

基于网络药理学和分子对接探讨痰热清注射液治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的机制

孔 艺, 吴红卫, 陈 永, 赖 莎, 杨泽民*, 陈吉生*

广东药科大学附属第一医院 药学部, 广东 广州 510080

摘要: **目的** 采用网络药理学和分子对接研究痰热清注射液治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在作用机制, 为临床治疗提供理论依据。 **方法** 通过文献检索, 并结合 TCMSP 和 BATMAN-TCM 数据库筛选痰热清注射液的化学成分及其对应的作用靶点。在 Genecards 数据库中以 “coronavirus” 为关键词搜索冠状病毒相关靶点, 与痰热清注射液靶点映射筛选出共同靶点作为研究靶点, 采用 Cytoscape 3.2.1 软件构建活性成分-靶点网络图。将共同靶点导入 STRING 数据库中构建蛋白质-蛋白质相互作用网络图。结合上述 2 个网络图筛选出痰热清注射液的核心靶点。通过 Cytoscape 3.2.1 的插件 “ClueGO 2.5.5” 进行 GO 生物学过程和 KEGG 信号通路富集分析。 **结果** 筛选得到痰热清注射液 54 个类药性良好的活性成分, 对应靶点 287 个。其中共同靶点 54 个, 关键靶点 34 个。GO 富集分析得出与痰热清注射液治疗作用有关的生物过程 29 个。KEGG 富集分析得到与痰热清注射液治疗作用相关的信号通路 70 条。分子对接结果显示山柰酚、槲皮素、黄芩素、木犀草素和汉黄芩素与新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 3CL 水解酶具有较好的亲和力。 **结论** 痰热清注射液的核心化合物可通过与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶结合发挥抗病毒作用, 其分子机制揭示中药多组分、多靶点和多通路的特点, 为进一步阐明痰热清注射液治疗 COVID-19 的作用机制提供重要的科学依据。

关键词: 痰热清注射液; 新型冠状病毒肺炎; 网络药理学; 分子对接; 作用机制; 山柰酚; 槲皮素; 黄芩素; 木犀草素; 汉黄芩素; SARS-CoV-2 3CL 水解酶; 抗病毒; 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)07-1785-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.012

Mechanism of Tanreqing Injection on treatment of coronavirus disease 2019 based on network pharmacology and molecular docking

KONG Yi, WU Hong-wei, CHEN Yong, LAI Sha, YANG Ze-min, CHEN Ji-sheng

Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To study the mechanism of Tanreqing Injection (TRQI) on treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) through network pharmacology and molecular docking, so as to provide theoretical basis for clinical treatment. **Methods** The active compounds of TRQI were searched by literature, BATMAN-TCM, and TCMSP database. The potential targets of TRQI active compounds were searched by TCMSP. In Genecards database, “coronavirus” was used as the key word to search for coronavirus targets and the common targets were selected by mapping with TRQI. The network between the active compounds and common targets was established by Cytoscape 3.2.1. The common targets were imported into a STRING database for protein-protein interaction analysis, and the target protein interaction network diagram (PPI) was constructed. The key antiviral targets of TRQI were screened by combining two networks. “ClueGO 2.5.5” plug-in unit in Cytoscape 3.2.1 was used to perform GO biological process and KEGG pathway enrichment analysis. **Results** A total of 54 components of TRQI were obtained and corresponding to 287 targets. Among them, there were 54 common targets and 34 key targets. GO analysis obtained 29 biological processes related to the treatment effect of TRQI, and KEGG analysis obtained 70 pathways. The results of molecular docking showed that kaempferol, quercetin, baicalin, luteolin, and wogonin had good affinity with SARS-CoV-2 3CL hydrolase. **Conclusion** The active compounds in TRQI may act as an

收稿日期: 2020-02-27

基金项目: 广东省中医药科学技术研究项目 (20191202)

作者简介: 孔 艺, 博士, 研究方向为抗肿瘤药理及临床合理用药。Tel: (020)61321787 E-mail: kongyijk@126.com

*通信作者 杨泽民, 主任药师。Tel: (020)61327157 E-mail: gyyangzemin@126.com

陈吉生, 主任药师, 研究方向为临床药学与药事管理。Tel: (020)87622305 E-mail: cjslym@163.com

antiviral agent by binding SARS-CoV-2 3CL hydrolase and regulating multiple signaling pathways. The molecular mechanism of TRQI in the treatment of COVID-19 indicated the synergistic features of multi-component, multi-target, and multi-pathway of traditional Chinese medicine, which provided an important scientific basis for further elucidating the mechanism of TRQI in the treatment of COVID-19.

Key words: Tanreqing Injection; coronavirus disease 2019; network pharmacology; molecular docking; mechanism; kaempferol; quercetin; baicalein; luteolin; wogonin; SARS-CoV-2 3CL hydrolase; anti-virus; signaling pathway

2019 年 12 月底我国湖北省爆发了由新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 引起的新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19)。其具有传播迅速广泛、传染性强、各类人群普遍易感的特点, 轻症患者出现发热、乏力、干咳等症状, 严重者可出现呼吸困难、呼吸窘迫综合征或脓毒症休克等, 临床尚无针对性的特效药物^[1-3]。

截至 2020 年 3 月 13 日, 国家卫生健康委员会先后发布了 7 版《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案 (试行)》, 将痰热清注射液纳入治疗重型 (气营两燔证) 和危重型 (内闭外脱证) COVID-19 方案中^[4]。痰热清注射液属国家二类新药, 由黄芩、熊胆粉、山羊角、金银花和连翘 5 味中药组成, 具有清热解毒、止咳化痰的功效, 临床主要用于治疗肺炎早期、急性支气管炎、慢性支气管急性发作及上呼吸道感染等疾病^[5-6]。截至 2020 年 3 月 13 日, 中国临床试验注册中心批准了《大剂量痰热清注射液治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 真实世界临床研究》 (注册号 ChiCTR2000029432) 和《痰热清胶囊治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 临床试验》 (注册号 ChiCTR2000029813) 2 项临床试验, 以评价痰热清注射液治疗 COVID-19 有效性及安全性。

冠状病毒的 3CL 水解酶 (也称 main proteinase, Mpro) 通过对 pp1a (相对分子质量 486 000) 和 pp1ab (相对分子质量 790 000) 2 种多聚蛋白复制酶泛水解, 在介导病毒复制和转录功能中发挥关键作用, 是治疗 SARS 和其他冠状病毒的理想靶点^[7-8]。饶子和/杨海涛课题组公布了 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的高分辨率晶体结构, 该水解酶与 SARS 病毒的 Mpro 具有高度的氨基酸序列同源性 (96%)^[9]。由于 SARS-CoV-2 3CL 水解酶可将多聚蛋白水解为具有复制和转录功能的成熟蛋白, 因此寻找具有抑制 SARS-CoV-2 3CL 水解酶功能的小分子化合物, 对减少病毒复制从而产生抗病毒作用至关重要。

中药网络药理学是一门新兴学科, 运用网络科学、生物信息学、计算机科学和数学等多个学科知识与方法构建“疾病-表型-基因-药物”多层次网络,

从整体角度阐释药物与疾病的关联性, 具有较强的整体性和系统性, 与中医学整体观和辨证论治的原则相一致^[10-14]。本研究通过网络药理学分析痰热清注射液有效成分、预测潜在靶点、作用通路及生物过程等信息, 并采用分子对接方法预测有效成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的结合能力, 从分子层面阐释治疗 COVID-19 机制, 为痰热清注射液推广应用提供理论依据。

1 方法

1.1 活性成分和靶蛋白筛选

通过中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP, <http://tcmispw.com/tcmisp.php>) 检索黄芩、金银花、连翘的化学成分, 检索国内外文献和 BATMAN-TCM (A Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechanism of Traditional Chinese Medicine) 数据库查找熊胆粉和山羊角的化学成分。以相对分子质量 (molecular weight, MW) ≤ 500 、类药性 (drug like index, DL) ≥ 0.18 和药物半衰期 (half life, HL) ≥ 4 作为条件, 筛选较高活性的化合物。然后在 TCMSP 数据库获取化合物对应的靶点蛋白, 同时使用蛋白质数据库 UniProt (<http://www.uniprot.org/uploadlists/>) 转换为统一基因名称。

1.2 痰热清注射液成分-靶点网络构建

把痰热清注射液的活性成分及其相应靶点导入 Cytoscape 3.2.1 中, 构建痰热清注射液成分-靶点网络图, 导出其相关的拓扑数据如度值、介数等, 并运用“Network Analyzer”功能分析其拓扑学属性。度值和介数是评价一个节点在网络中比重的重要拓扑学参数。度值 (degree) 可反映网络中某节点与其他节点的链接数目, 介数反映了网络中所有最短的路径中经过该节点的路径的数目与最短路径总数的比值。

1.3 冠状病毒相关靶点搜集

Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 是一个可提供基因组、蛋白质组、转录、遗传及功能

上所有已知人类基因的平台^[15]。首先以“coronavirus”为关键词，搜集冠状病毒相关的靶点信息。将在 Genecards 数据库中检索得到的冠状病毒靶点与痰热清注射液的靶点在 Venny 2.1.0 中映射筛选出共同靶点。接着将其作为痰热清注射液的抗病毒靶点导入 Cytoscape 3.2.1 中构建化合物-抗病毒靶点网络，最后运用“Network Analyzer”功能分析其拓扑属性。

1.4 构建靶点相互作用网络

为明确痰热清注射液的潜在抗冠状病毒靶点及靶点之间的相互作用，将筛选出的靶点导入 STRING 网络平台 (<https://string-db.org/>) 中构建靶点相互作用网络图 (protein-protein interaction, PPI)。把蛋白种类设置为“Homo sapiens”，将评分条件 (置信度) 设定 > 0.9，采用“Cytohubba”插件对度值进行分析，确定痰热清注射液的核心抗冠状病毒靶点。

1.5 KEGG 信号通路和 GO 生物过程富集分析

利用 Cytoscape 中的“ClueGO 2.5.5”插件对“1.2”和“1.4”项中得到的痰热清注射液核心靶点进行 GO 生物过程和 KEGG 信号通路富集分析。GO 富集可了解靶点主要的作用过程，KEGG 通路通过观察靶点在通路中的分布情况，可进一步了解该靶点在代谢、信号转导等通路中的作用。以 $P < 0.05$ 进行靶基因筛选，得到痰热清注射液发挥抗病毒药理作用参与的生物过程及主要信号通路。

1.6 分子对接

在 Pubchem 数据库搜索药物小分子 CAS 号，

下载 3D 结构的药物小分子并用 Chem3D pro 使其能量最小化，然后保存为 mol2 格式。从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 SARS-CoV-2 的靶点蛋白 3CL 水解酶 6LU7 的 3D 结构 (PDB 格式)，用 PyMOL 软件对蛋白水解酶进行去水、除去活性中心的原配体，利用 AutoDock 软件将靶蛋白加氢并将格式转换为 pdbqt 格式，同时设置药物小分子旋转键后保存为 pdbqt 格式；盒子参数为 7.2、7.2、7.0 nm，space 参数为 0.375，盒子中心坐标 (-17.329, 15.988, 67.414) 设在活性中心附近，最后运行 autodock 进行对接，Lamarckian GA (4.2) 算法搜索 100 个构象，最后取能量最低的构象为最优构象。结合能小于 0 说明配体与受体可以自发结合，本研究选取结合能 ≤ -5.0 kJ/mol^[16] 作为筛选依据。

2 结果

2.1 痰热清注射液候选化合物和对应人类靶点筛选结果

通过检索国内外文献报道^[5,17-21]，并结合 BATMAN-TCM 和 TCMSP 数据库，根据其 MW、DL 和 HL 值筛选出候选化合物 54 个 (表 1)，其中黄芩化合物 32 个；熊胆粉化合物 1 个；山羊角化合物 5 个，主要是氨基酸类，虽然 DL 值小于 0.18，但作为主要成分仍被保留；金银花化合物 14 个；连翘化合物 10 个。黄芩和金银花共有 2 个化合物，黄芩和连翘共有 1 个化合物，金银花和连翘共有 3 个化合物，黄芩、金银花和连翘共有 1 个化合物。54 个候选化合物中，有 48 个候选化合物可在 TCMSP

表 1 痰热清注射液有效成分

Table 1 Effective chemical constituents of TRQI

分子 ID	化学名称	MW	DL	HL	来源中药
M228	(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	270.30	0.20	17.02	黄芩
M359	sitosterol	414.79	0.75	5.37	黄芩
M525	norwogonin	270.25	0.21	16.93	黄芩
M552	5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	344.34	0.35	16.47	黄芩
M1458	coptisine	320.34	0.86	9.33	黄芩
M1689	acacetin	284.28	0.24	17.25	黄芩
M2714	baicalein	270.25	0.21	16.25	黄芩
M2897	epiberberine	336.39	0.78	6.10	黄芩
M2908	5,8,2'-trihydroxy-7-methoxyflavone	300.28	0.27	16.17	黄芩
M2909	5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	376.34	0.45	15.94	黄芩
M2910	carthamidin	288.27	0.24	15.81	黄芩
M2911	2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone	302.30	0.22	21.89	黄芩
M2913	dihydrobaicalin_qt	272.27	0.21	16.13	黄芩
M2915	salvigenin	328.34	0.33	15.87	黄芩

续表 1

分子 ID	化学名称	MW	DL	HL	来源中药
M2917	5,2',6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	330.31	0.33	16.37	黄芩
M2925	5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone	286.25	0.24	18.00	黄芩
M2926	dihydrooroxylin A	286.30	0.23	17.58	黄芩
M2927	skullcapflavone II	374.37	0.44	16.14	黄芩
M2928	oroxylin A	284.28	0.23	17.15	黄芩
M2932	panicolin	314.31	0.29	16.78	黄芩
M2933	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone	300.28	0.27	16.93	黄芩
M2934	neobaicalein	374.37	0.44	16.50	黄芩
M2937	dihydrooroxylin	286.30	0.23	17.17	黄芩
M8206	moslosooflavone	298.31	0.25	17.02	黄芩
M10415	11,13-eicosadienoic acid, methyl ester	322.59	0.23	5.44	黄芩
M12245	5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	302.30	0.27	16.12	黄芩
M12246	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	302.30	0.26	16.85	黄芩
M12266	rivularin	344.34	0.37	16.25	黄芩
M8845	deoxycholic acid	392.64	0.68	7.01	熊胆粉
M3969	<i>L</i> -serin	105.11	0.01	11.52	山羊角
M3971	threonin	119.14	0.01	11.42	山羊角
M2321	pyroglutamic acid	129.13	0.02	11.35	山羊角
M5448	leucinum	131.20	0.01	11.41	山羊角
M41	phenylalanine	165.21	0.04	4.62	山羊角
M1494	mandenol	308.56	0.19	5.39	金银花
M1495	ethyl linolenate	306.54	0.20	6.20	金银花
M3006	(-)-(3 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,9 <i>aS</i> ,10 <i>aS</i>)-9-ethenyl-8-(beta- <i>D</i> -glucopyranosyloxy)-2,3,9,9 <i>a</i> ,10,10 <i>a</i> -hexahydro-5-oxo-5 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -pyrano[4,3- <i>d</i>]oxazolo[3,2- <i>a</i>]pyridine-3-carboxylic acid_qt	281.29	0.23	5.50	金银花
M3036	ZINC03978781	412.77	0.76	5.79	金银花
M3044	chryseriol	300.28	0.27	16.31	金银花
M3095	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) chromone	358.37	0.41	15.98	金银花
M3111	centauroside_qt	434.48	0.50	5.18	金银花
M3124	xylostosidine	415.51	0.64	9.15	金银花
M211	mairin	456.78	0.78	8.87	连翘
M791	bicuculline	367.38	0.88	15.83	连翘
M3281	20(<i>S</i>)-dammar-24-ene-3 β ,20-diol-3-acetate	486.86	0.82	9.14	连翘
M3365	lactucasterol	426.75	0.85	5.53	连翘
M3370	onjixanthone I	302.30	0.30	14.86	连翘
M449	stigmasterol	412.77	0.76	5.57	黄芩、金银花
M2914	eriodictiol (flavanone)	288.27	0.24	15.88	黄芩、金银花
M173	wogonin	284.28	0.23	17.75	黄芩、连翘
M6	luteolin	286.25	0.25	15.94	金银花、连翘
M98	quercetin	302.25	0.28	14.40	金银花、连翘
M422	kaempferol	286.25	0.24	14.74	金银花、连翘
M358	beta-sitosterol	414.79	0.75	5.36	黄芩、金银花、连翘

表 2 痰热清注射液成分-靶点网络关键节点及其拓扑学特征

Table 2 Key nodes of TRQI component-target network and their topological characteristics

节点名称	类型	度值	介值中心度	节点名称	类型	度值	介值中心度	节点名称	类型	度值	介值中心度
M98	化合物	154	0.489 0	M1689	化合物	26	0.044 9	M2927	化合物	21	0.014 0
M422	化合物	63	0.128 4	M2928	化合物	26	0.040 2	M552	化合物	21	0.015 0
M6	化合物	57	0.124 2	M3095	化合物	26	0.034 5	SCN5A	靶点	20	0.010 7
M173	化合物	45	0.105 8	DPP4	靶点	25	0.029 4	PIK3CG	靶点	18	0.010 2
PTGS2	靶点	39	0.095 7	M3971	化合物	25	0.023 8	M2932	化合物	14	0.008 0
M358	化合物	38	0.071 4	M41	化合物	25	0.022 3	Thrombin	靶点	13	0.008 0
M3969	化合物	38	0.082 9	M8206	化合物	25	0.024 8	GABRA1	靶点	12	0.006 4
M2714	化合物	37	0.068 7	AR	靶点	24	0.022 2	ADRB2	靶点	12	0.006 9
PTGS1	靶点	37	0.070 8	PRKACA	靶点	23	0.019 8	M2897	化合物	11	0.005 6
HSP90AA1	靶点	32	0.060 1	M12266	化合物	22	0.015 8	KCNH2	靶点	10	0.004 9
M449	化合物	31	0.054 1	M228	化合物	22	0.017 4	CASP3	靶点	8	0.003 6
M791	化合物	27	0.049 5	M2934	化合物	22	0.016 9	M2321	化合物	7	0.002 8
NCOA2	靶点	27	0.049 8	PRSS1	靶点	22	0.017 3	PGR	靶点	7	0.003 1

在 Venny 2.1.0 中映射得出 54 个共同靶点,为了更好地探讨痰热清注射液的作用机制,将痰热清注射液 54 个冠状病毒相关靶点蛋白输入 STRING 数据库,构建靶蛋白相互作用 PPI 网络(图 2)。该网络共有 46 个节点,116 条相互作用关系,平均度值为 5.04。将在 STRING 平台中构建的 PPI 网络数据导入 Cytoscape 3.2.1 中,利用 Cytohubba 插件中的度

值降序排列筛选出大于平均度值的核心靶点 19 个(图 3)。

2.4 GO 生物过程分析

综合“2.2”和“2.3”中得到的 34 个(其中 CASP3 重复)痰热清注射液关键靶点进行 GO 生物过程富集分析,筛选出 $P < 0.05$ 的生物过程 29 个。利用 Cytoscape 插件“ClueGo”得出 GO 生物过程富集分

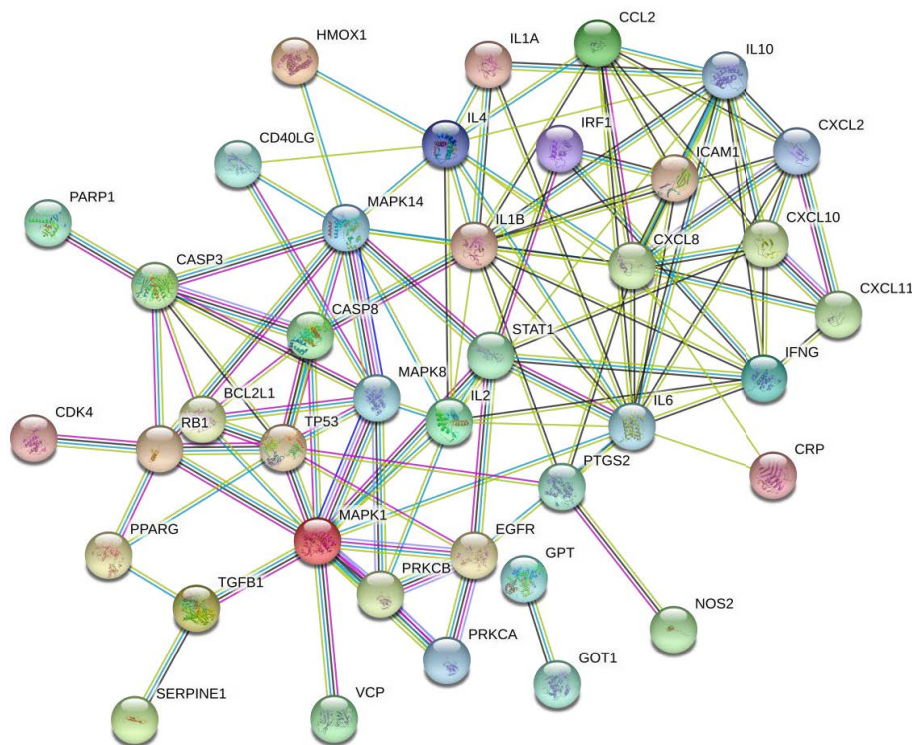


图 2 痰热清注射液相关靶点的 PPI 网络

Fig. 2 Protein-protein interaction network of TRQI

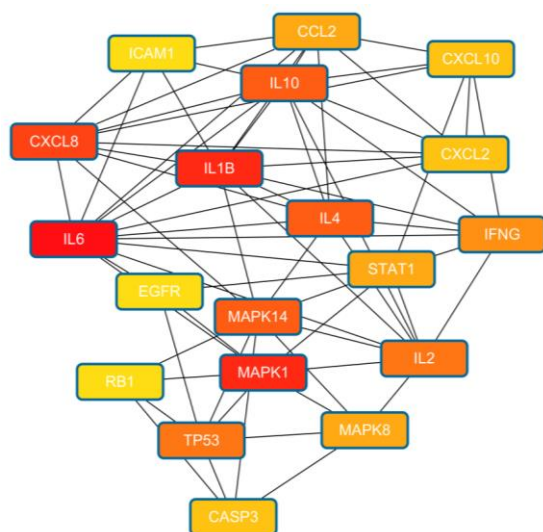


图 3 痰热清注射液核心靶点

Fig. 3 Key targets of TRQI

析的可视化结果如图 4 所示。涉及核质转运正向调控、炎症反应、免疫系统、信号通路和细胞凋亡过程等，这些通路即是痰热清注射液重要靶标干预的生物学过程。

2.5 KEGG 信号通路富集分析

对 34 个痰热清注射液关键靶点进行 KEGG 信号通路富集分析，筛选出 $P < 0.05$ 的信号通路 70 条，利用 Cytoscape 插件“ClueGo”得出 KEGG 分析的可视化结果如图 5 所示，涉及 IL-17 信号通路、卡波氏肉瘤相关疱疹病毒感染、Th17 细胞分化、糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、非小细胞肺癌和趋化因子信号通路等。

2.6 痰热清注射液中核心活性化合物作用于 SARS-CoV-2 3CL 水解酶分子对接结果分析

一般认为，配体与受体结合的构象稳定时能量

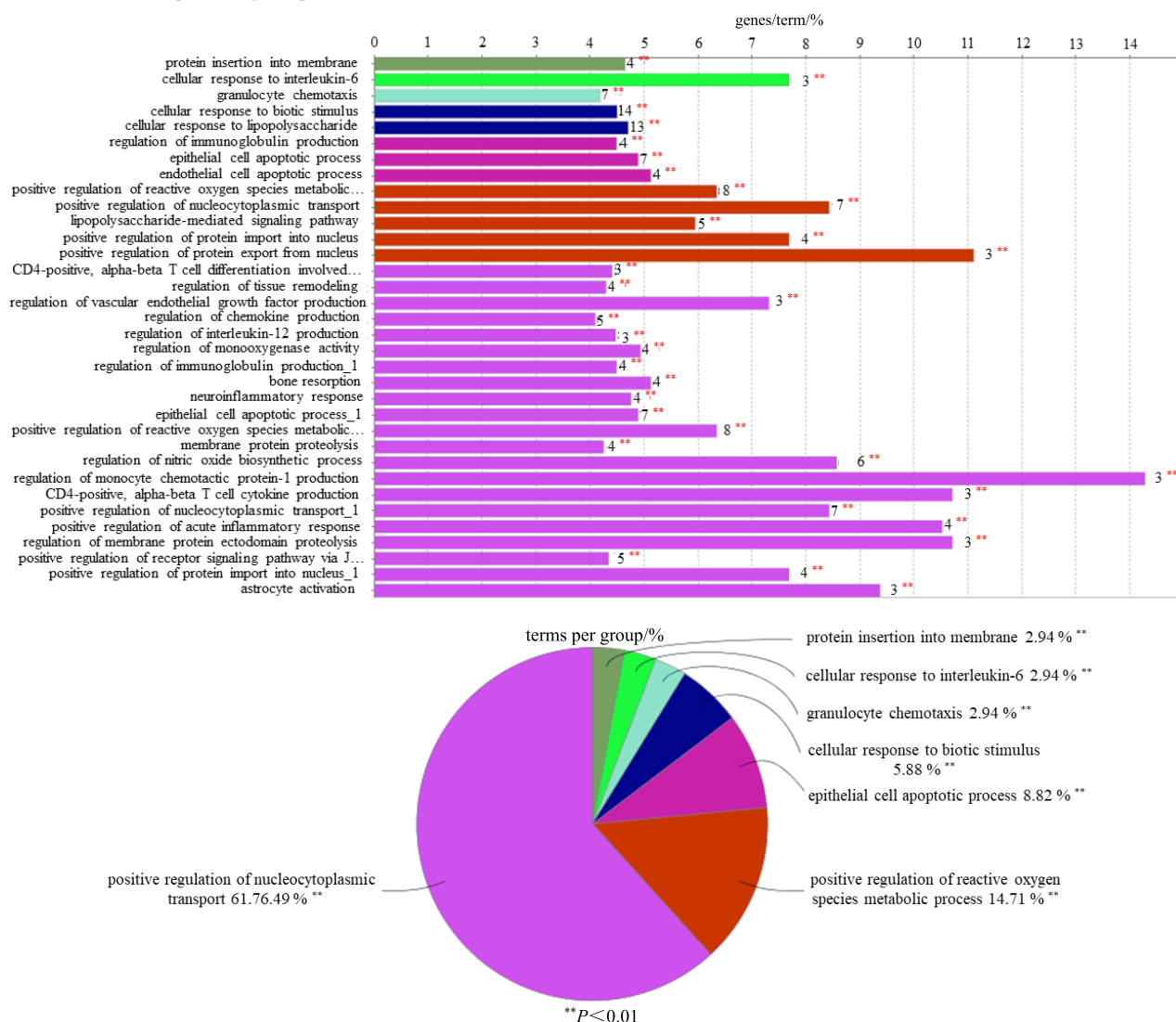


图 4 GO 生物过程分析

Fig. 4 Enrichment analysis on GO biological processes of key targets from active ingredients of TRQI

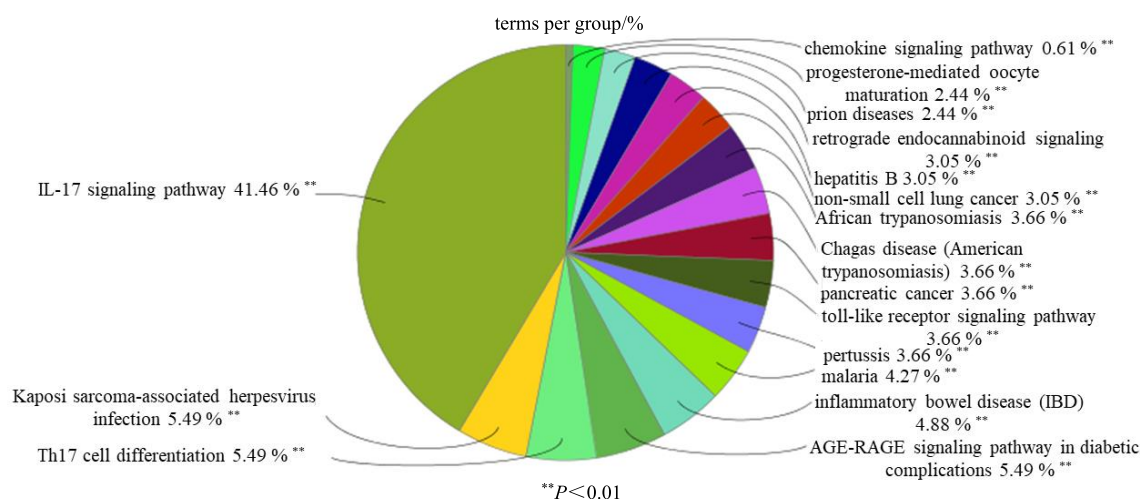


图 5 KEGG 信号通路富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis on KEGG pathways of key targets from main active ingredients of TRQI

越低, 结合可能性越大。分子对接结果显示, β -谷甾醇、山柰酚、槲皮素、黄芩素、木犀草素、汉黄芩素和丝氨酸与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的分子对接结合能均远远小于 -5.0 kJ/mol, 由此表明痰热清注射液核心活性化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶有较好的结合活性, 结果见表 2。山柰酚、槲皮素、黄芩素、木犀草素和汉黄芩素结合能与瑞德西韦和匹洛那韦相近, 它们与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的分子对接模式见图 6。

3 讨论

2020 年 2 月 20 日, 国家中医药管理局党组书记、副局长余艳红表示, 坚持中医药治疗 COVID-19 取得显著成效。夏文广等^[23]的一项回顾性研究表明中西医结合治疗 COVID-19 能显著减轻患者的临床症状, 缩短病程, 提高临床治愈率, 值得推广应用,

其中中成药包括痰热清注射液。

从网络药理学分析结果可知, 排名前 10 位的化合物和靶点分别为槲皮素、山柰酚、木犀草素、汉黄芩素、PTGS2、 β -谷甾醇、丝氨酸、黄芩素、PTGS1 和 HSP90AA1。槲皮素、山柰酚、木犀草素、汉黄芩素、 β -谷甾醇、丝氨酸和黄芩素是痰热清注射液发挥疗效的重要活性成分。此外它们与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶有较好的结合活性。近期发表于 *Cell Research* 的研究^[24]发现瑞德西韦 (Remdesivir) 和氯喹 (Chloroquine) 在体外可显著抑制 SARS-CoV-2 感染。值得一提的是, 本研究得出的山柰酚、槲皮素、黄芩素、木犀草素和汉黄芩素与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶结合能与文献报道^[16]的瑞德西韦和洛匹那韦相近。槲皮素和木犀草素在体外具有抗甲型流感病毒活性^[25], 此外, 研究^[26]表明槲皮素可以降

表 2 痰热清注射液核心化合物以及临床报道有效药物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶结合能

Table 2 Binding energy values of core compounds in TRQI and effective drugs reported clinically with SARS-CoV-2 3CL hydrolase

化合物	化学式	相对分子质量	CAS 号	SARS-CoV-2	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
β -谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	414.79	83-46-5	3CL 水解酶	-37.94
山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.25	520-18-3		-33.78
槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.25	117-39-5		-32.07
黄芩素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.25	491-67-8		-32.16
木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.25	491-70-3		-31.37
汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.28	632-85-9		-28.95
丝氨酸	C ₃ H ₇ NO ₃	105.11	6898-95-9		-12.02
瑞德西韦	C ₂₇ H ₃₅ N ₆ O ₈ P	602.58	1809249-37-3		-32.64 ^[16]
洛匹那韦	C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅	628.80	192725-17-0		-32.22 ^[16]
氯喹	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃	319.87	54-05-7		-24.69 ^[16]

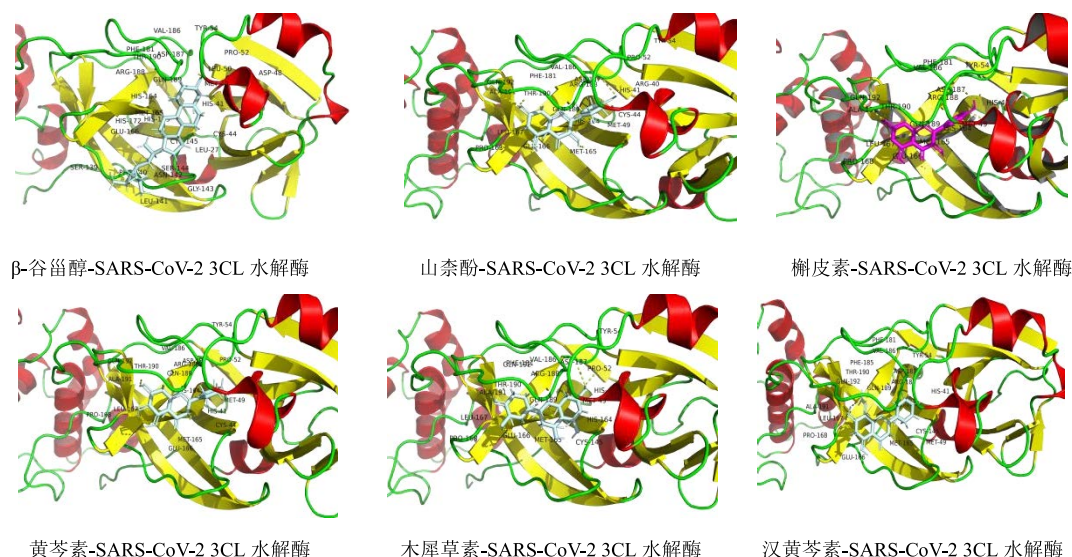


图 6 痰热清注射液核心化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶分子对接模式

Fig. 6 Molecular docking diagram of SARS-CoV-2 3CL hydrolase with core compounds of TRQI

低 TGF- β 1、 α -SMA 和 TNF- α 等表达,抑制大鼠肺泡细胞凋亡,降低大鼠肺组织炎症和纤维化损伤。何黎黎等^[27]分析发现黄芩苷和汉黄芩素通过抑制 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,减少肺组织炎症病理损伤,因此推测单味中药黄芩具有抗 COVID-19 免疫风暴的作用。以上结果说明痰热清注射液可通过多成分、多靶点的协同作用而充分发挥治疗 COVID-19 的作用,为中药单体抗病毒药物的研发提供了新线索。此外,环氧合酶 (PTGS2/COX-2) 是一种诱导酶,在组织损伤、炎症等情况下表达增强,研究发现 COX-2 表达与肺炎及肺损伤有关^[28-29]。

通过与冠状病毒相关靶点匹配得出 19 个核心靶点: IL6、IL1B、MAPK1、IL10、IL4、CXCL8、MAPK14、MAPK8、STAT1、CASPS3、TP53、MCP1 (CCL2)、IFNG、CXCL2、IP10 (CXCL10)、RB1、EGFR、ICAM1 和 IL2。武汉金银潭医院一项发表于 *Lancet* 的临床研究^[30]发现,重症患者血浆中 IL2、IL7、IL10、GSCF、IP10 (CXCL10)、MCP1 (CCL2)、MIP1A (CCL3) 和 TNF- α 显著高于非重症患者。因此,痰热清注射液能通过调节细胞因子释放发挥治疗重症和危重症 COVID-19 的作用,这也与指南推荐相一致^[4]。

进一步分析痰热清注射液 GO 生物过程和 KEGG 信号通路富集结果发现,首先,GO 生物过程富集分析发现痰热清注射液靶点涉及核质转运正向调控、炎症反应、免疫系统、信号通路和细胞凋亡过程等。KEGG 信号通路富集涉及 IL-17 信号通

路、卡波氏肉瘤相关疱疹病毒感染、Th17 细胞分化、糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、非小细胞肺癌和趋化因子信号通路等。SARS-CoV-2 感染导致强烈的免疫反应和炎症风暴,此过程中大量细胞因子被激活,与 SARS 冠状病毒相似^[31]。特别地, Th17 细胞的主要功能是促进中性粒细胞的动员、募集和活化,介导促炎症反应,一系列细胞因子如 TGFB、IL-6、IL-9、IL-1、IL-23、IL-21、IRF4、STAT3 参与了 Th17 细胞分化过程。痰热清注射液的多靶标可能通过调控免疫相关通路 Th17 细胞分化通路、MAPK 信号通路、EGFR 和 TNF 信号通路,起到抑制活化的细胞因子、缓和过激的免疫反应、消除炎症的作用。

综上所述,复方的调控过程除了针对 SARS-CoV-2 结构上的 3CL 水解酶,更注重在病毒入侵后对宿主自身免疫抗感染能力的调控和干预。因此,痰热清注射液通过多成分、多靶点和多通路的共同作用治疗 COVID-19。鉴于网络药理学的局限性,后期还将对通路进行验证,以期为痰热清注射液治疗 COVID-19 提供实验依据。

参考文献

- [1] Wang D, Hu B, Hu C, *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China [J]. *JAMA*, 2020, doi: 10.1001/jama.2020.1585.
- [2] Chan J F, Yuan S, Kok K, *et al.* A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: A study of a

- family cluster [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 514-523.
- [3] Phan L T, Nguyen T V, Luong Q C, *et al.* Importation and human-to-human transmission of a novel coronavirus in Vietnam [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(9): 872-874.
- [4] 国家卫生健康委办公厅. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版) [EB/OL]. [2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2/files/b218cfcb1bc54639af227f922bf6b817.pdf>.
- [5] 张振华, 钟萃萃, 徐英. 基于 HPLC-ESI-MS/MS 技术分析痰热清胶囊和痰热清注射液化学成分的差异 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 44-51.
- [6] 张蓓. 痰热清注射液联合注射用头孢唑肟钠治疗下呼吸道感染的疗效观察 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 947-948.
- [7] Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, *et al.* Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: Basis for design of anti-SARS drugs [J]. *Science*, 2003, 300(5626): 1763-1767.
- [8] Yang H, Yang M, Ding Y, *et al.* The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13190-13195.
- [9] PDB. New coronavirus protease structure available [EB/OL]. [2020-02-04]. <https://www.rcsb.org/news?year=2020&article=5e39e03fa5007a04a313edc3>.
- [10] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [11] 李国艳, 程艳刚, 曾桐春, 等. 基于网络药理学的分心木总黄酮抗 2 型糖尿病作用机制研究及关于 AKT/FoxO1 信号通路的细胞实验验证 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(1): 30-40.
- [12] 袁薪蕙, 王保和, 杜犀. 雷公藤多苷片治疗肾病综合征作用机制的网络药理学研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(11): 3209-3214.
- [13] 韩彦琪, 董亚楠, 许浚, 等. 基于网络药理学的疏风解毒胶囊抗炎和免疫调节作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3555-3562.
- [14] Wang Y L, Cui T, Li Y Z, *et al.* Prediction of quality markers of traditional Chinese medicines based on network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 349-356.
- [15] 耿胜男, 杨莉, 李阳杰, 等. 基于网络药理学的干姜抗肿瘤转移作用机制分析 [J]. 中药材, 2019, 11(42): 2659-2669.
- [16] 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.
- [17] 赵松峰, 张晓, 师秀琴, 等. 基于超高效液相色谱-高分辨质谱技术方法分析痰热清注射液和胶囊化学成分的定性差异 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(9): 739-748.
- [18] 王珏, 瞿海斌, 邵青. HPLC-UV-ELSD 法同时测定痰热清注射液中主成分含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11): 1804-1807.
- [19] 冯素香, 赵迪, 郝蕊, 等. HPLC-UV-ELSD 联用同时测定痰热清注射液中 6 种成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 278-284.
- [20] 姚文冰. HPLC 法同时测定痰热清注射液中木犀草苷和黄芩苷的含量 [J]. 中国药房, 2011, 22(35): 3311-3312.
- [21] 陈永刚, 陈文林, 李璠. HPLC 法同时测定痰热清注射液中 9 种有效成分 [A] // 2015 年中国药学会暨第十五届中国药师周论文集 [C]. 天津: 中国药学会, 2015.
- [22] 莫宗权, 敬娜, 陈晓俊, 等. 基于网络药理学分析康艾注射液抗肿瘤作用机制 [J]. 中药材, 2019, 10(43): 2386-2394.
- [23] 夏文广, 安长青, 郑婵娟, 等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎 34 例临床研究 [J]. 中医杂志, 2020, 61(5): 375-382.
- [24] Wang M, Cao R, Zhang L, *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro* [J]. *Cell Res*, 2020, 30(3): 1-3.
- [25] 李海波, 于洋, 王振中, 等. 热毒宁注射液抗病毒活性成分研究 (I) [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1682-1688.
- [26] 魏萍, 陈志斌, 王春娥, 等. 槲皮素对慢性阻塞性肺疾病大鼠的保护作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(21): 2570-2575.
- [27] 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.
- [28] Hsu P S, Lin C M, Chang J F, *et al.* Participation of NADPH oxidase-related reactive oxygen species in leptin-promoted pulmonary inflammation: Regulation of cPLA2 α and COX-2 expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1-15.
- [29] Teng R J, Jing X, Michalkiewicz T, *et al.* Attenuation of endoplasmic reticulum stress by caffeine ameliorates hyperoxia-induced lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 312(5): L586-L598.
- [30] Huang C, Wang Y, Li X, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [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): 1-10.