

# 基于网络药理学与分子对接技术的补肺活血胶囊用于新型冠状病毒肺炎(COVID-19)恢复期治疗的分子机制研究

郭盛<sup>1</sup>, 武文星<sup>1</sup>, 谢红<sup>1</sup>, 李全<sup>2</sup>, 王恒斌<sup>2\*</sup>, 段金廛<sup>1\*</sup>

1. 南京中医药大学 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/江苏省方剂高技术重点实验室, 江苏 南京 210023
2. 雷允上药业集团有限公司, 江苏 苏州 215003

**摘要:** 目的 探索补肺活血胶囊用于新型冠状病毒肺炎(COVID-19)恢复期治疗的潜在作用机制, 为其临床用药提供理论指导。方法 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)、BATMAN-TCM、中国知网(CNKI)和Pubmed数据库获得补肺活血胶囊的活性成分及作用靶点; 通过GeneCards数据库获取COVID-19相关靶点, 并采用交集法筛选出与补肺活血胶囊活性组分作用的共同靶点, 运用Cytoscape 3.7.2构建“中药-化合物-靶点”网络, 并通过String数据库构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络; 通过DAVID数据库进行KEGG通路和GO功能富集分析, 并运用R version 3.6.3软件将结果进行可视化; 采用AutoDock Tools 1.5.6、AutoDock vina 1.1.2进行分子对接研究。结果 从补肺活血胶囊中共筛选出潜在活性成分32个, 对应靶点203个, 核心化合物11个, 核心靶点52个; PPI网络分析获得补肺活血胶囊干预COVID-19关键作用靶点25个; GO及KEGG富集分析得出与补肺活血胶囊治疗COVID-19作用相关的生物过程251个( $P < 0.05$ ), 相关信号通路93条( $P < 0.05$ ); 分子对接结果显示补肺活血胶囊核心化合物与新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL水解酶和血管紧张素转化酶II(ACE2)具有较好的亲和。结论 补肺活血胶囊含有的核心化合物可作用于IL6、MAPK8、PTGS2、PTGS1、NCOA2等靶点, 调节多条信号通路, 从而发挥对COVID-19恢复期的治疗作用。

**关键词:** 补肺活血胶囊; 新型冠状病毒肺炎; SARS-CoV-2 3CL水解酶; 血管紧张素转化酶II; 网络药理学

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)09-2307-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.004

## Molecular mechanism of Bufei Huoxue Capsule on COVID-2019 based on network pharmacology and molecular docking

GUO Sheng<sup>1</sup>, WU Wen-xing<sup>1</sup>, Xie Hong<sup>1</sup>, LI Quan<sup>2</sup>, WANG Heng-bin<sup>2</sup>, DUAN Jin-ao<sup>1</sup>

1. National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Suzhou 215003, China

**Abstract: Objective** To explore the potential mechanism of Bufei Huoxue Capsule (BHC) on coronavirus disease 2019 (COVID-19), and provide a theoretical basis for the clinical application of BHC. **Methods** TCMSP, BATMAN-TCM, CNKI and Pubmed databases were used to search the compounds and targets of BHC and GeneCards database was used to search the targets of COVID-19; The intersection method was used to obtain the targets related to the therapeutic effect of BHC. Cytoscape 3.7.2 software was applied for the construction of CMM-compounds-targets network map. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING database. Gene ontology (GO) functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were conducted by DAVID. AutoDock Tools 1.5.6 and AutoDock vina 1.1.2 were used for molecular docking. **Results** A total of 32 potential active components were screened from BHC, corresponding to 203 targets. Among them, there were 11 core compounds

收稿日期: 2020-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81873189); 国家自然科学基金资助项目(81673532); 江苏省“六大人才高峰”项目(YY-026)

作者简介: 郭盛, 副研究员, 研究方向为中药资源化学与功效物质基础。E-mail: guosheng@njucm.edu.cn

\*通信作者 段金廛, 博士, 教授。Tel: (025)85811291 E-mail: dja@njucm.edu.cn

王恒斌, 高级工程师。Tel: (0512)68417086 E-mail: wanghengbin@lys.cn

and 52 core targets. PPI network analysis showed that there were 25 key targets intervening COVID-19 by BHC. A total of 251 biological processes ( $P < 0.05$ ) and 93 pathways ( $P < 0.05$ ) were obtained by GO analysis and KEGG analysis, respectively. The results of molecular docking showed that the key compounds had good affinity with SARS-CoV-2 3CL hydrolase and angiotensin converting enzyme II. **Conclusion** The active compounds of BHC can target IL6, MAPK8, PTGS2, PTGS1 and NCOA2 to regulate multiple signal pathways, and play a therapeutic role in the recovery period of COVID-19.

**Key words:** Bufe Huoxue Capsule; COVID-2019; SARS-CoV-2 3CL hydrolase; angiotensin converting enzyme II; network pharmacology

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 是一种新发现的冠状病毒, 其感染人体后会导致急性呼吸道传染病<sup>[1]</sup>, 截止 2020 年 4 月 29 日, 全球累计确诊病例逾 300 万例, 累计死亡患者达 20 万余例。SARS-CoV-2 属于  $\beta$  属冠状病毒, 世界卫生组织 (WHO) 将由其导致的肺炎命名为 coronavirus disease 2019 (COVID-19), 我国卫生健康委员会 (下文简称为国家卫健委) 将其命名为“新型冠状病毒肺炎”<sup>[2-3]</sup>。COVID-19 患者的主要临床症状表现为发热、干咳、乏力等, 肺部呈现纤维化及渗出性病变<sup>[4-5]</sup>。目前, 对 SARS-CoV-2 尚无特异性治疗药物, 除使用利巴韦林、洛匹那韦/利托那韦、磷酸氯喹、阿比多尔等潜在抗病毒药物外<sup>[5-7]</sup>, 临床多采用中西医结合治疗方法, 且效果显著, 凸显了中医药在防治病毒性传染病方面的独特优势<sup>[8]</sup>。

COVID-19 在中医临床属于“疫”病范畴, 病因为感受“疫戾”之气, 病位在肺、脾, 基本病机特点为“湿、毒、瘀、闭”<sup>[6]</sup>。国家卫健委颁布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)》根据疾病发生的不同阶段(医学观察期、临床治疗期、恢复期), 结合证候类型提出了多种治疗方案, 同时也推荐了系列中药处方及中成药应用于 COVID-19 不同阶段的治疗<sup>[5]</sup>。各省(市、区)也依据地区患者发病特点分别发布了地方诊疗方案及推荐用药目录。补肺活血胶囊具有益气活血、补肺固肾功效, 被列入北京、河北、安徽、贵州等地 COVID-19 诊疗推荐用药目录, 主要用于 COVID-19 恢复期的治疗<sup>[9-11]</sup>。补肺活血胶囊由黄芪、赤芍、补骨脂 3 味药物制成, 载入《中国药典》2015 年版, 临床主要用于肺心病(缓解期)属气虚血瘀证, 症见咳嗽气促或咳嗽胸闷、心悸气短、肢冷乏力、腰膝酸软、口唇紫绀、舌淡苔白或舌紫暗的治疗。现代研究表明, 补肺活血胶囊可有效改善患者肺纤维化样病变, 降低炎症因子表达, 促进肺组织修复, 且可有效提高患者免疫力, 有助于 COVID-19 恢复

期患者肺功能的恢复, 改善咳喘症状<sup>[12-15]</sup>, 但其分子机制尚未阐明。

网络药理学是一门运用网络方法分析药物与疾病、靶点之间“多成分、多靶点、多途径”协同作用关系的药理学分支学科, 可以构建“药物-成分-靶点-疾病”多维网络模型, 从而探讨药物与疾病之间的关系与变化规律<sup>[16]</sup>。本研究基于网络药理学研究方法, 系统分析补肺活血胶囊用于 COVID-19 恢复期治疗的有效成分、潜在靶点、作用通路及生物过程等信息, 并筛选其主要活性成分开展分子对接研究, 探讨补肺活血胶囊干预 COVID-19 发生发展的潜在分子机制, 为补肺活血胶囊用于 COVID-19 恢复期治疗提供理论依据。

## 1 方法

### 1.1 补肺活血胶囊化学成分收集

利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/>)<sup>[17]</sup> 搜索“黄芪”“赤芍”等关键词, 并结合 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 收集补肺活血胶囊中的化学成分及各化学成分的药动学等参数; 对于未检索到的单味药补骨脂, 通过中国知网、Pubmed、BATMAN-TCM 等数据库搜集其化学成分, 并结合 TCMSP、PubChem 收集其药动学参数。

### 1.2 潜在活性成分及其靶标蛋白筛选

根据收集到的化学成分列表及其口服生物利用度 (OB)、类药性 (DL) 等信息, 以  $OB \geq 30\%$  和  $DL \geq 0.18$  作为筛选阈值, 筛选补肺活血胶囊中能被较好地吸收入血的化学成分, 作为潜在活性成分<sup>[18-19]</sup>。在此基础上, 借助 TCMSP 数据库查询潜在活性成分的靶标蛋白, 并借助 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)<sup>[20]</sup>、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)<sup>[21]</sup> 等将靶标蛋白名称转换为对应的基因名称。

### 1.3 “中药-化合物-靶点”网络的构建

将筛选出的靶标蛋白基因列表、活性成分、药物等信息输入 Cytoscape 3.7.0 软件 (<http://www.cytoscape.org/>)

cytoscape.org/) [22], 构建“中药-化合物-作用靶点”网络, 导出其相关的拓扑数据, 如度值 (degree)、中心度值 (betweenness centrality, BC) 等, 并运用“Network Analyzer”功能分析其拓扑学属性。

#### 1.4 COVID-19 相关靶点的获取

以“novel coronavirus pneumonia”为关键词, 通过 GeneCard 数据库 (<https://www.genecards.org/>) [21], 预测与 COVID-19 相关的作用靶点; 为了提高结果的准确性, 通过数据库自带的 Gifts 算法计算靶点与 COVID-19 的相关度, 按照相关度排序选择得分  $\geq 30$  的靶点作为 COVID-19 病理靶点, 并摘录相应靶点的标准基因名。

#### 1.5 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络的构建与分析

利用 Venny 分析工具, 将活性成分对应的靶点与病理靶点进行叠加, 取交集, 作为补肺活血胶囊与 COVID-19 关系密切的靶点, 导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>) [23], 限定物种为“Homo Sapiens”, 去除孤立靶点, 以置信度 (0.4) 为条件筛选, 获取蛋白相互作用关系。分析结果保存为 TSV 格式文件, 导入 Cytoscape 3.7.0 软件, 结合节点度值大小, 构建 PPI 网络。

#### 1.6 靶点通路分析

为进一步获得各靶点的生物学功能及相关生物学通路信息, 将靶标蛋白基因列表导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) [24], 限定物种为“Homo Sapiens”, 进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 信号通路分析, 运用 R version 3.6.3 软件将其结果进行可视化。

#### 1.7 分子对接

为进一步筛选补肺活血胶囊中可能干预 SARS-COV-2 感染过程的潜在活性成分, 将“1.3”项中筛选出的关键化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和血管紧张素转化酶 II (ACE2) 进行分子对接; 先用 ChemOffice 软件构建活性成分 3D 分子结构, 并调整空间构象, 使其能量最小化, 保存为 mol2 格式。从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) [25] 下载靶蛋白的三维晶体结构 (PDB ID 为 6LU7 和 1R4L, PDB 格式), 采用 AutoDock Tools 1.5.6 软件删除靶蛋白的水分子, 分离配体和受体, 添加非极性氢, 计算 Gasteiger 电荷, 分别保存为 pdbqt 格式的文件。将已经保存为 mol2 格式的化合物导入 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。运行 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行对接, 采用 Pymol 软件可视化对接结果。

## 2 结果

### 2.1 潜在活性成分的筛选与对应靶点的收集

通过 TCMSP 检索到黄芪、赤芍的化学成分共 206 个, 其中 87 个来自于黄芪, 119 个来自于赤芍; 通过中国知网、Pubmed、BATMAN-TCM 等数据库搜集到补骨脂的化学成分共 148 个。利用 TCMSP 平台, 以  $OB \geq 30\%$  且  $DL \geq 0.18$  为阈值筛选出潜在活性成分共 50 个 (表 1), 其中 23 个来自于黄芪, 28 个来自于赤芍, 5 个来自于补骨脂。50 个潜在活性成分中, 有 32 个化合物通过 TCMSP 数据库共收集到 203 个靶点。

### 2.2 “中药-化合物-靶点”网络的构建与分析

运用 Cytoscape 3.7.0 软件构建“中药-化合物-靶点”网络, 见图 1, 共包括 238 个节点 (3 种中药节点, 32 种化合物节点, 203 种靶点节点) 和 544 条边。并借助 Cytoscape 3.7.0 软件中的“Network analyze”功能对网络进行拓扑属性分析, 其中度值与中心度值是衡量 1 个节点在网络中关键性的 2 个重要参数。选取度值与中心度值较大的节点, 这些节点在网络中起到了枢纽作用, 可能是关键成分或靶点 [26]。该网络中平均每个活性成分与 17 个靶点相互作用, 每个靶点平均与 2.5 个活性成分相互作用。以节点度值的平均数作为筛选标准, 同时参考其中心度值, 筛选出大于平均度值的化合物和靶点作为核心化合物和核心靶点, 共得到 11 个核心化合物和 52 个核心靶点 (表 2), 其中排名前 5 位的活性成分为槲皮素、山柰酚、7-O-甲基异丙醇胺、黄芩素、刺芒柄花素, 分别能与 137、53、33、30、29 个靶点蛋白发生作用; 排名前 5 的靶点为前列腺素 G/H 合酶 2 (PTGS2)、前列腺素 G/H 合酶 1 (PTGS1)、核受体共激活因子 2 (NCOA2)、丝氨酸蛋白酶 1 (PRSS1)、一氧化氮合成酶 (NOS2), 分别能与 21、17、17、12、11 个活性化合物相互作用。

### 2.3 COVID-19 靶点的收集与 PPI 网络的构建

通过 GeneCard 数据库共收集到与 COVID-19 相关的靶点 257 个, 与补肺活血胶囊的 203 个靶点进行交集分析后得到 44 个共有靶点, 见图 2。将共有靶点信息输入 String 数据库, 将输出结果 tsv 文件导入 Cytoscape 3.7.0 软件, 构建靶蛋白 PPI 网络。如图 3 所示, 网络中共包含 43 个节点 (其中

表1 补肺活血胶囊中的活性化合物基本信息

Table 1 Basic information of active compounds in Bufei Huoxue Capsule

Mol ID	化合物	OB/%	DL	来源
MOL000033	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i> )-10,13-dimethyl-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[ <i>a</i> ]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	黄芪
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28	黄芪
MOL000211	mairin	55.38	0.78	黄芪
MOL000239	jaranol	50.83	0.29	黄芪
MOL000296	常春藤皂苷元 (hederagenin)	36.91	0.75	黄芪
MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)	49.60	0.31	黄芪
MOL000371	3,9-di- <i>O</i> -methylnissolin	53.74	0.48	黄芪
MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di- <i>O</i> -glucoside	41.72	0.69	黄芪
MOL000378	7- <i>O</i> -甲基异丙醇胺 (7- <i>O</i> -methylisomucronulatol)	74.69	0.30	黄芪
MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside	36.74	0.92	黄芪
MOL000380	黄芪紫檀烷苷 [(6 <i>aR</i> ,11 <i>aR</i> )-9,10-dimethoxy-6 <i>a</i> ,11 <i>a</i> -dihydro-6 <i>H</i> -benzofurano [3,2- <i>c</i> ] chromen-3-ol]	64.26	0.42	黄芪
MOL000387	联苯双酯 (bifendate)	31.10	0.67	黄芪
MOL000392	刺芒柄花素 (formononetin)	69.67	0.21	黄芪
MOL000398	异黄酮酮 (isoflavanone)	109.99	0.30	黄芪
MOL000417	毛蕊异黄酮 (calycosin)	47.75	0.24	黄芪
MOL000433	叶酸 (folic acid)	68.96	0.71	黄芪
MOL000438	(3 <i>R</i> )-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl) chroman-7-ol	67.67	0.26	黄芪
MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di- <i>O</i> -glucosiole	49.28	0.62	黄芪
MOL000442	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48	黄芪
MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	41.88	0.24	黄芪、赤芍
MOL000358	β-谷甾醇 (β-sitosterol)	36.91	0.75	黄芪、赤芍
MOL002776	黄芩苷 (baicalin)	40.12	0.75	黄芪、赤芍
MOL000492	儿茶素 [(+)-catechin]	54.83	0.24	赤芍
MOL001002	鞣花酸 (ellagic acid)	43.06	0.43	赤芍
MOL001918	芍药苷元 (paeoniflorigenone)	87.59	0.37	赤芍
MOL001921	芍药新苷 (lactiflorin)	49.12	0.80	赤芍
MOL001924	芍药苷 (paeoniflorin)	53.87	0.79	赤芍
MOL002714	黄芩素 (baicalein)	33.52	0.21	赤芍
MOL002883	ethyl oleate (NF)	32.40	0.19	赤芍
MOL004355	菠菜甾醇 (spinasterol)	42.98	0.76	赤芍
MOL005043	campest-5-en-3β-ol	37.58	0.71	赤芍
MOL006990	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> )- <i>trans</i> -2-hydroxy-1,8-cineole-β- <i>D</i> -glucopyranoside	30.25	0.27	赤芍
MOL006992	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-4-methoxyl-distylin	59.98	0.30	赤芍
MOL006994	1- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranosyl-8- <i>O</i> -benzoylpaeonisuffrone_qt	36.01	0.30	赤芍
MOL006996	1- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranosylpaeonisuffrone_qt	65.08	0.35	赤芍
MOL006999	stigmast-7-en-3-ol	37.42	0.75	赤芍
MOL007003	苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin)	31.14	0.54	赤芍
MOL007004	芍药内酯苷 (albiflorin)	30.25	0.77	赤芍
MOL007008	4-乙基-芍药苷 (4-ethyl-paeoniflorin_qt)	56.87	0.44	赤芍
MOL007012	4- <i>O</i> -methyl-paeoniflorin_qt	56.70	0.43	赤芍
MOL007014	8-debenzoylpaeonidanin	31.74	0.45	赤芍
MOL007016	芍药苷元酮 (paeoniflorigenone)	65.33	0.37	赤芍
MOL007018	9-ethyl-neo-paeoniaflorin A_qt	64.42	0.30	赤芍
MOL007022	楝叶吴茱萸素 B (evofolin B)	64.74	0.22	赤芍
MOL007025	异苯甲酰芍药苷 (isobenzoylpaeoniflorin)	31.14	0.54	赤芍
MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76	赤芍、补骨脂
MOL001525	胡萝卜苷 (daucosterol)	36.91	0.75	补骨脂、赤芍、黄芪
MOL000448	异补骨脂查耳酮 (isobavachin)	54.44	0.32	补骨脂
MOL003673	wighteone	42.80	0.36	补骨脂
MOL012976	考迈斯托醇 (coumestrol)	32.49	0.34	补骨脂

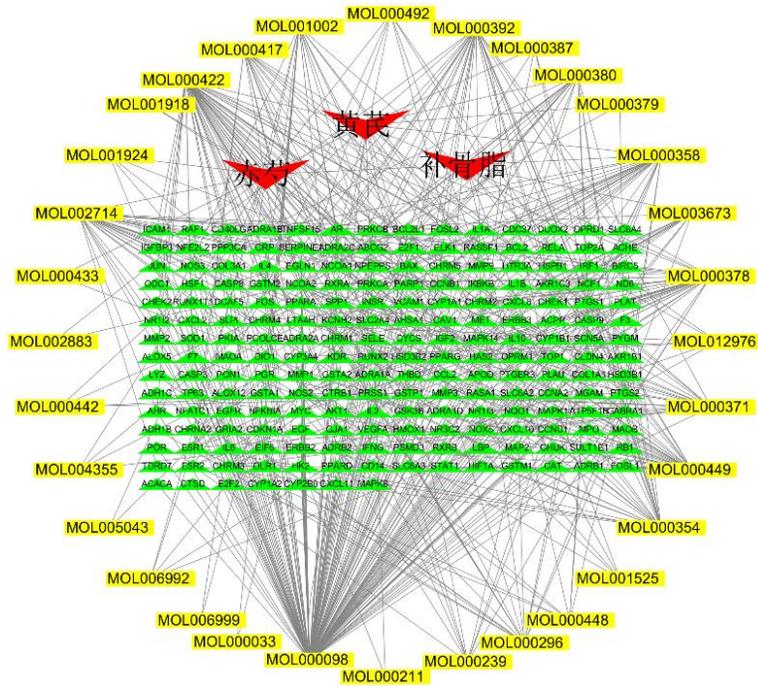


图 1 补肺活血胶囊的中药-化合物-靶点网络

Fig. 1 Chinese materia medica-compounds-targets network of Bufei Huoxue Capsule

表 2 中药-化合物-靶点网络关键节点及其拓扑学特征 (前 11 名)

Table 2 Key nodes of Chinese materia medica-compounds-targets network and their topological characteristics (top 11)

名称	类型	中心度值	度值	名称	类型	中心度值	度值
槲皮素	化合物	0.652 2	137	PTGS2	靶点	0.071 2	21
山柰酚	化合物	0.124 4	53	PTGS1	靶点	0.051 3	17
7-O-甲基异丙醇胺	化合物	0.063 8	33	NCOA2	靶点	0.049 6	17
黄芩素	化合物	0.092 1	30	PRSS1	靶点	0.024 8	12
刺芒柄花素	化合物	0.067 6	29	NOS2	靶点	0.005 2	11
豆甾醇	化合物	0.069 7	28	ESR1	靶点	0.006 7	11
β-谷甾醇	化合物	0.051 1	28	PGR	靶点	0.016 8	11
异鼠李素	化合物	0.040 9	25	PPARG	靶点	0.017 8	11
3,9-di-O-methylnissoin	化合物	0.020 4	20	SCN5A	靶点	0.016 9	10
(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano [3,2-c] chromen-3-ol	化合物	0.015 0	19	RXRA	靶点	0.019 6	10
鞣花酸	化合物	0.027 7	18	GABRA1	靶点	0.024 0	10

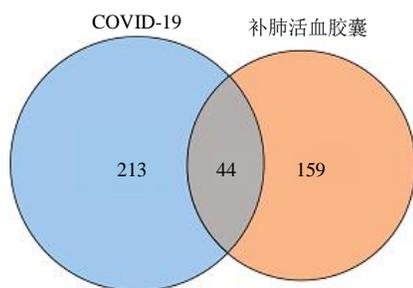


图 2 补肺活血胶囊化学成分作用靶点与 COVID-19 相关疾病靶点交集分析

Fig. 2 Intersection of targets of Bufei Huoxue Capsule and COVID-19

APOD 为孤立靶点, 未参与分析) 和 530 条边。靶蛋白的平均节点度值为 24.7, 其中度值大于平均值的靶点有 25 个, 这 25 个靶点可能是补肺活血胶囊发挥 COVID-19 治疗作用的关键靶点 (图 4)。

### 2.4 GO 及 KEGG 靶点通路富集分析

2.4.1 GO 富集分析 通过使用 DAVID 数据库, GO 富集分析得到 GO 条目 ( $P < 0.05$ ), 包含 251 个生物过程 (biological process, BP) 条目, 23 个细胞组成 (cellular component, CC) 条目, 37 个分子功能 (molecular function, MF) 条目。按照  $-lgP$  值排序, 分别选取前 15 条目, 见图 5。在 BP 中靶点主

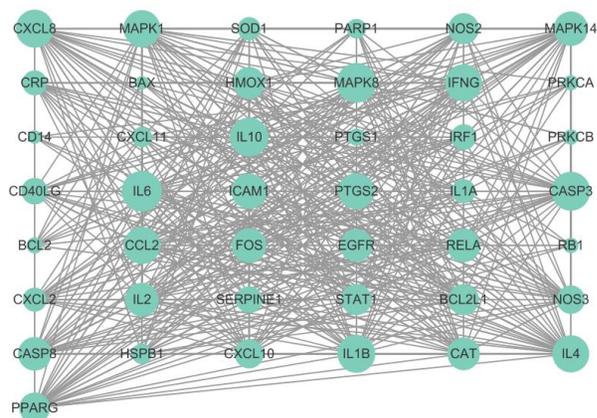


图 3 补肺活血胶囊作用靶点的 PPI 网络

Fig. 3 Protein-protein interaction network of Bufei Huoxue Capsule

要涉及脂多糖的细胞应答 (cellular response to lipopolysaccharide)、炎症反应 (inflammatory response)、药物应答 (response to drug); 在细胞组成中靶点主要涉及细胞外隙 (extracellular space)、细

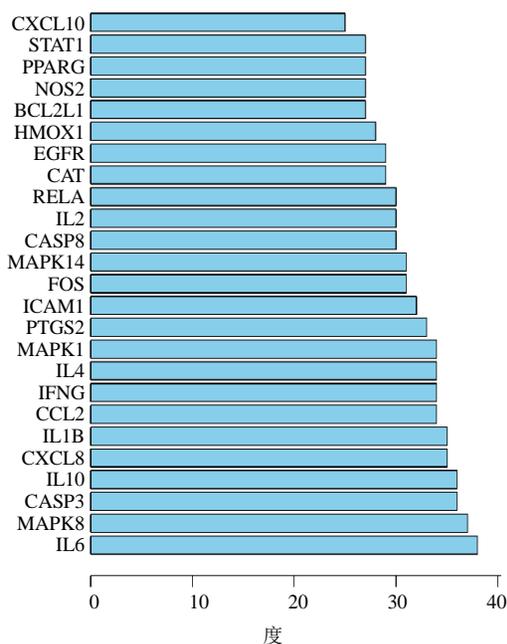


图 4 补肺活血胶囊作用的关键靶点

Fig. 4 Key targets of Bufei Huoxue Capsule

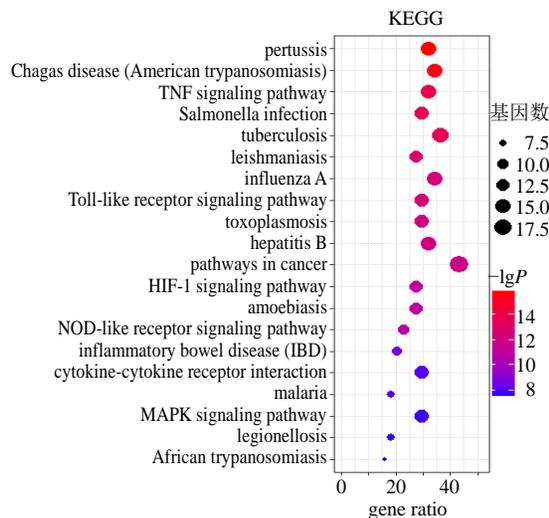
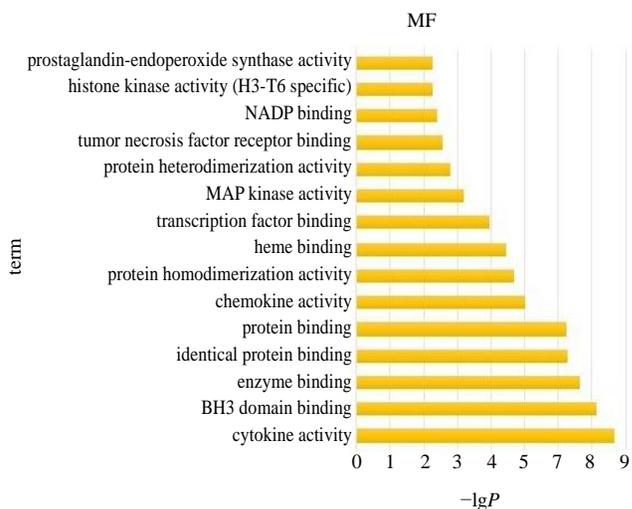
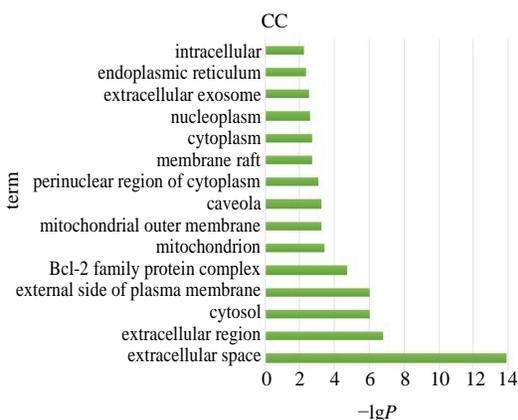
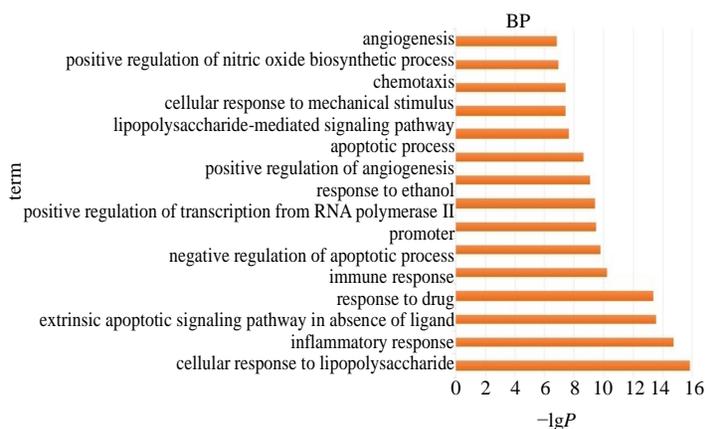


图 5 补肺活血胶囊作用靶点的 GO 及 KEGG 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis and KEGG enrichment analysis of targets of Bufei Huoxue Capsule

胞外区 (extracellular region)、细胞溶质 (cytosol); 在分子功能中靶点主要涉及酶结合 (enzyme binding)、蛋白结合 (identical protein binding)、细胞因子活性 (cytokine activity) 等。

**2.4.2 KEGG 通路富集分析** 通过使用 DAVID 数据中 KEGG 通路富集分析得到 93 条 ( $P < 0.05$ ) 信号通路, 按照  $-\lg P$  值排序, 选取前 20 条目, 绘制气泡图, 见图 5。主要涉及百日咳 (pertussis)、查加斯病 (Chagas disease)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、沙门氏菌感染 (Salmonella infection)、结核病 (tuberculosis) 等通路, 其中百日咳通路涉及的靶点有 IL6、RELA、CXCL8、IL10、MAPK1、FOS、CASP3、MAPK14、IRF1、IL1B、MAPK8、NOS2、CD14、IL1A, 查加斯病通路涉及的靶点有 IL6、CCL2、RELA、CXCL8、IL10、MAPK1、FOS、MAPK14、IFNG、SERPINE1、CASP8、IL1B、MAPK8、NOS2、IL2, TNF 信号通路涉及的靶点有 ICAM1、IL6、CCL2、PTGS2、RELA、CXCL2、CXCL10、MAPK1、FOS、CASP3、MAPK14、CASP8、IL1B、MAPK8。

### 2.5 分子对接

一般认为配体与受体结合的构象稳定时能量越低, 发生作用的可能性越大。本研究以结合能  $\leq -5.0$  kJ/mol 作为筛选标准<sup>[26]</sup>, 对“2.2”项中筛选出核心

化合物进行分子对接, 结果见表 3, 部分核心化合物对接模式见图 6。结果显示补肺活血胶囊中的核心化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 均远小于  $-5$  kJ/mol, 与目前临床使用的抗病毒药物洛匹那韦、瑞德西韦、利托那韦<sup>[27-28]</sup>比较, 其结合能未见显著差异。由此可见这些核心化合物与受体蛋白形成构象能量低, 结构稳定, 结合活性较高。

### 3 讨论

补肺活血胶囊处针对肺、脾、肾虚而设, 黄芪益肺气、补气固表、益气行滞, 既可改善肺部功能, 又可提高免疫力、抗感染; 赤芍活血化瘀, 可改善肺部血循环, 有凉血解毒、抗炎的作用; 补骨脂是补气纳肾的常用药味, 中医学认为肺主呼气, 肾主纳气, 调节呼吸功能, 而调补肺肾是补益正气的重要方法之一。综上, 补肺活血胶囊全方益气活血、补肺固肾, 现已在北京、河北、安徽、贵州等省市用于 COVID-19 恢复期属肺脾气虚证的治疗。

本研究运用网络药理学研究方法共筛选出补肺活血胶囊中活性成分 32 个, 作用靶点 203 个, 进一步筛选得到核心化合物 11 个, 核心靶点 52 个, 干预 COVID-19 的关键作用靶点 25 个, 体现了中药多成分、多靶点联合作用的整体性和关联性的特点。根据“中药-化合物-靶点”网络的拓扑属性分析结果, 进一步得到排名前 5 的关键化合物为槲皮素、

表 3 补肺活血胶囊核心化合物和部分化学药与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 的结合能

Table 3 Binding energy values of compounds in Bufeihuo Xue Capsule and recommend drugs with SARS-CoV-2 3CL hydrolase and ACE2

化合物	化学式	相对分子质量	CAS 号	结合能/(kJ·mol <sup>-1</sup> )	
				SARS-CoV-2 3CL	ACE2
槲皮素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302.23	117-39-5	-31.81	-20.93
山柰酚	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.25	520-18-3	-32.23	-21.35
7-O-甲基异丙醇胺	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	316.38	137217-83-5	-26.37	-19.26
黄芩素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.25	491-67-8	-32.65	-21.77
刺芒柄花素	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	268.28	485-72-3	-31.81	-21.77
豆甾醇	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	412.77	83-48-7	-31.40	-20.51
β-谷甾醇	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	414.79	83-46-5	-30.56	-17.58
异鼠李素	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	316.26	480-19-3	-31.40	-20.93
3,9-di-O-methylnissolin	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	314.33	73353-82-9	-27.63	-20.93
黄芪紫檀烷苷	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	300.33	73340-41-7	-29.30	-20.51
鞣花酸	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	302.20	476-66-4	-32.23	-20.93
洛匹那韦	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	628.80	192725-17-0	-33.07	-21.35
瑞德西韦	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> P	602.58	1809249-37-3	-31.81	-18.84
利托那韦	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	720.96	155213-67-5	-29.72	-17.16

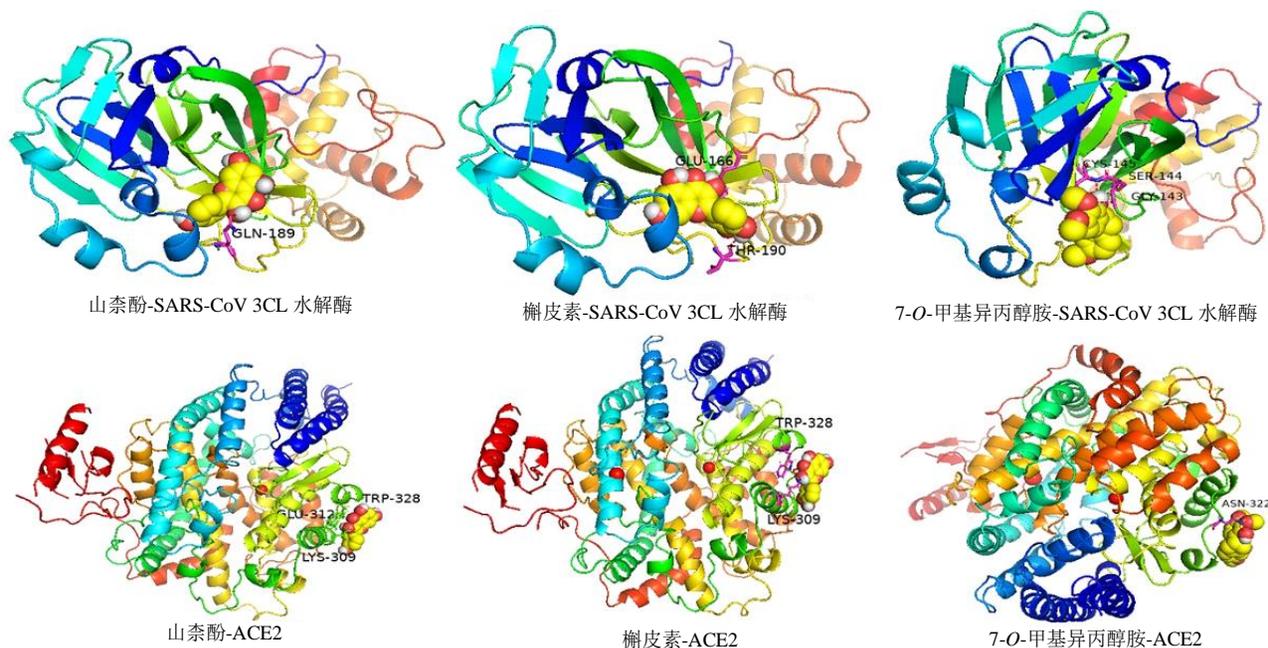


图 6 补肺活血胶囊部分核心化合物与 SARS-CoV 3CL 水解酶和 ACE2 分子对接模式

Fig. 6 Molecular docking diagram of SARS-CoV 3CL hydrolase and ACE2 with core compounds of Bufei Huoxue Capsule

山柰酚、7-*O*-甲基异丙醇胺、黄芩素、刺芒柄花素。其中，槲皮素、山柰酚、黄芩素等经研究发现也是《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)》临床推荐使用的中成药痰热清注射液、藿香正气口服液的核心化合物<sup>[29-30]</sup>。此外，部分通过中国知网、Pubmed、BATMAN-TCM 等多数据库所搜集到的补肺活血胶囊组方药材化学成分(如补骨脂甲素、补骨脂苷等)在 TCMSP 分析平台并未收录，对于该类成分的作用靶点等有待进一步研究。

现代药理研究表明，槲皮素具有减轻肺部炎症、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、保护肝细胞、保护肾脏等作用。有研究发现槲皮素可降低转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )等的表达，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。此外槲皮素还可通过抑制 SphK1/S1P 信号通路在体内外均可有效改善肺纤维化<sup>[31-33]</sup>。黄芩素可显著降低感染甲型流感病毒小鼠的死亡率，降低肺指数，改善肺部损伤，也可抑制 H5N1 流感病毒在肺癌 A549 细胞中的复制<sup>[34-35]</sup>。结合分子对接结果，这些关键化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 的形成构象能量低，结构稳定，结合活性较高，并且与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的结合能与临床目前使用的化学药物洛匹那韦、瑞德西韦、利托那韦相近，进一步确定槲皮素、山柰酚、黄芩素等在补肺活血

胶囊治疗 COVID-19 中发挥着重要作用。

根据 PPI 网络分析结果和“中药-化合物-靶点”网络的拓扑属性分析结果，补肺活血胶囊干预 COVID-19 的主要作用靶点有细胞因子 (IL6 和 IL10)、丝裂原活化蛋白激酶家族成员 (MAPK8)、前列腺素 G/H 合酶 (PTGS2 和 PTGS1)、核受体共激活因子 (NCOA2)、丝氨酸蛋白酶 (PRSS1)、一氧化氮合成酶 (NOS2) 等。GO 功能富集分析结果发现，补肺活血胶囊活性成分主要涉及细胞应答、炎症反应、凋亡通路、药物反应、免疫应答等生物学过程；KEGG 通路富集主要涉及百日咳、查加斯病、TNF 信号通路、沙门氏菌感染、结核病、Toll 样受体、甲型流感、乙型肝炎等通路，靶点富集数目最多的通路为癌症通路。其中，百日咳、查加斯病、沙门氏菌感染、结核病、甲型流感、乙型肝炎等通路与 COVID-19 感染源类似，即病毒感染。以上通路均涉及 IL6 基因。IL6 是一种促炎因子，其主要功能为通过趋化炎症细胞聚集和促进炎症细胞浸润加速肺纤维化早期的肺泡炎症反应，进而介导特发性肺纤维化的发生，对肺部产生损伤。研究结果提示补肺活血胶囊对病毒感染及肺部损伤具有一定的干预作用。此外，TNF 信号通路在抗病毒、介导能量代谢、炎症反应、血管生成以及维持干细胞特性等方面发挥重要作用，低氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路和 MAPK 信号通路与免疫反应及炎症反

应的发展与发展密切相关。以上结果提示补肺活血胶囊可能通过抗病毒、抑菌抗炎、免疫调节等途径起到治疗 COVID-19 的作用。

分子对接结果显示, 补肺活血胶囊中的核心化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶和 ACE2 的结合能均远小于 $-5$  kJ/mol, 并与目前临床使用的洛匹那韦、瑞德西韦、利托那韦等药物的结合能接近, 由此可见这些核心化合物与受体蛋白结合活性较高。推测补肺活血胶囊中的核心化合物可能通过与 ACE2 的结合阻止病毒对宿主的侵染, 通过与 3CL 水解酶的结合来控制病毒的复制, 但具体作用机制有待进一步研究。

中医药素有“未病先防、已病防变和瘥后防复”的理论认识与临床实践。目前, 我国对 COVID-19 的防治已经到了“瘥后防复”阶段<sup>[36]</sup>。《素问》中记载:“五疫之至, 皆相染易, 无问大小, 病状相似……不相染者, 正气存内, 邪不可干”, 疾病发生发展概括而言为正气与邪气在人体斗争的过程。COVID-19 病程较长, 易耗伤正气, 恢复期具有正气虚弱而余邪未尽的特点<sup>[37]</sup>。我国 COVID-19 诊疗方案中将恢复期患者分为肺脾气虚证和气阴两虚证 2 种证型<sup>[5]</sup>, 因此, 在 COVID-19 恢复期治疗过程中应以补益正气为主。补肺活血胶囊具有益气活血、补肺固肾的功效, 其中黄芪更是“补气之长”, 内可补肺脾之气, 外可固表止汗, 现代药理学研究也证实黄芪中的多种化合物具有抗病毒、调节免疫、抗氧化应激、抗炎的生物活性<sup>[38]</sup>。最近有研究提示 COVID-19 等病毒感染性疾病的病情加重甚至死亡原因不仅与肺部病毒感染有关, 还与机体的免疫功能失调密切相关<sup>[39]</sup>。综上分析, 补肺活血胶囊用于 COVID-19 恢复期的治疗不仅与其抗病毒、抑制炎症反应相关, 也与其调节机体免疫功能密切相关, 进一步证实了 KEGG 通路分析结果的合理性。

#### 参考文献

- [1] Zhou M, Zhang X, Qu J, *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A clinical update [J]. *Front Med*, 2020, doi: 10.1007/s11684-020-0767-8.
- [2] Wu F, Zhao S, Yu B, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-269.
- [3] 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.
- [4] 刘茜, 王荣帅, 屈国强, 等. 新型冠状病毒肺炎死亡尸体系统解剖大体观察报告 [J]. 法医学杂志, 2020, 36(1): 21-23.
- [5] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版) [EB/OL]. [2020-03-04]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [6] 谢茜, 伍政宇, 舒跃龙. 2019 新型冠状病毒的研究进展 [J/OL]. 病毒学报, [2020-04-05]. <https://elkssl0a75e822c6f3334851117f8769a30e1c.casb.njucm.edu.cn/10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003677>.
- [7] 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.
- [8] 韩园园, 赵梦冉, 石垚, 等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎的应用分析 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 878-882.
- [9] 北京市中医管理局. 北京市新型冠状病毒肺炎恢复期中医康复指导建议(试行) [EB/OL]. [2020-03-15]. <https://mp.weixin.qq.com/s/DbWUWakW-dFb-EaLY9n3lw>.
- [10] 贵州省中医药管理局. 贵州省新型冠状病毒肺炎中医药防治参考方案(第二版) [EB/OL]. [2020-02-19]. [http://atcm.guizhou.gov.cn/zwgk/xxgkml/jcxxgk/zcwj\\_5130534/bmwj/202002/t20200220\\_50331794.html](http://atcm.guizhou.gov.cn/zwgk/xxgkml/jcxxgk/zcwj_5130534/bmwj/202002/t20200220_50331794.html).
- [11] 安徽省卫生健康委员会. 安徽省新型冠状病毒肺炎中医药治疗专家共识 [EB/OL]. [2020-02-18]. [http://wjw.ah.gov.cn/news\\_details\\_55084.html](http://wjw.ah.gov.cn/news_details_55084.html).
- [12] 田立岩, 曹桂秋, 刘桂桃. 补肺活血胶囊治疗矽肺的效果 [J]. 广东医学, 2014, 35(11): 1778-1779.
- [13] 吴镛, 解朝霞, 邸平. 补肺活血胶囊的作用与临床疗效 [J]. 中国实用医药, 2012, 7(8): 148-149.
- [14] 马治刚, 余洁, 黎怡, 等. 补肺活血胶囊对支气管哮喘缓解期患者炎症因子及免疫功能的影响 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(19): 2746-2748.
- [15] 敬岳, 唐诗环, 金津, 等. 补肺活血胶囊对颗粒物致小鼠肺纤维化样变的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(6): 774-778.
- [16] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [17] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSp: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [18] Ahmed S S, Ramakrishnan V. Systems biological approach of molecular descriptors connectivity: Optimal descriptors for oral bioavailability prediction [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40654.
- [19] Ursu O, Rayan A, Goldblum A, *et al.* Understanding

- drug-likeness [J]. *Wires Comput Mol Sci*, 2011, 1(5): 760-781.
- [20] The UniProt Consortium. Uniprot: The universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D158-D169.
- [21] Rebhen M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, *et al.* GeneCards: Integrating information about genes, proteins and diseases [J]. *Trends Genet*, 1997, doi: 10.1016/s0168-9525(97)01103-7.
- [22] Smoot M E, Ono K, Ruscheinski J, *et al.* Cytoscape 2. 8: new features for data integration and network visualization [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 431-432.
- [23] von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, *et al.* STRING: A database of predicted functional associations between proteins [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(1): 258-261.
- [24] Huang D W, 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.
- [25] Burley S K, Berman H M, Kleywegt G J, *et al.* Protein Data Bank (PDB): The single global macromolecular structure archive [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-7000-1\_26.
- [26] 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.
- [27] 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): 269-271.
- [28] 谢 平, 何少贵, 郝春莉, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索玉屏风散治疗新冠病毒肺炎 (COVID-19) 活性化合物研究 [J/OL]. *中药材*, [2020-04-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1286.R.20200325.0829.002.html>.
- [29] 孔 艺, 吴红卫, 陈 永, 等. 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 [J]. *中草药*, 2020, 51(7): 1785-1794.
- [30] 邓燕君, 刘博文, 贺桢翔, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索藿香正气口服液预防新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 活性化合物研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(5): 1113-1122.
- [31] 马 纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(8): 221-224.
- [32] 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.
- [33] Zhang X, Cai Y, Zhang W, *et al.* Quercetin ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting SphK1/S1P signaling [J]. *Biochem Cell Biol*, 2018, 96(6): 742-751.
- [34] Ding Y, Dou J, Teng Z, *et al.* Antiviral activity of baicalin against influenza A (H1N1/H3N2) virus in cell culture and in mice and its inhibition of neuraminidase [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(12): 3269-3278.
- [35] Michaelis M, Sithisarn P, Cinatl J. Effects of flavonoid induced oxidative stress on anti-H5N1 influenza a virus activity exerted by baicalein and biochanin A [J]. *BMC Res Notes*, 2014, doi: 10.1186/1756-0500-7-384.
- [36] 仝小林, 李修洋, 赵林华, 等. 从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎的中医药防治策略 [J]. *中医杂志*, 2020, 61(6): 465-470.
- [37] 张 佳, 李晓东. 基于数据挖掘的各地区新冠肺炎恢复期中医药组方用药规律研究 [J/OL]. *湖北中医药大学学报*, [2020-03-31]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1844.R.20200330.1654.002.html>.
- [38] Auyeung K K, Han Q B, Ko J K. *Astragalus membranaceus*: A review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(1): 1-22.
- [39] Xu Z, Shi L, Wang Y, *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(4): 420-422.