

基于网络药理学和分子对接探讨清肺达原颗粒治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的作用机制

周珊珊¹, 李伟男^{2,3}, 艾中柱^{1*}, 王林群^{2,3}, 巴元明^{2,3*}

1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065

2. 湖北省中医院, 湖北 武汉 430061

3. 湖北省中医药研究院, 湖北 武汉 430074

摘要: **目的** 基于网络药理学与分子对接探讨清肺达原颗粒治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的主要活性成分、靶标及通路, 以期阐述其作用机制。 **方法** 通过 TCMSP、ETCM、YATCM 数据库检索清肺达原颗粒的中药化学成分, 以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 为阈值筛选潜在的活性化合物。通过 SIB、STITCH 数据库查询活性化合物对应的靶标, 利用 STRING 数据库获取蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络和网络拓扑参数, 导入 Cytoscape 3.6.0 对网络进行分析, 筛选关键靶标。通过 DAVID 进行基因本体 (GO) 功能富集分析、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析和组织富集 (tissue enrichment) 预测其作用机制。利用 AutoDock 将化合物与新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) S 蛋白受体结合结构域与血管紧张素转化酶 II (ACE2) 蛋白酶结构域复合物 (SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2) 进行分子对接。 **结果** 筛选得到清肺达原颗粒活性化合物 251 个, 对应靶点共 1 037 个; 筛选出关键靶标 107 个, 对应化合物 185 个, 关键靶点涉及 ESR1、AR、EGFR、KDR、MMP2 等, 与 ACE2 共表达基因 52 个。GO 功能富集分析结果显示清肺达原颗粒主要对细胞表面信号转导、分子功能、磷酸化和转录等生物学过程起调节作用, KEGG 通路富集主要涉及趋化因子信号通路、T 细胞受体信号通路、B 细胞受体信号通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒性和 Toll 样受体信号通路等。组织富集显示关键基因表达部位主要分布在肺及上皮细胞, 涉及多种免疫细胞, 如 T 细胞、B 细胞、淋巴细胞等。分子对接结果显示与 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 复合物亲和力较好的化合物主要来源于柴胡、党参、知母、甘草, 其中柴胡皂苷、甘草酸、知母皂苷与 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 复合物结合力较强, 可能为抗 SARS-CoV-2 的潜在活性成分。 **结论** 清肺达原颗粒具有多成分、多靶点、多途径的整体调控特点。其中柴胡皂苷、甘草酸、知母皂苷可能为抗 SARS-CoV-2 的潜在活性成分, 治疗 COVID-19 的作用机制可能与调控 ACE2 共表达的基因、调节炎症和免疫相关的信号通路、影响 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 复合物的稳定有关。

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 清肺达原颗粒; 网络药理学; 分子对接; 血管紧张素转化酶 II; S 蛋白; 柴胡皂苷; 甘草酸; 知母皂苷

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)07-1804-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.014

Investigating mechanism of Qingfei Dayuan Granules for treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking

ZHOU Shan-shan¹, LI Wei-nan^{2,3}, AI Zhong-zhu¹, WANG Lin-qun^{2,3}, BA Yuan-ming^{2,3}

1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China

3. Hubei Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430074, China

Abstract: Objective To explore the main active components, key targets and signaling pathways of Qingfei Dayuan Granules in treating of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking. **Methods** TCMSP, ETCM and YATCM databases were used to search the chemical constituents of Qingfei Dayuan Granules, and the threshold values of OB $\geq 30\%$ and DL \geq

收稿日期: 2020-02-24

基金项目: 湖北省科技厅新型肺炎应急科技攻关项目: 基于肺炎 1 号为主的中医药治疗新型冠状病毒肺炎的临床研究 (2020FCA007)

作者简介: 周珊珊, 博士研究生, 研究方向为中医药防治慢性肾脏疾病研究。E-mail: zhouss2009@126.com

*通信作者 巴元明, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治慢性肾脏疾病研究。E-mail: bayuanming@hbhtcm.com

艾中柱, 讲师, 博士, 研究方向为中药及其复方物质基础研究。E-mail: zeroai2009@126.com

0.18 were used to screen the potential active compounds. SIB and STITCH databases were used to query the targets corresponding to the active compounds, and the PPI network and network topology parameters were obtained by using STRING database. Cytoscape 3.6.0 was used to screen the hub targets. The key targets were analyzed by Gene Ontology (GO), the Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment and tissue enrichment using DAVID 6.8 software. The molecular docking was performed by AutoDock Tools 1.5.6 software. **Results** A total of 251 active compounds and 1 037 targets were obtained, 107 key targets and 185 corresponding compounds were screened. The key targets involved ESR1, AR, EGFR, KDR, MMP2, and 52 genes were coexpressed with ACE2. The results of GO function enrichment analysis showed that Qingfei Dayuan Granules mainly regulated the biological processes of cell surface signaling transduction, molecular function, phosphorylation and transcription. KEGG pathway enrichment mainly involved chemokine signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, natural killer cell mediated cytotoxicity and Toll like receptor signaling pathway. The results of tissue enrichment showed that the key gene expression sites were mainly in lung and epithelial cells, involving a variety of immune cells, such as T cells, B cells, lymphocytes, etc. Molecular docking showed that the compounds with good binding power to SARS-CoV-2-RBD-ACE2 complex in Qingfei Dayuan granules were mainly come from *Bupleuri Radix*, *Codonopsis Radix*, *Anemarrhenae Rhizoma*, and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. Saikosaponin, glycyrrhizic acid, anemarsaponin had good binding power with SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2, which may be potential active components against SARS-CoV-2. **Conclusion** Qingfei Dayuan Granules has the characteristics of multi-components, multi-targets and multi-pathway regulation. Saikosaponin, glycyrrhizic acid, and anemarsaponin may be the potential active components against SARS-CoV-2. The mechanisms of its treatment against COVID-19 may be related to the regulation of the co-expressed genes with ACE2, inhibition of inflammation and immune related signaling pathways, and the destruction of the complex structure of SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2.

Key words: coronavirus disease 2019; Qingfei Dayuan Granules; network pharmacology; molecular docking; angiotensin converting enzyme II; spike glycoprotein; saikosaponin; glycyrrhizic acid; anemarsaponin

2019 年 12 月以来,我国发生了由感染新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的急性肺炎疫情,世界卫生组织将新型冠状病毒肺炎正式命名为 coronavirus disease 2019 (COVID-19)。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)主要经呼吸道和密切接触传播,具有传染能力强、人群普遍易感的特点。早期以发热、干咳、乏力为主要表现,严重者可快速发展为多器官功能衰竭,甚至死亡^[1]。截至目前我国已累计 8 万余人确诊感染,重症患者超过 1 万,死亡人数达 3 千余人,对人类健康带来了巨大的威胁。西医尚无针对 COVID-19 的特效药物,目前临床以对症治疗为主,治疗炎症风暴的药物多考虑皮质激素,而化学药的使用在后期会出现一系列的不良反应^[2]。

中医药是中华民族的瑰宝,几千年来在与疫病的斗争中积累了丰富的经验^[3]。2020 年 1 月 25 日,习近平总书记主持中央政治局常委会会议,会议明确要求坚持中西医结合,使中医药进入防控疫情的主战场。随着中医药在临床治疗上的广泛介入,已有大量临床数据表明中医药对于轻症能有效缩短病程,提高治愈率;对于重症可延缓病情进展,促进患者康复^[4]。

湖北省作为疫情的主要爆发地,承担着疫情的重要防控工作。疫情发生后,在国医大师梅国强教授的指导下,湖北省中医院巴元明教授等专家积极

开展临床研究与调查,共同制定出“肺炎 1 号”方。临床数据表明,使用“肺炎 1 号”方等中西医结合方案能有效缓解 COVID-19 患者症状,主要表现为改善患者发热、干咳、乏力等症状,部分患者肺部 CT 显示炎症明显吸收,疗效确切。该方于 2020 年 2 月 13 日由湖北省防控指挥部科技攻关组推荐,正式对外公布^[5]。目前该方已获批医院制剂,同时根据湖北省防控指挥部的要求委托相关企业生产,“清肺达原颗粒”广泛用于湖北省中医院和相关定点医院的 COVID-19 患者的对症治疗^[6]。清肺达原颗粒由柴胡陷胸汤合达原饮加减而成,方药包括柴胡 20 g、黄芩 10 g、法半夏 10 g、党参 15 g、全瓜蒌 10 g、槟榔 10 g、草果 15 g、厚朴 15 g、知母 10 g、芍药 10 g、生甘草 10 g、陈皮 10 g、虎杖 10 g。全方具有和解少阳、化湿解毒之功效,用于少阳兼湿热壅肺证,症见发热、寒热往来,或午后发热明显,咳嗽,胸闷,乏力,纳差,舌质红或暗,苔厚或苔腻,脉滑数等。

网络药理学基于系统生物学和多向药理学研究理论,通过网络对生物信息进行整体、系统地分析,其研究策略符合中药多成分、多靶点、多途径的特点,有利于揭示中药复方的作用机制,从而为开发研制中医药成药提供科学指导。分子对接方法是利

用计算机技术, 研究药物分子与靶标之间的几何结构和空间相互作用, 更有针对性地探寻合适的药物。本研究拟通过网络药理学探寻清肺达原颗粒作用靶点的相关性, 并选取活性成分开展分子对接, 系统阐述清肺达原颗粒治疗 COVID-19 的作用机制。

1 方法

1.1 药物活性成分和靶点筛选

利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>), 获取清肺达原颗粒方中各药物化学成分, 并在 ETCM (<http://www.nrc.ac.cn:9090/ETCM/>) 数据库和 YATCM (<http://cadd.pharmacy.nankai.edu.cn/yatcm/home>) 数据库中补齐缺少的化合物。中药复方需通过吸收 (absorption)、分布 (distribution)、代谢 (metabolism) 和排泄 (excretion) 的药动学 (ADME) 过程发挥药效作用。因此以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 为阈值筛选出潜在的活性化合物, 并将筛选的化合物输入 SwissTargetPrediction (SIB, <http://www.swisstargetprediction.ch>) 数据库和 STITCH (<http://stitch.embl.de>) 数据库中获取化合物靶点, 筛选出 Probability ≥ 0.3 的靶基因。

1.2 化合物-靶点网络的构建

将上述得到的靶基因通过 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库规范基因名称, 将规范后的基因导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库, 下载蛋白相互作用信息, 将文件导入 Cytoscape 3.6.0 软件, 利用 Cytoscape 软件中 Network Analyzer 插件进行网络分析, 并获取网络拓扑参数, 筛选关键靶基因 (>2 倍平均度值), 将筛选出的靶基因和其对应的化合物导入 Cytoscape 3.6.0 软件构建中药-化合物-靶点网络图。

1.3 靶点富集分析

将上述筛选出的靶基因导入 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>) 数据库, 限定物种为人, 进行 KEGG 信号通路、GO 富集分析和组织富集分析, 将分析数据整理后, 利用 R 语言及 Cytoscape 软件对网络进行可视化。

1.4 活性化合物与 SARS-CoV-2 S 蛋白受体结合结构域与血管紧张素转化酶 II (ACE2) 蛋白酶结构域复合物 (SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2) 分子对接

将 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 (图 1) 于国家微生物科学数据中心 (<http://nmdc.cn/#/resource/detail?no=NMDCS0000001>) 下载后导入 Pymol 软

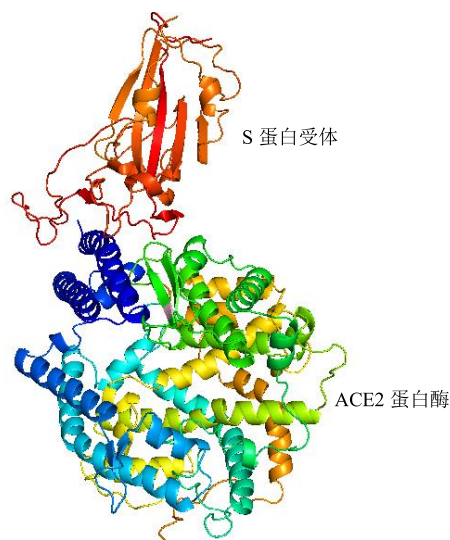


图 1 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 结构

Fig. 1 Complex structure of SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2

件, 删除水分子, 添加氢, 保存为 PDB 格式文件。采用 AutoDock Tools 1.5.6 软件, 导入蛋白, 设置 Grid Box 最大值, 运行 AutoGrid 预算原子的亲和力。选取清肺达原颗粒主要化合物, 导入 Pubchem 数据库中下载活性成分的结构式, 导入 Pymol 中检查无误后转化为 PDB 格式。将化合物导入 AutoDock Tools 1.5.6 软件, 确认柔性键可旋转, 保存为 pdbqt 格式文件, 作为对接配体。运行 AutoDock 软件进行分子对接, 对得到的结果进行分析处理。

2 结果

2.1 活性化合物筛选

通过上述数据库分别检索清肺达原颗粒中 13 味中药的化合物, 根据 OB 和 DL 值共筛选出 251 个化合物, 其中柴胡 17 个、黄芩 36 个、半夏 13 个、党参 21 个、瓜蒌 11 个、槟榔 8 个、草果 8 个、厚朴 2 个、知母 15 个、白芍 13 个、甘草 92 个、陈皮 5 个、虎杖 10 个。部分化合物基本信息见表 1。

2.2 化合物-靶点相互作用网络构建

将获取的化合物靶标整合并按条件筛选合并后共得到 1 037 个靶点, 导入 STRING 数据库中, 得到蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 关系网络, 该网络中边 (edge) 24 235 条, 节点 (node) 992 个, 平均度值 (degree) 为 48.9。下载 PPI 信息, 将文件导入 Cytoscape 软件中, 根据网络拓扑参数筛选出大于 2 倍平均度值的靶点, 这些靶点在网络中起到枢纽作用, 共得到关键靶标 107 个, 关键靶标对应的化合物共 185 个。

表 1 清肺达原颗粒中部分活性化合物信息

Table 1 Basic information of active compounds in Qingfei Dayuan Granules

药材	编号	化合物	相对分子质量	OB/%	DL
柴胡	MOL013187	萆澄茄苦素 (cubebin)	356.40	57.13	0.64
	MOL004644	sainfuran	286.30	79.91	0.23
	MOL004718	α -菠菜甾醇 (α -spinasterol)	412.77	42.98	0.76
	MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	412.77	43.83	0.76
	MOL004702	柴胡皂苷 C (saikosaponin C)	943.26	30.50	0.63
黄芩	MOL002934	黄芩新素 (neobaicalein)	374.37	104.34	0.44
	MOL002932	黄芩黄酮 I (panicolin)	314.31	76.26	0.29
	MOL012246	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	302.30	74.24	0.26
	MOL002927	黄芩黄酮 II (skullcapflavone II)	374.37	69.51	0.44
	MOL002714	黄芩素 (baicalein)	270.25	33.52	0.21
半夏	MOL006957	(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3-(benzyl)-6-(4-hydroxybenzyl) piperazine-2,5-quinone	310.38	46.89	0.27
	MOL006967	β -D-ribofuranoside, xanthine-9	284.26	44.72	0.21
	MOL000358	β -谷甾醇 (β -sitosterol)	414.79	36.91	0.75
党参	MOL002140	黑麦草碱 (perlolyrine)	264.30	65.95	0.27
	MOL005321	灌木远志酮 A (frutinone A)	264.24	65.90	0.34
	MOL008400	甘氨酸 (glycitein)	284.28	50.48	0.24
	MOL008397	曼陀罗灵 (daturilin)	436.64	50.37	0.77
瓜蒌	MOL007179	亚麻酸乙酯 (linolenic acid ethyl ester)	306.54	46.10	0.20
	MOL007165	10 α -cucurbita-5,24-diene-3 β -ol	426.80	44.02	0.74
	MOL007175	karounidiol 3-o-benzoate	544.89	43.99	0.50
槟榔	MOL000004	原花青素 B1 (procyanidin B1)	578.56	67.87	0.66
	MOL000073	表儿茶素 (ent-epicatechin)	290.29	48.96	0.24
	MOL010485	二十碳五烯酸 (EPA)	302.50	45.66	0.21
草果	MOL000074	(4 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-1,7-bis(4-hydroxyphenyl) hepta-4,6-dien-3-one	294.37	67.92	0.24
	MOL000096	(-)-儿茶素 [(-)-catechin]	290.29	49.68	0.24
	MOL000085	β -胡萝卜素 (β -daucosterol _{qt})	414.79	36.91	0.75
厚朴	MOL005970	桉叶油醇 (eucalyptol)	266.36	60.62	0.32
	MOL005980	新橙皮苷 (neohesperidin)	302.30	57.44	0.27
知母	MOL000483	(<i>Z</i>)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)- <i>N</i> -[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl] acrylamide	313.38	118.35	0.26
	MOL000631	香豆酰酪胺 (coumaroyltyramine)	283.35	112.90	0.20
	MOL000546	薯蓣皂苷元 (diosgenin)	414.69	80.88	0.81
	MOL004541	知母皂苷 E (anemarsaponin E)	935.24	30.67	0.86
	MOL004492	菊黄质 (chrysanthemaxanthin)	584.96	38.72	0.58
白芍	MOL001918	芍药苷 (paeoniflorgenone)	318.35	87.59	0.37
	MOL001925	芍药苷元 (paeoniflorin _{qt})	318.35	68.18	0.40
	MOL001928	芍药内酯苷元 (albiflorin _{qt})	318.35	66.64	0.33
	MOL000422	山柰酚 (kaemferol)	286.25	41.88	0.24
	甘草	MOL002311	甘草酚 (glycyrol)	366.39	90.78
MOL004990		7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-aryl coumarin	300.28	83.71	0.27
MOL004905		甘草香豆素 (licopyranocoumarin)	384.41	80.36	0.65
MOL004891		甘草素 (shinpterocarpin)	322.38	80.30	0.73
MOL005017		phaseol	336.36	78.77	0.58
陈皮	MOL004810	粗毛甘草素 F (glyasperin F)	354.38	75.84	0.54
	MOL005815	柠檬酸 (citromitin)	404.45	86.90	0.51
虎杖	MOL005828	川陈皮素 (nobiletin)	402.43	61.67	0.52
	MOL013287	毒扁豆次碱 (physovenine)	262.34	106.21	0.19
	MOL013288	鸭脚树叶醛碱 (picralinal)	366.45	58.01	0.75
	MOL000492	(+)-儿茶素 [(+)-catechin]	290.29	54.83	0.24

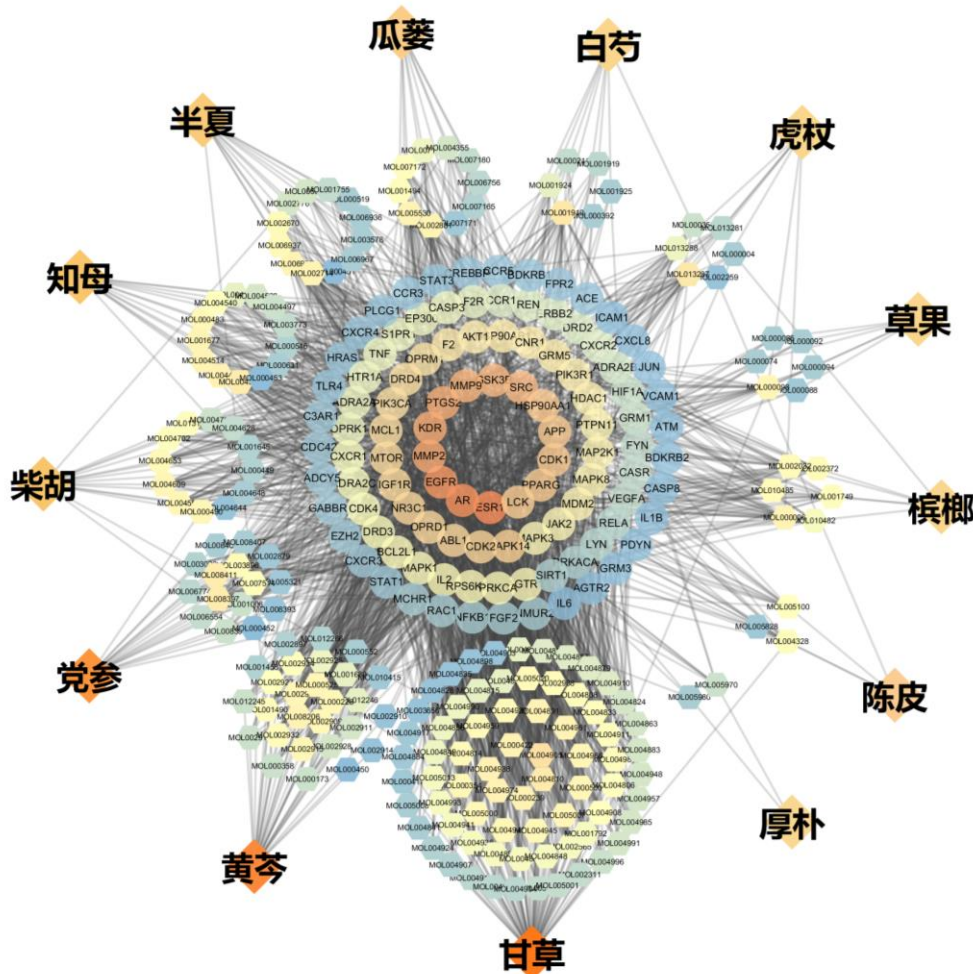
有研究表明 ACE2 是 SARS-CoV-2 感染人体的关键结合靶点^[7], ACE2 广泛分布于结肠上皮细胞, 也在肺、肾脏等器官有分布。相关研究表明^[8], 通过对结肠上皮细胞单细胞测序得到 ACE2 共表达基因有 5 556 个, 将 107 个关键基因与其取交集, 发现有 52 个基因为 ACE2 共表达基因。

将关键靶标及对应的化合物和中药导入到 Cytoscape 软件中, 构建中药-化合物-靶点网络, 见图 2。网络中节点颜色由蓝色向黄色、橙色转变程度与度值成正比。网络节点的度表示网络中和节点关联的边的数目。这些连接中药、化合物或靶点较多的节点在整个网络中起到枢纽的作用, 可能是关键的化合物或者靶点。其中甘草、黄芩、党参、柴胡的化合物最多, 其余依次为知母、半夏、瓜蒌、

白芍、虎杖、草果、槟榔、陈皮、厚朴。化合物中槲皮素 (来源于甘草、草果、柴胡、虎杖)、山柰酚 (来源于柴胡、知母、白芍、甘草)、黄芩苷 (来源于柴胡、半夏) 等化合物来源于清肺达原颗粒方中的多味中药。排名前 5 位的基因分别为 ESR1、AR、EGFR、KDR、MMP2。

2.3 清肺达原颗粒关键靶点的富集分析

2.3.1 GO 富集分析 将得到的 107 个关键靶点导入 DAVID 数据库中进行 GO 富集分析, GO 富集分析分 3 个模块, 分别为生物学过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。以 $P < 0.01$ 为阈值, 以 count 值排序, 分别筛选前 15 条 GO 条目, 绘制柱状图, 见图 3-A。其中纵坐标为 GO 条



图中圆形节点代表基因, 六边形节点代表化合物, 菱形节点代表中药, 节点颜色由橙色-黄色-蓝色变化与节点度值成正比
Circular nodes represent gene, 6-sided node represent compound, diamond nodes represent traditional Chinese medicine, nodes color change from blue-yellow-orange are proportional to nodes degree

图 2 清肺达原颗粒的中药-化合物-靶点网络

Fig. 2 Traditional Chinese medicine-compound-target network map of Qingfei Dayuan Granules

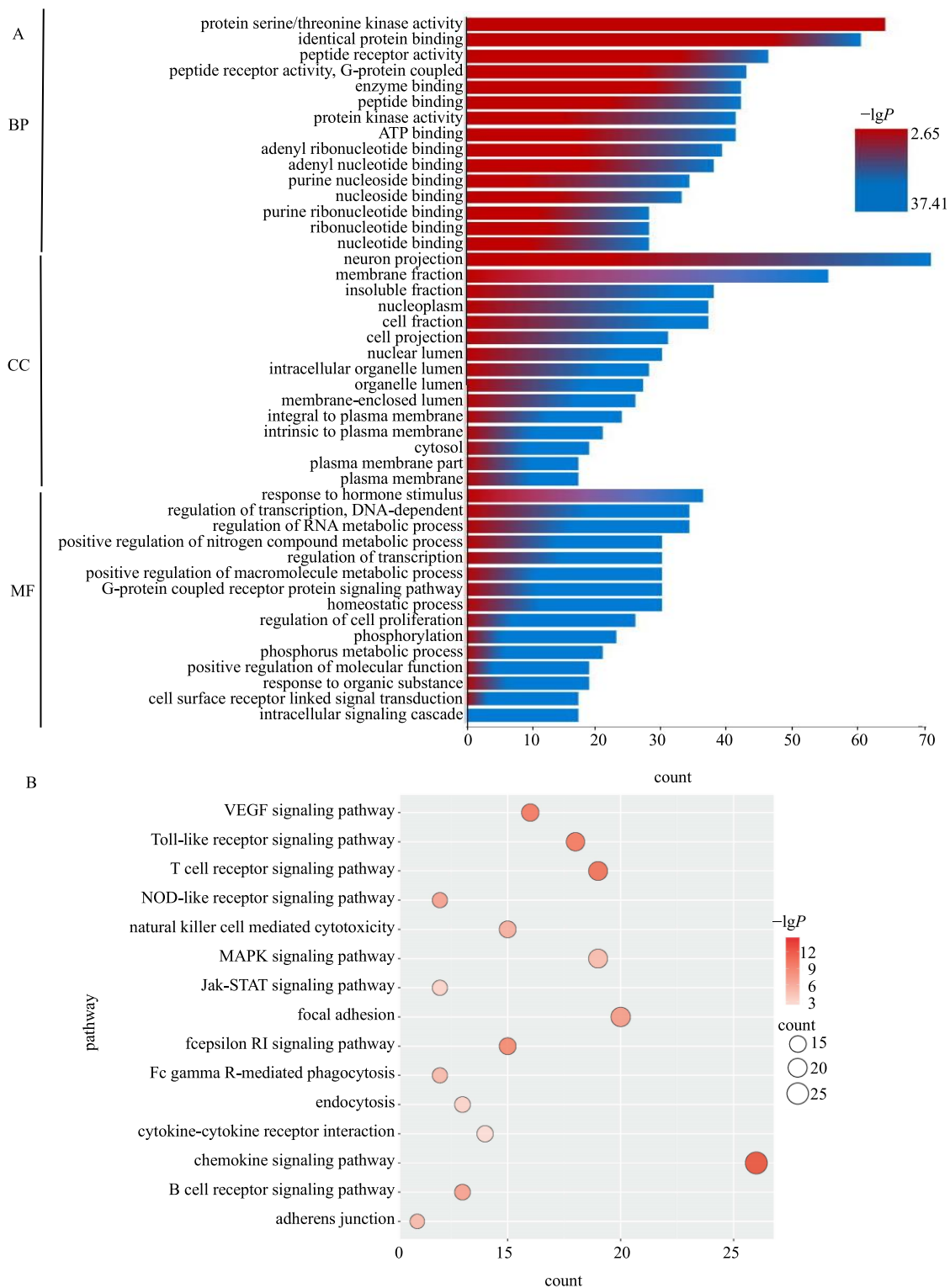


图 3 GO (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of GO (A) and KEGG pathways (B)

目名称，横坐标为基因数 count 值，其值表示富集在该 GO 条目上的靶点数。条目颜色代表 P 值，以 $-\lg P$ 表示。在生物过程中靶点主要涉及细胞内信号

级联 (intracellular signaling cascade)、细胞表面受体连接信号 (cell surface receptor linked signal) 和转录调节 (transduction regulation of transcription); 在

细胞组分中，靶点主要涉及质膜（plasma membrane）、细胞溶质（cytosol）和细胞器腔（organelle lumen）；在分子功能中主要涉及核苷酸结合（nucleotide binding）、嘌呤核苷酸结合（purine ribonucleotide binding）和核糖核苷酸结合（ribonucleotide binding）。

2.3.2 KEGG 通路富集分析 通过 KEGG 通路富集分析靶点信号通路，以 $P < 0.01$ 为阈值，依据 count 值排序，绘制出的 15 条信号通路中，有多条与免疫和炎症相关的通路。其中包括 B cell receptor signaling pathway、T cell receptor signaling pathway、natural killer cell mediated cytotoxicity、chemokine signaling pathway 和 Toll-like receptor signaling pathway 等。依据结果绘制高级气泡图，纵坐标为信号通路，横坐标为 count 值，其值表示富集在信号通路上的靶点数，气泡越大，富集靶点越多。气泡颜色代表 P 值，以 $-\lg P$ 表示，见图 3-B。

2.3.3 组织富集分析 进一步对关键靶点进行组织富集分析。如图 4 所示，107 个关键靶基因在肺部

富集最多，共映射有 33 个，其次为上皮细胞 32 个、血液 20 个、血小板 13 个、大脑 7 个、T 细胞 7 个、B 细胞 6 个、单核细胞 5 个、淋巴细胞 3 个。表明清肺达原颗粒的活性成分的关键靶点主要在肺组织、上皮细胞和免疫细胞中表达。

2.4 清肺达原颗粒活性成分与 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 分子对接结果分析

本研究结合网络药理学筛选的化合物以及相关文献研究^[9-10]，选取 56 个化合物与靶点蛋白开展对接研究。通常认为受体与配体结合构象越稳定，能量越低，越容易结合产生作用。将结合能 ≤ -6.0 kJ/mol 作为筛选标准。分析结果显示，纳入筛选的 56 个化合物中，与 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 的分子对接能小于 -6.0 kJ/mol 的有 49 个，表明清肺达原颗粒的主要活性成分与 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 有较好的结合活性。化合物主要来源于柴胡、党参、知母、甘草，其中柴胡皂苷、甘草酸、知母皂苷与 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 有较好的结合力，结果见表 2 和图 5。

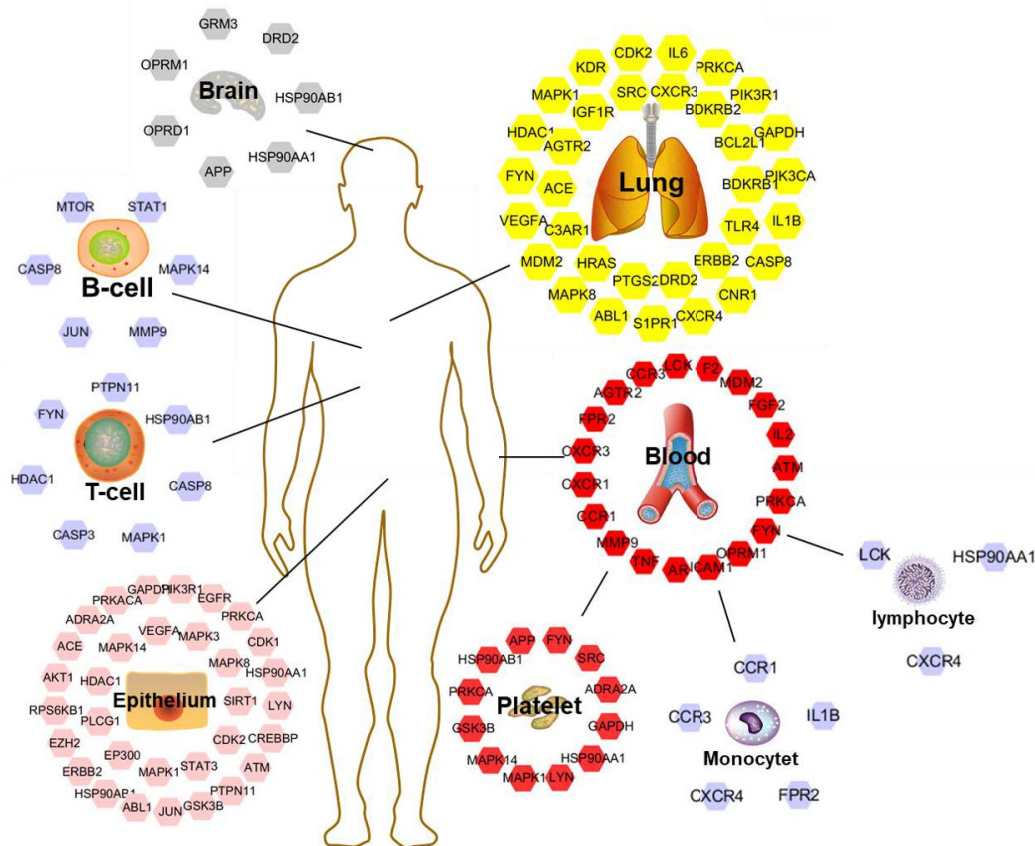


图 4 组织富集分析

Fig. 4 Tissue enrichment analysis

表 2 清肺达原颗粒部分化合物的结合能

Table 2 Binding energy value of compounds in Qingfei Dayuan Granules

化合物	化学式	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
柴胡皂苷 C	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	-32.21
知母皂苷 E	C ₄₆ H ₇₈ O ₁₉	-28.42
知母皂苷 B	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈	-18.67
柴胡皂苷 B3	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	-27.53
甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	-23.73
山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-15.35
党参苷 I	C ₂₉ H ₄₂ O ₁₈	-20.14
柴胡皂苷 F	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₇	-23.35
黄芩素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-16.73
菊黄质	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	-18.24

3 讨论

COVID-19 属中医“温疫”范畴。明·吴又可《温疫论·原序》曰：“夫瘟疫之为病，非风非寒非暑非湿，乃天地间别有一种异气所感”，指出疠气为有别于六淫、具有强烈传染性的外感病邪。《温病条辨》中提到“温疫者，厉气流行，多兼秽浊”。湖北省地处亚热带，江河湖泊众多，素有“千湖之省”之称，大部分地区属亚热带季风性湿润气候。另外，就发病季节而言，正值冬春交际，气候湿冷。故 COVID-19 病因当属疠气夹湿。从病机来看，《温疫论》中提到“疫者感天地之疠气……邪从口鼻而入，则其所客，内不在脏腑，外不在经络，舍于伏膂之内，去表不远，附近于胃，乃表里之分界，是为

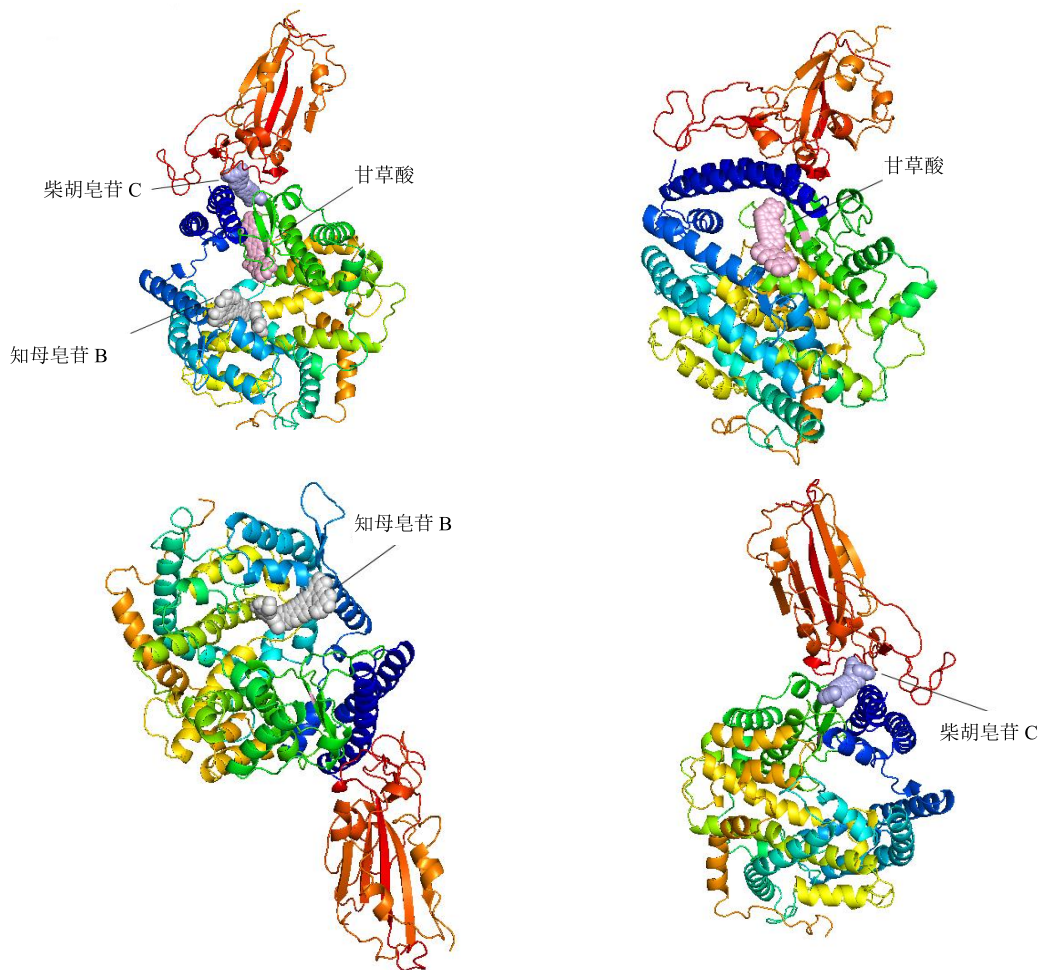


图 5 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 复合物与柴胡皂苷 C、甘草酸和知母皂苷 B 的相互作用

Fig. 5 Diagrams of interaction between SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 complex and saikosaponin C, glycyrrhizic acid and anemarsaponin B

半表半里，即《针经》所谓‘横连膜原’者也”。湿疫秽浊之邪气侵袭人体，从口鼻入，伏于膜原，表气不通，里气不达，湿遏热伏。又因邪伏膜原证之

热邪可溢三阳之经而不在表，邪热内盛而不入阳明之腑，故亦属少阳经之半表半里之位^[1]。清肺达原颗粒系由达原饮合柴胡陷胸汤加减而成。其中达原

饮出自明代医家吴又可的《温疫论》，为瘟疫秽浊毒邪伏于膜原之要方，具有开达膜原、避秽化浊之功效。柴胡陷胸汤为陶节庵、俞根初等医家历经推敲，于《重订通俗伤寒论》定名为柴陷汤，实为《伤寒论》中小柴胡汤合小陷胸汤而成的“和解兼开降”之方，能清热祛湿、化痰消痞，兼透半表半里之邪。国医大师梅国强教授临证加减多用于治疗发热性疾病、呼吸系统疾病、消化系统疾病及心血管系统疾病，临床疗效确切^[12]。此次疫情爆发以来，梅教授根据 COVID-19 患者临床表现，拟定了由达原饮合柴胡陷胸汤而成的清肺达原颗粒，诸药合用，能避秽化浊、开达膜原、和解少阳、化湿解毒。目前该方已广泛用于临床治疗 COVID-19。本研究基于网络药理学和分子对接技术，系统地分析了清肺达原颗粒治疗 COVID-19 的分子机制。

利用数据库对清肺达原颗粒中 13 味中药的活性成分进行挖掘，共得到 251 个活性化合物，对应 1 037 个靶标，筛选出 107 个关键靶标。通过构建中药-靶标-活性成分网络，发现活性化合物主要来源于甘草、黄芩、党参、柴胡、知母。由网络可以看出中药含有多种化合物，相同的化合物可来源于不同的中药；1 个化合物可对应多个靶标，同一靶标可对应不同化合物，充分体现了中药多成分、多靶点的作用特点。GO 功能富集分析发现，清肺达原颗粒方中活性成分主要对细胞表面信号转导、分子功能、磷酸化和转录等生物学过程起调节作用。KEGG 通路富集分析发现该复方主要调控趋化因子信号通路 (chemokine signaling pathway)、T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway)、B 细胞受体信号通路 (B cell receptor signaling pathway)、自然杀伤细胞介导的细胞毒性 (natural killer cell mediated cytotoxicity) 和 Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway)，这些信号通路主要与人体自身免疫及炎症相关，说明清肺达原颗粒对 COVID-19 治疗可能是通过调节这些信号通路从而抑制炎症因子的活化，缓解机体过激的免疫反应从而发挥抗炎作用。通过进一步对靶蛋白的组织富集分析发现，基因主要映射在肺组织和上皮细胞，此外在多种免疫细胞如淋巴细胞、B 细胞、T 细胞中表达。

斯坦福大学相关学者^[13]发现，SARS-CoV-2 S 蛋白受体结合结构域或附近的 2 个潜在的中和 B 细胞表位、中和抗体可以完全阻止病毒进入人体细胞，

已知的 SARS-CoV-2 受体有 ACE2，破坏其与 ACE2 的结合，病毒则无法侵入人体。除中和抗体外，人体还依赖于 CD8 T 细胞和辅助 CD4 T 细胞来清除病毒。已有研究提出 SARS-CoV-2 感染人体的关键在于 SARS-CoV-2 表面的 S 蛋白与人体 ACE2 蛋白的结合，即病毒通过其表面 S 蛋白与 ACE2 结合从而侵入人体^[14]，清肺达原颗粒方中有 52 个基因为 ACE2 的共表达基因。因此，清肺达原颗粒可能通过调控与 ACE2 共表达的基因，从而影响 S 蛋白与 ACE2 的结合。

S 蛋白全称为刺突糖蛋白 (spike glycoprotein)，位于 SARS-CoV-2 最外层，已有研究解析出 SARS-CoV-2 S 蛋白以三聚体形态存在，每个单体中约有 1 300 多个氨基酸，其中有 300 多个氨基酸构成了受体结合结构域^[15]，即 S 蛋白与 ACE2 相连接的地方。S 蛋白相当于 SARS-CoV-2 感染人体的钥匙，ACE2 则相当于病毒感染机体的锁，影响二者的结合力或影响其复合物结构的稳定，可能为抑制 SARS-CoV-2 感染人体的方式。因此，本研究选取清肺达原颗粒方中的化合物与 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 进行分子对接。通过相关文献发现，柴胡、党参、知母、甘草等中药均报道有抗病毒作用，其中皂苷和黄酮类抗病毒报道较多，包括甘草皂苷^[9]和柴胡皂苷^[10]等。因此本研究结合网络药理学筛选的化合物以及相关文献研究，选取 56 个化合物与靶点蛋白开展对接研究。通过分子对接发现，柴胡、知母、党参和甘草中的多数活性化合物均与复合物有效结合，尤其是皂苷等大分子结合能小，对接效果好。其中柴胡皂苷 (C、F)、知母皂苷 (B、E) 以及甘草酸与复合物有较好的结合力。有研究发现柴胡皂苷对甲型流感病毒具有抑制作用^[10]，知母皂苷对呼吸道合胞病毒具有抑制作用^[16]，甘草酸可以抑制 2 型人副流感病毒复制^[17]，基于相关文献及分子对接的结果，柴胡皂苷、知母皂苷及甘草酸可能为抗 SARS-CoV-2 的潜在活性成分，其作用机制可能是通过影响 SARS-CoV-2 S 蛋白受体结构域与 ACE2 蛋白结构域复合物结构的稳定从而起到抗病毒的作用。

综上所述，本研究通过网络药理学方法对清肺达原颗粒中化学成分、作用靶点和通路进行了系统地分析，并结合分子对接技术将复方中活性化合物与 SARS-CoV-2-S-RBD-ACE2 的结合能进行了研究。从分子水平阐述了该方多成分、多靶标、多途

径的作用机制,并揭示了清肺达原颗粒治疗 COVID-19 的可能活性成分,为后期深入研究清肺达原颗粒抗 SARS-CoV-2 的化学成分及活性机制具有一定的指导意义,也为临床运用该复方治疗 COVID-19 提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] Huang C, Wang Y, Li X, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [2] 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.
- [3] 江 泳. 中医疫病概念考 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(10): 1060-1062.
- [4] 陈 瑞, 罗亚萍, 徐勋华, 等. 基于武汉地区 52 例新型冠状病毒肺炎的中医证治初探及典型病案分析 [J/OL]. *中医杂志*, [2020-02-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200220.1443.002.html>.
- [5] 湖北省人民政府. 鄂版药方“肺炎 1 号”正式公布 [EB/OL]. [2020-02-14]. http://www.hubei.gov.cn/zhuanti/2020/gzxxgzbd/zxtb/202002/t20200214_2027698.shtml.
- [6] 湖北省人民政府. 武汉健民连夜开工生产“肺炎 1 号” [EB/OL]. [2020-02-17]. http://www.hubei.gov.cn/hbfb/bmdt/202002/t20200217_2039397.shtml.
- [7] Yan R H, Zhang Y Y, Guo Y Y, *et al.* Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 [J]. *BioRxiv*, 2020, doi: 10.1126/science.abb2762.
- [8] Wang J, Zhao S, Liu M, *et al.* ACE2 expression by colonic epithelial cells is associated with viral infection, immunity and energy metabolism [J]. *Med Rxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.02.05.20020545.
- [9] Bentz G L, Lowrey A J, Horne D C, *et al.* Using glycyrrhizic acid to target sumoylation processes during Epstein-Barr virus latency [J]. *PLoS One*. 2019, 14(5): e0217578.
- [10] 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.
- [11] 李振明, 李守伟. “邪伏膜原”与达原饮之应用 [J]. *湖北中医杂志*, 1998(6): 40-41.
- [12] 王海燕, 梅国强. 梅国强教授运用柴胡陷胸汤辨治经验述要 [J]. *新中医*, 2012, 44(12): 180-181.
- [13] Fast E, Chen B B. Potential T-cell and B-cell epitopes of 2019-nCoV [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.02.19.955484.
- [14] Lan J, Ge J W, Yu J F, *et al.* Crystal structure of the 2019-nCoV spike receptor-binding domain bound with the ACE2 receptor [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.02.19.956235.
- [15] Wrapp D, Wang N, Corbet K S, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV Spike in the prefusion conformation. [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [16] Toun U J, Jang J E, Nam J W, *et al.* Anti-respiratory syncytial virus (RSV) activity of timosaponin A-III from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* [J]. *J Med Plant Res*, 2011, 5(7): 1062-1065.
- [17] Sakai-Sugino K, Uematsu J, Kamada M, *et al.* Glycyrrhizin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication by the inhibition of genome RNA, mRNA and protein syntheses [J]. *Drug Discov Ther*, 2017, 11(5): 246-252.