

藿朴夏苓汤治疗早期新型冠状病毒肺炎(COVID-19)湿邪郁肺证物质基础及功效的网络分析

范梦月^{1,2}, 刘静⁴, 孙蓉^{1,3*}

1. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033

2. 天津中医药大学, 天津 301617

3. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

4. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 筛选藿朴夏苓汤治疗早期新型冠状病毒肺炎(COVID-19)湿邪郁肺证的物质基础, 预测其作用机制。 **方法** 查阅文献及临床报道分析藿朴夏苓汤与早期 COVID-19 湿邪郁肺证的方证关系。运用 TCMSP 数据库筛选藿朴夏苓汤中潜在活性成分, 将活性成分与新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL 水解酶、血管紧张素转化酶 II (ACE2) 进行分子对接, 根据结合能筛选与两者均有较好结合作用的核心成分。借助 Cytoscape 软件构建关键成分靶点蛋白互作网络, 筛选出核心靶点; 通过 STRING 数据库进行核心靶点的 GO 分析, Cytoscape 软件 ClueGO 插件进行 Pathway、KEGG 富集分析。 **结果** 方证关系分析藿朴夏苓汤用于治疗早期 COVID-19 湿邪郁肺证, 筛选出藿朴夏苓汤中潜在作用成分 12 个, 核心靶点 67 个。其中通草中的通脱木皂苷元 I, 茯苓、猪苓中的过氧麦角甾醇, 半夏中的黄芩苷与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶、ACE2 均具有较好的结合活性。GO、Pathway、KEGG 富集分析结果显示藿朴夏苓汤中 12 个潜在作用成分参与调节刺激反应、信号转导、细胞死亡等生物过程以及白介素信号通路、癌症 EGFR 信号通路、酪氨酸激酶信号转导途径、编程性细胞死亡途径、MAPK 信号通路等。 **结论** 藿朴夏苓汤以化湿解毒、宣肺透邪治疗早期 COVID-19 湿邪郁肺证患者, 菲酮、黄芩苷、酸枣仁皂苷、啤酒甾醇、常春藤皂苷元、过氧麦角甾醇、柠檬二烯醇、麦角甾-7,22-二烯-3-酮、通脱木皂苷元 I、泽泻醇 B-23-醋酸酯、泽泻醇 B、新橙皮苷可能为其主要的物质基础, 通过阻断 SARS-CoV-2 病毒蛋白合成, 阻止病毒进入宿主细胞, 通过调控白介素信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、T 细胞受体信号通路、C 型凝集素受体信号通路, 抑制相关炎症因子的表达发挥作用。

关键词: 藿朴夏苓汤; 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 分子对接; 网络药理学; 物质基础; 血管紧张素转化酶 II; 菲酮; 黄芩苷; 酸枣仁皂苷; 啤酒甾醇; 常春藤皂苷元; 过氧麦角甾醇; 柠檬二烯醇; 麦角甾-7,22-二烯-3-酮; 通脱木皂苷元 I; 泽泻醇 B-23-醋酸酯; 泽泻醇 B; 新橙皮苷

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)09-2297-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.003

Analysis on material basis and efficacy network of Huopo Xialing Decoction in treating damp pathogen stagnation of lung syndrome of early COVID-19

FAN Meng-yue^{1,2}, LIU Jing⁴, SUN Rong^{1,3}

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

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. Institute of Advanced Medical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China

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

Abstract: Objective To screen the material basis of Huopo Xialing Decoction in the treatment of damp pathogen stagnation of lung syndrome of early COVID-19 and predict its mechanism. **Methods** Literatures and clinical reports were reviewed to analyze the relationship between Huopo Xialing Decoction and damp pathogen stagnation of lung syndrome of early stage of COVID-19. TCMSP database was used to screen the potential active components in Huopo Xialing Decoction. Molecular docking of the active components with SARS-CoV-2 hydrolase and ACE2 was also carried out. According to the binding ability, the core components with both were screened. The interaction network of key components target proteins was constructed by using the software of Cytoscape to

收稿日期: 2020-03-10

基金项目: 泰山学者工程专项经费项目 (ts201511107)

作者简介: 范梦月, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理。Tel: 18822195102 E-mail: 17862969136@163.com

*通信作者 孙蓉, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药理与毒理研究。Tel: 13605311799 E-mail: sunrong@sdu.edu.cn

screen the main targets; The GO analysis of the main targets was carried out by using the STRING database, and the Pathway and KEGG enrichment analysis was carried out by using the plug-in of the software ClueGO of Cytoscape. **Results** The Huopo Xialing Decoction was used to treat the early coronavirus pneumonia with damp pathogen and lung depression syndrome in the relationship analysis between prescriptions and syndrome, and the potential components of the 12 ingredients in Huopo Xialing Decoction were selected, with 67 core targets. Among them, paryriogenin I from *Tetrapanax papyrifer*, ergosterol peroxide from *Poria cocos* and *Polyporus umbellatus*, baicalin from *Pinellia ternata* had good binding activity with SARS-CoV-2 3CL hydrolase and ACE2. The results of enrichment analysis of GO, Pathway and KEGG showed that 12 potential components in Huopo Xialing Decoction were involved in regulating the biological processes such as stimulation response, signal transduction, cell death and the related signaling pathways including interleukins, EGFR in cancer, tyrosine kinases, programmed cell death and MAPK signaling pathways. **Conclusion** For the early COVID-19 patients with the syndrome of damp pathogen stagnation of lung, Huopo Xialing Decoction was used to resolve dampness and detoxification, and ventilate lung and promote pathogenic penetration. Phenanthrone, baicalin, jujuboside_{qt}, cerevisterol, hederagenin, ergosterol peroxide, citrostadienol, ergosterol-7,22-diene-3-one, paryriogenin I, alisol B,23-acetate, alisol B, neohesperidin may be the main material basis, and play a role by blocking the protein synthesis of SARS-CoV-2 virus, preventing the virus from entering the host cells, regulating the IL signaling pathway, MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, C-type lectin receptor signaling pathway and inhibiting the expression of related inflammatory factors.

Key words: Huopo Xialing Decoction; SARS-CoV-2; COVID-19; molecular docking; network pharmacology; material basis; ACE2; phenanthrone; baicalin; jujuboside; cerevisterol; hederagenin; ergosterol peroxide; citrostadienol; ergosterol-7,22-diene-3-one; paryriogenin I; alisol B-23-acetate; alisol B; neohesperidin

2019 年 12 月,由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的急性呼吸道传染病,即新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)成为全球各国广泛关注的公共卫生事件。SARS-CoV-2 具有较强的传染性和流行性,截止 3 月 4 日已有 74 个国家出现 COVID-19 患者。我国疫情期间,中医药在“减轻发热症状、控制病情进展、减少激素用量、减轻并发症”等方面疗效显著^[1]。《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行)》中将本病归为中医“疫病”范畴。COVID-19 病因是以“湿”为基本属性的疫病之气,可称之为“湿毒疫”,辨证论治始终围绕湿邪开展^[2]。中医治湿有 3 法,即芳香化湿、苦温燥湿、淡渗利湿,藿朴夏苓汤融 3 法为一方,外宣内化,通利小便,可谓治湿良剂。在四川省、广东省、海南省、贵州省发布的中医药诊疗方案中,都曾建议将藿朴夏苓汤用于 COVID-19 临床治疗。

相关研究表明, SARS-CoV-2 可能通过其 S 蛋白与宿主细胞表面的血管紧张素转化酶 II (ACE2) 结合导致病毒进入宿主细胞^[3], ACE2 在严重急性呼吸道综合征冠状病毒(SARS-CoV)和中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)等多种病毒感染后可显著上调^[4]。2020 年 1 月 26 日,上海科技大学饶子和与杨海涛团队公布了测定的 SARS-CoV-2 结构 3CL 水解酶,参与病毒蛋白质的复制,是目前研

究抗 SARS-CoV-2 的关键药物靶点之一^[5]。本研究根据 COVID-19 出现的临床表现与藿朴夏苓汤进行方证关系分析,再基于 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 药物靶点,借助分子对接技术探索藿朴夏苓汤抗 SARS-CoV-2 主要活性成分,并通过网络药理学预测其作用机制,为探索藿朴夏苓汤抗 SARS-CoV-2 相关物质基础及抗 SARS-CoV-2 病毒药物筛选提供帮助。

1 方法

1.1 方证关系分析

查阅文献和临床报道,总结 COVID-19 的病因病机、治则治法及藿朴夏苓汤临床应用情况,针对 COVID-19 的临床表征分析其与藿朴夏苓汤的方证关系。

1.2 藿朴夏苓汤化学成分及靶点的收集

以广藿香、半夏、茯苓、杏仁、薏苡仁、豆蔻、通草、猪苓、泽泻、厚朴、淡豆豉为关键词,通过 TCMSP 数据库(<http://tcmsp.com/index.php>)检索藿朴夏苓汤的化学成分信息,以口服生物利用度(OB)≥30%和化合物类药性(DL)≥0.18 为标准筛选成分,查阅文献补充未纳入的主要活性成分。借助 TCMSP、PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)数据库筛选化合物的靶点蛋白,UniProt (<http://tcmsp.com/index.php>)、STRING 数据库 (<https://string-db.org/>)将靶点蛋白规范成对应基因名。

1.3 分子对接前配体和受体准备

通过 PubMed、ZINC 数据库 (<https://zinc.docking.org/>) 下载筛选后的藿朴夏苓汤中所有的活性成分以及《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行)》中推荐药物的 2D 或 3D 结构,使用 Chem3D 软件生成分子 3D 结构,进行能量最小化,将所用配体都保存为 mol2 格式。借助 AutoDockTools-1.5.6 的脚本文件赋予配体原子类型、计算电荷,最终生成 pdbqt 格式配体参数文件。PDB 数据库下载 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 蛋白结构,PyMOL 软件去除受体蛋白中的溶剂,AutoDockTools-1.5.6 软件加氢、合并非极性氢、计算电荷,同样保存为 pdbqt 格式的受体参数文件。

1.4 成分靶点对接

首先利用 AutoDockTools-1.5.6 软件设置受体蛋白的格点参数,并配置参数文本文件,其中 num_modes=10、energy_range=4、exhaustiveness=100。再运行 AutoDock Vina 软件在 Linux 虚拟环境下将藿朴夏苓汤中的成分、推荐药物分别与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 蛋白进行批量对接。PyMOL1.7、Discovery Studio 3.5 软件对对接结果进行可视化分析。

1.5 关键成分筛选

筛选藿朴夏苓汤抗 SARS-CoV-2 关键作用成分,以推荐药物与 2 种蛋白对接的结合能为基准,分别筛选与 2 种蛋白结合后结合能小于或等于推荐药物结合能的藿朴夏苓汤中的成分,合并 2 次筛选后的成分,选取与 2 个靶点蛋白均有较好结合作用的成分,获取其作用靶点。

1.6 关键成分的靶点蛋白互作(PPI)网络构建及 GO、Pathway、KEGG 富集分析

借助 Cytoscape 3.7.1 软件构建“1.5”中关键成分-靶点的 PPI 网络,运用 CytoNCA 插件,以节点连接度(degree)、介度(betweenness)、紧密度(closeness)、特征向量(eigenvector)、局部平均连通度(LAC)、网络(network)为筛选指标进行核心靶点网络的筛选。首先以度值大于 2 倍的中位数进行筛选,然后以上述指标值大于中位数进行筛选,最终获得核心靶点的 PPI 网络。借助 STRING 进行 GO 分析和 Cytoscape 3.7.1 软件插件 ClueGO 对核心靶点基因进行 pathway、KEGG 富集分析,预测其可能的作用机制。

2 结果

2.1 方证关系分析

王玉光^[2]认为 COVID-19 基本病机为“湿、毒、瘀、闭”,主要病因为“湿毒疫邪”,病位在肺、脾。肺为娇脏,COVID-19 早期治疗宜化湿以防湿邪郁闭以后化热,入阳明,致腑实不通加重肺气郁闭。若肺气不宣与腑实不降形成恶性循环,邪气有所依,湿毒瘀闭气机可能会造成休克、多器官损伤,所以 COVID-19 早期防治尤为重要^[2]。根据疾病传变规律,并结合各地区 COVID-19 中医药诊疗方案,将 COVID-19 确诊患者分为早期、进展期、危重期、恢复期 4 个阶段。早期阶段以寒湿郁肺证、湿邪(毒)郁肺证为主;进展期以热毒郁肺证、湿热蕴肺证为主;危重期以内闭外脱证和热毒闭肺证为主;恢复期则常见肺脾气虚证及气阴两虚证^[6]。对于早期 COVID-19 湿邪郁肺证,藿香、淡豆豉芳香,三焦气化与肺主气密切相关,以气化则湿亦化;厚朴、半夏、豆蔻、杏仁或温燥湿,并有芳香醒脾之效;猪苓、赤苓、泽泻、薏苡仁淡渗利湿,共集芳香化湿、苦温燥湿、淡渗利湿于一方,使表里之湿内外分解^[7]。2020 年 1 月 26 日粤中医药局公布的《新型冠状病毒感染肺炎中医药治疗试行方案》中提出可用藿朴夏苓汤治以化湿解毒、宣肺透邪。近期海南省发布的中医药诊疗方案也再次推荐使用藿朴夏苓汤为基础方治以解毒化湿,透邪外达。

藿朴夏苓汤出自《医原》,宣通气机,燥湿芳化,上宣下渗,主治湿热病邪在气分而湿偏重者。由藿香、半夏、赤苓、杏仁、薏苡仁、白蔻仁、通草、猪苓、淡豆豉、泽泻、厚朴共 11 味药组成。本方用药涉及三焦,以藿香为主药,芳香宣透,化肌表之湿^[7]。症见身热恶寒、肢体倦怠、胸闷口腻、舌苔薄白、脉濡弦^[8]。临床常用于治疗脾胃系、肺系等疾病,如呕吐、泄泻、便秘、感冒、咳嗽等病症^[9]。陈瑞等^[10]基于武汉地区 52 例 COVID-19 分析发现早期 COVID-19 湿邪郁肺证患者症见身热不扬,全身困重乏力,干咳少痰,纳呆,或伴恶心,或伴口苦,口干渴而不欲饮,大便溏滞不爽,舌苔腻,舌淡红或边尖红,脉无定体。过建春等^[11]认为早期 COVID-19 湿邪郁肺证患者若有舌苔白腻如积粉等属湿浊偏盛或邪伏膜原者,藿朴夏苓汤可主以疏利透达,或宣上运中渗下以透化湿浊。

由此可见藿朴夏苓汤所治病症与早期 COVID-19 湿邪郁肺证患者临床症状不谋而合。早

期 COVID-19 湿邪郁肺证患者湿邪困遏,阻滞气机,气化不利,津液不行,与本方“轻开肺气为主”“启上闸,开支河,导湿下行以为出路,湿去气通,布津于外”之功用相合^[9]。

2.2 藿朴夏苓汤活性成分筛选

共筛选藿朴夏苓汤活性成分 104 个,广藿香 9 个,半夏 10 个,茯苓 15 个,杏仁 20 个,薏苡仁 9 个,

豆蔻 12 个,通草 3 个,猪苓 11 个,泽泻 9 个,厚朴 4 个,淡豆豉 2 个。藿朴夏苓汤部分成分基本信息见表 1。其中过氧麦角甾醇、啤酒甾醇为茯苓、猪苓共有成分;槲皮素为藿香、豆蔻的共有成分;豆甾醇为半夏、薏苡仁、杏仁共有成分;二十碳-11-烯酸为半夏、杏仁共有成分; β -谷甾醇为半夏、薏苡仁、豆蔻、猪苓、杏仁共有成分。

表 1 藿朴夏苓汤部分活性成分基本信息

Table 1 Information of some chemical components of Huopo Xialing Decoction

来源	MOL ID	英文名称	中文名称	OB/%	DL
广藿香	MOL002879	diop	邻苯二甲酸二异辛酯	43.59	0.39
	MOL005573	genkwanin	芫花素	37.13	0.24
	MOL005916	irisolidone	尼泊尔鸢尾异黄酮	37.78	0.30
	MOL005918	phenanthrone	菲酮	38.70	0.33
	MOL000098	quercetin	槲皮素	46.43	0.28
半夏	MOL000358	β -sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75
	MOL000449	stigmasterol	豆甾醇	43.83	0.76
	MOL002776	baicalin	黄芩苷	33.52	0.21
	MOL003578	cycloartenol	环木菠萝烯酸	38.69	0.78
	MOL005030	gondoic acid	二十碳-11-烯酸	30.70	0.20
茯苓	MOL000300	dehydroeburicoic acid	去氢齿孔酸	44.17	0.83
	MOL000275	trametenolic acid	3 β -羟基-羊毛甾-8,24-二烯-21-酸	38.71	0.80
	MOL000279	cerevisterol	啤酒甾醇	37.96	0.77
	MOL000296	hederagenin	常春藤皂苷元	36.91	0.75
	MOL000283	ergosterol peroxide	过氧麦角甾醇	40.36	0.81
薏苡仁	MOL000289	pachymic acid	茯苓酸	33.63	0.81
	MOL001323	sitosterol alpha1	柠檬二烯醇	43.28	0.78
	MOL001494	mandenol	十八碳-6,9-二烯酸乙酯	42.00	0.19
	MOL000359	β -sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75
	MOL000449	stigmasterol	豆甾醇	43.83	0.76
豆蔻	MOL008118	coixenolide	薏苡仁酯	32.40	0.43
	MOL000230	pinocembrin	松属素	57.56	0.20
	MOL000239	jaranol	华良姜素	50.83	0.29
	MOL000006	luteolin	木犀草素	36.16	0.25
	MOL000098	quercetin	槲皮素	46.43	0.28
通草	MOL000359	β -sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75
	MOL008020	paryriogenin I	通脱木皂苷元 I	45.26	0.79
猪苓	MOL000279	cerevisterol	啤酒甾醇	37.96	0.77
	MOL011169	ergosterol peroxide	过氧麦角甾醇	40.36	0.81
	MOL000817	ergosta-5,7,22-trien-3-ol	麦角甾-5,7,22-三烯-3-醇	46.18	0.72
	MOL000298	ergosterol	麦角固醇	14.29	0.72
	MOL000359	β -sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75
泽泻	MOL000832	alisol B-23-acetate	泽泻醇 B-23-醋酸酯	32.52	0.82
	MOL000853	alisol B	泽泻醇 B	36.76	0.82
	MOL000856	alisol C monoacetate	泽泻醇 C 单乙酸酯	33.06	0.83

续表 1

来源	MOL ID	英文名称	中文名称	OB/%	DL
厚朴	MOL005980	neohesperidin	新橙皮苷	57.44	0.27
	MOL005955	honokiol	和厚朴酚	60.67	0.15
	MOL005970	eucalyptol	桉树脑	60.62	0.32
淡豆豉	MOL008400	glycitein	大豆黄素	50.48	0.24
杏仁	MOL010921	estrone	雌酮	53.56	0.32
	MOL000359	β -sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75
	MOL000449	stigmasterol	豆甾醇	43.83	0.76
	MOL005030	gondoic acid	二十碳-11-烯酸	30.70	0.20
	MOL004355	spinasterol	菠菜甾醇	42.98	0.76
	MOL000211	mairin	白桦脂酸	55.38	0.78
	MOL000492	(+)-catechin	(+)-儿茶素	54.83	0.24
	MOL003410	jujuboside_qt	酸枣仁皂苷	66.95	0.62

2.3 活性成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶对接

将“2.2”项中筛选出的藿朴夏苓汤的成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶进行半柔性对接。分子对接结果结合能越小, 构象越稳定。对接结果显示, 藿朴夏苓汤的活性成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶对接的结合能均小于-17.00 kJ/mol。结合作用排名前 15 的成分为过氧麦角甾醇、菲酮、新橙皮苷、通脱木皂苷元 I、泽泻醇 B、酸枣仁皂苷、泽泻醇 C 单乙酸酯、常春藤皂苷元、泽泻醇 C、泽泻醇 B-23-醋酸酯、麦角甾-7,22-二烯-3-酮、柠檬二烯醇、啤酒甾醇、黄芩苷、 β -羟基-羊毛甾-8,24-二烯-21-酸, 对接结果见表 2。其中 10 个成分的对接结果优于推荐药物, 过氧麦角甾醇源自茯苓、猪苓, 其与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶相互作用结果最显著。

2.4 活性成分与 ACE2 靶点对接

将“2.2”中筛选出的藿朴夏苓汤的成分与 ACE2 蛋白进行半柔性对接。结果显示藿朴夏苓汤活性成分与 ACE2 对接后结合能均小于-28.00 kJ/mol, 通草中成分通脱木皂苷元 I 与 ACE2 对接结果最好, 且有 43 个成分结合能小于推荐药物对接结合能, 与 ACE2 对接结合作用排名前 15 的成分为通脱木皂苷元 I、白桦脂酸、黄芩苷、麦角甾-5,7,22-三烯-3-醇、利卡灵 B、菠菜甾醇、桉树脑、环木菠萝烯酸、雌酮、菲酮、啤酒甾醇、过氧麦角甾醇、豆甾醇、泽泻醇 B-23-醋酸酯、酸枣仁皂苷, 对接结果见表 2。

2.5 筛选藿朴夏苓汤治疗早期 COVID-19 湿邪郁肺证关键成分及对接构象分析

根据 2 次对接结果, 以结合能小于或等于推荐

药物结合能为标准筛选成分, 并进行合并, 发现与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 都有较强结合力的 12 个关键成分, 分别为菲酮、黄芩苷、酸枣仁皂苷、啤酒甾醇、常春藤皂苷元、过氧麦角甾醇、柠檬二烯醇、麦角甾-7,22-二烯-3-酮、通脱木皂苷元 I、泽泻醇 B-23-醋酸酯、泽泻醇 B、新橙皮苷, 具体信息见表 2。12 个成分来自藿香、半夏、杏仁、茯苓、薏苡仁、猪苓、通草、泽泻、厚朴 9 味药, 没有发现藿朴夏苓汤中淡豆豉、豆蔻 2 药中的成分。综合 2 次对接结果, 排名前 3 的化学成分为通脱木皂苷元 I、过氧麦角甾醇、黄芩苷。化合物与蛋白质之间氢键的形成会使两者之间结合更加紧密, 分析 3 种成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶对接构象 (图 1), 通木皂苷元 I 与 151 位 ASN 残基, 过氧麦角甾醇与 128 位 CYS 残基、294 位 PHE 残基, 黄芩苷与 287 位 LEU 残基、137 位 LYS 残基、199 位 THR 残基、131 位 ARG 残基存在氢键相互作用。3 种成分与 ACE2 对接构象如图 2 所示, 通脱木皂苷元 I 与 982 位 ARG 残基, 过氧麦角甾醇与 653 位 GLY 残基, 黄芩苷与 960 位 ASN 残基、727 位 ASP 残基、307 位 VAL 残基、577 位 SER 残基、576 位 CYS 残基发生氢键相互作用。

2.6 关键成分靶点的 PPI 网络构建及核心靶点的筛选

构建“2.5”项中获得的 12 个关键成分靶点 PPI 网络, 其相互作用关系 4 538 条, 节点数 914 个。通过 CytoNCA 插件对网络进行筛选, 首先以度 ≥ 12 进行筛选, 接着以度 ≥ 13 、介数 ≥ 163.535 、紧密

表 2 藿朴夏苓汤活性成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 部分对接结果

Table 2 Partial docking results of active components of Huopo Xialing Decoction with SARS-CoV-2 3CL hydrolase and ACE2

来源	成分	CAS 号	与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶对接结合能/(kJ·mol ⁻¹)	与 ACE2 对接结合能/(kJ·mol ⁻¹)
广藿香	菲酮	484-16-2	-35.56	-43.93
半夏	黄芩苷	31564-28-0	-33.05	-46.86
	环木菠萝烯酸	469-38-5	-31.38	-44.35
杏仁	菠菜甾醇	481-18-5	-29.28	-45.19
	雌酮	53-16-7	-30.12	-44.35
	酸枣仁皂苷	55466-05-2	-34.73	-43.93
	白桦脂酸	472-15-1	-32.21	-47.28
茯苓	常春藤皂苷元	465-99-6	-33.47	-41.41
	3 β -羟基-羊毛甾-8,24-二烯-21-酸	24160-36-9	-33.05	-39.74
薏苡仁	柠檬二烯醇	474-40-8	-33.05	-41.83
猪苓	麦角甾-7,22-二烯-3-酮	32507-77-0	-33.05	-43.08
	麦角甾-5,7,22-三烯-3-醇	—	-32.21	-46.86
通草	通脱木皂苷元 I	—	-35.15	-47.69
泽泻	泽泻醇 B-23-醋酸酯	26575-95-1	-33.47	-43.93
	泽泻醇 B	18649-93-9	-34.73	-42.67
	泽泻醇 C 单乙酸酯	26575-93-9	-33.89	-40.58
	泽泻醇 C	30489-27-1	-33.47	-39.74
厚朴	桉树脑	97-53-0	-30.54	-44.77
	新橙皮苷	13241-33-3	-35.56	-42.67
豆蔻	利卡灵 B	51020-87-2	-30.54	-45.61
半夏、杏仁、薏苡仁	豆甾醇	83-48-7	-29.70	-43.93
茯苓、猪苓	过氧麦角甾醇	2061-64-5	-36.40	-43.93
	啤酒甾醇	516-37-0	-33.05	-43.93
推荐药物	洛匹那韦	192725-17-0	-33.05	-41.00
	α -干扰素	—	-27.20	-40.58
	磷酸氯喹	50-63-5	-25.10	-32.22

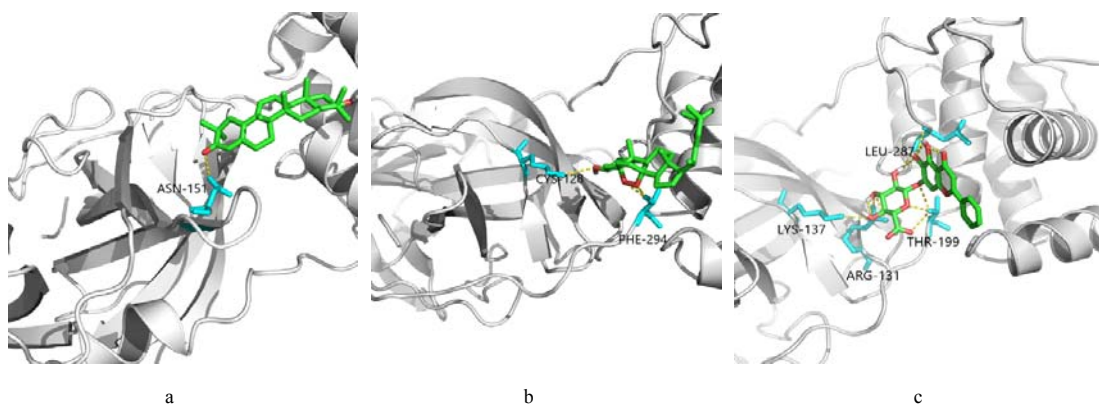


图 1 通脱木皂苷元 I (a)、过氧麦角甾醇 (b)、黄芩苷 (c) 与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的对接构象

Fig. 1 Docking conformations of paryriogenin I (a), ergosterol peroxide (b) and baicalin (c) with SARS-CoV-2 3CL hydrolase

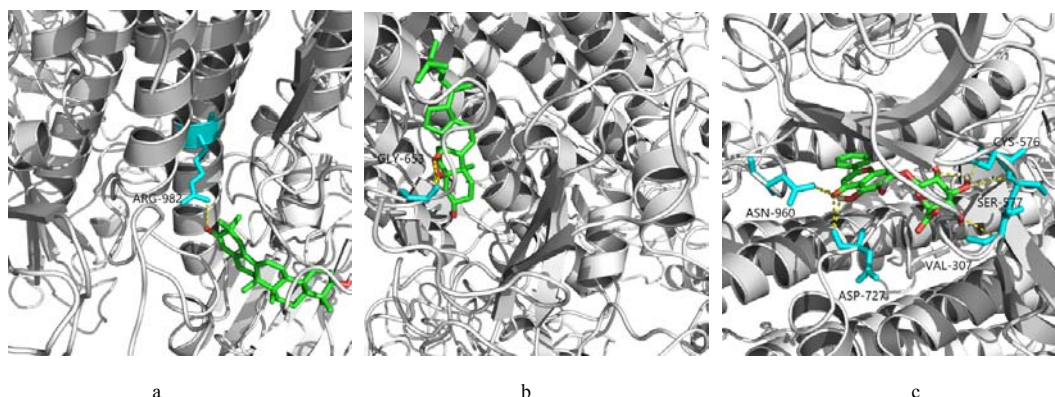


图 2 通脱木皂苷元 I (a)、过氧麦角甾醇 (b)、黄芩苷 (c) 与 ACE2 的对接构象

Fig. 2 Docking conformations of paryriogenin I (a), ergosterol peroxide (b) and baicalin (c) with ACE2

度 ≥ 0.423 、特征向量 ≥ 0.043 、局部平均连通度 ≥ 3.628 、网络 ≥ 4.268 为标准筛选,最终获得 67 个核心节点、476 条相互作用关系的 PPI 网络,节点即靶点,如图 3 所示(度值越大,节点颜色越深)。

2.7 核心靶点的 GO、pathway、KEGG 富集分析

对 2.6 中获得的 67 个核心靶点通过 STRING 数据库进行 GO 分析,GO 富集分析包括生物过程(BP)、细胞组成(CC)、分子功能(MF)3 部分,根据 P 值筛选每部分显著性前 10 的条目绘制条形图,如图 4 所示。结果显示藿朴夏苓汤抗 SARS-CoV-2 的 12 个关键成分参与刺激反应的调节(regulation of response to stimulus)、信号转导调控(regulation of signal transduction)、信号转导的正调控(positive regulation of signal transduction)、细胞过程正调控(positive regulation of cellular process)、调节细胞死亡(regulation of cell death)等生物过程;胞浆(cytosol)、含蛋白质复合物(protein-containing

complex)、细胞核(nucleus)、细胞内膜结合细胞器(intracellular membrane-bounded organelle)等细胞组成;酶结合(enzyme binding)、激酶结合(kinase binding)、相同蛋白质结合(identical protein binding)等分子功能。

借助 Cytoscape 中的 ClueGO 插件,对 67 个核心靶点进行 KEGG 富集分析,结果分别如图 5、6。Pathway 分析结果显示,12 个关键成分可能参与白细胞介素信号(signaling by interleukins)、癌症 EGFR 信号(signaling by EGFR in cancer)、酪氨酸激酶信号转导(signaling by receptor tyrosine kinases)、编程性细胞死亡(programmed cell death)等通路,其中白细胞介素细胞信号通路占 50.83%。KEGG 富集分析结果主要涉及慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia)、丙型肝炎(hepatitis C)、乙型肝炎(hepatitis B)、人巨细胞病毒感染(human cytomegalovirus infection)、卡波西肉瘤相关疱疹病

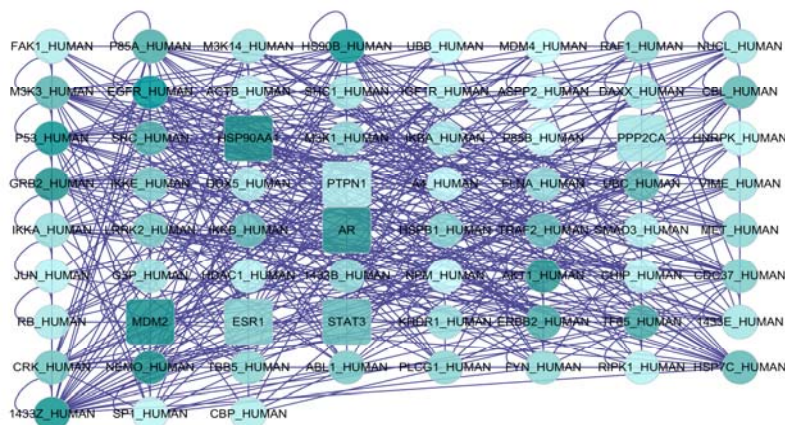


图 3 关键成分核心靶点的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of core target of key components

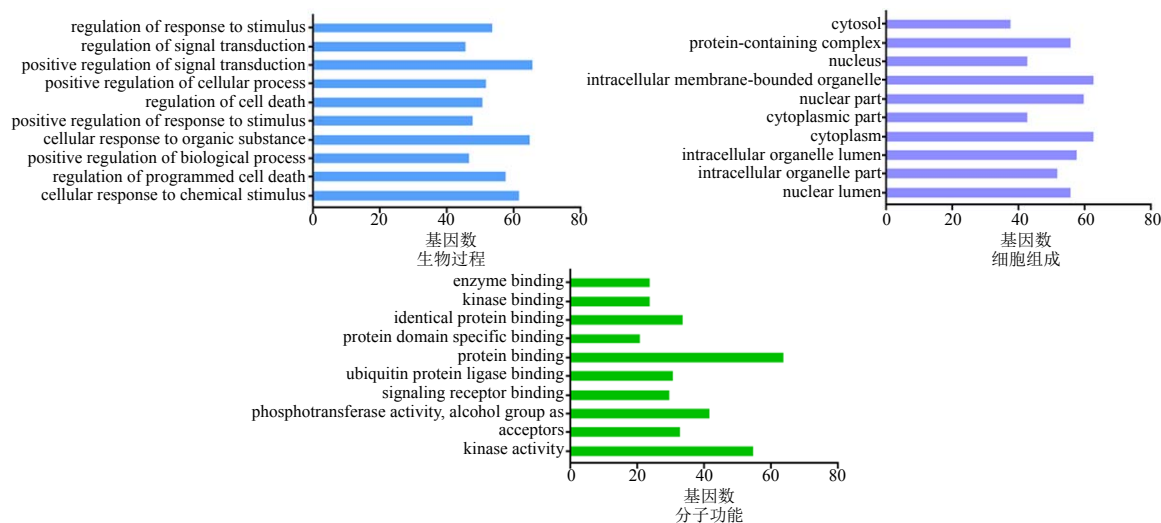


图 4 核心靶点的 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of core targets

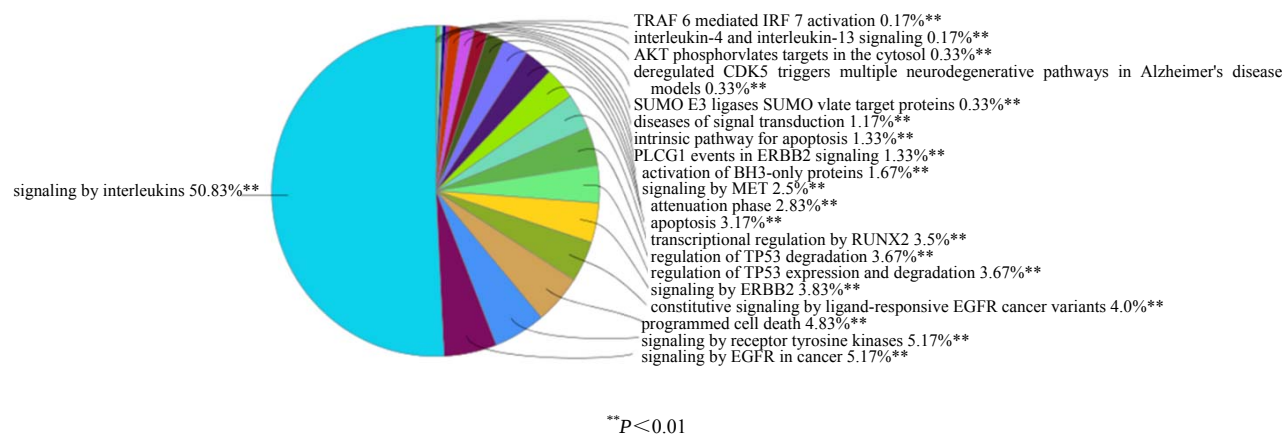


图 5 核心靶点的 Pathway 富集分析

Fig. 5 Pathway enrichment analysis of core targets

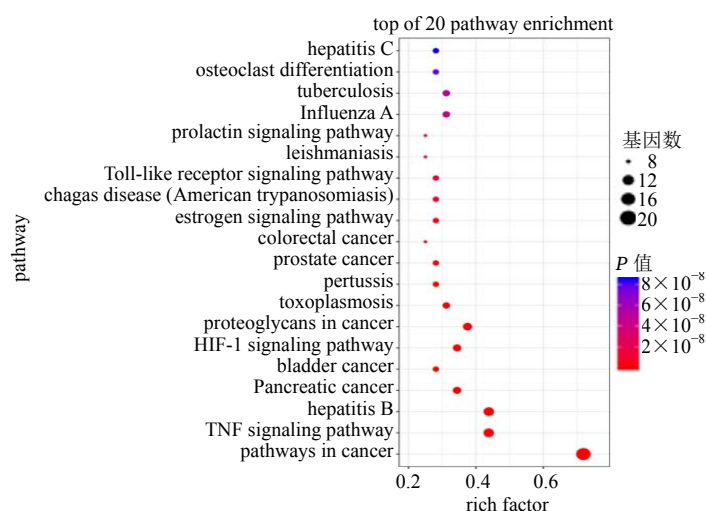


图 6 核心靶点的 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of core targets

毒感染 (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、eb 病毒感染 (Epstein-Barr virus infection)、病毒致癌(viral carcinogenesis)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway)、C 型凝集素受体信号通路 (C-type lectin receptor signaling pathway) 等。

3 讨论

COVID-19 患者湿邪为患, 病程迁延, 从而导致病情复杂多变。藿朴夏苓汤用于治疗早期 COVID-19 湿邪郁肺证, 使湿邪得以透达, 脾胃得以健旺^[8]。在 COVID-19 患者血清中检测到较高表达的炎症细胞因子^[12], 如白细胞介素-2(IL-2)、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)》病理检测结果显示 COVID-19 死亡患者肺部有明显的炎性细胞浸润, 可见 SARS-CoV-2 的致病机制与免疫系统密切相关。药理研究发现, 藿朴夏苓汤能显著降低 TNF- α 、IL-6 等炎症细胞因子的含量, 抑制 NF- κ B 炎症通路的表达^[13]。

借助分子对接技术基于蛋白质受体, 选择最好的“结合亲和力”作为强配体, 用于进一步药物研发, 在计算机辅助药物设计中发挥了重要作用^[14]。目前在 COVID-19 缺乏特效药物的情况下, 分子对接技术在药物筛选方面发挥了其独特优势^[15]。本研究选择 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 作为受体蛋白, 虚拟筛选藿朴夏苓汤治疗早期 COVID-19 湿邪郁肺证物质基础。但目前分子对接技术并没有规定结合能大小来定义优势结果, 所以本实验选择诊疗方案中推荐药物与受体蛋白对接后的结合能为基准, 筛选出结合能小于或等于推荐药物结合能的活性成分, 合并 2 次筛选结果。最终筛选出菲酮、黄芩苷、酸枣仁皂苷、啤酒甾醇、常春藤皂苷元、过氧麦角甾醇、柠檬二烯醇、麦角甾-7,22-二烯-3-酮、通脱木皂甙元 I、泽泻醇 B-23-醋酸酯、泽泻醇 B、新橙皮苷共 12 个核心成分, 淡豆豉和豆蔻中没有发现相关物质基础。其中通草中的通脱木皂苷元 I、茯苓、猪苓中的过氧麦角甾醇, 半夏中的黄芩苷与两蛋白结合作用优势显著, 优于推荐药物。

基于网络药理学预测藿朴夏苓汤中 12 个关键成分治疗早期 COVID-19 湿邪郁肺证的作用机制, 获得核心靶点 67 个。对其生物过程、相关通路分析,

预测其参与白细胞介素信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、T 细胞受体信号通路、C 型凝集素受体信号通路等, 白细胞介素、MAPK、T 细胞受体信号通路在人体免疫系统的调节以及炎症反应中起着重要作用, 而 PI3K-Akt 信号通路可以参与 T 细胞发育、功能与稳定性的调节^[16], C 型凝集素受体是一类模式识别受体, 在机体对病毒、细菌、真菌等多种呼吸道病原体的天然免疫应答及其调控中起着关键作用^[17]。可见藿朴夏苓汤可能通过调节以上信号通路发挥抗 COVID-19 作用。研究发现, 过氧麦角甾醇能导致促炎介质和干扰素 (IFN- β 和 IFN- λ 1) 的产生减少, 阻断 RIG-I 信号抑制甲型流感病毒 (IAV) 相关的炎症和凋亡^[18]。黄芩苷具有显著的抗炎^[19-20]作用, 影响细胞信号的转导而发挥抗病毒作用^[19], 临床多用于肺炎、肝炎的治疗^[21]。啤酒甾醇可以降低 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎性细胞因子的表达, 通过靶向 MAPK、NF- κ B、AP-1 和 Nrf2 介导的 HO-1 信号级联反应治疗炎症性疾病^[22]。泽泻醇 B-23-醋酸酯、泽泻醇 B 都属于泽泻中具有抗炎作用的三萜类化合物^[23], 参与人体补体系统的调节^[24]。泽泻醇 B-23-醋酸酯可以减少炎症浸润, 降低 IL-6、IL-1、TNF- α 水平^[25]。常春藤皂苷元^[26]、新橙皮苷^[27]也具有抗炎作用。通脱木皂苷元 I 属于通草中三萜类化合物, 有报道其三萜类化合物具有抗炎活性^[28]。目前对藿香中菲酮以及薏苡仁中柠檬二烯酸的研究较少, 还需要进一步的研究。但是藿香中挥发油成分具有显著抗病毒作用^[29], 薏苡仁提取物存在免疫调节作用^[30]。由此可见藿朴夏苓汤中 12 个核心成分抗 SARS-CoV-2 作用可能通过调节免疫系统来抑制相关炎症因子的表达。

综上, 藿朴夏苓汤中多成分存在潜在的抗 SARS-CoV-2 作用, 可能通过阻断 SARS-CoV-2 病毒蛋白合成, 阻止 SARS-CoV-2 病毒进入宿主细胞, 调控白介素信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、T 细胞受体信号通路、C 型凝集素受体信号通路, 抑制相关炎症因子的表达发挥作用。过氧麦角甾醇、黄芩苷成分抗 SARS-CoV-2 作用值得重点关注。为临床应用藿朴夏苓汤治疗早期 COVID-19 湿邪郁肺证的作用机制提供数据支撑。

参考文献

- [1] 高树明, 马 英, 杨丰文, 等. 张伯礼: 中医药在防治新型冠状病毒肺炎全过程发挥作用 [J]. 天津中医药,

- 2020, 37(2): 121-124.
- [2] 王玉光, 齐文升, 马家驹, 等. 新型冠状病毒肺炎中医临床特征与辨证治疗初探 [J]. 中医杂志, 2020, 61(4): 281-285.
- [3] Xu X, Chen P, Wang J, *et al.* Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(3): 457-460.
- [4] Wang P H, Cheng Y. Increasing host cellular receptor—angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression by coronavirus may facilitate 2019-nCoV infection [J]. *BioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.24.963348>.
- [5] 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.
- [6] 王传池, 吴 珊, 江丽杰, 等. 全国各地区新型冠状病毒肺炎中医药治疗方案综合分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(2): 1-7.
- [7] 盛生宽, 盛全成. 藿朴夏苓汤临床运用体会 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(2): 19-20.
- [8] 徐 凯, 朱尔春, 陶方泽. 藿朴夏苓汤方证探析及临床运用体会 [J]. 环球中医药, 2016, 9(1): 70-72.
- [9] 常丽萍, 吕军影, 阙铁生, 等. 藿朴夏苓汤的文献研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(17): 2207-2208.
- [10] 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, [2020-03-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200220.1443.002.html>.
- [11] 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/OL]. 中医杂志, [2020-03-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200225.0919.002.html>.
- [12] 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.
- [13] 钟艳花, 林 重, 钟映芹, 等. 藿朴夏苓汤对 HBZY-1 细胞及 DN 大鼠 NF- κ B 炎症通路的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(4): 381-386.
- [14] Chen Y C. Beware of docking! [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(2): 78-95.
- [15] 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]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1213-1218.
- [16] Pompura S L, Dominguez-Villar M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function [J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 103(6): 1065-1067.
- [17] Raymond B B A, Neyrolles O, Rombouts Y. C-type lectins in immunity to lung pathogens [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2020, doi: 10.1007/82_2020_197.
- [18] Zhou B, Liang X, Feng Q, *et al.* Ergosterol peroxide suppresses influenza A virus-induced pro-inflammatory response and apoptosis by blocking RIG-I signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172543.
- [19] Dinda B, Dinda S, Dassharma S, *et al.* Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.
- [20] Guo M, Zhang N, Li D, *et al.* Baicalin plays an anti-inflammatory role through reducing nuclear factor-kappaB and p38 phosphorylation in *S. aureus*-induced mastitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16(2): 125-30.
- [21] 龙 宇, 向 燕, 谭裕君, 等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6142-6148.
- [22] Alam M B, Chowdhury N S, Sohrab M H, *et al.* Cerevisterol alleviates inflammation via suppression of MAPK/NF-kappaB/AP-1 and activation of the Nrf2/HO-1 signaling cascade [J]. *Biomolecules*, 2020, doi: 10.12659/MSM.918252.
- [23] 张慧娟, 龚苏晓, 许 浚, 等. 泽泻药材的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4741-4751.
- [24] Matsuda H, Tomohiro N, Yoshikawa M, *et al.* Studies on *Alismatis Rhizoma*. II. Anti-complementary activities of methanol extract and terpene components from *Alismatis Rhizoma* (dried rhizome of *Alisma orientale*) [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(12): 1317-1321.
- [25] Wang B, Chen L, Dai L, *et al.* Alisol B 23-acetate ameliorates lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction by suppressing Toll-like receptor 4 (TLR4)/NADPH oxidase 2 (NOX2) signaling pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019, doi: 10.12659/MSM.918252.
- [26] 邢 颖, 南敏伦, 王 雪, 等. 常春藤皂苷元的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 226-234.
- [27] Zhao T, Hu S, Ma P, *et al.* Neohesperidin suppresses IgE-mediated anaphylactic reactions and mast cell activation via Lyn-PLC-Ca²⁺ pathway [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(8): 2034-2043.
- [28] 徐静兰, 胡慧军, 张 虹, 等. 通草的化学成分及生物活性的研究进展 [J]. 临床合理用药杂志, 2016, 9(11): 178-181.
- [29] 彭绍忠, 李 耿, 秦 臻, 等. 广藿香不同提取部位体内抗流感病毒作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2578-2579.
- [30] 毕天琛, 杨国宁, 马海春. 中药薏苡仁化学成分及药理活性研究进展 [J]. 海峡药学, 2019, 31(11): 52-56.