

小柴胡汤治疗早期新型冠状病毒肺炎(COVID-19)邪热郁肺、枢机不利证功效网络分析与机制预测

孙凯滨^{1,2}, 张新雨², 刘静², 孙蓉^{1,3*}

1. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033

2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

3. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

摘要: 目的 研究小柴胡汤在治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)邪热郁肺、枢机不利证过程中的功效作用网络及潜在机制, 分析方剂中抗新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的活性成分。方法 首先查阅文献分析 COVID-19 邪热郁肺、枢机不利证与小柴胡汤适应证的方证对应关系, 继而运用网络药理学技术 Cytoscape 3.6.0 等软件分别构建小柴胡汤“中药方剂-活性成分-关键靶点”功效作用网络, 并确认方中抗 SARS-CoV-2 活性成分, 从多方面分析小柴胡汤治疗早期 COVID-19 邪热郁肺、枢机不利证的功效作用及机制。结果 已有文献报道中药潜在抗 SARS-CoV-2 活性成分 48 个; 共分析出小柴胡汤中治疗肺炎、调节免疫的活性成分 140 个, 其中黄芩素、芒柄花素、槲皮素等 12 个成分具有潜在抗 SARS-CoV-2 活性。小柴胡汤中活性成分通过 IL-6、NOS2、ESR1 等 95 个关键靶点进行肺炎治疗和免疫调节, 涉及 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、甲型流感等多条通路。基因共表达和蛋白-蛋白互相作用(PPI)分析发现, 血管紧张素转化酶 II(ACE2)仅与上述靶点中 NOS2 具有共表达, 并且在 PPI 互作网络中也仅与 5 个靶点有相互作用关系, 推测 ACE2 靶点仅在 SARS-CoV-2 入侵人体的时候起到重要作用, 而在病毒感染后的肺炎治疗中作用甚微。结论 小柴胡汤中活性成分在抑制 SARS-CoV-2 活性、阻断 SARS-CoV-2 入侵途径、抑制炎症风暴、调节机体免疫等多方面发挥治疗 COVID-19 的作用; 值得注意的是针对 ACE2 靶点设计药物可阻断病毒入侵, 但对肺泡内炎症等病变疗效可能不佳, 因此, 这也为小柴胡汤对早期 COVID-19 治疗提供了多靶点、多向性空间。另外, 小柴胡汤用于治疗早期 COVID-19 时尤应注意精准辨证用药, 一是避免产生不良反应, 二是避免加重 COVID-19 病情出现细胞因子损伤。

关键词: 小柴胡汤; 新型冠状病毒; 网络药理学; 血管紧张素转化酶 II; 黄芩素; 芒柄花素; 槲皮素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2020)07 - 1750 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.009

Network pharmacological analysis and mechanism prediction of Xiaochaihu Decoction in treatment of COVID-19 with syndrome of pathogenic heat lingering in lung and obstructive cardinalate

SUN Kai-bin^{1,2}, ZHANG Xin-yu², LIU Jing², SUN Rong^{1,3}

1. The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

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

3. Advanced Medical Research Institute, Shandong University, Jinan 250012, China

Abstract: Objective To study the efficacy network and potential mechanism of Xiaochaihu Decoction (XCHD) in the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with syndrome of pathogenic heat lingering in the lung and obstructive cardinalate, and analyze the active ingredients of XCHD with anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) efficacy. **Methods** The correspondence between COVID-19 and XCHD was analyzed by literature consulting. Based on network pharmacology, Cytoscape 3.6.0 and other software were then used to construct XCHD efficacy network of “Chinese medicine prescription-active ingredient-key target” for pneumonia and immune regulation, in order to confirm anti-SARS-CoV-2 active ingredients in the

收稿日期: 2020-03-03

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2016ZDJS07A21); 山东省重点研发计划项目(2017CXGC1301); 泰山学者工程专项经费项目(ts201511107)

作者简介: 孙凯滨, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理。Tel: 13515315572 E-mail: sunkaibin122@126.com

*通信作者 孙蓉, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理与毒理研究。Tel: 13605311799 E-mail: sunrong107@163.com

prescription. Some softwares were used to analyze XCHD for COVID-19 treatment in multiple aspects. **Results** A total of 48 active ingredients with potential anti-SARS-CoV-2 effect in herbs were collected; 140 active ingredients in XCHD for pneumonia treatment and immune regulation were analyzed, of which 12 ingredients had direct anti-SARS-CoV-2 activity including baicalein, formononetin, quercetin, etc. The active ingredients in XCHD exerted efficacy for pneumonia treatment and immunoregulation through 95 key targets such as IL-6, NOS2, and ESR1, involving multiple pathways such as the TNF signaling pathway, IL-17 signaling pathway, and influenza A. Analysis of gene co-expression and PPI interaction analysis found that ACE2 only co-expressed with NOS2 in the above targets, and also interacted with only five targets in the PPI interaction network. It is speculated that the ACE2 target only plays an important role when SARS-CoV-2 invaded the human body, and had little effect in the treatment of pneumonia after viral infection. **Conclusion** The active ingredients in XCHD play a role in treating COVID-19 by inhibiting SARS-CoV-2 activity, blocking the SARS-CoV-2 invasion pathway, inhibiting cytokine storm, and regulating immunity. It is worth noting that drugs designed for the ACE2 target can block virus invasion, but may not be effective for diseases such as alveolar inflammation. Therefore, this study also provides a multi-target and multi-directional space for XCHD for early COVID-19 treatment. In addition, when XCHD is used in the early treatment of COVID-19, we should pay attention to the precise use of drugs based on syndrome accurate identification, one is to avoid adverse reactions, the other is to avoid cytokine damage caused by re-crown disease.

Key words: Xiaochaihu Decoction; coronavirus disease 2019; network pharmacology; ACE2; baicalein; formononetin; quercetin

新型冠状病毒肺炎（coronavirus disease 2019, COVID-19）是人体感染新型冠状病毒（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2）而引起的一种急性呼吸道传染病，以发热、干咳、乏力为主要表现，少数患者有鼻塞、咽痛、腹泻等症状^[1]。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应对，积极出台诊疗以及预防方案^[2-3]，随着对 COVID-19 的深入认识和临床经验的积累，中医在这场抗疫大战中逐渐——从参与者变成主力军^[4]，其中小柴胡汤被多地、多部门联袂推荐使用，而最近被推荐的清肺排毒汤也是由小柴胡汤与麻杏石甘汤、射干麻黄汤、五苓散合方而成，可见仲景古方在治疗新病中正发挥重要作用。

目前，运用分子对接技术，肖小河课题组^[5]基于临床经验筛选发现了 46 个能作用于 SARS-CoV-2 S 蛋白与人体血管紧张素转化酶 II (ACE2) 结合区域且具有较低结合能的中药活性成分，Zhang 等^[6]评估了潜在活性成分在体内吸收、分布、代谢及排泄过程 (ADME) 后筛选出了 13 个与 SARS-CoV-2 木瓜样蛋白酶 (PLpro)、3C 样蛋白酶 (3CLpro) 和棘突糖蛋白 (Spike) 具有较低结合能的活性成分，李婧等^[7]、宗阳等^[8]基于文献挖掘筛选出了 44 个与 SARS-CoV-2 的 3CLpro 蛋白具有较低结合能的活性成分。小柴胡汤中柴胡、黄芩、人参、半夏、生姜、甘草药味已经包含在上述筛选中，本研究基于现有资料，对小柴胡汤与 COVID-19 出现的证候表征进行方证对应关系分析，运用网络药理学技术研究小柴胡汤中抗 SARS-CoV-2 的活性成分，分析方剂在

治疗 COVID-19 过程中的功效作用及机制，并对潜在的肝毒性进行探讨，为小柴胡汤临床安全应用提供数据支持。

1 方法

1.1 方证关系分析

查阅文献以及临床报道，总结小柴胡汤主要的临床应用和药理学研究，并且针对 COVID-19 出现的证候表征与小柴胡汤适应证进行方证关系分析，为后续功效分析奠定基础。

1.2 活性成分搜集

检索 PubMed、中国知网等数据库，下载与抗 SARS-CoV-2 中药活性成分筛选相关的文献，并将文献分析的药效成分进行整理。借助 TCMSP 数据库 (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>)、TCMID 数据库 (<http://www.megabionet.org/tcmid/>) 以小柴胡汤方中药味柴胡、黄芩、人参、半夏、甘草、生姜、大枣为关键词检索收集其化学成分，并且以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 为条件进行筛选。

1.3 潜在靶点预测

将“1.2”项收集到的小柴胡汤中活性成分输入 TCMSP 数据库获得化合物的预测蛋白靶点，并运用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将所有靶点名称校正为官方名称 (official gene symbol)。在 PubMed 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)、CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>) 和 OMIM 数据库 (<http://omim.org/>) 分别以“pneumonia”“regulates immune”为关键词获取肺

炎、免疫调节相关潜在靶点，合并 3 个数据库信息并保留唯一值。

1.4 作用网络构建与分析

首先将收集到的肺炎、免疫调节相关潜在靶点分别输入 STRING (<https://string-db.org/>) 网站获得蛋白-蛋白互作 (PPI) 网络；运用 Cytoscape 3.6.0 软件构建小柴胡汤-化学成分-作用靶点关系网络。然后运用 Cytoscape 软件中 Merge 功能分别将小柴胡汤-化学成分-作用靶点关系网络与肺炎、免疫调节潜在靶点 PPI 互作网络做交集处理，并且根据靶点度 (degree) 值的 2 倍中位数为条件进行关键作用网络的筛选，获得小柴胡汤-化学成分-肺炎关系网络、小柴胡汤-化学成分-免疫调节关系网络^[9]。最后运用 Cytoscape 3.6.0 软件中 Network Analyzer 功能进一步对上述关系网络进行分析，将方中成分、作用靶点以度值进行排序作图，分析方剂在治疗 COVID-19 过程中的作用；明确方中抗 SARS-CoV-2 的活性成分，并抽提出抗病毒成分作用网络进行分析。

1.5 关键靶点分析

运用 STRING (<https://string-db.org/>)、Cytoscape 3.6.0 软件中 ClueGO 插件将“1.4”项分析得到的关键基因进行基因共表达分析、通路富集分析。

2 结果

2.1 方证关系分析

小柴胡汤为张仲景所创，由柴胡、黄芩、人参、半夏、生姜、甘草、大枣 7 味中药组成，是和解少阳的经典名方，临幊上常被用来治疗肺系统、免疫系统等疾病^[10-11]。COVID-19 是 SARS-CoV-2 通过结合人体 ACE2 受体而引起的一种急性呼吸道传染病，主要临床表现为发热、干咳、乏力，中医认为其属于瘟疫范畴，基本病机特点为“湿、毒、瘀、闭”，病位在肺、大肠、脾、胃，从少阳半表半里，到胃和大肠阳明经均遭波及^[12]。

COVID-19 为湿毒所致，极易阻滞气机，致使肺气郁闭，出现胸闷喘促，气机不利，肺失宣肃，气机郁闭等症状，发病早期以邪热郁肺、枢机不利，邪热壅肺、肺失宣降两大证型为主^[13]。因此，及时化湿理气，调畅气机，防止湿邪闭阻气机形成疫毒闭肺，在疫情的防治中极为关键。针对邪热郁肺、枢机不利型的 COVID-19，小柴胡汤中君药柴胡透散湿热、调畅气机，黄芩清热燥湿，人参、半夏扶正益气，生姜、大枣护脾和胃，甘草生用既能清热解毒，又可调和诸药，诸药合用，共奏祛湿防疫之功。

据统计，COVID-19 患者最常见的症状是发热 (87.9%) 和咳嗽 (67.7%)，腹泻 (3.7%) 和呕吐 (5.0%) 较为少见，部分患者发热往往呈现持续反复波动的特点；《伤寒论》原文中记载“往来寒热，胸胁苦满，默默不欲饮食，心烦喜呕，或胸中烦而不呕，或渴，或腹中痛，或胁下痞硬，或心下悸、小便不利，或不渴、身有微热，或咳者，小柴胡汤主之”，患者出现的往来寒热以及胸闷、咳嗽、食欲不振、情绪低落等症状均符合小柴胡汤适应证^[14]。

2.2 活性成分确定

中药抗 SARS-CoV-2 活性成分共收集到 48 个。肖小河课题组^[5]在桑叶、甘草、金银花等 40 味中药 405 种候选成分中筛选出了抗病毒活性成分 46 个；Zhang 等^[6]筛选了 125 种潜在抗病毒中药，筛选出了抗病毒活性成分 13 个，并分析了这些成分主要来自连翘、甘草、柴胡等 26 味中药；李婧等^[7]在板蓝根、金银花、黄芩等 11 味中药 469 个候选成分中筛选出了抗病毒活性成分 41 个；宗阳等^[8]在达原饮中筛选出了抗病毒活性成分 5 个；具体活性成分及与蛋白结合自由能见表 1。小柴胡汤中活性成分共收集到 188 个，其中 10 个成分在多味药材中均含有，方中各味中药活性成分数量见表 2。

通过韦恩图（图 1）可以看到，小柴胡汤中共有黄芩素 (baicalein)、芒柄花素 (formononetin)、槲皮素 (quercetin) 等 12 个成分具有直接抗 SARS-CoV-2 活性。另外柴胡皂苷 a (saikosaponin a)、柴胡皂苷 b2 (saikosaponin b2)、柴胡皂苷 d (saikosaponin d)、甘草酸 (glycyrrhizic acid) OB 值或 DL 值低于筛选条件，鉴于这些成分具有潜在抗 SARS-CoV-2 活性，且以往报道具有抗病毒作用^[15-18]，所以也纳入了此次研究。

2.3 潜在靶点预测

在 TCMSP 数据库、TCMID 共得到小柴胡汤成分作用靶点 411 个，方中各味中药活性成分作用的靶标数量见表 2。

通过 PubMed 数据库、CTD 数据库和 DrugBank 数据库共获得肺炎潜在靶点 242 个，调节免疫潜在靶点 1 292 个。

2.4 作用网络构建与分析

通过 Cytoscape 3.6.0 软件构建了小柴胡汤治疗肺炎、调节免疫的作用网络，网络中节点的大小与度值呈正比关系，节点的度值越大，说明这个节点在网络中的作用越大。

2.4.1 治疗肺炎网络 小柴胡汤中槲皮素、山柰酚

表 1 中药抗 SARS-CoV-2 活性成分汇总

Table 1 Summary of active ingredients in Chinese medicines with anti-SARS-CoV-2 effect

序号	化合物名称	结合自由能/(kJ·mol ⁻¹)			
		ACE2	PLpro	3CLpro	Spike
1	albanol (桑呋喃)	—	/	/	/
2	keyptoxanthin (隐黄质)	—	/	/	/
3	saikosaponin E (柴胡皂苷 E)	/	/	-41.800	/
4	glycyrrhizin (甘草酸)	/	/	-38.874	/
5	saikosaponin B ₁ (柴胡皂苷 B ₁)	/	/	-38.874	/
6	saikosaponin D (柴胡皂苷 D)	/	/	-38.874	/
7	saikosaponin F (柴胡皂苷 F)	/	/	-38.874	/
8	6-(3-oxoindolin-2-ylidene) indolo [2,1-b]quinazolin-12-one	/	/	-38.456	/
9	saikosaponin B ₂ (柴胡皂苷 B ₂)	/	/	-38.456	/
10	ochnaflavone	/	/	-37.620	/
11	anthraglycoside A (蒽苷 A)	/	/	-36.784	/
12	rutin (芦丁)	/	/	-36.366	/
13	hyperin (金丝桃苷)	/	/	-36.366	/
14	isochlorogenic acid A (异绿原酸 A)	/	/	-36.366	/
15	veronicastroseide (忍冬苷)	/	/	-35.948	/
16	astragaloside IV (膜荚黄芪苷 IV)	/	/	-35.948	/
17	emodin-8-glucoside	/	/	-35.948	/
18	coptisine (黄连碱)	/	/	-35.948	/
19	linarin (蒙花苷)	/	/	-35.530	/
20	oleanolic acid (齐墩果酸)	/	/	-35.530	/
21	astragalin (黄芪苷)	/	/	-35.530	/
22	worenine (甲基黄连碱)	/	/	-35.530	/
23	saikosaponin A (柴胡皂苷 A)	/	/	-35.530	/
24	neohesperidin (新橙皮苷)	/	/	-35.112	/
25	all-trans-rhodoxanthin	/	/	-35.112	/
26	forsythiaside (连翘酯苷)	/	/	-35.112	/
27	isoquercitrin (异槲皮苷)	/	/	-35.112	/
28	palmidin A (甘油棕榈酸酯 A)	/	/	-35.112	/
29	cynaroside (木犀草苷)	/	/	-34.694	/
30	obacunone (黄柏酮)	/	/	-34.694	/
31	beta-carotene (β-胡萝卜素)	/	/	-34.276	/
32	forsythoside A (连翘酯苷 A)	/	/	-34.276	/
33	betulinic acid (桦木酸)	/	/	-4.300	/
34	courmaroyltyramine (香豆酰酪胺)	/	-3.22	-4.180	/
35	cryptotanshinone (隐丹参酮)	/	-5.25	-6.230	/
36	desmethoxyreserpine (去甲氧基利血平)	/	/	-3.520	/
37	dihomo-γ-linolenic acid (二高-γ-亚麻酸)	/	/	-3.880	/
38	dihydrotanshinone i (二氢丹参酮)	/	/	/	-5.16
39	kaempferol (山柰酚)	-32.22	-2.15	-6.010	/
40	lignan (木脂素)	/	/	-4.270	/
41	moupinamide (马兜铃酰胺)	/	-3.05	/	/
42	N-cis-feruloyltyramine (N-顺式阿魏酸)	/		-3.110	/
43	quercetin (槲皮素)	-26.36	-4.62	-6.250	/
44	sugiol (柳杉酚)	/	/	-6.040	/
45	tanshinone II _A (丹参酮 Iia)	/	-5.02	-5.170	/
46	7-methoxy-2-methyl-isoflavone	-30.54	/	/	/
47	formononetin (芒柄花素)	-29.71	/	/	/
48	baicalein (黄芩素)	-32.64	/	/	/

“—”为已对该蛋白进行分子对接但无法提取具体数值; “/”为尚未对该蛋白进行分子对接

“—” indicates that the protein has completed molecular docking, but data cannot be extracted; “/” indicates that the protein has not completed molecular docking

表 2 小柴胡汤“中药-成分-靶标”基本信息

Table 2 Information on Chinese medicine-ingredient-key target of XCHD

中药名称	成分数量	预测靶点数量
柴胡	17	215
黄芩	37	150
人参	21	255
半夏	12	97
生姜	7	66
大枣	26	249
甘草	93	287

(kaempferol)、黄芩素、 β -谷甾醇 (beta-sitosterol)、汉黄芩素 (wogonin)、异鼠李素 (isorhamnetin)、甘草酸、芒柄花素 (formononetin)、人参皂苷 Rh₂ (ginsenoside Rh₂)、 β -胡萝卜素 (beta-carotene) 等 111 个活性成分作用于 NOS2、IL6、TNF、STAT3、VEGFA、CXCL8、NOS3、MMP9、CCL2、ALB 等 55 个靶点发挥治疗肺炎的作用；其中槲皮素来自柴胡、大枣、甘草，山柰酚来自柴胡、人参、甘草，黄芩素来自黄芩，3 种活性成分分别调控 33、11、5 个靶点，见图 2。

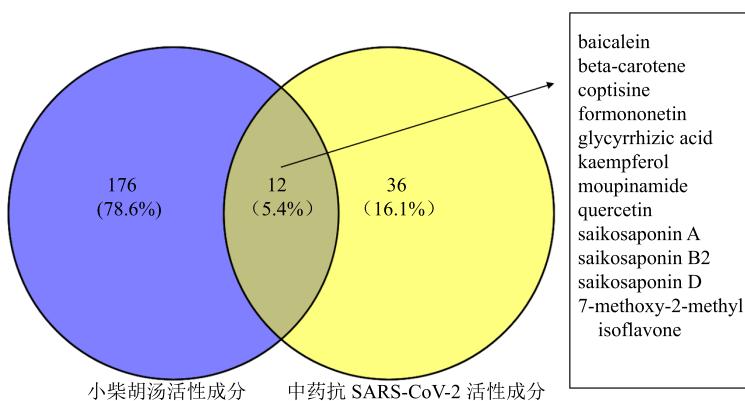


图 1 小柴胡汤活性成分与中药抗病毒活性成分 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of XCHD active ingredient and antiviral active ingredient of Chinese medicine

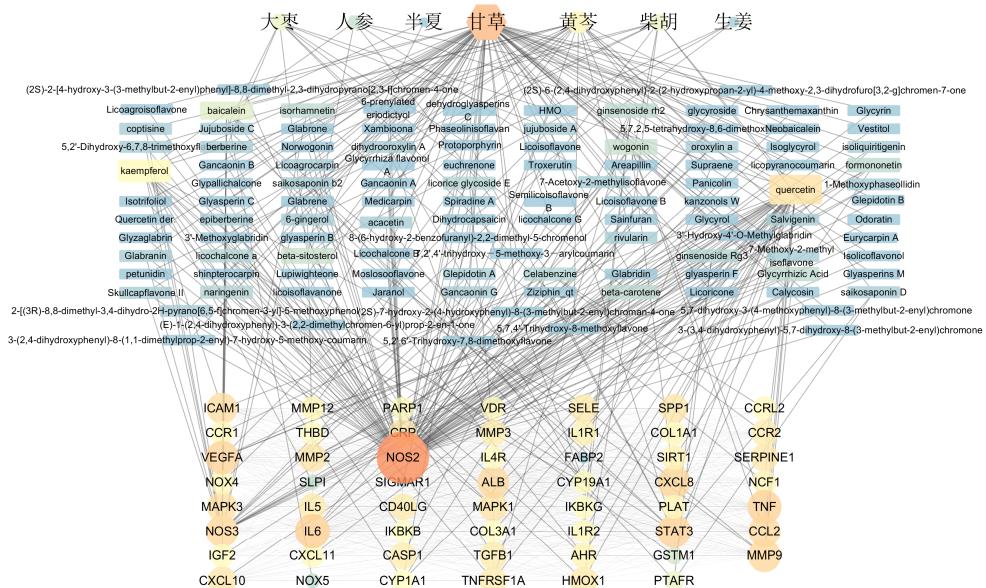


图 2 小柴胡汤治疗肺炎作用网络

Fig. 2 Network of XCHD in treatment of pneumonia

药理实验表明槲皮素、黄芩苷均可降低流感病毒感染小鼠死亡率和肺指数，同时可抑制病毒的复制，减轻肺部的炎症，保护流感病毒感染的小鼠肺

部功能^[19-20]。目前白细胞介素-6 (IL-6) 和 C 反应蛋白 (CRP) 已被用作肺炎患者的预后生物标志物，其表达水平越低代表患者预后越好^[21-22]。另有实验

表明 VEGF-A 水平升高可能与肺部炎症消退有关^[23]。基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 在社区获得性肺炎患者血清中的水平显著增加，在治疗后与健康者无差异，可作为诊断的一种血清标志物^[24]。

2.4.2 调节免疫网络 小柴胡汤中槲皮素、汉黄芩素、山柰酚、β-胡萝卜素、柚皮素 (naringenin)、异鼠李素、芒柄花素、甘草查耳酮 a (licochalcone a)、6-姜酚 (6-gingerol)、β-谷甾醇等 134 个成分通过 ESR1、PPARG、MAPK14、GSK3B、STAT3、JUN、AKT1、VEGFA、CASP3 等 73 个靶点调节人体免疫功能；槲皮素作用靶点 51 个，为方中最多，汉黄芩素 17 个次之，随后为山柰酚 16 个，见图 3。

实验研究表明槲皮素可以显著增强环磷酰胺造成的免疫低下小鼠的免疫功能^[25]，汉黄芩素可通过增加免疫细胞的浸润、调节免疫细胞的表型以及促进相关细胞因子的分泌来增强免疫功能^[26]。p38 (MAPK14) 信号通路在先天性和适应性免疫反应中的作用已被证实，特别是在树突状细胞 (DC) 产生炎性细胞因子方面^[27-28]。巨噬细胞被激活，引发先天免疫反应，Akt 途径会收敛炎症和代谢信号，从而调节巨噬细胞反应，从而调节其激活表型^[29]。FOXO 通过负调节基质细胞中免疫抑制蛋白和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达来促进抗肿瘤活性，这可以在细胞微环境中形成免疫耐受状态^[30]。

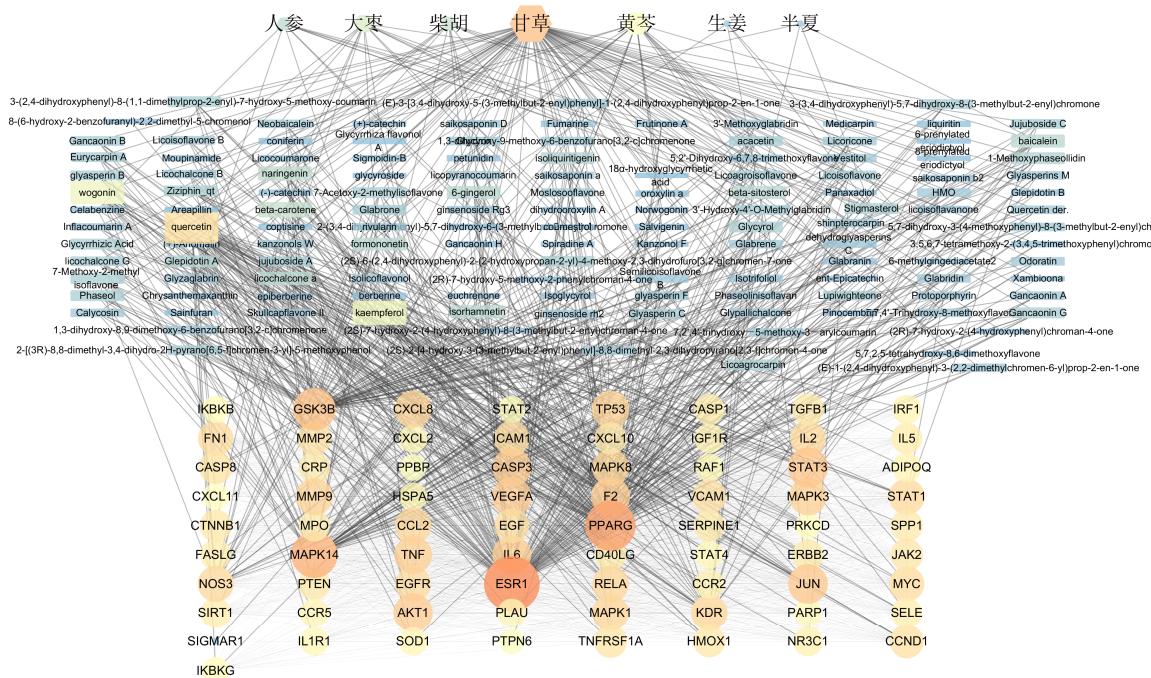


图 3 小柴胡汤调节免疫作用网络
Fig. 3 Network of immune regulation of XCHD

2.4.3 抗 SARS-CoV-2 活性成分网络 在小柴胡汤治疗肺炎和调节免疫网络中，将具有抗 SARS-CoV-2 的活性成分相关的作用网络抽提出来进行进一步分析。在治疗肺炎网络中有来自 6 味中药的 10 个活性成分与 44 个靶点相互作用，见图 4；在调节免疫网络中有来自 6 味中药的 12 个活性成分与 63 个靶点相互作用，见图 5。目前通过对已有报道的抗病毒活性成分筛选小柴胡汤药效成分，可看到小柴胡汤 7 味中药中，除生姜外都具有抗 SARS-CoV-2 的活性成分，君药柴胡和佐使药甘草

都含有 5 个，其次为黄芩和大枣各含有 3 个，这表明小柴胡汤具有极大的抗 SARS-CoV-2 潜力。

抽提出来的治疗肺炎网络活性成分由原来的 111 个减少到 10 个，免疫调节网络则由 134 个减少到 12 个，2 个网络在活性成分的数量上均减少了 90% 左右，但可以看到，网络中作用靶点并没有减少太多，这进一步说明了小柴胡汤中的这 12 个成分不仅具有抗 SARS-CoV-2 的活性，而且在治疗肺炎和调节人体免疫方面同样具有良好的作用，佐证了小柴胡汤被推荐为此次 COVID-19 的预防治疗处方的正确性。

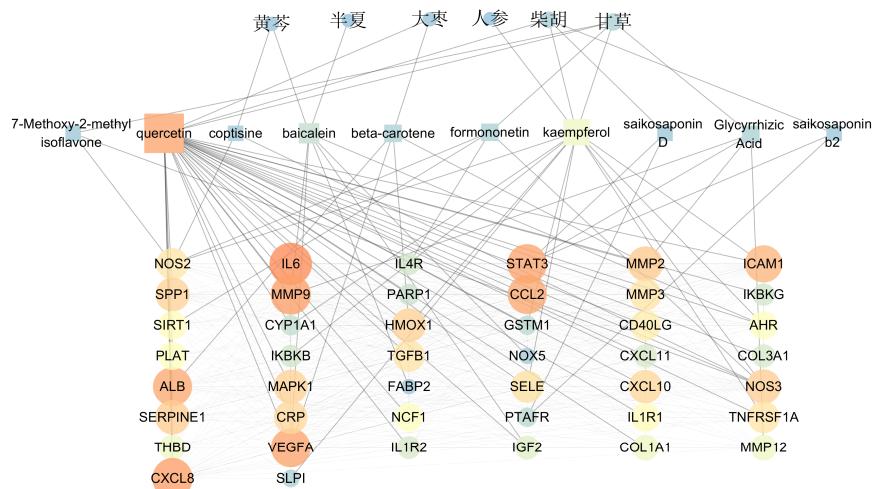


图 4 抗 SARS-CoV-2 活性成分治疗肺炎网络

Fig. 4 Network of anti-SARS-CoV-2 active ingredients for pneumonia

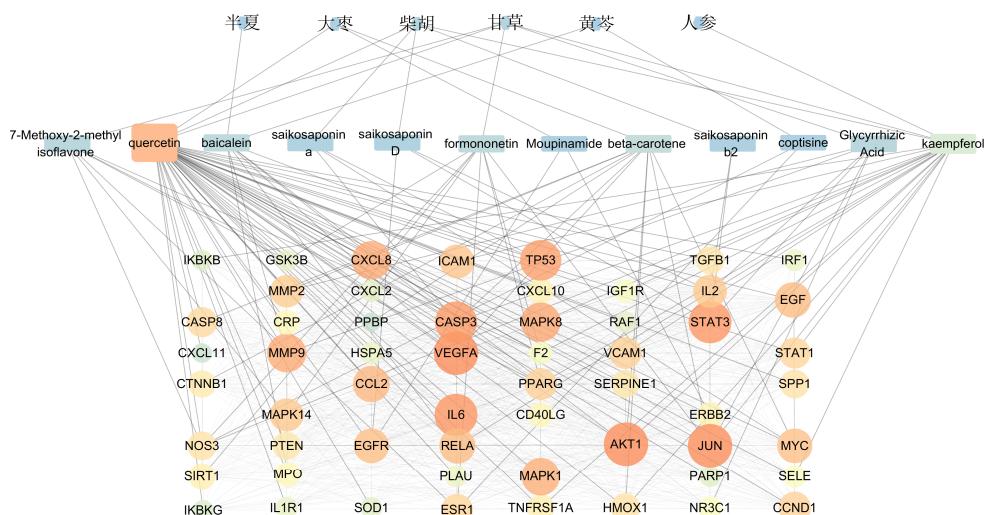


图 5 抗 SARS-CoV-2 活性成分调节免疫网络

Fig. 5 Network of anti-SARS-CoV-2 active ingredients for immune regulation

2.5 关键靶标分析

由于 STRING 软件的限制, 将小柴胡汤治疗肺炎和调节免疫各自度值排名前 20 位的基因与 ACE2 进行基因共表达分析。结果显示, ACE2 仅与 NOS2 具有共表达, 并且在 PPI 互作网络中也仅与 MAPK3、IL-6、NOS3 等 5 个靶点有相互作用关系, 见图 6。ACE2 作为 SARS-CoV-2 的重要受体^[31], 在病毒入侵人体的过程中起到重要作用, 但其在病毒感染后的肺炎治疗中可能作用甚微。

通路富集分析显示小柴胡汤在治疗 COVID-19 过程中主要涉及 TNF 信号通路 (TNF signaling

pathway)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、癌症通路 (pathways in cancer)、甲型流感 (Influenza A)、卡波济肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection) 等多条信号通路, 见图 7。

COVID-19 患者出现多脏器损伤, 其可能的机制是 SARS-CoV-2 结合 ACE2, 使人体细胞中 ACE2 与 CAE 表达失衡, Ang-(1-7) 水平下降, 而 Ang II 表达升高, 进而引发炎症瀑布反应, 造成肺炎、心力衰竭等多脏器损伤^[32]。而调节 NF-κB/MAPK 信号通路, 可以减轻肺组织的炎症^[33-34]。王婷婷等^[35]

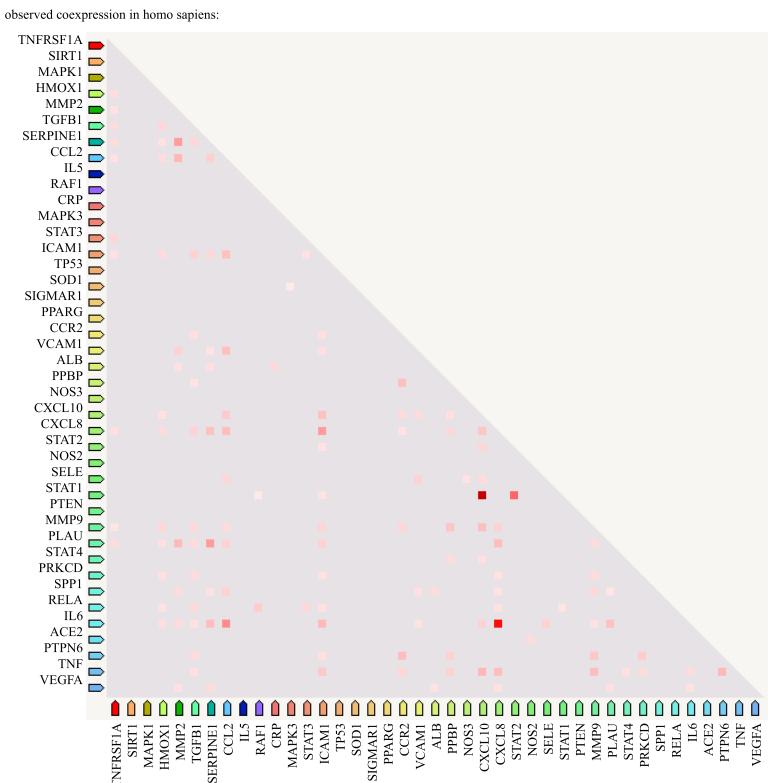


图 6 ACE2 与小柴胡汤治疗 COVID-19 关键靶点的共表达情况

Fig. 6 Co-expression of ACE2 and key targets of XCHD in treatment of COVID-19

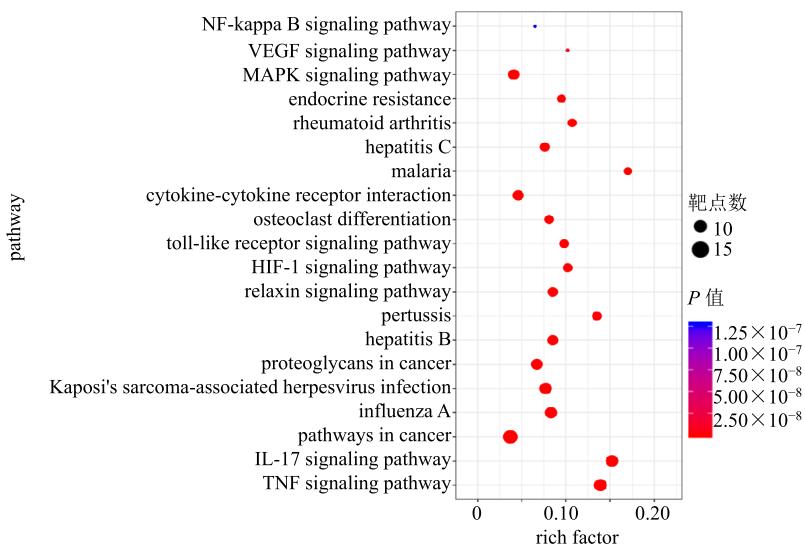


图 7 小柴胡汤治疗 COVID-19 关键靶点 pathway 分析

Fig. 7 Pathway analysis of key targets of XCHD in treatment of COVID-19

通过实验发现槲皮素抑制金黄色葡萄球菌肺炎小鼠炎症反应可能与其抑制 IKK/NF- κ B/I κ B 炎症信号通路有关。汉黄芩素则通过抑制 TLR7 介导的 MyD88 依赖性信号通路，抑制了 NF- κ B p65 的核转位及表达，从而减轻病毒感染后的炎症反应^[36]。

3 讨论

小柴胡汤出自《伤寒论》，由柴胡、黄芩、人参、半夏、生姜、甘草、大枣 7 味中药组成，为和解少阳的经典名方，具有和解表里的功效。COVID-19 是 SARS-CoV-2 通过结合人体 ACE2^[37]、TMPRSS2、

AAK1^[38]等蛋白而引起的一种急性呼吸道传染病。目前认为，重症肺炎的产生并非是病毒本身，而是由于病毒诱发了机体产生失调的、过度的免疫应答，从而引起患者体内炎症因子过度表达而出现“细胞因子风暴”，这是造成肺炎及急性肺损伤的一个重要的原因；抑制体内 TNF-α 表达，促进抗炎因子 IL-10 分泌，进而减轻过度免疫激活导致的肺部组织损伤，并可以部分降低病死率^[39-40]。现代药理学研究表明小柴胡汤对免疫系统具有良好的调节作用，能够调节淋巴细胞、NK 细胞、巨噬细胞以及相关免疫因子^[41]。

以中医理论为指导，基于网络药理学对小柴胡汤治疗 COVID-19 进行了深入分析，结果发现小柴胡汤中有 12 种抗 SARS-CoV-2 的活性成分，其中黄芩素、7-甲氧基-2-甲基异黄酮、芒柄花素通过结合人体 ACE2 受体阻断病毒的入侵，柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 B2、柴胡皂苷 D、甘草酸、β-胡萝卜素、黄连碱通过结合病毒 3CLPro 蛋白抑制病毒的复制，马兜铃酰胺通过结合病毒 PLpro 蛋白抑制病毒的复制，而槲皮素、山柰酚对这 3 个蛋白都有结合能力，这表明了小柴胡汤具有抗 SARS-CoV-2 的作用。网络分析发现，在病毒感染后的肺炎治疗中，小柴胡汤中 111 个活性成分作用于 NOS2、IL6、TNF 等 55 个靶点直接发挥治疗肺炎的作用，134 个成分通过 ESR1、PPARG、MAPK14 等 73 个靶点调节人体免疫功能以扶正祛邪。进一步分析了方中 12 个抗 SARS-CoV-2 活性成分在治疗肺炎和调节免疫的能力，发现这 12 个活性成分几乎可以调控肺炎网络和免疫网络中的所有靶点。这说明了小柴胡汤在治疗 COVID-19 具有巨大的潜力。基因共表达和 PPI 互相作用分析结果表明，ACE2 与 COVID-19 治疗相关的靶点关系并不密切，所以推测 ACE2 受体仅在病毒入侵人体的过程中起到重要作用，而在病毒感染后的肺炎治疗中可能作用甚微，所以针对 ACE2 靶点设计药物可阻断病毒入侵，但对肺泡内炎症等病变可能疗效不佳，提示临床应坚持中西医并重，多方面联合治疗。

李晓骄阳等^[42]分析了目前临床用于治疗 COVID-19 常用药物的肝损伤作用情况，包括洛匹那韦/利托那韦、α-干扰素、利巴韦林等化学药和柴胡、半夏、附子等中药都能造成一定程度的肝损伤，警示在 COVID-19 的治疗过程中注重合理用药，最大程度地减少肝损伤的发生。刘静等^[43]运用网络药

理学方法整体分析了小柴胡汤导致肝损伤的机制，与 Ras/Raf/MEK/ERK 等信号传导途径密切相关。另外值得注意的是在“日本小柴胡”事件中，由于不辨证候、长期大剂量的服用小柴胡颗粒而导致了间质性肺炎的发生^[44]，而此次小柴胡汤被用于治疗 COVID-19 应当注意辨证论治、合理应用，一是避免产生不良反应，二是避免加重病情出现细胞因子损伤。

本研究运用网络药理学方法对小柴胡汤治疗 COVID-19 进行了分析，预测的活性成分以及作用靶点仍需进一步体内外实验验证。另外药材炮制导致的成分变化、体内代谢导致的成分转化以及成分的量效关系等问题是网络药理学现在的短板和亟待发展的地方，例如药材不同炮制品的成分应当加以区分，并且这也是相对容易实现的，各大数据库应当积极改进。

参考文献

- Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 507-513.
- 徐旭, 张莹, 李新, 等. 各地区中医药预防新型冠状病毒(COVID-19)肺炎方案分析 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 866-872.
- 于明坤, 柴倩云, 梁昌昊, 等. 新型冠状病毒肺炎中医预防及诊疗方案汇总分析 [J]. 中医杂志, 2020, 61(05): 383-387.
- 李琳, 杨丰文, 高树明, 等. 张伯礼: 防控疫情, 中医从参与者变成主力军 [J/OL]. 天津中医药大学学报, [2020-03-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1391.R.20200218.1136.004.html>.
- 牛明, 王睿林, 王仲霞, 等. 基于临床经验和分子对接技术的抗新型冠状病毒中医组方快速筛选模式及应用 [J/OL]. 中国中药杂志, [2020-03-11]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20200206.501>.
- Zhang D H, Wu K L, Zhang X, et al. In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus [J]. *J Integr Med*, 2020. doi: 10.1016/j.joim.2020.02.005.
- 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]. 中草药, 2020, 51(4): 845-850.
- 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(2019-nCoV)肺炎活性化合物的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(4):

- 836-844.
- [9] 孙凯滨, 李晓宇, 张新雨, 等. 大柴胡汤治疗肝郁气滞型胰腺炎功效物质基础与作用机制网络研究 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5125-5134.
- [10] 谢纬, 熊广, 曲敬来. 曲敬来运用小柴胡汤加减治疗肺系疾病经验 [J]. 河南中医, 2019, 39(1): 31-35.
- [11] 张莹, 周小莉. 小柴胡汤对机体免疫系统的影响及临床应用 [J]. 中医药导报, 2016, 22(8): 116-118.
- [12] 南征, 王檀, 仕丽, 等. 吉林省新型冠状病毒肺炎中医诊治思路与方法 [J]. 吉林中医药, 2020, 40(2): 141-144.
- [13] 宇凤, 李晶, 马菡. 浅谈新型冠状病毒肺炎 [J/OL]. 中医学报, [2020-03-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.r.20200218.2344.002.html>.
- [14] 黄煌. 基于经方医学对新型冠状病毒肺炎的思考 [J/OL]. 南京中医药大学学报, [2020-03-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1247.R.20200216.2006.002.html>.
- [15] Chen J, Duan M, Zhao Y, et al. Saikosaponin A inhibits influenza A virus replication and lung immunopathology [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(40): 42541-42556.
- [16] Lin L T, Chung C Y, Hsu W C, et al. Saikosaponin b2 is a naturally occurring terpenoid that efficiently inhibits hepatitis C virus entry [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(3): 541-548.
- [17] Ushio Y, Abe H. Inactivation of measles virus and herpes simplex virus by saikosaponin d [J]. *Planta Med*, 1992, 58(2): 171-173.
- [18] 陈秀秀, 周红霞, 亓文宝, 等. 甘草酸联合利巴韦林体内抗甲型 H1N1 流感病毒作用 [J]. 药学学报, 2015, 50(8): 966-972.
- [19] 吴修华, 刘妮, 杨丽, 等. 黄芩素体内抗甲型流感病毒作用的研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 157-159.
- [20] 徐培平, 符林春, 张奉学, 等. 槲皮素抗流感病毒作用研究 [J]. 热带病与寄生虫学, 2010, 8(2): 66-68.
- [21] Miroliaee A E, Salamzadeh J, Shokouhi S, et al. The study of vitamin D administration effect on CRP and interleukin-6 as prognostic biomarkers of ventilator associated pneumonia [J]. *J Crit Care*, 2018, doi: 10.1016/j.jcrc.2017.08.040.
- [22] 薛李. 头孢哌酮舒巴坦在老年性肺炎患者中的疗效及对血清 CRP、ALB、PCT、MIF、D-D 的影响研究 [J]. 四川医学, 2013, 34(10): 1571-1572.
- [23] Strouvalis I, Routsi C, Adamopoulou M, et al. Early increase of VEGF-A is associated with resolution of ventilator-associated pneumonia: Clinical and experimental evidence [J]. *Respirology*, 2018, 23(10): 942-949.
- [24] 张永标, 刘小云, 符永珍, 等. 社区获得性肺炎患者血清 MMP-9 水平的变化与意义 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(19): 2824-2826.
- [25] 李莉, 司松波. 槲皮素对小鼠动情周期及免疫功能的调节作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(12): 1092-1095.
- [26] 肖炜明, 卜平, 龚卫娟. 汉黄芩素抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3004-3009.
- [27] Zhou Y, Wu J, Liu C, et al. p38alpha has an important role in antigen cross-presentation by dendritic cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(3): 246-259.
- [28] Lo U, Selvaraj V, Plane J M, et al. p38alpha (MAPK14) critically regulates the immunological response and the production of specific cytokines and chemokines in astrocytes [J]. *Sci Rep*, 2014, doi: 10.1038/srep07405.
- [29] Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, et al. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization [J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1006-1014.
- [30] Deng Y, Wang F, Hughes T, et al. FOXOs in cancer immunity: Knowns and unknowns [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, doi: 10.1016/j.semcan.2018.01.005.
- [31] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
- [32] 张岩, 唐德志, 舒冰, 等. 基于肾素-血管紧张素系统评析新冠病毒致多脏器损伤作用及中药干预作用 [J/OL]. 世界科学技术—中医药现代化, [2020-03-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5699.R.20200216.1533.002.html>.
- [33] Zhang Y, Zhou S, Zhou J, et al. Regulation of NF-kappaB/MAPK signaling pathway attenuates the acute lung inflammation in Klebsiella pneumonia rats by mollugin treatment [J]. *Microb Pathog*, 2019, doi: 10.1016/j.micpath.2019.05.007.
- [34] Dai J, Gu L, Su Y, et al. Inhibition of curcumin on influenza A virus infection and influenza pneumonia via oxidative stress, TLR2/4, p38/JNK MAPK and NF-kappaB pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, doi: 10.1016/j.intimp.2017.11.009.
- [35] 王婷婷, 冷承浩, 郭昆鹏, 等. 槲皮素对小鼠金黄色葡萄球菌肺炎的防治作用及 IKK/NF-κB/IκB 信号通路机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(4): 53-57.
- [36] 吴莹, 金叶智, 张舒, 等. 汉黄芩素对流感病毒感染肺泡巨噬细胞 NF-κB 核转位及表达的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 161-165.
- [37] Shi Z L, Zhou P, Yang X L, et al. Discovery of a novel

- coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin [J]. *BioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.01.22.914952.
- [38] 邓卫宁, 王利娜, 崔艳丽. 抗新型冠状病毒肺炎药物靶点的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 401-404.
- [39] 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.
- [40] 李红蓉, 常丽萍, 魏 聰, 等. 连花清瘟治疗新型冠状病毒肺炎的理论研究基础和临床疗效 [J/OL]. 世界中医药, [2020-03-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5529.R.20200309.1642.036.html>.
- [41] 张 莹, 周小莉. 小柴胡汤对机体免疫系统的影响及临床应用 [J]. 中医药导报, 2016, 22(8): 116-118.
- [42] 李晓骄阳, 李雅静, 葛俊德, 等. 注重新型冠状病毒肺炎(COVID-19)治疗中药物性肝损伤的预警与保护 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 851-859.
- [43] 刘 静, 李晓宇, 吴恺怿, 等. 小柴胡汤治疗肝炎时出现肝损伤的“效-毒”作用网络分析与机制预测 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5135-5144.
- [44] 岩崎学, 傅延龄. 用中医理论分析日本运用小柴胡汤导致的间质性肺炎 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(12): 1149-1151.