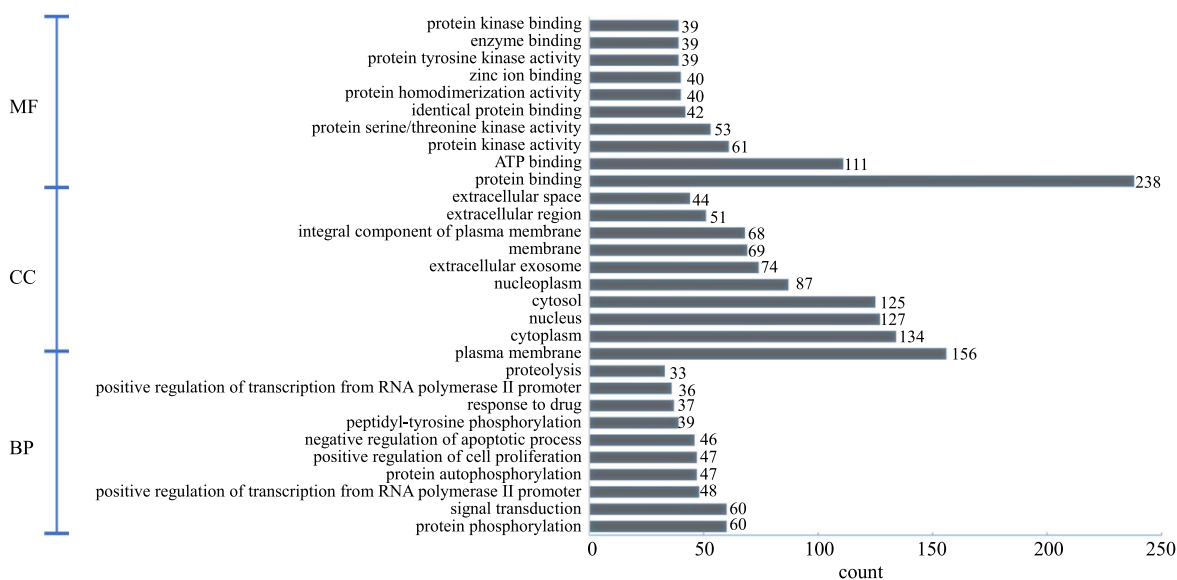


图 5 甘草-桑白皮药对的 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of targets of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Mori Cortex* drug pair

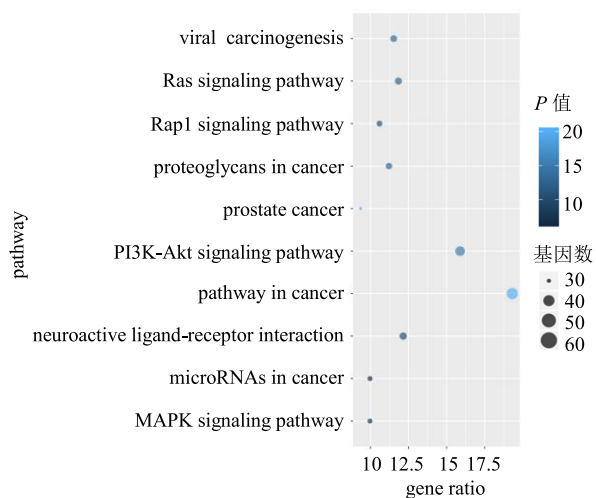


图 6 甘草-桑白皮药对潜在靶点 KEGG 通路富集分析的前 10 条通路

Fig. 6 Ten pathways as targets of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Mori Cortex* drug pair by KEGG enrichment analysis

的复杂分子机制，本研究筛选排名前 10 的通路，构建成分-靶点-通路网络，如图 7 所示，绿色节点代表甘草-桑白皮药对的主要活性成分，蓝色节点代表作用靶点，橘红色靶点代表相关通路。该网络中共包含 179 个节点（13 个化学成分、156 个靶点、10 条相关通路），672 条边，充分体现了甘草-桑白皮药对的主要活性成分的作用靶点分布于不同的通路，各成分之间相互协调、协同作用于机体的特点。

3 讨论

据相关文献报道，COVID-19 属于“湿毒疫”

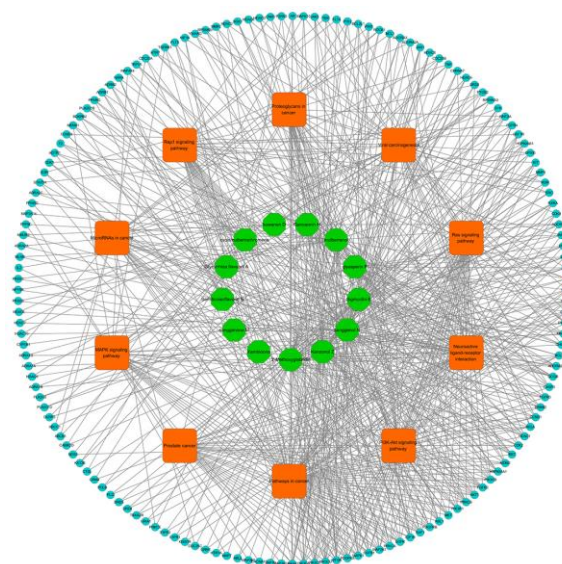


图 7 “甘草-桑白皮”药对成分-靶点-通路网络

Fig. 7 Compound-target-pathway network of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Mori Cortex* drug pair

范畴，感受“湿毒之邪”致病。大部分患者出现身热不扬、咳嗽、乏力、纳差、舌苔厚腻等多种症状^[43]，基于此，在中医“辨证施治”理论指导下，中药的运用具有得天独厚的优势。为促进中药高效合理地使用，探究中药抗 COVID-19 药效物质基础和作用机制，在前人研究基础上^[44-45]，本实验运用高通量分子对接技术基于 ADME-Lipinski 规则筛选，获得 66 个药动学性质良好的天然小分子抑制剂，优选出 12 味中药单味药，2 个中药药对甘草-桑白皮和金银花-连翘药，以及桑菊饮、桑菊饮合银

翘散加减等 12 个中药处方作为抗击 SARS-CoV-2 的候选方案, 为后续实验研究提供理论依据。

此外, 本研究基于网络药理学角度, 简单探讨了优选出来的甘草-桑白皮药对的主要活性成分潜在靶点可能参与的生物过程与作用通路。GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析结果表明, 甘草-桑白皮药对的主要活性成分潜在靶点主要在细胞膜、细胞质部位发生蛋白结合、ATP 结合、酶反应等分子反应, 参与细胞生物过程的调节与信号转导, 多通路协同发挥抗 COVID-19 作用。

总而言之, 面对当前严峻的疫情形势, 早隔离、早治疗仍是目前最有效的解决方案, 因此, 预防重于治疗。中药单味药以及中药复方在中医“治未病”理论指导下, 发挥多效协同作用, 使其在抗 COVID-19 方面, 具有更显著的优势和巨大的潜力。本研究基于高通量虚拟筛选技术和网络药理学的角度, 对 TCMSP 数据库中的中药小分子化合物进行了关于 SARS-CoV-2 3CL 水解酶抑制剂的初步探索和机制预测, 提出了较为合理的中药解决方案。该结果充分体现了中药多成分、多靶点作用机制的复杂性与中药药理作用的多效性和广泛性。鉴于虚拟筛选结果的局限性, 后期如有条件还需进一步通过体内、体外实验来验证本研究的结果, 以期为抗病毒天然药物的研发提供实验依据。

参考文献

- [1] Wang C, Horby P W, Hayden F G, *et al.* A novel coronavirus outbreak of global health concern [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 470-473.
- [2] Lu H. Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV) [J]. *Biosci Trends*, 2020, doi: 10.5582/bst.2020.01020.
- [3] 宋 昊, 成梦群, 魏贤文. 新型冠状病毒 (2019-nCoV) 治疗药物体内外研究及药物研发进展 [J/OL]. 病毒学报, [2020-03-04]. <https://doi.org/10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003646>.
- [4] Chen C N, Lin C P, Huang K K, *et al.* Inhibition of SARS-CoV 3C-like protease activity by theaflavin-3,3'-digallate (TF3) [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2005, 2(2): 209-215.
- [5] Hirayama N. Docking simulations between drugs and HLA molecules associated with idiosyncratic drug toxicity [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2017, 32(1): 31-39.
- [6] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [7] Nguyen N T, Nguyen T H, Pham T, *et al.* Autodock vina adopts more accurate binding poses but autodock4 forms better binding affinity [J]. *J Chem Inf Model*, 2020, 60(1): 204-211.
- [8] Vugmeyster Y, Harrold J, Xu X. Absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) studies of biotherapeutics for autoimmune and inflammatory conditions [J]. *AAPS J*, 2012, 14(4): 714-727.
- [9] Lipinski C A. Chris Lipinski discusses life and chemistry after the Rule of Five [J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8(1): 12-16.
- [10] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, *et al.* Swiss target prediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014(W1): W32-W38.
- [11] 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.
- [12] 石俊英, 郭承军. 金银花体外抗流感病毒有效部位研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(2): 178-180.
- [13] 张国刚, 黎琼红, 叶英子博, 等. 桑白皮抗病毒有效成分的提取分离及体外抗病毒活性研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(3): 207-209.
- [14] 李 婧, 马小兵, 沈 杰, 等. 基于文献挖掘与分子对接技术的抗新型冠状病毒中药活性成分筛选 [J/OL]. 中草药, [2020-03-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20200218.1239.008.html>.
- [15] 陈 杨, 李 鑫, 周婧瑜, 等. 连翘抗病毒有效部位 (LC-4) 体外抗呼吸道合胞病毒作用的研究 [J]. 卫生研究, 2009, 38(6): 733-735.
- [16] Lv J, Yu S, Xin Y, *et al.* Anti-viral and cytotoxic norbisabolane sesquiterpenoid glycosides from *Phyllanthus emblica* and their absolute configurations [J]. *Phytochemistry*, 2015, 117: 123-134.
- [17] Thanigaivel S, Durgadevi H, Balasubramaniam J, *et al.* Comparative evaluation of the anti-Hepatitis B virus activity of *Centella asiatica* and *Camellia sinensis* (green tea) [J]. *BMC Infectious Dis*, 2014, 14(3 Suppl): 1471-2334.
- [18] 王振基, 孟小倩, 刘文亚, 等. 野菊花保肝胶囊抗乙肝病毒及抗酒精性肝损伤的作用 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2017, 52(5): 549-553.
- [19] Haruyama T, Nagata K. Anti-influenza virus activity of *Ginkgo biloba* leaf extracts [J]. *J Nat Med*, 2013, 67(3): 636-642.
- [20] Liu Z, Ma N, Zhong Y, *et al.* Antiviral effect of emodin from *Rheum palmatum* against coxsackievirus B₅ and human respiratory syncytial virus *in vitro* [J]. *J Huazhong*

- Univ Sci Technol, 2015, 35(6): 916-922.
- [21] 彭宗根, 陈鸿珊, 郭志敏, 等. 牛膝多糖硫酸酯体外和体内抗艾滋病病毒作用 [J]. 药学报, 2008, 43(7): 702-706.
- [22] 赛福丁·阿不拉. 黄精多糖和牛膝多糖及其硫酸化产物的抗病毒和增强免疫活性的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [23] Zou W, Kim B O, Zhou B Y, *et al.* Protection against human immunodeficiency virus type 1 tat neurotoxicity by *Ginkgo biloba* extract EGb 761 involving glial fibrillary acidic protein [J]. *J Med Res*, 2007, 171(6): 1923-1935.
- [24] Toshihito N, Masaya F, Kosuke O, *et al.* Effects of traditional kampo drugs and their constituent crude drugs on influenza virus replication *in vitro*: Suppression of viral protein synthesis by *Glycyrrhizae Radix* [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2019, 2019: 3230906.
- [25] Wang C Z, Li W J, Tao R, *et al.* Antiviral activity of a nanoemulsion of polyphenols from ginkgo leaves against influenza A H3N2 and hepatitis B virus *in vitro* [J]. *Molecules*, 2015, 20(3): 5137-5151.
- [26] Myrna A, Chie A, Mari K, *et al.* Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species [J]. *Microbiol Immunol*, 2014, 58(3): 180-187.
- [27] 董德刚, 张秀英, 刘小雪. 桑白皮不同有效部位群对小鼠呼吸道合胞病毒肺炎肺指数及肺组织病毒载量的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(6): 785-787.
- [28] 龚 诗, 苏海飞, 苏雪梅, 等. 复方丹参片联合核苷类抗病毒药物对乙型肝炎肝硬化患者纤维化指标及网织红细胞参数的影响研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(15): 3370-3372.
- [29] 董 娜, 李 倩, 张贵强, 等. 淫羊藿多糖对甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的免疫佐剂作用 [J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(1): 63-68.
- [30] Fan Y, Wang D, Liu J, *et al.* Adjuvanticity of epimedium polysaccharide-propolis flavone on inactivated vaccines against AI and ND virus [J]. *Inter J Biol Macromolecules*, 2012, 51(5): 1028-1032.
- [31] 崔振泽, 徐 超, 迟 磊. 基于“肺肠理论”和胆汁酸代谢网络探讨定喘汤对呼吸道合胞病毒感染大鼠肠道菌群调节的研究 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2018, 10(6): 461-465.
- [32] 李含章, 王筱薇. 定喘汤对合胞病毒感染型肺炎患者免疫、炎症因子的影响 [J]. 实用中西医结合临床, 2018, 18(8): 14-17.
- [33] 孙同英. 定喘汤对呼吸道合胞病毒感染儿童及大鼠的临床与基础研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2017.
- [34] 莫红缨, 赖克方, 江永南, 等. 双黄连及其拆方抗呼吸道合胞病毒作用的药效学研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(3): 194-196.
- [35] 张美义, 何家靖, 杨子峰, 等. 金翘片体内抗流感病毒作用研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(1): 143-148.
- [36] Zhang N, Yan Q Q, Lu L, *et al.* The KLF6 splice variant KLF6-SV1 promotes proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by up-regulating PI3K-AKT signaling pathway [J]. *J Cancer*, 2019, 10(22): 5324-5331.
- [37] Liao X Z, Gao Y, Sun L L, *et al.* Rosmarinic acid reverses non-small cell lung cancer cisplatin resistance by activating the MAPK signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2020, doi: 10.1002/ptr.6584.
- [38] Nagaraja S. Embelin impact on paraquat-induced lung injury through suppressing oxidative stress, inflammatory cascade, and MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, doi: 10.1002/jbt.22456.
- [39] Hu T, Shen H, Huang H, *et al.* Cholesterol-lowering drug pitavastatin targets lung cancer and angiogenesis via suppressing prenylation-dependent Ras/Raf/MEK and PI3K/Akt/mTOR signaling [J]. *Anti-cancer Drugs*, 2020, doi: 10.1097/CAD.0000000000000885.
- [40] Wang Y, Kuang H, Xue J, *et al.* LncRNA HOXB-AS3 exacerbates proliferation, migration, and invasion of lung cancer via activating the PI3K-AKT pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2020, doi: 10.1002/jcp.29618.
- [41] 李明明, 屈 彬, 方向明. 平喘宁调节 PI3K/Akt 信号通路干预寒性哮喘大鼠气道重塑的机制 [J]. 云南中医学院学报, 2019, 42(2): 11-15.
- [42] El-Sayed L A, Osama E, Mehesen M N, *et al.* Contribution of angiotensin II in hepatic ischemia/reperfusion induced lung injury: Acute versus chronic usage of captopril [J]. *Pulmonary Pharm Ther*, 2020, 60: 101888.
- [43] 王玉光, 齐文升, 马家驹, 等. 新型冠状病毒 (2019-nCoV) 肺炎中医临床特征与辨证治疗初探 [J/OL]. 中医杂志, [2020-03-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200129.1258.002.html>.
- [44] 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/OL]. 中草药, [2020-03-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20200302.0849.002.html>.
- [45] 宗 阳, 丁美林, 贾可可, 等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 活性化合物的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 836-844.