

基于计算机辅助药物设计的清肺排毒汤多靶点系统治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 物质基础探究

靳晓杰^{1,2}, 关瑞宁¹, 毛建军¹, 王燕如², 王 菲¹, 李潮新¹, 李佳蔚², 刘东玲^{1,2}, 张志明⁴, 刘永琦^{2,3*}

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃中医药大学 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室, 甘肃 兰州 730000

3. 敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730000

4. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 通过对清肺排毒汤功效和新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 病机的分析, 基于计算机辅助药物设计 (CADD) 从多靶点结构出发系统探索清肺排毒汤排毒、抑制炎症风暴、利水渗湿 3 个方面的物质基础和分子机制。**方法** TCMS 下载清肺排毒汤成分, 基于血管紧张素转化酶 II (ACE2)、白细胞介素-6 受体 (IL-6R) 和水通道蛋白 (AQP) 分别进行分子对接虚拟筛选并对其结合模式进行分析。对利水药白术、茯苓、猪苓、泽泻进行反向靶点预测和 GO 分析和 KEGG 通路富集分析, 预测其作用机制。**结果** 阻断病毒作用最突出的前 3 位中药为甘草、麻黄、枳实, 抑制炎症作用最突出的前 3 位中药是甘草、柴胡、紫菀; 清肺排毒汤 4 个子方中, 小柴胡汤阻断病毒、抑制炎症风暴的潜在活性化合物数均排第 1。槲皮素及其衍生物对 ACE2 和 IL-6R 2 个靶点均具有较强结合能力, 是潜在的双靶点活性化合物。ACE2 的 Lys 353 残基是化合物与 ACE2 结合的关键位点。白术、茯苓、猪苓、泽泻缺乏阻断病毒、抑制炎症风暴的化合物, 分子对接结果显示, 这 4 味药材中含有的东莨菪内酯、去氢齿孔酸、 α -D-半乳糖、环氧泽泻烯具有与水通道蛋白 4 (AQP4) 的潜在结合能力。**结论** 清肺排毒汤可通过多种化合物分别与 ACE2、IL-6R、AQP4 结合, 发挥排毒、抑制炎症风暴、利水渗湿的作用; 各组成子方配伍合理, 通过多点协同、优势互补发挥防治作用; 得到了中药阻断新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 成分关键的结合位点 Lys 353, 为清肺排毒汤药效机制的多角度挖掘和单体成分的现代化开发提供线索。

关键词: 清肺排毒汤; 计算机辅助药物设计; 新型冠状病毒肺炎; 水通道蛋白 4; 白细胞介素-6 受体; 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)08-1984-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.002

Exploration on material basis of Qingfei Paidu Decoction with multi-target system against COVID-19 based on CADD

JIN Xiao-jie^{1,2}, GUAN Rui-ning¹, MAO Jian-jun¹, WANG Yan-ru², WANG Fei¹, LI Chao-xin¹, LI Jia-wei², LIU Dong-ling^{1,2}, ZHANG Zhi-ming⁴, LIU Yong-qi^{2,3}

1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Gansu University Key Laboratory for Molecular Medicine & Chinese Medicine Prevention and Treatment of Major Diseases, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

3. Dunhuang Key Laboratory of Medicine and Transformation, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China

4. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective Based on the multi-target structure of computer aided drug design (CADD), the material basis and molecular mechanism of QPD were systematically discussed from three aspects of detoxification, anti-inflammatory storm and promoting

收稿日期: 2020-03-05

基金项目: 甘肃省新型冠状病毒肺炎 (NCP) 科技重大专项 (2020); 2020 年度甘肃中医药大学新型冠状病毒感染的肺炎应急防治专项项目 (2020XGZX-01, 2020XGZX-02); 甘肃省高等学校科研项目 (2017A-048); 2020 年度甘肃省重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室新型冠状病毒防治研究专项开放基金资助项目 (FZYX20-1, FZYX20-2, FZYX20-3)

作者简介: 靳晓杰, 硕士生导师, 副教授, 主要从事计算机辅助药物设计与中药现代化研究。Tel: 13919839318 E-mail: jinlovedream@163.com

***通信作者** 刘永琦, 主要从事中医药免疫与干细胞生物学研究。Tel: 13919019578 E-mail: liuyongqi73@163.com

urination and draining dampness, so as to analyze the efficacy of Qingfei Paidu Decoction (QPD) and the pathogenesis of COVID-19.

Methods Compounds of QPD were downloaded from TCMSP, and molecular docking virtual screening was conducted based on angiotensin-converting enzyme II (ACE2), interleukin-6 receptor (IL-6R), and aquaporins (AQP), and their binding patterns were analyzed; Reverse target prediction, GO function enrichment analysis, and KEGG pathway enrichment analysis were carried out for *Atractylodes macrocephala*, *Poria cocos*, *Polyporus umbellatus*, *Alisma orientale*, and the mechanism of action was predicted.

Results The most prominent drugs to block the virus were *Glycyrrhiza uralensis*, *Ephedra sinica* and *Citrus aurantium*; While the top three with inhibiting the inflammation effects were *G. uralensis*, *Bupleurum chinense*, and *Asteris tataricus*. Among the four sub-prescriptions of QPD, Xiaochaihu Decoction ranked first in the number of potentially active compounds to block virus and suppress inflammatory storm. Quercetin and its derivatives had high binding ability to ACE2 and IL-6R targets, which were potential dual-target active compounds. Lys 353 of ACE2 was the key site of ACE2 binding in Chinese medicine monomer compound. *Atractylodes macrocephala*, *Poria cocos*, *Polyporus umbellatus* and *Alisma orientale* lacked compounds that blocked viruses and suppressed inflammatory storms, but scopoletin, dehydroeburicoic acid, α -D-galactose, and alismoxide in these four herbs had potential binding ability with AQP4. **Conclusion** QPD can play the role of detoxification, suppression of inflammatory storm, and promoting urination and draining dampness in the treatment of COVID-19 by combining with ACE2, IL-6R and AQP4. Each component of the sub-medical prescription is reasonable compatibility, through multi-point cooperation, complementary advantages to play the role of prevention and cure; Blocking the key binding site of the virus, Lys 353, is known, which provides clues for the multi-angle exploration of the pharmacodynamic mechanism of QFPDT and the modern development of monomers.

Key words: Qingfei Paidu Decoction; computer aided drug design (CADD); COVID-19; AQP4; IL-6R; ACE2

研究已证实新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 通过血管紧张素转化酶 II (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 进入人体细胞造成感染。因此, ACE2 是抑制 SARS-CoV-2 感染的关键靶点^[1]。SARS-CoV-2 轻度感染患者出现发热、乏力、干咳等症状, 严重者可出现呼吸困难、急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 临床调查表明新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的严重程度与机体炎症反应的强度相关^[2]。如患者体内出现过度的炎症反应, 即“细胞因子风暴 (cytokine storm)”, 将可能导致严重的后果甚至死亡。细胞因子风暴在其他致病性冠状病毒感染疾病中也是导致多器官衰竭、预后不良的重要因素^[3]。

白细胞介素-6 (IL-6) 是引发炎症风暴的关键细胞因子^[4], 阻断 IL-6 与其受体的结合可以抑制炎症风暴, 从而达到控制病情的效果。因此白细胞介素-6 受体 (IL-6R) 是抑制炎症风暴的关键靶点。

清肺排毒汤是国家中医药管理局组织筛选得到的防治 COVID-19 的推荐方^[5], 由汉代张仲景所著《伤寒杂病论》中多个治疗由寒邪引起的外感热病的经典方剂优化组合而成^[6], 在临床上取得了显著疗效。据统计, 截至 2020 年 2 月 5 日 0 时, 4 个试点省份运用清肺排毒汤救治 COVID-19 确诊病例 214 例, 3 d 为 1 个疗程, 总有效率达 90% 以上, 其中 60% 以上患者症状和影像学表现改善明显, 30% 患者症状平稳且无加重^[7]。通过对清肺排毒汤功效和

COVID-19 病机的分析, 清肺排毒汤治疗 COVID-19 应该体现在排毒、抑制炎症风暴、利水渗湿等方面。

本研究从 ACE2 和 IL-6R 2 个靶点结构出发, 采用分子对接筛选研究, 获得了清肺排毒汤“排毒”和“控制炎症风暴”的物质基础以及分子机制。然后依据结果, 对清肺排毒汤方之一的五苓散中白术、茯苓、猪苓、泽泻 4 味利水渗湿药通过反向对接和 GO 分析、KEGG 分析方法进行了作用机制的探索, 同时通过分子对接方法筛选了其成分与水通道蛋白 4 (aquaporins 4, AQP4) 的结合能力, 初步得到了该方“利水渗湿”的物质基础和分子机制。

1 材料与方法

1.1 清肺排毒汤成分收集

在中药系统药理学分析平台^[8] (TCMSP) (<http://tcmsp.com/>), 以“细辛”“桂枝”“生姜”“麻黄”“柴胡”“石膏”“射干”“黄芩”“紫菀”“半夏”“冬花”“陈皮”“枳实”“猪苓”“泽泻”“茯苓”“白术”“杏仁”“山药”“甘草”“藿香”为关键词检索清肺排毒汤化学成分。

1.2 蛋白晶体结构选择和处理

本研究选择 ACE2 与 SARS-CoV-2 S 蛋白晶体结构 (PDB: 2AJF)^[9]、IL-6R (PDB: 1P9M)^[10] 作为虚拟筛选靶点结构。晶体结构获取自 RCSB 蛋白质数据库 (www.rcsb.org)。根据 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 与 ACE2 结合模式, 选择热点残基 Gln 24、Thr 27、Lys 31、His 34、Glu 37、Asp 38、Tyr 41、

Gln 42、Leu 45、Leu 79、Met 82、Tyr 83、Asn 90、Gln 325、Glu 329、Asn 330、Lys 353 和 Gly 354 作为分子对接格点生成的依据^[9]。IL-6R 依据 IL-6 与 IL-6R 结合的热点残基 Phe 229、Phe 279 产生格点^[10]。

1.3 分子对接

使用 Glide 的标准精度方法(standard precision, SP) 进行分子对接。下载“1.2”项下所述蛋白结构并对其进行预处理。将“1.1”项下收集的小分子结构用 LigPrep v2.3 进行处理,运用 MMFFs 力场得到相应的低能构象。采用 Epik28 v2.0 以 pH 值 7.0±2.0 为条件分配电离状态并进行对接计算。

1.4 中药成分作用靶点反向预测

中药成分通过与特定靶点相结合调节生物功能,使药物发挥治疗疾病的作用。依据分子相似性原理,应用化学计量学方法,是化合物反向靶点预测的有效方法^[11]。Swiss Target Prediction 是一款小分子作用靶点预测的在线分析软件,能够基于分子相似性原理预测小分子化合物的作用靶点^[3],本研究利用 SwissTargetPrediction,预测白术、泽泻、猪苓、茯苓成分的作用靶点,并将概率值大于 0.5 的大分子作为该成分的潜在作用靶点。

1.5 中药-成分-靶点网络分析

本研究基于白术、泽泻、猪苓、茯苓成分潜在作用靶点,在 Cytoscape 3.6.1 中构建中药-成分-靶点网络,依据活性成分-作用靶点网络的中心性(centrality)参数分析主要有效成分和关键靶点。中心性是生物网络中任意节点在整个网络中所在中心的程度,度(degree)是在网络节点中心性指标。节点度值越大这个节点的中心性越高。本研究以中药成分在网络中的度值分析中药作用的主要有效成分。

1.6 GO 分析和 KEGG 通路富集分析

生物学信息注释数据库^[12](DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>) 为大规模的基因或蛋白富集工具,提供系统综合的生物功能注释信息,能够找出最显著富集的生物学注释。将白术、泽泻、茯苓、猪苓 4 味药预测作用靶点导入 DAVID 数据库,Select identifier 设置为 official gene symbol, List type 设置为 gene list,限定物种为 homo sapiens, 阈值 $P < 0.05$, 进行 GO 分析 KEGG 通路分析。利用 image GP(<http://www.ehbio.com/ImageGP/>) 工具在线绘制气泡图。

2 结果

2.1 清肺排毒汤成分筛选

TCMSP 中共收集到清肺排毒汤中化合物 2 740

个(表 1)。需补充的是,复方当中石膏属矿物药,其起效机制不在本研究讨论范围,故未纳入。

表 1 清肺排毒汤成分

Table 1 Compounds collection of QPD

类型	中药名	化合物数/个
化湿药	藿香	94
化痰药	半夏	116
行气药	陈皮	63
	枳实	65
补虚药	白术	55
	山药	71
	甘草	280
利水渗湿药	猪苓	17
	泽泻	31
	茯苓	34
清热药	石膏	0
	射干	56
	黄芩	143
止咳平喘药	紫菀	91
	杏仁	113
	冬花	148
解表药	细辛	192
	桂枝	202
	生姜	265
	麻黄	355
	柴胡	349

2.2 排毒、抑制炎症风暴成分筛选

分子对接的打分结果见表 2, 本研究认为打分值 ≤ -5 的成分具有潜在的阻断活性,认为打分值 ≤ -7 的成分具较高的阻断活性。清肺排毒汤中各药味对 ACE2 打分值 ≤ -5 的化合物数量排名前 5 的中药为甘草、柴胡、麻黄、桂枝、黄芩, 分别有 168、88、85、61 和 51 个成分具有潜在阻断活性,说明这些药味可能对 SARS-CoV-2 的感染过程更具针对性作用。而陈皮、白术、泽泻、猪苓与茯苓中打分值 ≤ -5 的化合物数量均小于 20, 初步说明这些中药对 SARS-CoV-2 感染过程直接阻断作用较弱。与 IL-6R 有较强作用的药味为甘草、柴胡、麻黄、枳实, 其打分值 ≤ -5 的化合物数量分别为 30、17、17、14, 表明其具有较强的抑制炎症风暴作用。

2.3 清肺排毒汤子方和诸药对不同功效靶点的针对性分析

根据对排毒靶点 ACE2 和炎症风暴靶点 IL-6R 的对接结果分析(图 1),清肺排毒汤的 4 个子方麻杏石甘汤、小柴胡汤、五苓散、射干麻黄汤及各药

表 2 清肺排毒汤中药成分与 ACE2 和 IL-6R 不同对接分值范围的成分数量统计

Table 2 Statistic of number of components in different docking scoring ranges of QPD

序号	中药名	成分数				序号	中药名	成分数		
		对接分 值≤-8	对接分 值≤-7	对接分 值≤-6	对接分 值≤-5			对接分 值≤-7	对接分 值≤-6	对接分 值≤-5
A1	甘草	3	21	88	168	B1	甘草	1	2	30
A2	麻黄	0	10	24	85	B2	麻黄	0	0	17
A3	枳实	2	5	22	36	B3	枳实	0	0	14
A4	冬花	1	9	17	44	B4	冬花	0	0	8
A5	柴胡	0	4	19	88	B5	柴胡	0	2	17
A6	藿香	0	5	17	35	B6	藿香	0	0	5
A7	黄芩	1	2	14	51	B7	黄芩	0	0	9
A8	半夏	1	2	12	40	B8	半夏	0	0	8
A9	射干	0	0	12	36	B9	射干	0	0	8
A10	紫菀	0	5	11	29	B10	紫菀	0	1	11
A11	杏仁	0	2	11	25	B11	杏仁	0	0	2
A12	桂枝	0	2	6	61	B12	桂枝	0	0	6
A13	山药	0	0	5	22	B13	山药	0	0	6
A14	生姜	1	1	2	40	B14	生姜	0	1	5
A15	陈皮	0	1	4	12	B15	陈皮	0	0	4
A16	细辛	0	1	4	45	B16	细辛	0	0	5
A17	白术	0	1	3	15	B17	白术	0	0	0
A18	泽泻	0	0	2	20	B18	泽泻	0	0	2
A19	猪苓	0	0	1	8	B19	猪苓	0	0	1
A20	茯苓	0	0	0	4	B20	茯苓	0	0	0
总数		9	56	229	672	总数		1	6	116

中药成分在不同药味存在交叉重复现象, 总数为去重后结果; A1~A20-清肺排毒汤成分与 ACE2 对接结果 B1~B20-清肺排毒汤成分与 IL-6R 对接结果, 表 3 同

The total number in the table is the result after weight removal; A1~A20-docking results of QFPDT ingredients and ACE2 B1~B20- docking results of QFPDT ingredients and IL-6R, same as table 3

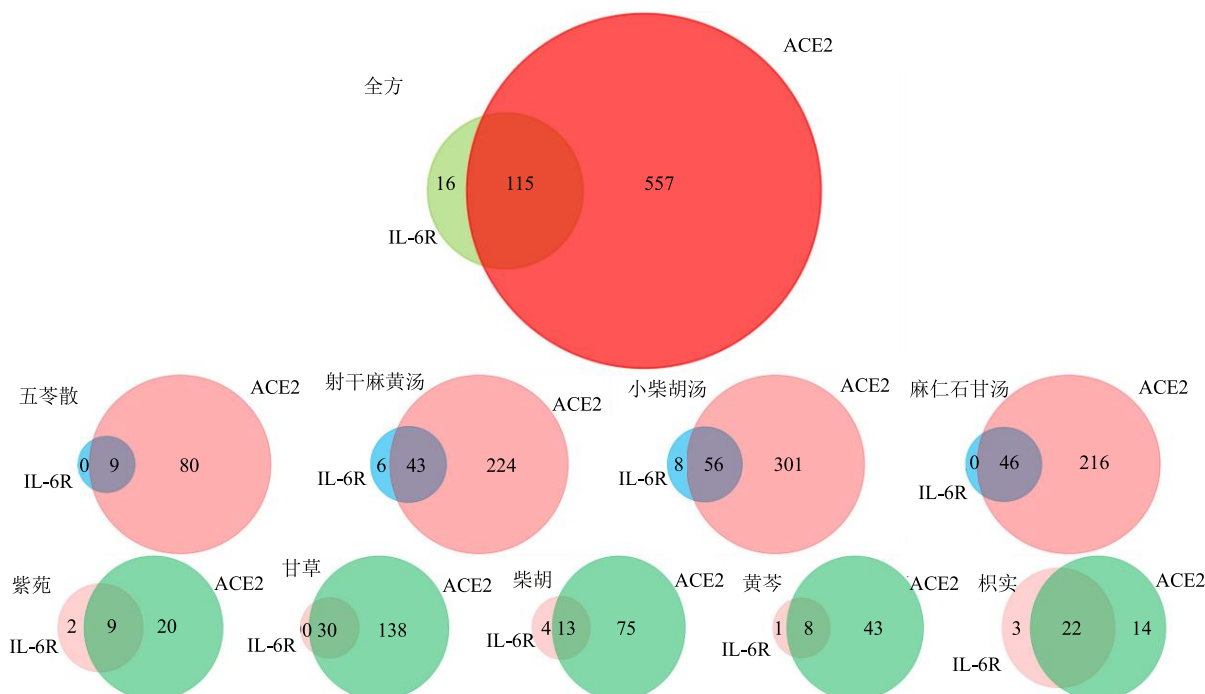


图 1 清肺排毒汤子方及各药材对 ACE2 和 IL-6R 选择性

Fig. 1 Selectivity of ACE2 and IL-6R in QPD

成分对不同靶点具有选择性和针对性。4 个子方中,小柴胡汤针对 2 个靶点的潜在活性化合物数均排第 1。表明小柴胡汤既防疫邪入里,又解表散热的双重功效突出^[13]。小柴胡汤、射干麻黄汤、麻杏石甘汤 3 方对排毒和炎症风暴抑制具有协同增效的作用^[14-16],形成组方时针对疫情病势剧猛,以麻杏石甘汤加射干麻黄汤中的紫菀、冬花、射干清肺排毒,缓解肺部症状^[17];以小柴胡汤调理气机,促进三焦通利,达到三方合而为治^[18]。

五苓散排毒和炎症风暴抑制化合物主要集中于桂枝。该结果和五苓散的主要功效为温阳化气、利水渗湿高度一致^[19]。方中桂枝辛甘化阳、扶正抵御邪气,猪苓、泽泻、茯苓、白术主要起到化饮之用,五苓散合方又控制桂枝发汗之峻;以五苓散加细辛温阳化饮,防止水饮凌肺^[13]。对于单独药味而言,甘草、柴胡、黄芩中具有排毒及抑制炎症 2 个功效化合物数量之和位居前 3。而柴胡中有 4 个单独作用于 IL-6R 而不与 ACE2 产生相互作用的化合物。现代药理学研究已证实,柴胡中的主要活性成分柴胡皂苷有强抗炎活性,抑制促炎细胞因子^[20]。余刘勤等^[21]将柴胡皂苷的抗炎作用进行了总结,指出柴胡皂苷主要通过抑制核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路发挥抗炎作用。另外,丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、肝 X 受体- α (LXR α) 信号通路和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路可能也参与了柴胡皂苷的抗炎过程。主要表现是显著抑制促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6 和 IL-1 β 的表达,而且增强抗炎细胞因子转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 和 IL-10 的表达。

2.4 潜在病毒阻断活性成分与 ACE2 核心位点的相互作用

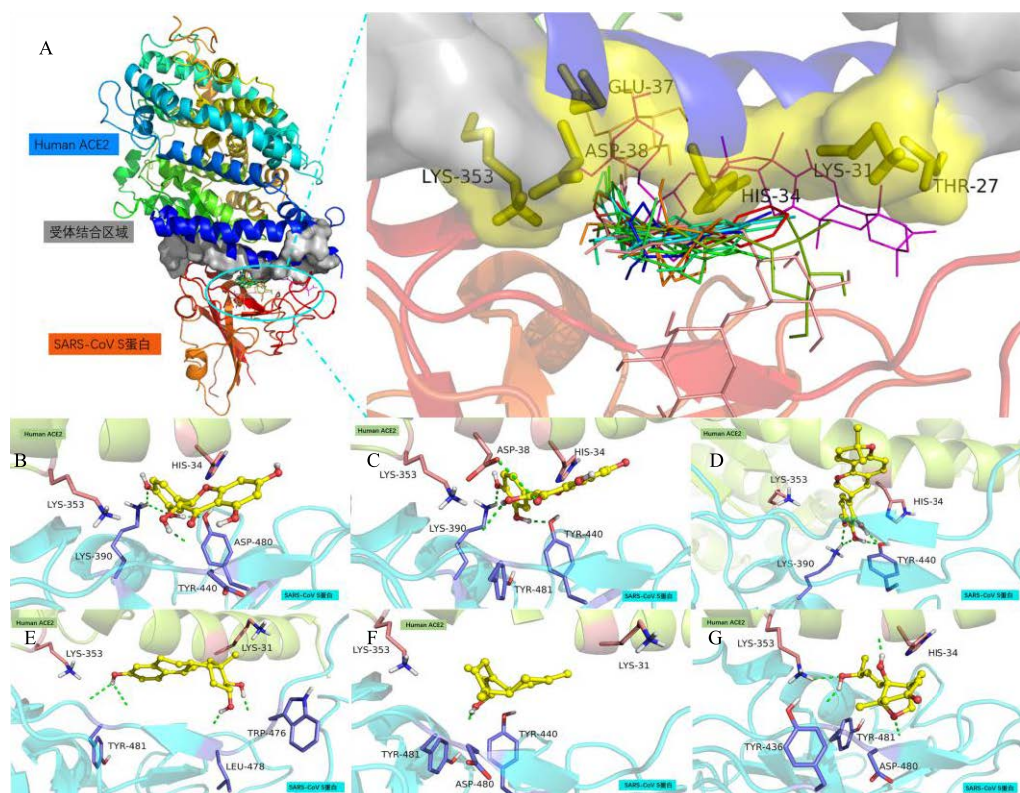
分子对接的打分值只能初步预测小分子与靶点是否具有相互作用,而化合物与药物靶点是否具有合理的结合模式是其是否会产生药效的关键^[22]。因此本研究基于 ACE2 的核心位点及对接结果对结合模式进行了深入分析。根据对接结果,从符合 Lipinski 规则的化合物中选取打分值前 100 的化合物导入到 Canvas 进行层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis),共得到 6 类,根据聚类结果和结构丰富性,共选取 10 个化合物用于结合模式分析。结构叠合结果显示所选化合物中有 9 个在同一区域与 ACE2 蛋白结合 (图 2-A),热点残基为 His 34、Glu 37、Asp 38 和 Lys 353。

图 2-B~G 所示,选取其中 6 个典型化合物花旗松素 (taxifolin)、槲皮素 (quercetin)、3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin、雌三醇 (estriol)、cis-lanceol、shionoside B_{qt} 进行结合模式分析,6 个化合物都垂直嵌入 ACE2 与 SARS-CoV-2 S 蛋白的结合区域内,与结合区域内的氨基酸残基产生相互作用,表明结合能力强的成分有相似的构象。部分代表性潜在阻断成分的芳环、羟基氧原子或醚氧原子与 ACE2 蛋白的 Lys 353 形成较强的阳离子- π 键、静电相互作用,说明 Lys 353 是 ACE2 识别化合物的关键位点。

在药物与靶点结合过程中,药效基团是否与关键位点产生相互作用是药物是否具有药效的关键,ACE2 中的 Lys 353 残基在病毒 S 蛋白结合过程中起非常关键的作用,是核心位点。有研究发现将 Lys 353 突变成组氨酸显著抑制了 S 蛋白介导的结合^[23]。相反,在大鼠 ACE2 中引入人 Lys 353,会使其转化为一种高效的 SARS-CoV-2 受体^[24]。同时,Asp 38 通过中和 Lys 353 的电荷对 S 蛋白和 ACE2 结合界面的稳定了具有重要作用^[9],因此也是关键位点。潜在活性化合物与 ACE2 结合模式分析显示清肺排毒汤潜在活性成分与 Lys 353 和 Asp 38 2 个核心位点具有潜在的结合能力,这种相互作用会干扰 ACE2 Tyr 41 和 S 蛋白残基形成稳定的疏水性界面。花旗松素、槲皮素等化合物能与 ACE2 受体结合界面的关键残基产生相互作用,是有效的结合方式,产生阻断病毒入体活性的可能较大。通过进一步结合模式发现,花旗松素上的苯环与 ACE2 蛋白的残基 His 34、Lys 353 分别与形成了 π - π 堆积作用、阳离子- π 键。槲皮素与 Lys 353 和 Asp 38 都有相互作用。

2.5 潜在炎症风暴阻断活性化合物与 IL-6R 相互作用分析

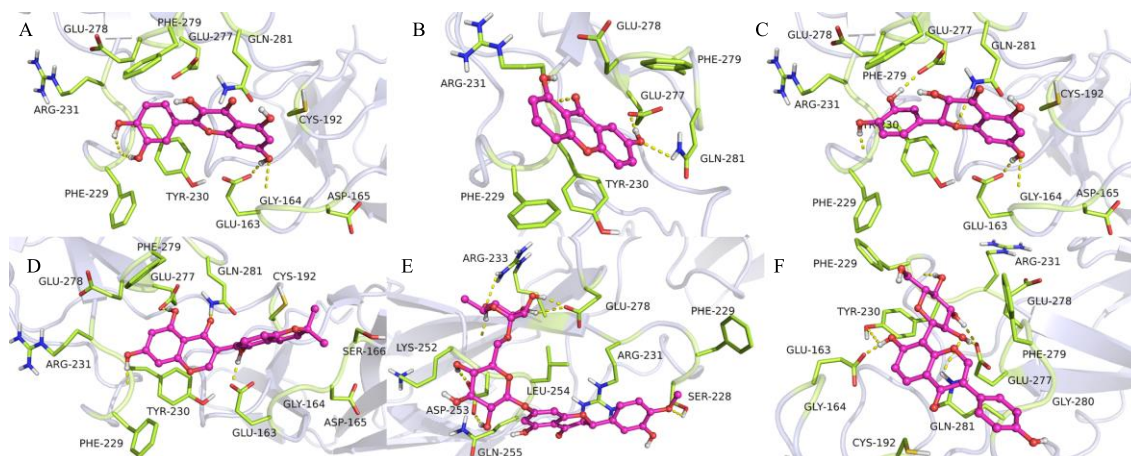
选取打分值较高药味中的单体化学成分槲皮素、印度黄酮 (euxanthone)、花旗松素、5,7-dihydroxy-3-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-yl)-4H-1-benzopyran-4-one、橙皮苷 (hesperidin)、葛根素 (puerarin) 进行结合模式分析。如图 3 所示,残基 Phe 229、Glu 163 与 6 个化合物都形成较强的氢键相互作用,以图 3-D 为例,其母核结构的苯环与 Try 230、Phe 279 形成 π - π 堆积作用,周围的极性残基 Gln 281 与离子型残基进一步稳定了化合物-蛋白结构。说明 IL-6R 活性口袋有很好的空间及电性的互补特征,易于与相应的化合物结合为稳定构象^[25]。



A-化合物-靶点结合位点 B~G-花旗松素、槲皮素、3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin、雌三醇、*cis*-lanceol、shionoside B_qt 结合模式图
A-compound-target binding site B~G-binding mode of taxifolin, quercetin, 3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin, estriol, *cis*-lanceol and shionoside B_qt

图 2 化合物-ACE2 结合模式

Fig. 2 Binding mode of representative compounds



A~F-槲皮素、印度黄芩、花旗松素、5,7-dihydroxy-3-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-yl)-4H-1-benzopyran-4-one、橙皮苷、葛根素
A~F-quercetin, eucanthone, taxifolin, 5,7-dihydroxy-3-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-yl)-4H-1-benzopyran-4-one, hesperidin and puerarin

图 3 化合物-IL-6R 结合模式

Fig. 3 Binding pattern of compound-IL-6R

2.6 代表性潜在高活性化合物分析

对 2 个靶点打分值排名前 20 的化合物进行统计, 见表 3, 化合物归属分析显示具有潜在高活性阻断成分最多的药味为甘草, 其具有 4 种潜在高活性病毒阻断成分。对数据整理发现, 虽然槲皮素打分值并

未位居前列, 但其与 ACE2 核心位点 Lys 353、Asp 38 具有相互作用, 且其在甘草、藿香、款冬花、麻黄等多个药味中都有分布。通过对化合物-ACE2 相互作用模式分析发现, 与蛋白结合力较好且具有一定口服生物利用度 (OB) 的化合物大都与槲

表 3 清肺排毒汤中药成分与 ACE2 和 IL-6R 分子对接打分 (前 20 位)
Table 3 Top 20 in dockingscores with ACE2 and IL-6R of compounds in QPD

序号	化合物	中药 归属	对接 分值	序号	化合物	中药 归属	对接 分值
A1	naringenin-4'-glucoside-7-rutinoside	枳实	-8.77	B1	甘草苷 A	甘草	-7.15
A2	甘草苷 E (licorice glycoside E)	甘草	-8.55	B2	柴胡皂苷 V (saikosaponin V)	柴胡	-6.62
A3	甘草苷 A (licorice glycoside A)	甘草	-8.50	B3	gingerglycolipid A	生姜	-6.42
A4	licuraside	甘草	-8.46	B4	柴胡皂苷 C (saikosaponin C)	柴胡	-6.24
A5	异地黄苷 (isomartynoside)	黄芩	-8.36	B5	甘草异黄酮 B (licoisoflavone B)	甘草	-6.13
A6	8-姜酚 (8-gingerol)	生姜	-8.29	B6	aster saponin F	紫菀	-6.04
A7	soya-cerebroside i	半夏	-8.27	B7	asterbatanoid J	紫菀	-5.85
A8	圣草次苷 (eriocitrin)	枳实	-8.08	B8	芦丁 (rutin)	柴胡	-5.82
A9	扁蓄苷 (guajavarin)	冬花	-8.00	B9	柴胡皂苷 B1 (saikosaponin B1)	柴胡	-5.80
A10	quercetin-3-L-arabinon-7-D-glucoside	紫菀	-7.85	B10	去甲麻黄碱 (Usaf cs-6)	麻黄	-5.76
A11	花旗松素	麻黄、桂枝	-7.80	B11	machiline	杏仁	-5.69
A12	dehydroniciferylalcohol-4-β-D-glucoside	枳实	-7.73	B12	(S)-尿囊素 [(S)-allantoin]	山药	-5.68
A13	hesperidin	陈皮	-7.72	B13	夫洛丙酮 (labroda)	藿香	-5.67
A14	腺苷 (adenosine)	半夏	-7.72	B14	β 半乳糖 (β-galactose)	山药、柴胡	-5.66
A15	香叶木素 (diosmetin)	麻黄	-7.70	B15	异香兰素 (isovanillin)	生姜	-5.64
A16	(+)-leucocyanidin	麻黄	-7.68	B16	硝酸胍 (GUN)	半夏	-5.61
A17	绣线菊苷 (spiraein)	冬花	-7.62	B17	去甲伪麻黄碱 (cathine)	麻黄	-5.59
A18	商陆素 (ombuin)	藿香	-7.59	B18	5,8,2'-trihydroxy-7-methoxyflavone	黄芩	-5.58
A19	毛蕊花糖苷 (acteoside)	藿香	-7.57	B19	葫芦巴碱 (gynesine)	半夏	-5.58
A20	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-aryl coumarin	甘草	-7.53	B20	葛根素 (puerarin)	柴胡	-5.58

皮素具有相似的骨架结构或者为槲皮素的衍生物。依据构效关系的原理及中药多成分起效的作用特点,推测清肺排毒汤组方中各药味相似成分可以增加起效浓度,达到药理活性所需的稳态浓度。结合现代药理学的基础,槲皮素类化合物应是阻断病毒的主要活性成分。

对 IL-6R 具有潜在抑制作用成分最多的药味为柴胡,具有 6 种潜在高活性炎症风暴阻断成分,潜在高活性化合物中葛根素现代药理学研究较多^[26],具有作为抗炎风暴单体成分开发的潜力。

值得注意的是,槲皮素同时具有对 ACE2 和 IL-6R 的潜在活性,表明槲皮素类化合物含量较高的中药抑制炎症、阻断病毒入里的双重功能较为突出,本课题组在前期工作中通过微量热涌动实验 (MST) 对槲皮素与 IL-6R 的亲合力进行过测定,其平衡解离常数 (K_d) = (212.0 ± 99.9) mol/L,表明槲皮素在体外与 IL-6R 具有一定的亲合力^[25]。且该方中大多数药味中都存在槲皮素类衍生物,且含量较高,故槲皮素类化合物具有作为阻断 SARS-CoV-2 和抑制炎症风暴双重功效单体成分开发的潜力。

2.7 利水药“利水渗湿”的分子机制

清肺排毒汤来源于中医经典方剂组合,包括麻杏石甘汤、射干麻黄汤、小柴胡汤和五苓散,四方

皆出自《伤寒杂论》。COVID-19 以湿毒为病,首先犯肺,继而碍脾,甚则伤肾,湿性黏滞,阻碍气机,郁久化热^[27-28]。清肺排毒汤在清肺排毒、宣通气机的基础上,以建运化湿为本,合方而治。本研究通过对 IL-6R 和 ACE2 探讨了清肺排毒汤排毒、抑制炎症风暴的物质基础以及分子机制,发现分子对接结果中缺乏这 2 个关键治疗靶点潜在活性化合物的 4 味药猪苓、茯苓、白术、泽泻皆具利水功效,同时注意到此 4 药同属五苓散,应该是清肺排毒汤利水渗湿的主要药味。结合 COVID-19 “湿邪”是共识的致病特征,鹿振辉等^[29]指出,湿饮毒疫之邪随气运行流窜三焦,致上焦肺气无以宣降、中焦脾阳无以运化、下焦命门之火郁闭,病及三焦湿饮合而致病,强调了“利水化饮”的重要性,上述 4 味药中白术归脾肾,茯苓归心肺脾肾,泽泻、猪苓归肾膀胱,4 味药共治三焦之水。对这 4 味药的作用靶点以及作用机制研究有助于推进对清肺排毒汤的进一步认识。首先依据 OB > 30% 筛选化合物,4 味药共得到 89 个成分,并对其进行靶点预测,保留概率值 ≥ 0.5,得到 35 个潜在靶点。

依据白术、泽泻、茯苓、猪苓 4 味药的药物-成分-靶点关系,应用 Cytoscape 3.6.1 生成药物-成分-靶点网络 (图 4)。该网络共包括 113 个节点,

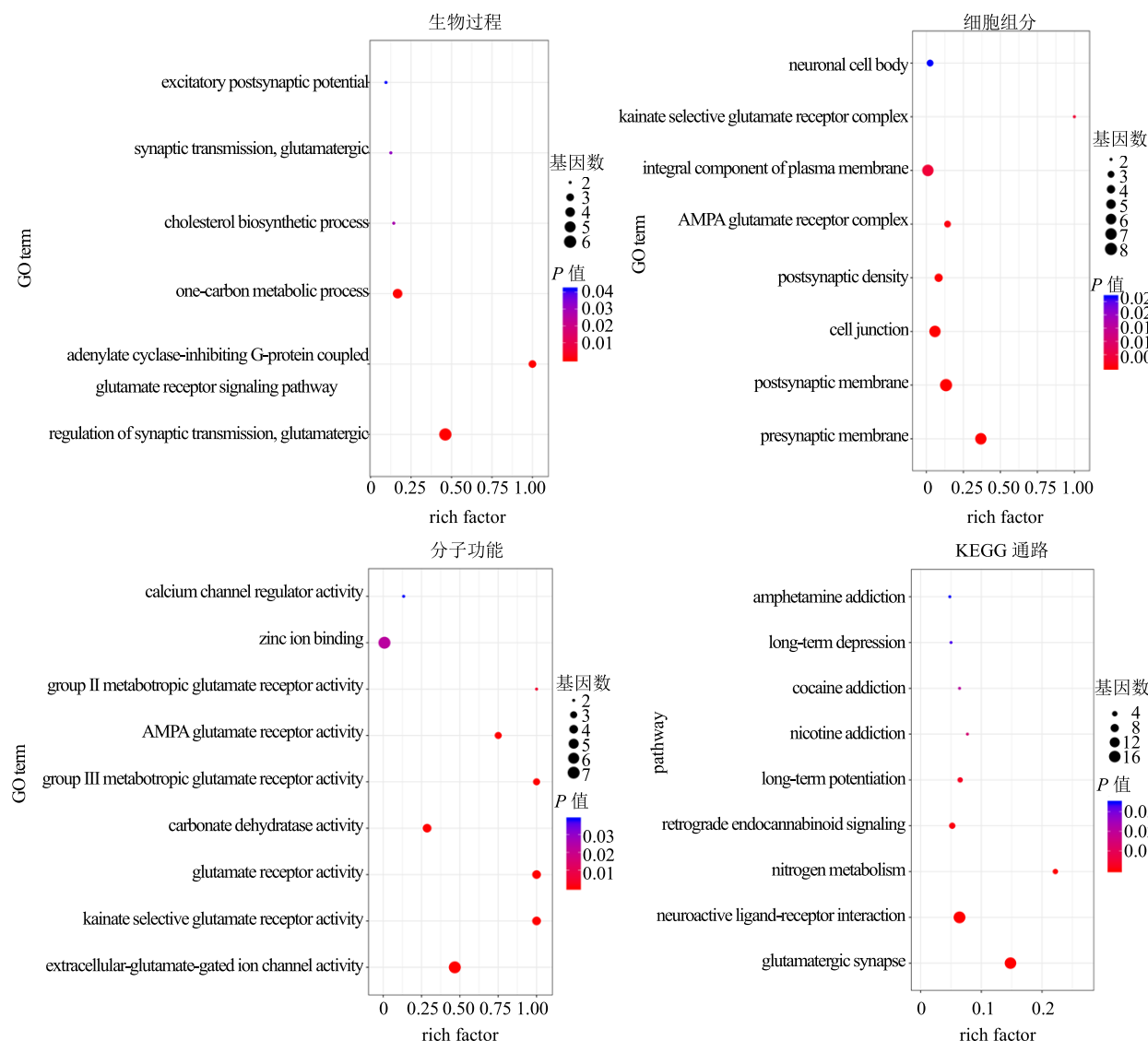


图 5 4 种中药潜在靶点的 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

Fig. 5 GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis of potential targets in four TCM herbs

及分子机制尚不清楚。基于文献调研,本研究选取猪苓、茯苓、白术、泽泻 4 味药中 $OB \geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.15 的化合物对 AQP4 进行了基于分子对接的虚拟筛选。

虚拟筛选结果显示,这 4 味药所含小分子中与 AQP4 对接打分结果较好分别是东莨菪内酯 (scopoletin)、去氢齿孔酸 (dehydroeburicoic acid)、 α -D-半乳糖 (alpha-D-galactose)、环氧泽泻烯 (alismoxide)。对其相互作用进行分析 (图 6),4 个化合物都与 Trp 59 附近的残基存在氢键以及静电作用力。以图 6-A 为例,东莨菪内酯与 Asp 69 存在静电相互作用;其苯环上的羟基与 Ser 55 形成氢键相互作用。推测这 4 个化合物与 Trp 59 附近的氨基

酸残基存在相互作用影响胞内外水的进出,发挥门控作用,对生理病理条件下 AQP4 蛋白功能的发挥可能具有一定的调节作用。

2.8 中药成分多点显效、协同增效分子机制分析

中药通常通过多成分协同起效,为了进一步探索方中化合物与同一靶点的协同作用机制,以 ACE2 分子对接打分值较高的潜在活性成分为例,根据分子对接结果进行了构象叠合分析。在考虑聚类及药味归属的基础上,根据打分值与 Lipinski 规则挑选了槲皮素、花旗松素、商陆素 (ombuin)、雌三醇分析不同潜在阻断活性成分之间的协同作用机制,所选化合物见表 4,结构及分子对接结果见图 7、8。

究, 疫苗以及新药研发取得了较大进展, 瑞德西韦等小分子药物已进入临床研究, 但是新药研发的规律决定了抗 SARS-CoV-2 新药还需耐心等待。

中医药在此次抗击 COVID-19 的过程中起到了关键作用, 包括清肺排毒汤、肺炎 1 号在内的很多复方能够明显改善轻型 COVID-19 患者的临床症状, 有减少重型肺炎发生的趋势, 具有较好的临床价值。尽管中医根据其辨证论治及系统的治则治法取得了良好的临床效果, 但是所用中药的有效成分及作用机制的模糊限制了其现代化开发和国际化认可。计算机辅助药物设计能够从疾病靶点的结构出发, 筛选得到有针对性的药效物质及相互作用方式, 得到有效小分子信息, 可为复方的功效本质研究提供明确的现代科学证据, 同时可对临床中复方的优化提供依据。

目前中药成分的分子对接和虚拟研究缺乏对成分-靶点相互作用模式的重视, 而化合物结合模式分析是判断化合物有效性的重要参考, 也是对化合物进行药物设计的基础。因此本研究格外重视对潜在活性化合物结合模式的分析, 通过深入的结合模式分析发现中药化合物与 ACE2 结合的热点残基以 Lys 353 为中心, 而 Lys 353 是 ACE2 被 SARS-CoV S 蛋白识别的关键残基。Lys 353 是进行单体成分选择和开发时需要重点关注的残基位点。

尽管目前对于清肺排毒汤已有多项网络药理学和分子对接研究, 但是缺乏对多功效靶向成分筛选及组成该方的子方功能物质基础的对比性分析研究, 限制了对该方系统性的认识。本研究在综合分析清肺排毒汤治疗原则及 COVID-19 疾病特征的基础上, 从炎症风暴靶点 IL-6R、病毒阻断靶点 ACE2 和 AQP 多个靶点的结构出发, 采用计算机辅助药物设计联合靶点反向预测及通路分析的系统研究方法, 初步阐明了清肺排毒汤排毒、抑制炎症风暴和利水化饮 3 方面的物质基础及分子机制, 为该复方多环节系统治疗 COVID-19 进一步提供理论支持。

参考文献

- [1] Zhou P, Yang X L, Wang X G, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [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] Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: Causes and consequences of cytokine storm and immunopathology [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(5): 529-539.
- [4] 孙 健, 沈巨信. 炎症及细胞自噬与急性肺损伤关系的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(17): 2163-2168.
- [5] 国家卫生健康委员会, 国家中医药管理局. 关于推荐在中西医结合救治新型冠状病毒感染的肺炎中使用“清肺排毒汤”的通知 [EB/OL]. [2020-02-06]. <http://yzs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-02-07/12876.html>.
- [6] 赵 静, 田赛赛, 杨 健, 等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨 [J]. *中草药*, 2020, 51(4): 829-835.
- [7] 国家中医药管理局. 中医药有效方剂筛选研究取得阶段性进展 [EB/OL]. [2020-02-06]. <http://news.sina.com.cn/c/2020-02-06/doc-iimxyqvz0817739.shtml>.
- [8] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMPSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [9] Li F, Li W, Farzan M, *et al.* Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor [J]. *Science*, 2005, 309(5742): 1864-1868.
- [10] Boulanger M J, Chow D C, Brevnova E E, *et al.* Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 α -receptor/gp130 complex [J]. *Science*, 2003, 300(5628): 2101-2104.
- [11] 李冰涛, 翟兴英, 李 佳, 等. 基于网络药理学葛根解热作用机制研究 [J]. *药学报*, 2019, 54(8): 1409-1416.
- [12] 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.
- [13] 薛伯寿, 姚魁武, 薛燕星. 清肺排毒汤快速有效治疗新型冠状病毒肺炎的中医理论分析 [J]. *中医杂志*, 2020, 61(6): 461-462.
- [14] 肖 卉. 小柴胡汤加减方治疗上呼吸道感染发热的临床研究 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(A5): 178-179.
- [15] 陈 豪, 陈军红, 沈旭波, 等. 射干麻黄汤对哮喘性肺炎大鼠肺部炎症反应及免疫反应的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(2): 317-323.
- [16] 蒋鹏飞, 李书楠, 刘 培, 等. 全国各地区新型冠状病毒肺炎中医防治方案分析 [J/OL]. *中医学报*, [2020-03-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.R.20200302.1856.010.html>.
- [17] 田朝晖, 向建军, 葛 舰, 等. 清肺排毒汤治疗新型冠

- 状病毒肺炎理论分析与临床实践 [J/OL]. 世界中医药, [2020-03-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5529.R.20200331.0937.034.html>.
- [18] 吴昊, 王佳琪, 杨雨薇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术初步探索“清肺排毒汤”抗新型冠状病毒肺炎作用机制 [J]. 药学学报, 2020, 55(3): 374-383.
- [19] 蒋谦谦, 陈新宇. 基于方证辨证对清肺排毒汤速效治疗新型冠状病毒肺炎的思考 [J/OL]. 中医杂志, [2020-03-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200228.1618.002.html>.
- [20] 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.
- [21] 余刘勤, 贾爱梅, 宋永砚. 柴胡皂苷抗炎、抗氧化和降脂研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(1): 87-92.
- [22] Xue W, Wang P, Li B, *et al.* Identification of the inhibitory mechanism of FDA approved selective serotonin reuptake inhibitors: An insight from molecular dynamics simulation study [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2016, 18(4): 3260-3271.
- [23] Li W, Moore M J, Vasilieva N, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus [J]. *Nature*, 2003, 426(6965): 450-454.
- [24] Li W, Zhang C, Sui J, *et al.* Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2 [J]. *EMBO J*, 2005, 24(8): 1634-1643.
- [25] 冯彩琴, 骆亚莉, 刘永琦, 等. 基于 IL-6R 运用分子对接筛选红芪防护 BMSCs 的活性成分 [J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(7): 867-871.
- [26] 房伟. 葛根药理作用研究进展 [J]. 中国药物经济学, 2017, 12(11): 159-160.
- [27] 过建春, 万海同. 新型冠状病毒肺炎的中医病因病机与治则治法探讨 [J]. 中医杂志, [2020-02-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200225.0919.002.html>.
- [28] 岳萍, 唐仕欢, 于欢, 等. 新型冠状病毒肺炎中医防治方案的病机与组方规律分析 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志, [2020-03-04]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20200842>.
- [29] 鹿振辉, 邱磊, 张少言, 等. 试论新型冠状病毒肺炎重症“寒湿水饮闭肺, 命门之火不振”之变 [J/OL]. 中国中医药信息杂志, [2020-02-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3519.R.20200219.2120.002.html>.
- [30] 王鹏程, 赵珊, 王秋红, 等. 利水中药功效发挥与水通道蛋白之间的关系 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2272-2277.
- [31] 张晓丹. 白术、茯苓与白术茯苓汤对脾虚泄泻动物模型胃肠形态及水液代谢的影响研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [32] 伍小燕, 陈朝, 张国伟. 泽泻水提物对正常大鼠利尿活性及肾脏髓质 AQP2 作用研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2010, 14(21): 5-7.
- [33] 刘洋, 苏凤哲, 徐华洲, 等. 五苓散对腹泻模型小鼠结肠 AQP-4 mRNA 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(3): 197-198.