

基于网络药理学和分子对接探寻升降散抗新型冠状病毒潜在作用机制研究

杨小林¹, 袁永亮^{2#}, 张 杰³, 王如锋^{1*}, 倪力强^{1*}

1. 上海中医药大学, 上海 201203

2. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052

3. 中国医科大学第一附属医院, 辽宁 沈阳 110001

摘要: 目的 探究升降散抑制新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的潜在作用。方法 采用 ETCM、中药系统药理学分析平台 (TCMSP)、BATMAN-TCM 和 CMAUP 数据库获得升降散复方的靶蛋白基因; 采用 GeneCards 数据库获取抗病毒相关靶基因; 采用交集法进而获得升降散复方与抗病毒作用相关的靶基因; 运用 Cytoscape 3.7.2 构建“复方-中药-靶点”网络; 运用 R 语言进行 KEGG 通路富集分析和 GO 功能富集分析, 预测升降散抗病毒的潜在作用。采用 TCMSP、中国知网和 PubChem 数据库检索升降散中的化学成分, 将各化学成分与 3CL 水解酶和血管紧张素转化酶 II (ACE2) 进行分子对接。结果 升降散复方可能通过 663 个基因发挥抗病毒作用。KEGG 富集筛选得到 10 条与抗病毒最相关的通路 ($P < 0.01$), 涉及甲型流感等通路。升降散中与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 进行分子对接的结合能数值小于 -29.3 kJ/mol 的化合物分别有 133 个和 145 个。结论 升降散可能通过多通路发挥抗病毒作用, 对 SARS-CoV-2 具有潜在的抑制作用。

关键词: 升降散; 新型冠状病毒; 冠状病毒; SARS-CoV-2 3CL 水解酶; 血管紧张素转化酶 II

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)07-1795-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.013

Exploring potential effect of Shengjiang San on SARS-CoV-2 based on network pharmacology and molecular docking

YANG Xiao-lin¹, YUAN Yong-liang², ZHANG Jie³, WANG Ru-feng¹, NI Li-qiang¹

1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

3. The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Abstract: Objective To explore the potential effect of Shengjiang San for inhibiting SARS-CoV-2. **Methods** The target genes of *Beauveria bassiana*, *Cryptotympana pustulata*, *Curcuma longa*, *Rheum officinale* in Shengjiang San were screened out through the database analysis of Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine (ETCM), and traditional Chinese medicine system pharmacology platform (TCMSP), Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM) and Collective Molecular Activities of Useful Plants (CMAUP). GeneCards database was used to obtain target genes of antivirus. The intersection method was used to obtain the target genes related to the antiviral effect of Shengjiang San. Cytoscape 3.7.2 software was applied for the construction of prescription-CMM-targets (genes) networks. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis and gene ontology (GO) functional enrichment analysis were performed by R language to predict the potential mechanism of Shengjiang San against the virus. TCMSP, CNKI and PubChem databases were used to retrieve the chemical components of *B. bassiana*, *C. pustulata*, *C. longa* and *R. officinale* in Shengjiang San. AutoDock Vina 1.1.2 was used for molecular docking to study the interactions of each chemical component with SARS-CoV-2 3CL hydrolase or angiotensin converting enzyme II (ACE2). **Results** Shengjiang San could play an antiviral role through the corresponding 663 target genes.

收稿日期: 2020-03-09

基金项目: 国家中医药管理局基本中医药循证能力建设基金项目 [国中医药科技 (2019) 130 号]; 辽宁中医药管理局中医临床学 (专) 科能力建设基金项目 [辽中医药函字 (2018) 27 号]

作者简介: 杨小林, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为中药药效物质基础及其活性研究。E-mail: xiaolinyan@126.com

*通信作者 倪力强, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为中医内科与临床药理学。E-mail: xyylc_nilq@126.com

王如锋, 男, 博士, 副研究员。E-mail: wrffw0801@163.com

#并列第一作者 袁永亮, 男, 博士, 助理研究员。E-mail: fccyuanyl@zzu.edu.cn

Top ten pathways were related to antiviral ($P < 0.01$) in the KEGG pathway enrichment screening, including influenza A, etc. The affinity values of a total of 133 compounds in Shengjiang San were < -29.3 kJ/mol for molecular docking with SARS-CoV-2 3CL hydrolase. The affinity values of 145 compounds for molecular docking with ACE2 were < -29.3 kJ/mol. **Conclusion** Shengjiang San could regulate multiple signaling pathways to inhibit virus, and have a potential inhibiting effect on SARS-CoV-2.

Key words: Shengjiang San; SARS-CoV-2; coronavirus; SARS-CoV-2 3CL hydrolase; angiotensin converting enzyme II

新型冠状病毒肺炎, 又名 2019 冠状病毒病 (COVID-19)^[1], 为一种新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 感染引起的急性传染病。世界卫生组织宣布将 COVID-19 全球风险等级提至最高级别^[2]。该病毒感染的临床症状一般为发热、乏力、干咳或腹泻, 逐渐出现呼吸困难等, 严重者表现为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、代谢性酸中毒和凝血功能障碍。该病毒在人群中易感染, 潜伏期长。截至 2020 年 2 月 28 日 24 时, 累计报告确诊病例 79 251 例^[3]。目前仍无治疗 COVID-19 的特效药物, 因此亟待研究和开发出抗 SARS-CoV-2 的药物。升降散源于清代杨栗山所撰的《伤寒温病条辨》, 为中医治疗温病名方, 由大黄 *Rheum officinale* Baill.、僵蚕 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant、蝉蜕 *Cryptotympana pustulata* Fabricius 和姜黄 *Curcuma longa* L. 组成, 擅治温病表里三焦大热, 无论病情轻重皆可酌用。近年来, 该方用于治疗多种温热病, 表现出良好的抗感染、退热等作用^[4]。

随着对 COVID-19 认识的不断深入, 国家发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行)》(以下简称诊疗方案)在短短的 1 个月内已更新至第七版。各省市自治区也结合地域特点, 先后出台了各自的诊疗方案, 升降散已成为国家卫健委诊疗方案(第三版)推荐处方之一^[5-6]。作者团队也曾将升降散用于 COVID-19 患者的治疗, 收到了良好效果。中药复方的物质基础为化合物群/库, 从已有的抗病毒中成药或汤方中筛选潜在的抗 SARS-CoV-2 药物, 可能是一条捷径。已有文献报道^[6], 在 SARS-CoV-2 冠状病毒进入人体细胞后, 释放出的 RNA 直接与宿主的核糖体结合, 翻译出的病毒复制所需的关键蛋白酶, 已知 3CL 水解酶为关键蛋白酶之一。研究证实血管紧张素转化酶 II (ACE2) 受体蛋白对于 SARS-CoV-2 感染细胞是必需蛋白^[7]。目前 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 已为抗 SARS-CoV-2 药物开发的热点靶标。本研究拟对升降散组方药物大黄、僵蚕、蝉蜕和姜黄 4 味药物中的成分进行网络药理学和分子模拟对接研究, 探索

升降散组方药味中各化学成分抗 SARS-CoV-2 的可能作用, 以期发现潜在的 SARS-CoV-2 3CL 水解酶/ACE2 靶点药物。

1 材料

数据库包括中药系统药理学分析平台 (TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>)^[8], PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[9], ETCM 数据库 (<http://www.nrc.ac.cn:9090/ETCM>)^[10], BATMAN-TCM 中药分子机制的生物信息学分析工具 (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)^[11], CMAUP 数据库 (<http://bidd2.nus.edu.sg/CMAUP/>)^[12], GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)^[13]。软件包括 AutoDock Tools 1.5.6、AutoDock Vina 1.1.2、PyMol、Chem3D 17.1、LigPlus、Cytoscape 3.7.2 和 R 语言软件包。

2 方法

2.1 获取升降散中各味中药的相关靶点蛋白基因

以升降散中的 4 味中药的中文拼音/拉丁文名称为关键词, 在 ETCM、TCMSP、BATMAN-TCM 和 CMAUP 等数据库检索, 获得复方中各个中药相关的靶点蛋白基因。在数据库中未检索到相关中药的靶点蛋白基因, 则以该中药中的化合物为关键词进行检索获得相关靶点蛋白基因。

2.2 获取抗病毒相关的靶点蛋白基因

通过 GeneCards 数据库, 搜索关键词“antivirus”, 获得了与抗病毒相关的靶点蛋白基因。

2.3 构建“复方-中药-靶点”网络

通过 Cytoscape 3.7.2 软件构建“复方-中药-靶点”网络, 并对“复方-中药-靶点”网络进行分析, 得到该网络的分析参数。

2.4 靶点的通路分析

运用 R 语言富集分析 clusterprofiler 软件包对所得到的相关基因进行 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路富集分析和 GO (gene ontology) 注释通路分析, 并将其结果可视化。

2.5 升降散中化合物-靶点蛋白分子对接

通过 TCMSP、中国知网和 PubChem 数据库收集升降散组方中大黄、僵蚕、蝉蜕和姜黄各药味所

含成分。从 PubChem 数据库中下载相应化合物结构式 (SDF 格式), 用 Chem3D 软件转化为 PDB 格式备用。从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 下载 SARS-CoV-2 3CL 水解酶 (PDB ID: 6LU7) 和 ACE2 (PDB ID: 1R4L) 的晶体结构, 进行分子对接。采用 AutoDock Tools 1.5.6 软件删除 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 中水分子, 分离配体和受体, 添加非极性氢, 计算 Gasteiger 电荷, 分别保存为 6LU7_sss.pdbqt 和 1R4L_sss.pdbqt 文件。将待进行分子对接的化合物 PDB 格式文件导入 AutoDock Tools 1.5.6, 添加原子电荷, 分配原子类型, 所有柔性键均默认可旋转。保存为 pdbqt 格式, 作为对接配体。以 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 作为受体, 以升降散组方中各化合物作为配体, 根据靶蛋白中配体的坐标确定分子对接的活性位点, 根据 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 活性口袋设置 Gridbox 坐标及大小。SARS-CoV-2 3CL 水解酶的 Gridbox 位置设置为 center_x=-10.733, center_y=12.416, center_z=68.829; 大小设置为 size_x=16, size_y=22, size_z=16; spacing=1, 其他参数默认。ACE2 的 Gridbox 位置设置为 center_x=40.199, center_y=6.024, center_z=29.006; 大小设置为 size_x=16, size_y=16, size_z=16; spacing=1, 其他参数默认。采用 AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接。采用 Pymol 和 Ligplus 软件可视化分析对接构象。从各化合物对接结果的结合构象中, 选取结合能较低且构象较好的对接结果。

3 结果与分析

3.1 升降散中各味中药的相关靶点蛋白基因

从 ETCM、TCMSP、BATMAN-TCM 和 CMAUP 等数据库中获得升降散中各味中药相关的靶点基因。去除重复靶点蛋白基因后, 分别得到与大黄相关的靶点蛋白基因 1 209 个、姜黄相关基因 804 个、蝉蜕相关基因 172 个、僵蚕相关基因 80 个, 它们之间的交集见图 1。

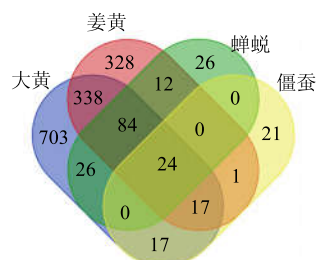


图 1 升降散中各化学成分相关靶点蛋白基因交集
Fig. 1 Distribution of target genes in Shengjiang San

3.2 升降散中各药物与抗病毒相关靶点蛋白基因

通过检索 GeneCards 数据库, 获得与抗病毒相关的基因 5 693 个, 将其与复方中 1 597 个相关基因进行交集, 得到 663 个与抗病毒相关基因 (图 2)。据以上分析可知, 升降散可能是通过这 663 个基因发挥抗病毒作用, 其中大黄抗病毒靶基因有 513 个、姜黄有 287 个、蝉蜕有 59 个、僵蚕有 80 个 (不同的中药之间存在重复靶点基因)。

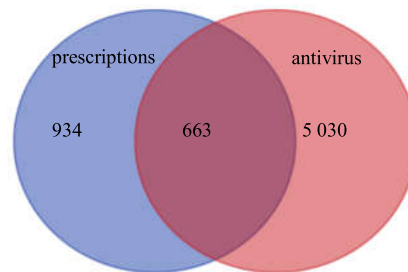


图 2 升降散各药味相关基因与抗病毒相关基因交集
Fig. 2 Distribution of target genes of Shengjiang San and antivirus

3.3 构建“复方-中药-靶点”网络

通过 Cytoscape 3.7.2 软件构建“复方-中药-靶点”网络, 并对“复方-中药-靶点”网络进行分析, 得到以下网络分析参数: 节点数目 (number of nodes) 为 668 个, 网络度 (network density) 为 0.004, 网络异质性 (network heterogeneity) 为 8.183, 网络中心度 (network centralization) 即平均相邻节点数 (average number of neighbors) 为 2.805, 特征路径长度 (characteristic path length) 为 2.587, 最短路径 (shortest paths) 为 452、256。

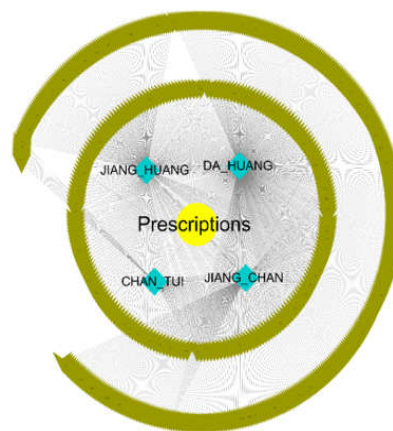


图 3 升降散“复方-中药-靶点”网络
Fig. 3 Prescription-CMM-targets (genes) network diagram of Shengjiang San

3.4 靶点蛋白基因的通路分析

对 663 个靶点蛋白基因进行 KEGG 通路富集分析, 富集得到与抗病毒相关的前 10 条通路 (图 4), 分别是人巨细胞病毒感染 (human cytomegalovirus infection)、乙型肝炎 (hepatitis B)、人类 T 细胞白血病病毒 I 感染 (human T-cell leukemia virus 1 infection)、卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒感染 (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、丙型肝炎 (hepatitis C)、耶尔森氏鼠疫杆菌感染 (Yersinia infection)、EB 病毒感染 (Epstein-Barr virus infection)、人类免疫缺陷病毒 1 型感染 (human immunodeficiency virus 1 infection)、病毒致癌 (viral carcinogenesis) 和甲型流感 (influenza A)。

其中升降散复方与甲型流感病毒通路的相关性最大, 病毒感染后可将信号汇聚到 I κ B 激酶 (IKK) 复合体引起核转录因子- κ B (NF- κ B) 活化导致靶基因转录和表达在宿主免疫和炎症反应中起重要作用, 且复制、致病也都依赖于蛋白激酶 C (PKC)/细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 等通路的激活。

运用 R 语言富集分析 clusterprofiler 软件包对 663 个靶基因进行 GO 注释通路分析, 得到 GO 条目 3 977 个 ($P < 0.01$), 其中生物过程 (BP) 条目 3 500 个, 细胞组成 (CC) 条目 186 个, 分子功能 (MF) 条目 291 个, 分别占 88%、5%、7%, 见图 5。

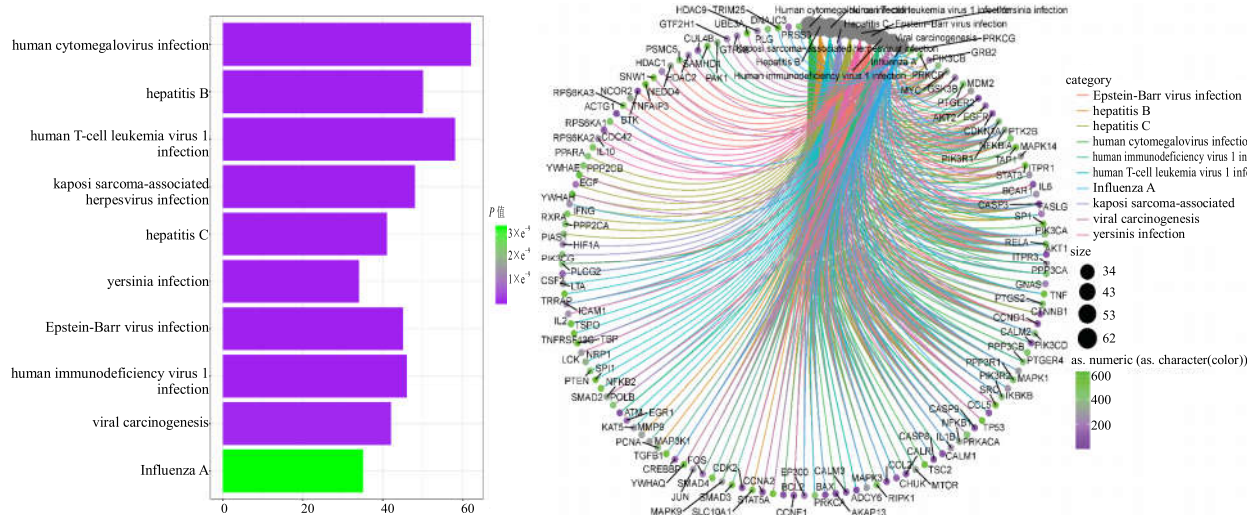


图 4 升降散复方靶标的 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of targets of Shengjiang San

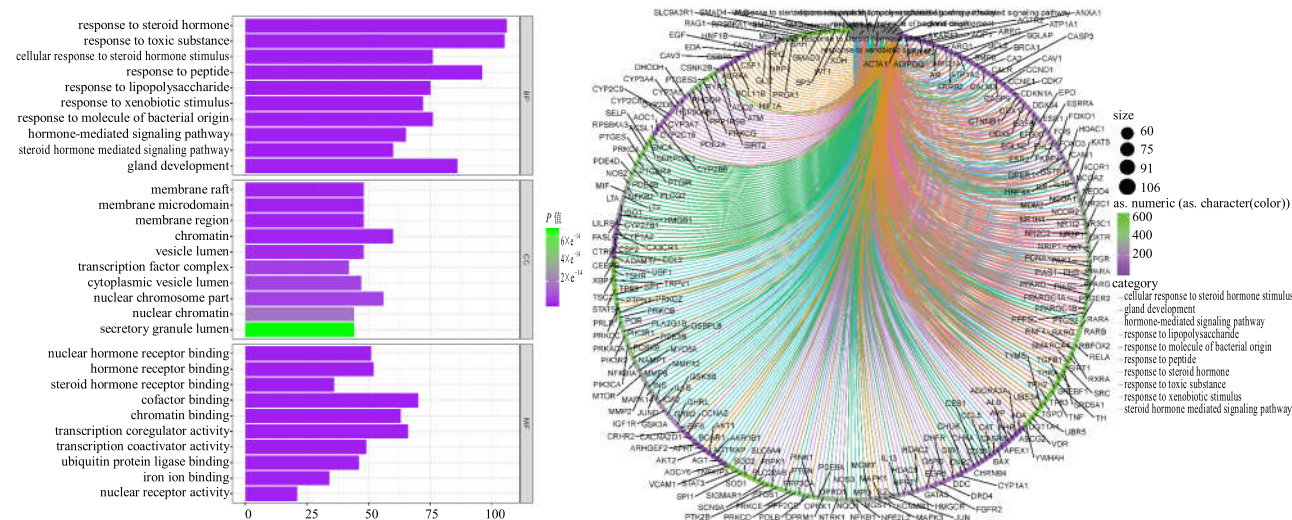


图 5 升降散复方靶标的 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of targets of Shengjiang San

通过“复方-中药-靶标”的关系网络分析和 KEGG 分析,发现升降散复方具有抗病毒的功效,但对 SARS-CoV-2 是否有抑制作用,具体复方中哪些成分可能起到抑制 SARS-CoV-2 的作用,这些问题网络药理学研究不能给出答案,故拟通过分子对接研究预测复方中哪些成分对新型冠状病毒靶标具有潜在的抑制作用。

3.5 升降散中各化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 的分子对接结果及分析

通过 TCMSP、CNKI、PubChem 检索到大黄、

蝉蜕、姜黄和僵蚕中化合物 297 个,其中有 117 个化合物来源于大黄,有 133 个化合物来源于姜黄,有 31 个化合物来源于僵蚕,有 16 个化合物来源于蝉蜕。上述各化合物分别与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 靶标蛋白进行分子对接。升降散中部分化合物分子对接结果见表 1、2。分子对接结合能越小,说明受体和配体之间的亲和力越大。一般认为结合能数值小于-29.3 kJ/mol 说明受体和配体具有较好的亲和力。升降散中共有 133 个化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶进行分子对接的结合能数

表 1 升降散中部分化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶对接的结合能

Table 1 Binding affinities of core compounds in Shengjiang San with SARS-CoV-2 3CL

序号	化合物名称	Pubchem CID	结合自由能/ (kJ·mol ⁻¹)	来源
1	revandchinone-2	5320940	-46.4	大黄
2	原花青素 B2-3'-O-没食子酸 (procyanidin B2-3'-O-gallate)	15593124	-43.3	大黄
3	掌叶大黄二蒽酮 B (palmidin B)	5320385	-42.3	大黄
4	大黄二蒽酮 A (rheidin A)	5320957	-42.3	大黄
5	大黄二蒽酮 C (rheidin C)	5320959	-41.8	大黄
6	掌叶大黄二蒽酮 C (palmidin C)	5320386	-41.4	大黄
7	大黄素二蒽酮 B (emodin bianthrone)	10097848	-41.0	大黄
8	掌叶大黄二蒽酮 A (palmidin A)	5320384	-40.6	大黄
9	大黄二蒽酮 B (rheidin B)	5320958	-40.6	大黄
10	番泻苷元 A (sennidine A)	122839	-40.2	大黄
11	3-二氢-2,4-羟基-3-甲氧基苯基-6-[(1E)-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)乙烯基]-4H-吡喃-4-酮 (cyclocurcumin 2)	69879809	-32.2	姜黄
12	豆甾醇 (stigmasterol)	5280794	-29.7	姜黄
13	去甲氧基姜黄素 (demethoxycurcumin)	5469424	-29.7	姜黄
14	姜黄素 (curcumin)	969516	-29.3	姜黄
15	双去甲氧基姜黄素 (bisdemethoxycurcumin)	5315472	-29.3	姜黄
16	二氢姜黄素 (dihydrocurcumin)	10429233	-29.3	姜黄
17	N-[(2S,3R)-7-(2-acetamidoethyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-2-yl] acetamide	—	-31.8	蝉蜕
18	N-[(2R,3S)-7-(2-acetamidoethyl)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-3-yl] acetamide	—	-31.4	蝉蜕
19	N-[(E)-2-[(2R,3S)-3-acetamido-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-7-yl] vinyl] acetamide	—	-31.0	蝉蜕
20	(3Z)-3-(2-amino-4,6-dioxo-5,8-dihydro-1H-pteridin-7-ylidene)-2-oxopropanoic acid	—	-29.3	蝉蜕
21	氧麦角甾醇	6449952	-36.4	僵蚕
22	槲皮素-7-O-β-D-4-O-甲基吡喃葡萄糖苷	5282160	-36.0	僵蚕
23	(22E,24S)-5α,8α-环二氧-24-甲基-胆甾-6,9(11),22-三烯-3β-醇	—	-33.1	僵蚕
24	(2R,3S)-2-(3',4'-二羟基苯基)-3-乙酰氨基-7-(N-乙酰基-2"-氨基乙基)-1,4-哌氧环烷	—	-33.1	僵蚕
25	(2R,3S)-2-(3',4'-二羟基苯基)-3-乙酰氨基-6-(N-乙酰基-2"-氨基乙基)-1,4-哌氧环烷	—	-33.1	僵蚕
26	(2R,3S)-2-(3',4'-二羟基苯基)-3-乙酰氨基-7-(N-乙酰基-2"-氨基乙基)-1,4-哌氧环烷	—	-32.6	僵蚕
27	槲皮素	5280343	-32.6	僵蚕
28	山柰酚	5280863	-32.6	僵蚕
29	(22E,24R)-5α,6α-环氧麦角甾-8(14),22-二烯-3β,7α-二醇	—	-32.6	僵蚕
30	22E-3β-羟基-5α,6α-环氧麦角甾-22-烯-7-酮	—	-32.2	僵蚕

表 2 升降散中部分化合物与 ACE2 对接的结合能

Table 2 Binding affinities of core compounds in Shengjiang San with ACE2

序号	化合物名称	Pubchem CID	结合自由能/(kJ·mol ⁻¹)	来源
1	revandchinone-3	5320941	-55.6	大黄
2	revandchinone-2	5320940	-53.1	大黄
3	掌叶大黄二蒽酮 B (palmidin B)	5320385	-49.8	大黄
4	revandchinone-4	5320942	-47.3	大黄
5	大黄酚-8- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -没食子酰)-吡喃葡萄糖苷 [chrysophanol-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6'- <i>O</i> -galloyl)-glucopyranoside]	—	-46.9	大黄
6	掌叶大黄二蒽酮 C (palmidin C)	5320386	-46.9	大黄
7	白皮杉醇-4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6''- <i>O</i> -没食子酰)-吡喃葡萄糖苷 [piceatannol-4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6''- <i>O</i> -galloyl)-glucopyranoside]	—	-46.0	大黄
8	掌叶大黄二蒽酮 A (palmidin A)	5320384	-45.6	大黄
9	revandchinone-1	101223029	-44.8	大黄
10	(+)-表儿茶素-7,3'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	—	-44.8	大黄
11	gitoxygenin	348482	-38.1	姜黄
12	stigmasterol	5280794	-38.1	姜黄
13	cyclocurcumin	69879809	-37.7	姜黄
14	姜黄素 (curcumin)	969516	-34.3	姜黄
15	β-谷甾醇 (β-sitosterol)	222284	-33.9	姜黄
16	去甲氧基姜黄素 (demethoxycurcumin)	5469424	-33.9	姜黄
17	5'-甲氧基姜黄素 (5'-methoxycurcumin)	10250249	-33.9	姜黄
18	四甲基姜黄素 (tetramethylcurcumin)	11487078	-33.9	姜黄
19	桉木酮 (alnutone)	5317598	-33.1	姜黄
20	2-hydroxy-methyl-anthraquinone	87014	-32.2	姜黄
21	<i>N</i> -[(<i>E</i>)-2-[(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3-acetamido-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-7-yl]vinyl] acetamide	—	-37.7	蝉蜕
22	<i>N</i> -[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-7-(2-acetamidoethyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-2-yl] acetamide	—	-37.7	蝉蜕
23	<i>N</i> -[(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-7-(2-acetamidoethyl)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-3-yl]acetamide	—	-37.7	蝉蜕
24	(3 <i>Z</i>)-3-(2-amino-4,6-dioxo-5,8-dihydro-1 <i>H</i> -pteridin-7-ylidene)-2-oxopropanoic acid	—	-35.1	蝉蜕
25	BB ctapeptide	—	-31.8	蝉蜕
26	cyclo (<i>S</i>)-Pro-(<i>R</i>)-Leu	—	-31.4	蝉蜕
27	(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-5α,6α-环氧麦角甾-8(14),22-二烯-3β,7α-二醇	—	-43.1	僵蚕
28	3β,5α-二羟基-(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-麦角甾-7,22-二烯-6-酮	—	-42.7	僵蚕
29	槲皮素-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -4- <i>O</i> -甲基吡喃葡萄糖苷	5282160	-42.3	僵蚕
30	7α-甲氧基-(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-5α,6α-环氧麦角甾-8(14),22-二烯-3β-醇	—	-42.3	僵蚕
31	22 <i>E</i> -3β-羟基-5α,6α-环氧麦角甾-22-烯-7-酮	—	-41.8	僵蚕
32	(22 <i>E</i> ,24 <i>R</i>)-麦角甾-5,7,22-三烯-3β-醇	444679	-41.0	僵蚕
33	豆甾醇-7,22-二烯-3β,5α,6α-三醇	—	-39.7	僵蚕
34	β-谷甾醇	222284	-38.5	僵蚕
35	山柰酚-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -4- <i>O</i> -甲基吡喃葡萄糖苷	—	-38.5	僵蚕
36	金色酰胺醇酯	9832120	-38.1	僵蚕

值小于 -29.3 kJ/mol, 其中大黄中的化合物有 104 个, 姜黄中的化合物有 6 个, 蝉蜕中的化合物有 4 个, 僵蚕中的化合物有 19 个; 共有 145 个化合物与 ACE2 进行分子对接的结合能数值小于 -29.3 kJ/mol, 其中大黄中的化合物有 91 个, 姜黄中的化合物有 27 个, 蝉蜕中的化合物有 6 个, 僵蚕中的化合物有 21 个。说明升降散中的化合物群与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶、ACE2 有较好的结合活性, 显示升降散发挥抗

SARS-CoV-2 的潜在作用及其特点。

3.6 升降散中各化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 的结合模式分析

根据分子对接结果可知, 大黄中蒽酮类化合物 revandchinone-2 对 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 都具有较高的亲和力, 其结合能分别是 -46.4 、 -53.1 kJ/mol, 相互作用图见图 6、7。SARS-CoV-2 3CL 水解酶活性口袋区域主要位于蛋白晶体中原

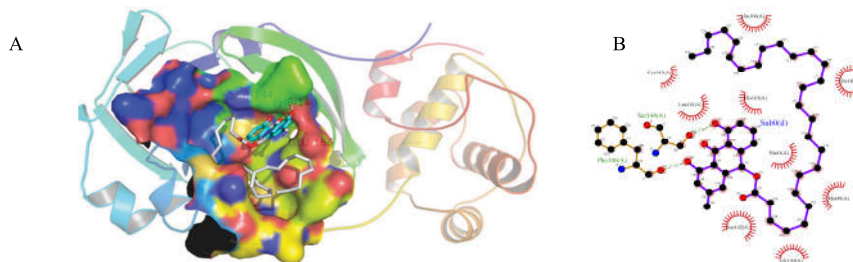


图 6 Revandchinone-2 (A) 与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶 (B) 的分子对接

Fig. 6 Molecular docking of revandchinone-2 (A) with SARS-CoV-2 (B) 3CL hydrolase

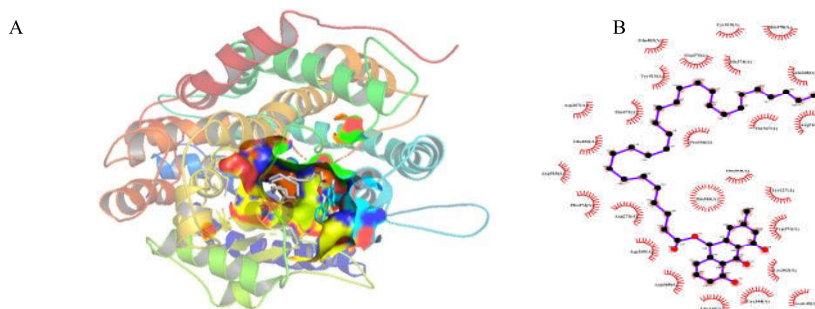


图 7 Revandchinone-2 (A) 与 ACE2 (B) 的分子对接

Fig. 7 Molecular docking of revandchinone-2 (A) with ACE2 (B)

配体 N3 抑制剂所在的 loop 区域。通过进一步分析, revandchinone-2 的羟基与 3CL 水解酶中的 Phe140 和 Ser144 形成氢键, 与 His41、Met49、Asn142、Gly143、Gln189 形成疏水作用, 增强了该化合物与靶蛋白之间的相互作用力。同理, ACE2 的活性口袋区域以其配体所在位置为分子对接的活性口袋区域。Revandchinone-2 与 Trp271、Cys344、Glu145、Asp269、Arg273、Thr371、Try515、His374 等氨基酸形成疏水环, 构成稳定的结合构象。

4 讨论

在几千年的历史长河中, 中医药在抗击瘟病、防疫方面发挥了重要作用, 积累了丰富的经验。在 2003 年 SARS 来袭时, 中医药的重要作用已经得到了彰显。在目前抗击 COVID-19 战役中, 凡是中医药参与治疗的确证患者, 治愈率高、

死亡率低^[14]。目前, 国家和各省卫健委已经发布十 10 余种可用于新型冠状病毒肺炎 COVID-19 治疗的汤方剂或中成药, 它们在抗疫过程中发挥了重要的作用。上述中药汤方或中成药多数已经被药学工作者迅速的进行了网络药理学或分子对接预测研究, 并发现了多种可能的靶点药物。升降散是抗疫中卫生健康委员会发布的可使用抗疫中药方药之一, 但目前还未见到相关研究报道。升降散是治疗温病宗方, 适应证广泛, 如憎寒壮热、头痛、骨节酸痛, 或头面猝肿、咽喉肿痛、痰涎壅盛, 或上吐下泻、呕吐血汁、丹毒发斑、雷鸣腹痛, 或舌卷囊缩、腰痛如折、大便火泻、小便淋涩等。症状虽多, 但受邪则一, 均由“杂气内郁”所致, 与 COVID-19 的临床多种症状类似。作者和其他在抗疫一线的中医专家, 都

曾给 COVID-19 患者对症使用过升降散, 并收到了良好效果, 故有必要对升降散治疗 COVID-19 的潜在作用进行预测探索研究。中药复方在抗病毒方面的优势, 在于其不同于化学药的“锁钥”模式, 中药复方的化学成分群, 可以在遇到不同病毒的时候, 启动不同的活性成分或活性成分群。化学药的研发速度远远慢于病毒的发现和变异速度, 而对具有抗病毒作用的中药成药或方剂进行挖掘和探索, 可能是研究抗新冠病毒药物的一条捷径。

本研究通过搜索 GeneCards 数据库, 获得了与抗病毒相关的靶蛋白基因及升降散各药物相关的靶蛋白基因, 交集后得到了升降散复方的 663 个与抗病毒相关的靶蛋白基因。这 663 个相关的靶蛋白基因中包括大黄的 513 个、姜黄的 287 个、蝉蜕的 59 个、僵蚕的 80 个抗病毒靶蛋白基因。通过 KEGG 富集分析得到了与抗病毒最相关的 10 条通路, 分别是人巨细胞病毒感染、乙型肝炎、人类 T 细胞白血病病毒 I 感染、卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒感染、丙型肝炎、耶尔森氏鼠疫杆菌感染、EB 病毒感染、人类免疫缺陷病毒 1 型感染、病毒致癌、甲型流感病毒通路。升降散的抗病毒通路如此广泛, 可以解释和证明升降散中医临床广泛用于治疗“杂气内郁”的合理内核, 治疗瘟疫、温病、伤寒等杂症取得成就的科学内涵。推测升降散对 SARS-CoV-2 可能具有防治作用, 对升降散中诸多化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 对接研究十分必要。

已有天然化合物与 SARS-CoV-2 相关靶蛋白分子对接诸多研究报道^[15-16]。对接过程中, 活性中心 Gridbox 的大小设置合理与否直接影响到分子对接的准确性。故本文以原配体抑制剂为活性口区域, 合理设置分子对接的 Gridbox 大小。本研究通过 TCMSP、CNKI、PubChem 检索到升降散中已知化合物 297 个, 其中 117 个化合物来源于大黄、133 个化合物来源于姜黄、31 个化合物来源于僵蚕、16 个化合物来源于蝉蜕。上述各化合物分别与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶、ACE2 进行了分子对接。升降散中共有 133 个化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶进行分子对接的结合能数值小于 -29.3 kJ/mol, 其中大黄中的化合物有 104 个; 升降散中共有 145 个化合物与 ACE2 进行分子对接的结合能数值小于 -29.3 kJ/mol, 其中大黄中的化合物有 91 个。推测大黄可能在升降散

发挥潜在抗 SARS-CoV-2 作用中具有较大贡献。分子对接的结果显示, 升降散与靶蛋白 SARS-CoV-2 3CL 水解酶、ACE2 结合力强的化合物群比较庞大, 可以预判升降散抗 SARS-CoV-2 的可能性大、作用好, 可能是一个复杂的化合物群发挥作用。

从分子对接分析结果可知, 综合评分较高的化合物大部分属于大黄中蒽酮和蒽醌类成分。《中国药典》2015 年版记述大黄具有“泻下攻积, 清热泻火, 凉血解毒, 逐瘀通经, 利湿退黄”的功效。大黄中具有泻下作用的活性成分主要是结合蒽醌类、蒽酮类^[17], 具有清热作用的主要是游离蒽醌类^[18], 这为升降散的君药为大黄之说提供了依据^[19]。升降散可能具有治疗 COVID-19 的潜在作用, 推测君药大黄的贡献度较大, 该结果还需要将来进行体内外活性研究进一步验证。

参考文献

- [1] World Health Organization. 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) [EB/OL]. [2020-02-12]. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/index.html>.
- [2] 凌馨, 刘曲. 世卫组织将新冠肺炎疫情全球风险级别上调至“非常高” [EB/OL]. [2020-02-29]. <http://world.people.com.cn/n1/2020/0229/c1002-31610462.html>.
- [3] 国家卫生健康委卫生应急办公室. 截至 2 月 28 日 24 时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况 [EB/OL]. [2020-02-23]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqfkdt/202002/4ef8b5221b4d4740bda3145ac37e68ed.shtml>.
- [4] 张再良. 疫病临床与伤寒六经——兼析新型冠状病毒肺炎中医治疗中的六经辨证 [J/OL]. 上海中医药杂志, [2020-02-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1276.R.20200222.2059.001.html>.
- [5] 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.
- [6] 张炜, 吴银根, 张惠勇, 等. 《上海市新型冠状病毒感染的肺炎中医诊疗方案 (试行)》解读 [J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(3): 1-4.
- [7] 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): 1-4.
- [8] Zhou J W, Wang Q Y, Xiang Z N, et al. Network pharmacology analysis of traditional Chinese medicine formula Xiao Ke Yin Shui treating type 2 diabetes mellitus [J]. *Evid-Based Compl Alternat Med*, 2019, doi: [org/10.1155/2019/4202563](https://doi.org/10.1155/2019/4202563).
- [9] Kim S. Getting the most out of PubChem for virtual

- screening [J]. *Exp Opin Drug Discov*, 2016, 11(9): 843-855.
- [10] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, *et al.* ETCM: An encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D976-D982.
- [11] Liu Z, Guo F, Wang Y, *et al.* BATMAN-TCM: A bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21146.
- [12] Zeng X, Zhang P, Wang Y, *et al.* CMAUP: A database of collective molecular activities of useful plants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(1): D1118-D1127.
- [13] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, *et al.* The GeneCards Suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinform*, 2016, 54(1): 1-33.
- [14] 陈 婧, 王文清, 施春阳, 等. 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 中医药防治的思考 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1106-1112.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Gong X H, Li Y, Zhang R Q, *et al.* The synergism mechanism of rhubarb anthraquinones on constipation elucidated by comparative pharmacokinetics of rhubarb extract between normal and diseased rats [J]. *Eur J Drug Metab Pharm*, 2015, 40(4): 379-384.
- [18] Azelmat J, Larente J F, Grenier D. The anthraquinone rhein exhibits synergistic antibacterial activity in association with metronidazole or natural compounds and attenuates virulence gene expression in *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Archiv Oral Biol*, 2015, 60(2): 342-346.
- [19] 刘培民, 张晓斌, 孔德坤. 升降散之君药为大黄论 [J]. 山东中医药大学学报, 2000, 24(4): 259.