

网络药理学及分子对接法探讨三仁汤主要成分对新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的机制研究

李嘉丽¹, 杨良俊¹, 周恒立¹, 林琨洋¹, 梁绮婷¹, 何 维¹, 赵自明², 潘华峰^{1*}

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

2. 广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州 510095

摘要: **目的** 通过网络药理学及分子对接法探讨三仁汤主要成分对新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制。**方法** 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)及中医整合药理学研究平台 V2.0(TCMIP V2.0)获得三仁汤君药(苦杏仁、白蔻仁、薏苡仁)全部化学成分并筛选,结合相关文献筛得主要活性成分。借助 UniPort 数据库查询活性成分对应靶标蛋白, Cytoscape 3.7.2 构建成分-靶点网络。通过 STRING 网站构建 PPI 蛋白互作网络,运用 cytoHubba 分析关键子网络。CTD 数据库对三仁汤君药活性成分靶蛋白进行 GO、KEGG 富集分析。以三仁汤君药活性成分及洛匹那韦等相关化学药物为配体,通过 CB-Dock 网站分别与新型冠状病毒(SARS-CoV-2) 3CL 水解酶进行分子对接。**结果** 三仁汤君药共有 39 个活性成分,对应有效靶标 168 个。GO 功能富集分析筛得生物学过程(BP)、细胞组成(CC)、分子功能(MF)分别为 25 条、14 条及 2 条。KEGG 富集筛得先天免疫系统(innate immune system)、免疫系统中的细胞因子信号转导(cytokine signaling in immune system)及白介素信号通路(signaling by interleukins)等信号通路,共 36 条。分子对接提示三仁汤君药活性成分白桦脂酸、枣素及齐墩果酸与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶结合性较好,三者的 Vina 得分与 3CLpro 抑制剂洛匹那韦及 RdRp 抑制剂瑞德西韦的得分相近。**结论** 三仁汤君药可能通过调控炎症因子,参与炎症相关信号通路,以多成分、多靶点、多途径参与 COVID-19 的多种生理过程,对治疗 COVID-19 发挥一定的干预作用,且其活性成分具有潜在抗 SARS-CoV-2 的可能性。

关键词: 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 三仁汤; 网络药理学; 分子对接; 3CL 水解酶; 白桦脂酸; 枣素; 齐墩果酸
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)09-2345-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.008

Mechanism of sovereign medicines in Sanren Decoction on COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking

LI Jia-li¹, YANG Liang-jun¹, ZHOU Heng-li¹, LIN Kun-yang¹, LIANG Qi-ting¹, HE Wei¹, ZHAO Zi-ming², PAN Hua-feng¹

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of sovereign medicines in Sanren Decoction on coronavirus disease 2019 (COVID-19) through network pharmacology and molecular docking methods. **Methods** The main active ingredients of sovereign medicines in Sanren Decoction (*Armeniacae Semen Amarum*, *Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep, and *Coicis Semen*) were obtained and screened from by TCMSP and TCMID V2.0, combined with related research. Using UniPort database to query the target proteins corresponding to the active ingredients, then a component-target network was constructed by Cytoscape 3.7.2. PPI network was constructed through the STRING website, and cytoHubba was used to analysis the key subnetworks. CTD database was used to analyze GO and KEGG enrichment of the active ingredient target proteins of Sanren Decoction. Using the active ingredients of sovereign medicines in Sanren Decoction and related chemical drugs such as lopinavir as ligands, molecular docking with the SARS-CoV-2 3CL hydrolase was performed through the CB-Dock website. **Results** Sovereign medicines in Sanren Decoction

收稿日期: 2020-02-14

基金项目: 广东省普通高校特色创新类项目(2018KTSCX040); 广东普通高校新冠肺炎疫情防控科研专项(No.2020KZDZX1061); 广东省自然科学基金资助项目(2017A030313845); 广州市科技计划项目(201803010055)

作者简介: 李嘉丽, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治胃癌前病变研究。E-mail: 1007008149@qq.com

***通信作者** 潘华峰, 博士生导师, 教授, 研究方向为中医药防治胃癌前病变研究。E-mail: gzphf@126.com

had 39 active ingredients, corresponding to 168 target proteins. The GO enrichment analysis obtained 25 biological processes (BP) items, 14 related items of cell composition (CC), and two molecular function (MF) item, respectively. KEGG enrichment screened 36 signaling pathways such as innate immune system, cytokine signaling in immune system, signaling by interleukins. The molecular docking results suggested that the active ingredients of mairin, zizipin_qt, and oleanolic acid of sovereign medicines in Sanren Decoction had good binding energy with SARS-CoV-2 3CL hydrolase, and the Vina score of them were similar to those of lopinavir (the 3CLpro inhibitor) and remdesivir (RNA-dependent RNA polymerase inhibitor). **Conclusion** Sovereign medicines in Sanren Decoction may participate in inflammation-related signaling pathways by regulating inflammatory factors, regulating multiple physiological processes of the disease with multi-components, multi-targets, and multi-pathways. It plays a certain intervention role in the treatment of COVID-19 and its active ingredients have potential resistance to SARS-CoV-2.

Key words: SARS-CoV-2; COVID-19; Sanren Decoction; network pharmacology; molecular docking; 3CL hydrolase; mairin; zizipin_qt; oleanolic acid

新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 是一种急性呼吸道传染病, 其病原体为严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2), 属于 β 属冠状病毒。自 2019 年 12 月底, COVID-19 疫情备受关注, 患者在发病起初以发热、乏力、干咳为主要表现, 重症者多在发病 1 周后出现呼吸困难和 (或) 低氧血症, 严重者快速进展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克等。大量研究证实, 中医药可用于治疗急性和重症疾病并取得良好疗效^[1], 在《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》中, 中医药作为重要治疗方案之一被推荐在临床一线使用, 中西医结合亦展示出较好的诊疗效果。

《素问·刺法论篇》云: “五疫之至, 皆相染易, 无问大小, 病状相似。” COVID-19 属于中医 “疫病” 范畴, 基本病机特点为 “湿、热、毒、瘀”^[2]。COVID-19 患者初起见发热、热势不高、乏力, 伴腹泻、便溏、四肢肌肉酸痛、舌苔腻等症状。脾主运化水液, 喜燥恶湿, 故骤感湿邪常易困脾。湿热病邪初犯人体, 郁遏卫表之阳, 湿重热轻, 热为湿所遏, 故发热而热势不高。湿邪为患, 易伤脾土, 而脾主四肢, 症见乏力、肌肉酸痛。湿邪阻遏气机, 中焦气机运化失常, 见痞闷、纳差、便溏之症。清代温病学派代表人之一吴鞠通创立 “卫气营卫” 学说, 在《温病条辨·上焦篇》记载三仁汤可用以治疗湿温病, 以苦杏仁、白蔻仁及薏苡仁共为君药, 淡渗、芳化、苦燥同用, 宣上、畅中、渗下三法并行, 使湿热之邪从上下内外分消。因此, 本研究从宏观上通过网络药理学筛选三仁汤君药活性成分, 分析活性成分作用的核心靶点及可能的作用机制, 构建 “成分-靶点-通路” 多层次互作网络; 微观上运用分子对接技术挖掘三仁汤抗 SARS-CoV-2 的特异性及可能性, 为

临床研究及基础科学研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 活性成分确定

依据中医整合药理学研究平台 V2.0 (TCMIP V2.0, <http://www.tcmip.cn/>) 检索白蔻仁 (*Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep.) 的初筛化合物 (需具有 Similar Score > 0.8 的高可信度靶蛋白), 确定白蔻仁的活性成分。通过中药系统药理学分析平台^[3] (TCMSP, <http://tcmsp.com/index.php>) 检索三仁汤君药苦杏仁 *Armeniacae Semen Amarum*、薏苡仁 *Coicis Semen* 三者的全部化学成分, 根据药动学特性 (ADME) 进行筛选, 一般认为活性分子需具有较好的生物利用度 (OB) 及较好的类药性 (DL), 即需满足 $OB \geq 30\%$ 以及 $DL \geq 0.18$ 两项标准^[4], 故以二者作为筛选条件。结合相关文献, 增加 1,8-桉叶素 (MOL000122) 及苦杏仁苷 (MOL001320) 等活性化合物, 最终确定三仁汤君药的活性成分。

1.2 成分-靶点网络构建

UniProt 数据库^[5] (<https://www.uniprot.org/>) 是蛋白质序列和注释数据的综合资源, 具有高质量自由获取蛋白质序列和及丰富的功能信息资源。通过 TCMSP 数据库获取苦杏仁及薏苡仁的活性成分对应的靶点信息后, 利用 UniPort 数据库获取各活性成分靶标蛋白对应的人类基因。TCMIP V2.0 通过化学成分二维结构相似性搜索, 针对中药化学成分和 FDA 上市药物进行相似性打分 (Similar Score), 通过 TCMIP V2.0 对白蔻仁活性成分的靶标进行筛选, 满足 Similar Score > 0.8 条件的靶蛋白具备高可信度, 为相应成分的候选靶标。借助 Cytoscape 3.7.2 软件构建三仁汤君药成分-靶点网络。

1.3 靶蛋白相互作用 (PPI) 网络构建

运用 STRING 数据库 (v11.0) (<https://string-db>).

org/cgi/input.pl)^[6], 将三仁汤君药靶蛋白导入数据库, 构建靶蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。运用 Cytoscape 3.7.2 软件, 通过 cytoHubba 分析并构建三仁汤君药的关键子网络。

1.4 GO (gene ontology) 功能富集与 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 生物通路富集分析

CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>) 提供了关于化学基因/蛋白质相互作用, 化学-疾病和基因-疾病关系的人工策划信息, 可与功能和途径数据相结合, 以帮助开发关于环境影响疾病潜在机制的假设。将三仁汤君药靶基因导入 CTD 数据库, 进行 GO 富集和 KEGG 信号通路富集分析, 并使用 R 语言 (R x64 3.2.5) 做图。

1.5 成分-靶点分子对接

以三仁汤君药关键活性成分以及目前临床报道有效药物作为配体, 通过 PDB 数据库^[7] (<http://www.rcsb.org/>) 查找 SARS-CoV-2 3CL 水解酶 (Mpro) (PDB: 6LU7) 的蛋白质 3D 结构作为受体, 通过 CB-Dock 网站^[8] (<http://cao.labshare.cn/cb-dock/>) 进行分子对接。

2 结果

2.1 活性化合物筛选结果

ADME 是指药物吸收 (absorption)、分布 (distribution)、代谢 (metabolism) 和外排 (excretion), 为药物进入机体后, 体内对药物的处理过程。药物的 ADME 属性决定其在体内的浓度、分布情况和代谢速率等, 对预测药物生物利用度及生物活性具有重要的参考价值。因此通过 TCMSP 数据库查找苦杏仁及薏苡仁的全部化合物, 结合药物 ADME 特性, 以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件, 筛得苦杏仁及薏苡仁的活性化合物分别为 19 个及 9 个, 其中 4 个活性化合物 (MOL000359、MOL000449、MOL000953、MOL002372) 为苦杏仁及薏苡仁共有。TCMIP V2.0 检索白蔻仁的全部化合物为 33 个, 以具有 Similar Score >0.8 的高可信度靶蛋白作为化合物筛选条件, 获得候选活性成分为 11 个, 其中甘油三油酸酯 (MOL000256) 为白蔻仁及薏苡仁共有。结合相关文献研究, 增加 1,8-桉叶素 (MOL000122) 及苦杏仁苷 (MOL001320) 等活性化合物。删除重复项后 3 药共得活性化合物 39 个。三仁汤君药活性成分基本信息见表 1。

表 1 三仁汤君药活性化合物

Table 1 Main active ingredients of sovereign medicines in Sanren Decoction

来源	MOL_ID	活性成分	OB/%	DL
白蔻仁	MOL000262	冰片烯	39.62	0.04
白蔻仁	MOL000207	甲基丁香酚	73.36	0.04
白蔻仁	MOL000018	异龙脑	86.98	0.05
白蔻仁	MOL000267	香茅醇	38.89	0.02
白蔻仁	MOL004786	4-松油醇	57.08	0.04
白蔻仁	MOL000263	齐墩果酸	29.02	0.76
白蔻仁	MOL000254	丁香酚	56.24	0.04
白蔻仁	MOL012135	利卡灵-B	11.35	0.40
白蔻仁、薏苡仁	MOL000256	甘油三油酸酯	27.27	0.13
白蔻仁	MOL000265	异榄香脂素	46.72	0.16
白蔻仁	MOL000255	甘油三肉豆蔻酸酯	17.76	0.29
白蔻仁	MOL000122	1,8-桉叶素	39.73	0.05
白蔻仁	MOL000125	α -蒎烯	46.25	0.05
白蔻仁	MOL000905	β -蒎烯	44.77	0.05
苦杏仁	MOL001320	苦杏仁苷	4.42	0.61
苦杏仁	MOL000211	白桦脂酸	55.38	0.78
苦杏仁	MOL000492	(+)-儿茶素	54.83	0.24
苦杏仁	MOL002211	11,14-二十碳二烯酸	39.99	0.20
苦杏仁	MOL002311	甘草酚	90.78	0.67
苦杏仁	MOL003410	枣素	66.95	0.62
苦杏仁	MOL004355	菠菜甾醇	42.98	0.76

续表 1

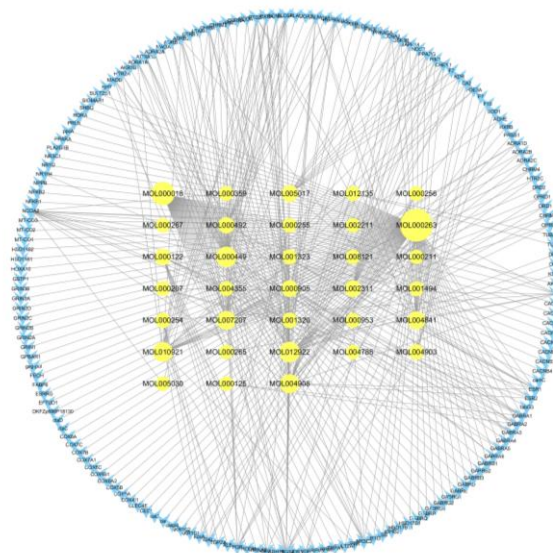
来源	MOL_ID	活性成分	OB/%	DL
苦杏仁	MOL004841	甘草查耳酮 B	76.76	0.19
苦杏仁	MOL004903	甘草苷	65.69	0.74
苦杏仁	MOL004908	光甘草定	53.25	0.47
苦杏仁	MOL005017	菜豆素	78.77	0.58
苦杏仁	MOL005030	灵芝酸	30.70	0.20
苦杏仁	MOL007207	乌药碱	79.64	0.24
苦杏仁	MOL010921	雌酚酮	53.56	0.32
苦杏仁	MOL010922	丁二酸二异辛酯	31.62	0.23
苦杏仁	MOL012922	左旋千金藤啶碱	87.35	0.54
苦杏仁、薏苡仁	MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75
苦杏仁、薏苡仁	MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76
苦杏仁、薏苡仁	MOL000953	胆甾醇	37.87	0.68
苦杏仁、薏苡仁	MOL002372	(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23- 六 甲 基 -2,6,10,14,18,22-廿四碳六烯	33.55	0.42
薏苡仁	MOL001323	柠檬二烯醇	43.28	0.78
薏苡仁	MOL001494	亚油酸乙酯	42.00	0.19
薏苡仁	MOL002882	甘油单油酸酯	34.13	0.30
薏苡仁	MOL008118	薏苡仁酯	32.40	0.43
薏苡仁	MOL008121	2-十八烯酸单甘油酯	34.23	0.29

2.2 成分-靶点网络

通过 UniProt 数据库检索各靶蛋白对应的人类基因信息,进行靶标规范化。三仁汤君药包含 39 个活性成分(其中 6 个活性成分无对应靶点),共得靶点 425 个,删除重复项后得 177 个靶点蛋白,UniPort 数据库检索后得到 168 个有效靶基因。通过 Cytoscape 3.7.2 软件绘制三仁汤君药的成分-靶点网络(图 1),可见三仁汤君药中靶点数量最多的前 3 种活性成分为齐墩果酸(MOL000263)、异龙脑(MOL000018)及豆甾醇(MOL000449),分别靶向 80、42 及 29 个靶基因,体现中药多成分-多靶点的特点。

2.3 PPI 网络构建

通过 STRING 数据库分析 168 个三仁汤君药靶蛋白,构建 PPI 网络。为得到高置信度,PPI 网络设置的最低要求互动得分(minimum required interaction score)为 0.7,并隐藏网络中断开连接的节点,筛选后得 162 个靶点可发生蛋白质互作,559 条边代表了蛋白间的互作关系,各节点的平均自由度为 6.9,三仁汤君药靶蛋白 PPI 网络见图 2。运用 cytoHubba 根据 nodes 在网络中的属性进行排名,选择 MCC 拓扑分析方法提取关键子网络,算得具有高度(degree)值的蛋白更倾向于关键蛋白,分析得 degree 前 6 个关键靶标蛋白依次为 PRKACA、



黄色圆点表示三仁汤君药活性成分,活性成分的靶蛋白越多,圆点越大;蓝色菱形表示各活性成分对应靶点信息

The yellow dots indicate the active ingredients of sovereign medicines in Sanren Decoction. The more target protein the active ingredient has, the larger the dot is. The blue rhombuses indicate the targets information corresponding to each active ingredient

图 1 三仁汤君药活性成分-靶点网络

Fig. 1 Network diagram of main active ingredient-target of sovereign medicines in Sanren Decoction

NCOA1、HSP90AA1、NCOA2、RXRA、MT-CO2, 三仁汤君药 PPI 关键子网络见图 3。

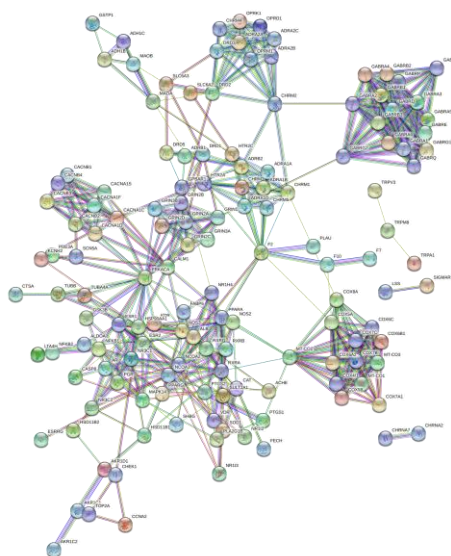


图 2 三仁汤君药靶蛋白 PPI 网络

Fig. 2 PPI network diagram of sovereign medicines in Sanren Decoction

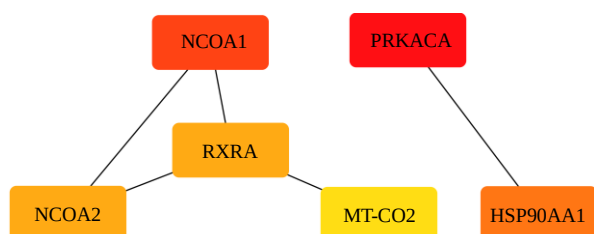


图 3 三仁汤君药 PPI 关键子网络

Fig. 3 Key subnetwork for PPI network diagram of sovereign medicines in Sanren Decoction

2.4 GO 功能富集

GO 功能富集包括生物学过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 以及细胞组分 (cellular component, CC) 3 个部分。将三仁汤君药 168 个靶基因导入 CTD 数据库进行富集分析, 以 $P < 0.01$ 为条件获得 BP、MF、CC 富集条目分别为 709 条、127 条及 134 条, 结合 Genome Frequency $\geq 15\%$ 最终筛得三者的富集条目分别为 25 条、14 条及 2 条。GO 功能富集以 BP 条目最具代表性, 可知三仁汤君药参与生物调节 (biological regulation)、代谢过程 (metabolic process)、细胞刺激反应 (cellular response to stimulus) 等生物学过程。结果见图 4。

2.5 KEGG 通路富集

通过 CTD 数据库分析三仁汤君药靶基因, 获取其显著改变的代谢通路, 共得 156 条富集结果。以 $P < 0.01$ 及 Genome Frequency $\geq 0.5\%$ 为条件筛选出

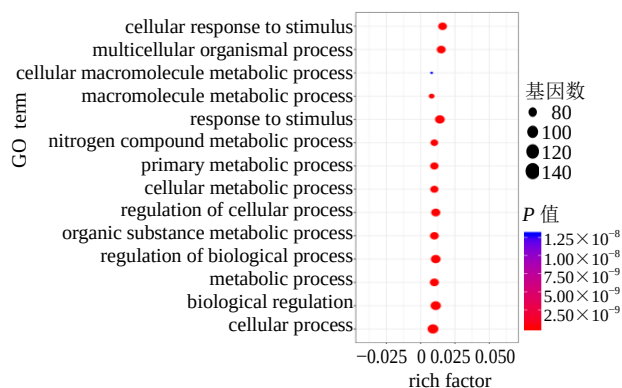


图 4 三仁汤君药 GO 功能富集结果 (生物学过程)

Fig. 4 GO enrichment of sovereign medicines in Sanren Decoction (biological process)

36 条候选信号通路, 涉及先天免疫系统 (innate immune system)、免疫系统中的细胞因子信号转导 (Cytokine Signaling in Immune system)、白介素信号通路 (Signaling by Interleukins) 及 PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway) 等。结果见图 5。

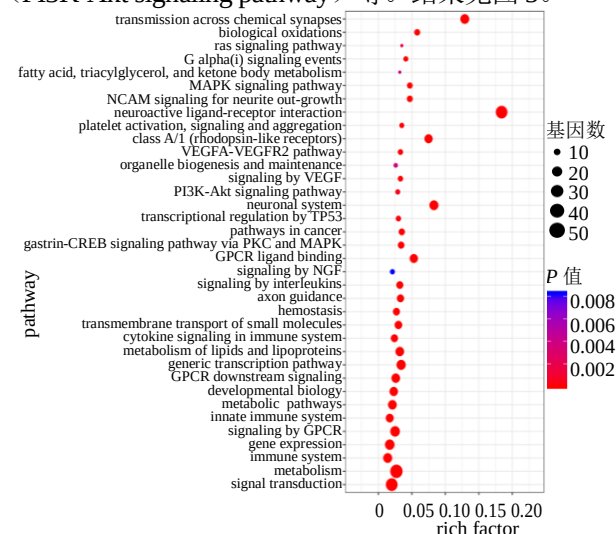


图 5 三仁汤君药 KEGG 富集结果

Fig. 5 KEGG enrichment of sovereign medicines in Sanren Decoction

2.6 分子对接结果

CB-Dock 网站可预测给定蛋白质的结合位点, 使用基于曲率的新型腔检测方法来计算中心和大小, 执行 AutoDock Vina (1.1.2 版本) 分子对接。输入蛋白质结构 (PDB 格式) 后, 网站通过 Cyscore 经验评分函数对疏水性自由能、范德华相互作用能、氢键能和配体熵的影响进行处理, 提高预测精度。SARS-CoV-2、SARS-CoV 以及中东呼吸综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus,

MERS-CoV) 三者同为 β 属冠状病毒, 具有高相似性。研究表明, 瑞德西韦 (Remdesivir) 及氯喹 (Chloroquine) 可在低浓度下能有效控制 Vero E6 细胞的 SARS-CoV-2 感染情况^[9], 而利托那韦 (Ritonavir)^[10]、洛匹那韦 (Lopinavir)^[11]及利巴韦林 (Ribavirin)^[12]为抗 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的有效药物, 因此增加上述 5 种化学药物与三仁汤君药活性成分进行比较。通过 PDB 数据库查找 SARS-CoV-2 3CL 水解酶(Mpro)的三维结构(PDB: 6lu7), 下载化合物 MOL 结构式, 分别导入 CB-Dock 网站进行分子对接。Vina 得分 (Vina score) 是用

Vina 程序以相应的口袋参数对受体和配体进行分子对接得到复合物的得分, 值越低代表受体和配体亲和力越高。对接结果提示, 与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶亲和力最高的前 5 位依次是洛匹那韦、瑞德西韦、白桦脂酸 (MOL000211) 枣素 (MOL003410) 及齐墩果酸 (MOL000263), 且得分相对接近 (表 2 和图 6)。

3 讨论

COVID-19 以“湿、热、毒、瘀”为基本病机, 湿毒是该疾病的病理基础, 故病位不单在肺, 更涉及脾。“饮入于胃, 游溢精气, 上输于脾, 脾气散

表 2 三仁汤君药活性化合物及相关化学药物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶的 Vina 得分

Table 2 Vina score of compounds in Sanren Decoction and related drugs with SARS-CoV-2 3CL hydrolase

类别	来源	化学成分	Vina 得分	空腔尺寸	center ^a			size ^b		
					x	y	z	x	y	z
化学药物	—	洛匹那韦	-8.2	264	-37	5	58	28	28	28
化学药物	—	瑞德西韦	-8.2	227	-34	16	54	20	20	20
中药	苦杏仁	MOL000211	-7.8	227	-34	16	54	23	23	23
中药	苦杏仁	MOL003410	-7.5	264	-37	5	58	24	24	24
中药	白蔻仁	MOL000263	-7.4	227	-34	16	54	23	23	23
中药	白蔻仁	MOL012135	-7.4	227	-34	16	54	22	22	22
化学药物	—	利托那韦	-7.4	264	-37	5	58	28	28	28
中药	苦杏仁	MOL002311	-7.3	227	-34	16	54	23	23	23
中药	苦杏仁	MOL004903	-7.3	227	-34	16	54	24	24	24
中药	苦杏仁	MOL001320	-7.3	289	-14	34	56	24	24	24
中药	苦杏仁	MOL005017	-7.2	227	-34	16	54	22	22	22
中药	苦杏仁、薏苡仁	MOL000359	-7.1	264	-37	5	58	25	25	25
中药	苦杏仁、薏苡仁	MOL000449	-7.1	264	-37	5	58	25	25	25
中药	苦杏仁	MOL004355	-7.0	227	-34	16	54	25	25	25
中药	苦杏仁	MOL004841	-7.0	227	-34	16	54	21	21	21
中药	苦杏仁	MOL010921	-7.0	227	-34	16	54	19	19	19
中药	苦杏仁	MOL004908	-6.9	264	-37	5	58	23	23	23
中药	薏苡仁	MOL001323	-6.9	227	-34	16	54	26	26	26
中药	苦杏仁	MOL007207	-6.8	227	-34	16	54	20	20	20
中药	苦杏仁、薏苡仁	MOL000953	-6.8	264	-37	5	58	25	25	25
中药	苦杏仁	MOL000492	-6.4	289	-14	34	56	21	21	21
化学药物	—	利巴韦林	-6.2	329	-11	15	66	19	19	19
中药	苦杏仁	MOL012922	-6.1	289	-14	34	56	22	22	22
中药	苦杏仁、薏苡仁	MOL002372	-6.0	264	-37	5	58	30	30	30
化学药物	—	氯喹	-5.5	227	-34	16	54	22	22	22
中药	白蔻仁	MOL000254	-5.4	227	-34	16	54	18	18	18
中药	苦杏仁	MOL002211	-5.2	264	-37	5	58	26	26	26
中药	白蔻仁	MOL000122	-5.1	227	-34	16	54	16	16	16
中药	薏苡仁	MOL008121	-5.0	264	-37	5	58	33	33	33

续表 2

类别	来源	化学成分	Vina 得分	空腔尺寸	center ^a			size ^b		
					x	y	z	x	y	z
中药	白蔻仁	MOL000255	-5.0	264	-37	5	58	24	24	24
中药	白蔻仁	MOL000265	-5.0	227	-34	16	54	19	19	19
中药	薏苡仁	MOL008118	-4.9	227	-34	16	54	38	38	38
中药	白蔻仁	MOL000207	-4.9	227	-34	16	54	18	18	18
中药	白蔻仁	MOL004786	-4.9	227	-34	16	54	17	17	17
中药	苦杏仁	MOL005030	-4.8	227	-34	16	54	32	32	32
中药	薏苡仁	MOL002882	-4.8	264	-37	5	58	28	28	28
中药	苦杏仁	MOL010922	-4.7	227	-34	16	54	30	30	30
中药	白蔻仁、薏苡仁	MOL000256	-4.7	227	-34	16	54	36	36	36
中药	白蔻仁	MOL000125	-4.7	227	-34	16	54	16	16	16
中药	白蔻仁	MOL000905	-4.7	227	-34	16	54	16	16	16
中药	白蔻仁	MOL000262	-4.6	227	-34	16	54	16	16	16
中药	白蔻仁	MOL000018	-4.6	227	-34	16	54	16	16	16
中药	白蔻仁	MOL000267	-4.6	329	-11	15	66	19	19	19
中药	薏苡仁	MOL001494	-4.5	227	-34	16	54	29	29	29

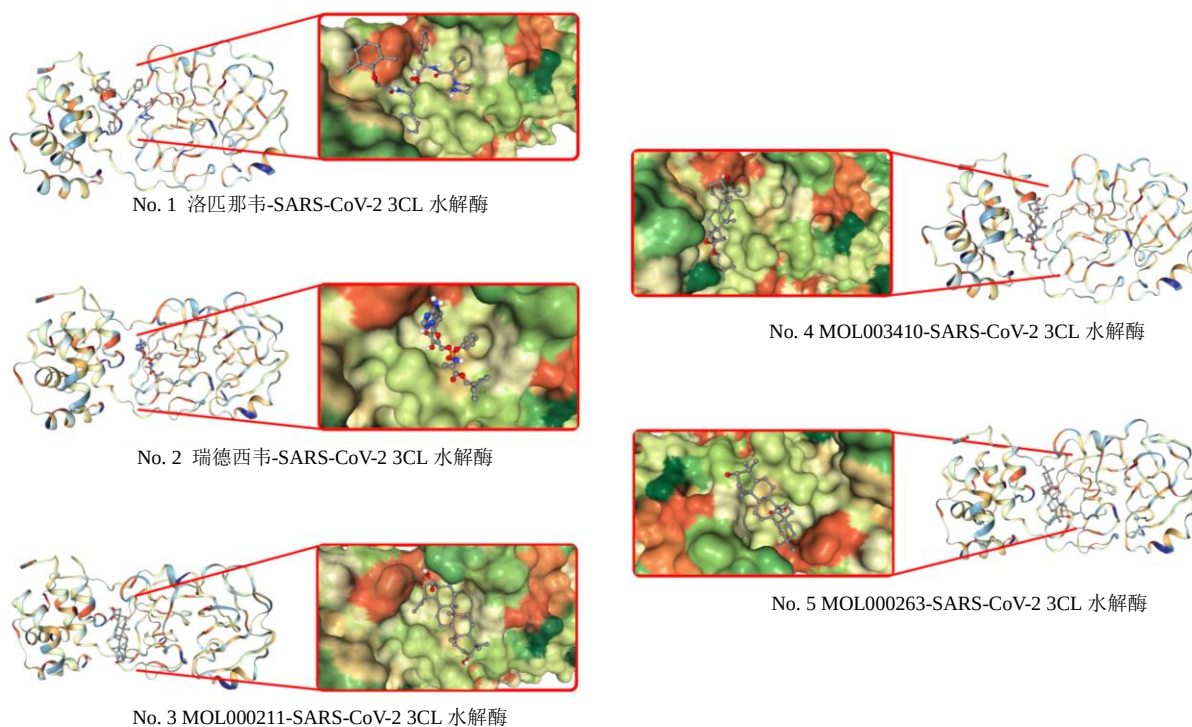
^a 对接口袋的中心坐标; ^b 对接口袋在 x、y、z 轴方向的大小^athe center coordinates of the interface bag; ^bThe size in the x, y, and z directions of the interface bag

图 6 Vina 得分最低的前 5 种化合物分子对接模式

Fig. 6 Docking mode of top five compounds with lowest Vina score

精，上归于肺，通调水道，下输膀胱，水精四布，五经并行，合于四时五脏阴阳，揆度以为常也。”脾土为肺金之母，湿邪困脾，脾气不升，浊气不降，

中焦气机升降失司，而致脾失健运，肺失肃降，故疾病发展时见发热、热势不高、乏力，伴腹泻、便溏、四肢肌肉酸痛、舌苔腻等症状。明清时期是瘟

疫病学研究的鼎盛时期,清代吴鞠通在《温病条辨·上焦篇》记载:“头痛恶寒,身重疼痛,舌白不渴,脉弦细而濡,面色淡黄,胸闷不饥,午后身热,状若阴虚,病难速已,名曰湿温。”三仁汤君药之苦杏仁轻开上焦肺气,盖肺主一身之气,气化则湿亦化;白蔻仁宣畅中焦气机,调脾理胃,振复运化水湿之机;薏苡仁渗淡疏导下焦,清热利湿,湿热之邪自有出路。

本研究从宏观上运用网络药理学进行分析,可知三仁汤君药活性成分共 39 种,作用于人体 168 个靶蛋白,体现了中药复方“多成分-多靶点”的作用特点。通过 PPI 网络分析关键子网络核心靶蛋白,其中包括 HSP90AA1。HSP90 是 HSP 家族相对分子质量在 $8.3 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ 的热休克蛋白,参与多种重要的细胞过程和调节途径,是病毒在其生命周期的多个阶段(包括病毒进入、核输入、转录和复制)所必需的重要宿主因子,在病毒感染细胞的恶性转化中起着至关重要的作用^[13]。研究表明抑制 HSP90 过表达可延长用媒介物预处理并接受内毒素的小鼠败血症生存期,减轻炎症,并减少肺损伤^[14]。

COVID-19 患者可能出现严重炎症反应,临床胸部影像可以呈现胸膜下斑片影、磨玻璃样影和间质性肺炎表现,重症期可见急性呼吸窘迫综合征、脓毒症、多器官衰竭等。根据富集结果提示,三仁汤君药可通过参与调控核转录因子- κ B (NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、一氧化氮合酶 (NOS2) 等多个靶标蛋白,参与调控免疫系统中的细胞因子信号转导 (cytokine signaling in immune system)、白介素信号通路 (signaling by interleukins)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (MAPK signaling pathway) 等信号通路。NF- κ B 是一类关键性的核转录因子,可通过调控 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、COX2 等多种细胞因子,在炎症、免疫反应中发挥重要作用。研究表明^[15],白蔻仁的活性成分丁香酚 (MOL000254) 可减轻 LPS 诱导肺损伤 BALB/c 小鼠肺实质中的胶原蛋白沉积,抑制 NF- κ B 的活化以及 TNF- α 等炎症细胞因子表达,减轻肺部炎症。此外,丁香酚还可抑制脊椎损伤大鼠模型中的 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、SOD、NF- κ B 及 p38 MAPK 的过表达,减轻炎症与氧化应激反应^[16]。研究挖掘临床中药治疗病毒性肺炎的组方用药规律,可知组方的核心药物频次最高为苦杏仁^[17]。苦杏仁及薏苡仁共同活性成分谷甾醇 (MOL000359) 及豆甾醇 (MOL000449) 属植物甾醇,研究表明 2 种植物甾

醇可能通过参与 MAPK 信号通路抑制 ERK 磷酸化,降低环氧化酶-2 (COX-2)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和 TNF- α 的表达,从而减轻 LPS 诱导的巨噬细胞模型的炎症反应^[18],豆甾醇还可控制 VCAM-1 过表达,减少细支气管周围、血管周围和肺泡对炎症细胞的浸润^[19]。此外,三仁汤可通过影响炎症相关的 NF- κ B,抑制湿热证病毒性肺炎模型小鼠的炎症反应以及病毒核酸 mRNA 表达^[20],还可干预湿热证型病毒性肺炎模型小鼠免疫功能,具有改变机体炎症因子含量、增强机体免疫功能的作用^[21]。KEGG 富集分析为理论水平上的探讨结果,与新型冠状病毒肺炎之间的关系仍需进一步体外细胞实验和体内动物实验等手段加以验证阐释。

随着高通量技术发展,大量蛋白质的三维结构被证实,计算机技术已成为研究化合物与靶标蛋白关系的重要手段之一。通过计算机模拟成分-靶点间的分子对接,可迅速且准确地了解化合物与靶标之间的作用关系,可加速药物设计,缩短研发周期^[22]。SARS-CoV-2 需要 3CL 水解酶 (Mpro) 来复制 RNA,是病毒的 1 个关键蛋白质,若化合物与 Mpro 结合可大概率阻隔病毒的复制,抑制病毒多蛋白的裂解并防止传播,为抗病毒药物研发指明方向,因此本研究在微观层面上运用分子对接技术,挖掘三仁汤抗新型冠状病毒的特异性及可能性。将三仁汤君药活性成分及相关化学药物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶进行分子对接,比对发现, Vina 得分 ≤ -7.0 的化合物共 16 种,三仁汤君药活性成分占 13 种,化学药物占 3 种。其中三仁汤君药活性成分的白桦脂酸、枣素及齐墩果酸等与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶结合性较好,所耗结合能均低于利托那韦,与 3C 类似蛋白酶 (protease 3C-like, 3CLpro) 抑制剂洛匹那韦及 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 抑制剂瑞德西韦^[23]相近。研究发现,白桦脂酸作用于 A549 细胞可呈剂量依赖性抑制 A/PR/8 流感病毒增殖,而在动物实验中则可显著降低感染的 C57BL/6 小鼠体内的炎症细胞因子水平,表明白桦脂酸在体内及体外均具有抗病毒活性^[24]。以上结果均提示三仁汤君药活性成分可能具有潜在的抗病毒作用,但具体的参与机制及作用途径尚未清楚,具备一定的深入研究价值。

在抗击新型冠状病毒肺炎的疫情中,中央强调应强化中西医结合,促进中医药深度介入诊疗全过程,及时推广有效方药及中成药,因此本研究通过

2 个层面探讨三仁汤主要成分对新型冠状病毒肺炎的潜在治疗作用。宏观层面上,运用网络药理学明确活性成分及其靶蛋白,构建三仁汤君药的“成分-靶点-通路”多层次互作网络;微观层面上则通过分子对接技术分析三仁汤君药活性化合物抗新型冠状病毒的特异性及可能性,为后续进一步完善体内及体外实验提供科学假设及理论依据,更好地发挥中医药抗击疫情的防治效果。

参考文献

- [1] Luo Y, Wang C Z, Hesse-Fong J, et al. Application of Chinese medicine in acute and critical medical conditions [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(6): 1223-1235.
- [2] 国家卫健委, 国家中医药管理局. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第三版) [S]. 2020.
- [3] 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.
- [4] 汝锦龙. 中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [5] The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(5): 2699.
- [6] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [7] Burley S K, Berman H M, Bhikadiya C, et al. RCSB protein data bank: Biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D464-D474.
- [8] Liu Y, Grimm M, Dai W T, et al. CB-Dock: A web server for cavity detection-guided protein-ligand blind docking. [J]. *Acta Pharm Sin*, 2020, 41(1): 138-144.
- [9] 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.
- [10] Chu C M, Cheng V C, Hung I F, et al. Role of Lopinavir/Ritonavir in the treatment of SARS: Initial virological and clinical findings [J]. *Thorax*, 2004, 59(3): 252-256.
- [11] Nukoolkarn V, Lee V S, Malaisree M, et al. Molecular dynamic simulations analysis of Ritronavir and Lopinavir as SARS-CoV 3CL pro inhibitors [J]. *J Theoretical Biol*, 2008, 254(4): 861-867.
- [12] Beaucourt S, Vignuzzi M. Ribavirin: A drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation molecular basis of ribavirin resistance [J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 8: 10-15.
- [13] Wang Y, Jin F, Wang R, et al. HSP90: A promising broad-spectrum antiviral drug target [J]. *Arch Virol*, 2017, 162(11): 3269-3282.
- [14] Chatterjee A, Dimitropoulou C, Drakopanayiotakis F, et al. Heat shock protein 90 inhibitors prolong survival, attenuate inflammation, and reduce lung injury in murine sepsis [J]. *Am J Respirat Critl Care Med*, 2007, 176(7): 667-675.
- [15] Magalhães C B, Riva D R, DePaula L J, et al. *In vivo* anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury [J]. *J Appl Physiol*, 2010, 108(4): 845-851.
- [16] Ma L, Mu Y, Zhang Z, et al. Eugenol promotes functional recovery and alleviates inflammation, oxidative stress, and neural apoptosis in a rat model of spinal cord injury [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2018: 36(5): 659-668.
- [17] 杨海昊, 于莹, 汤继芹, 等. 近30年中药治疗病毒性肺炎组方用药规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3): 197-200.
- [18] Yuan L, Zhang F, Shen M, et al. Phytosterols suppress phagocytosis and inhibit inflammatory mediators via ERK pathway on LPS-triggered inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and the correlation with their structure [J]. *Foods*, 2019, doi: 10.3390/foods8110582.
- [19] Antwi A O, Obiri D D, Osafo N. Stigmasterol modulates allergic airway inflammation in guinea pig model of ovalbumin-induced asthma [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 2953930.
- [20] 季旭明, 庄凌云, 崔有利, 等. 三仁汤对湿热证型病毒性肺炎小鼠模型的多靶点干预作用 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6): 1287-1289.
- [21] 庄凌云, 张桂菊, 崔有利, 等. 三仁汤对湿热证型病毒性肺炎模型小鼠免疫功能的干预作用 [J]. 山东中医药大学学报, 2019, 43(5): 508-512.
- [22] 赵晨, 夏春光, 于敏, 等. 分子对接软件在药物设计中的应用 [J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(3): 234-240.
- [23] Tchesnokov E P, Feng J Y, Porter D P, et al. Mechanism of inhibition of ebola virus RNA-dependent RNA polymerase by remdesivir [J]. *Viruses*, 2019, 11(4): 326.
- [24] Hong E H, Song J H, Kang K B, et al. Anti-influenza activity of betulinic acid from *Zizyphus jujuba* on influenza A/PR/8 virus [J]. *Biomol Therap*, 2015, 23(4): 345-349.