

• 药理与临床 •

基于网络药理学的痰热清胶囊治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 机制研究

韩彦琪^{1,2}, 刘耀晨³, 武琦³, 许浚^{1,2}, 张铁军^{1,2}, 穆竞伟^{4*}, 刘昌孝^{1,2*}

1. 天津药物研究院, 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462

2. 天津药物研究院, 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300462

3. 天津医科大学, 天津 300070

4. 上海凯宝药业股份有限公司, 上海 200030

摘要: **目的** 探索痰热清胶囊治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的网络调控机制。**方法** 选取痰热清胶囊中 19 个主要成分作为研究对象, 利用 Swiss Target Prediction 服务器和 TCMSP 数据库预测化合物潜在作用靶点, 借助 Omicsbean 分析系统与 String 10 数据库对靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析和信号通路分析, 利用 Cytoscape 3.6.1 软件进行可视化处理。**结果** 19 个化合物可通过作用于 163 个相关靶点干预 68 条关键信号通路, 如白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路、T 细胞受体信号通路、花生四烯酸代谢、cAMP 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、甲型流感等, 主要涉及抗炎、免疫调节、解热、化痰、镇咳平喘、止痛、抗菌、抗病毒、镇静等方面, 构建了痰热清胶囊“化合物-靶点-通路-药理作用-功效”网络。**结论** 痰热清胶囊中主要化学成分野黄芩苷、黄芩苷、千层纸素-7-O-葡萄糖醛酸苷、白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷、连翘苷、连翘酯苷 E、连翘酯苷 D、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸等可能通过作用于 TNF、EGFR、NOS3、PTGS2、IL2、GABBR1、MAPK14、ADRB2、REN、VCAM1、ACHE、PTPRC 等关键蛋白干预了多个与清热、化痰、解毒相关的生物过程, 从而发挥对 COVID-19 的治疗作用。

关键词: 痰热清胶囊; 新型冠状病毒肺炎; 网络药理学; 作用机制; 野黄芩苷; 黄芩苷; 千层纸素-7-O-葡萄糖醛酸苷; 白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷; 连翘苷; 连翘酯苷 E; 连翘酯苷 D; 绿原酸; 咖啡酸; 异绿原酸 A; 熊去氧胆酸; 鹅去氧胆酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)11-2967-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.015

Mechanism of Tanreqing Capsule on treatment of coronavirus disease 2019 based on network pharmacology

HAN Yan-qi^{1,2}, LIU Yao-chen³, WU Qi³, XU Jun^{1,2}, ZHANG Tie-jun^{1,2}, MU Jing-wei⁴, LIU Chang-xiao^{1,2}

1. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

3. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

4. Shanghai Kaibao Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200030, China

Abstract: Objective To explore the network regulation mechanism of Tanreqing Capsule (TRQC) on the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Methods** Potential targets of the 19 major constituents in TRQC were predicted by the Swiss Target Prediction server and TCMSP database. Gene ontology (GO) function enrichment and pathway analysis of the targets were analyzed by Omicsbean analytic system and String 10 database. Finally, Cytoscape 3.6.1 software was used to construct the network pharmacology map. **Results** A total of 19 compounds affected 68 pathways such as IL-17 signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, arachidonic acid metabolism, cAMP signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, influenza A, etc, by acting

收稿日期: 2020-04-15

作者简介: 韩彦琪, 女, 助理研究员。Tel: (022)23003935 E-mail: hanyq@tjipr.com

*通信作者 穆竞伟 E-mail: jingwei_mu@sina.com

刘昌孝, 中国工程院院士。E-mail: liuchangxiao@163.com

on 163 related targets, which associated with anti-inflammation, immune regulation, antipyresis, eliminating phlegm, relieving cough and asthma, analgesia, antibacterial and antiviral, and sedation. The network of “compound-target-pathway-pharmacological action-efficacy” was also constructed. **Conclusion** The major constituents in TRQC, including scutellarin, baicalin, oroxylin-7-*O*-glucuronide, chrysin-7-*O*-glucuronide, forsythin, forsythiaside E, forsythiaside D, chlorogenic acid, caffeic acid, isochlorogenic acid A, ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid, may interfere with efficacy-related biological processes associated with antipyresis, eliminating phlegm and removing toxin by acting on key protein like TNF, EGFR, NOS3, PTGS2, IL2, GABBR1, MAPK14, ADRB2, REN, VCAM1, ACHE, PTPRC, etc.

Key words: Tanreng Capsule; coronavirus disease 2019; network pharmacology; mechanism; scutellarin; baicalin; oroxylin-7-*O*-glucuronide; chrysin-7-*O*-glucuronide; forsythin; forsythiaside E; forsythiaside D; chlorogenic acid; caffeic acid; isochlorogenic acid A; ursodeoxycholic acid; chenodeoxycholic acid

新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)具有潜伏期长、传染性强、各类人群普遍易感的特点,对全球人民健康、经济发展和社会稳定带来巨大负面影响。世界卫生组织宣布将 COVID-19 全球风险等级提至最高级别^[1]。治疗 COVID-19 至今尚无针对性的有效药物,临床治疗以对症、支持疗法为主。如何形成快速有效的救治方案,是当前面临的重大问题。国家卫生健康委员会先后印发了 7 版《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》^[2],各省市自治区也结合地域特点,先后出台了各自的诊疗方案,在这些诊疗方案中,推荐采用中医药方剂进行 COVID-19 的治疗及预防。其中,在《上海市新型冠状病毒肺炎中医诊疗方案(试行第二版)》^[3]、《广东省新型冠状病毒肺炎中医诊疗方案(试行第二版)》^[4]中,将清热解毒类中成药痰热清胶囊推荐用于 COVID-19 轻型患者。

痰热清胶囊由黄芩、熊胆粉、山羊角、金银花、连翘 5 味药材组成,具有清热、化痰、解毒的功效,用于风温肺热病属风热袭肺证,症见发热、恶风、咳嗽、咯痰或咽痛、流涕、口干等^[5]。痰热清胶囊中的黄芩为君药,具有清热燥湿、泻火解毒之功效;熊胆粉、山羊角为臣药,熊胆粉具有清热、平肝、明目作用;山羊角具有清热镇惊、平肝熄风、散瘀止痛的功效;金银花为佐药,有广谱抗菌作用,以助清热解毒、宣肺化痰;连翘为使药,具有升浮宣散之力。目前针对痰热清胶囊作用机制的研究报道较少,其用于治疗 COVID-19 的机制研究尚未见报道。由于中药复方具有多成分、多靶点及协同作用的特点,传统药理学研究手段存在一定的局限性,而网络药理学是系统生物学和多向药理学相融合而成,强调药物作用特点是干预疾病网络,其理念与

中药复方的作用特点具有一致性,为中药复方的机制研究提供了新的策略^[6]。因此,本研究借助 Swiss Target Prediction 服务器、TCMSP 数据库获取痰热清胶囊中主要化合物的作用靶点,利用 String10、Omicsbean 等在线分析平台进行通路富集分析和生物信息学分析,从网络药理学角度阐释痰热清胶囊多成分、多靶点、多途径发挥清热、化痰、解毒功效的科学内涵,为其治疗 COVID-19 的临床应用提供参考,同时为其进一步的作用机制研究奠定基础。

1 材料

ChemBio Office 2010; Swiss Target Prediction 服务器(<http://new.swisstargetprediction.ch/>); 中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmspsearch.php>); UNIPROT 数据库(<http://www.uniprot.org/>); 京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>); STRING 10 数据库(<http://string-db.org/>); DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>); Omicsbean 在线分析软件(<http://www.omicsbean.cn/>); Omicshare Tools 在线制图软件(<https://www.omicshare.com/>); Cytoscape 3.6.1 软件。

2 方法

2.1 目标化合物的选取

痰热清胶囊由黄芩、熊胆粉、山羊角、金银花、连翘 5 味药材提取制成,以课题组前期化学物质组研究结果为基础,结合该方的功能主治、药味作用特点以及制备工艺、成分含量等方面,选取了来源于 5 味药材中的黄酮类、木脂素类、苯乙醇苷类、有机酸类、氨基酸类、胆汁酸类 19 个化合物为研究对象,具体信息见表 1。

表 1 痰热清胶囊中 19 个化合物信息

Table 1 Information of 19 compounds in TRQC

编号	结构类型	化合物	分子式	来源
1	黄酮	野黄芩苷 (scutellarin)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	黄芩
2		黄芩苷 (baicalin)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	
3		千层纸素-7-O-葡萄糖醛酸苷 (oroxylin-7-O-glucuronide)	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	
4		白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷 (chrysin-7-O-glucuronide)	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	
5	木脂素	连翘苷 (phillyrin)	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	连翘
6	苯乙醇苷	连翘酯苷 E (forsythoside E)	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	连翘
7		连翘酯苷 D (forsythoside D)	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₃	
8		绿原酸 (chlorogenic acid)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	
9	有机酸	咖啡酸 (caffeic acid)	C ₉ H ₈ O ₄	金银花
10		异绿原酸 A (3,5-dicaffeoylquinic acid)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	
11		甘氨酸 (glycine)	C ₂ H ₅ NO ₂	
12		丙氨酸 (alanine)	C ₃ H ₇ NO ₂	
13	氨基酸	精氨酸 (arginine)	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	山羊角
14		赖氨酸 (lysine)	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	
15		缬氨酸 (valine)	C ₅ H ₁₁ NO ₂	
16		酪氨酸 (tyrosine)	C ₉ H ₁₁ NO ₃	
17		亮氨酸 (leucine)	C ₆ H ₁₃ NO ₂	
18		熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid)	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	
19		鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid)	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	

2.2 目标化合物靶点的预测分析

登录 Swiss Target Prediction 服务器, 在线绘制痰热清胶囊 19 个化合物的化学结构, 采用反向药效团匹配方法得到虚拟匹配筛选结果。同时在 TCMSP 数据库检索, 获取化合物的相关靶点信息。由于检索到的药物靶标存在命名不规范等问题, 因此, 本实验使用 UniProt 数据库中 UniProtKB 搜索功能, 通过输入蛋白名称并限定物种为“human”, 将检索得到的所有蛋白校正为其官方名称。整合 Swiss Target Prediction 和 TCMSP 靶点结果, 得到化合物潜在作用靶点库。

2.3 通路分析及生物信息学分析

运用 Omicsbean 软件对靶点蛋白进行生物信息学分析, 探究靶点蛋白在细胞组分 (cellular component)、分子功能 (molecular function) 以及生物过程 (biological process) 方面的作用机制。通过 STRING 10 数据库得到与靶点相关的通路过程, 利用 KEGG 数据库以及查阅相关文献, 对得到的通路进行深入分析。

2.4 构建蛋白互作 (PPI) 网络及筛选关键蛋白靶点

将整合的靶点信息导入 STRING10 数据库中, 物种限定为“Homo sapiens”, 获得蛋白间相互作用信息, 将文件导入 Cytoscape 3.6.1 软件中绘制 PPI 网络, 分析其网络拓扑参数, 筛选出关键蛋白靶点。

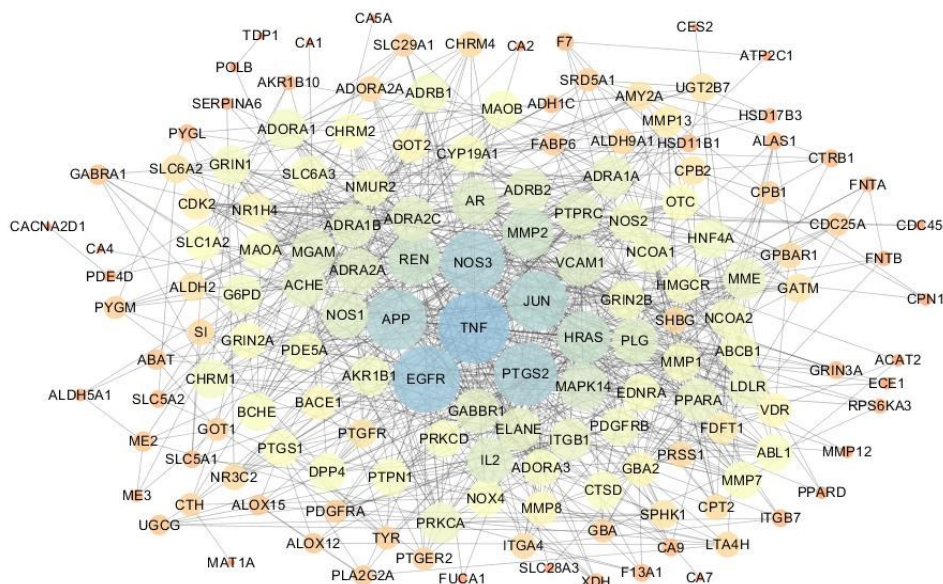
2.5 “化合物-靶点-通路-药理作用-功效”网络构建

根据上述痰热清胶囊 19 个化学成分靶点及通路预测结果, 在 Excel 表格中建立化合物-靶点、靶点-通路、通路-药理作用、药理作用-功效的相互对应关系, 然后导入 Cytoscape 3.6.1 软件中构建网络, 并运用其插件 Network Analyzer 计算网络的特征。网络中节点 (node) 表示化合物、靶点以及作用通路、药理作用、功效。边 (edge) 表示化合物-靶点, 靶点-通路以及靶点-药理作用、药理作用-功效相互作用。经处理后, 得到 19 个成分的相关靶点、通路预测图, 以该图来表示痰热清胶囊“化合物-靶点-作用通路-药理作用-功效”之间的相互关系。

3 结果

3.1 化合物潜在靶点分析结果

通过 Swiss Target Prediction 服务器反向对接实验和 TCMSP 数据库检索, 得到 19 个化合物共 163 个相关靶点, 导入 STRING 10 数据库中得到 PPI 网络, 该网络有 163 个节点, 901 条边, 其中节点代表靶点, 边代表靶点之间的相互作用关系。利用 Cytoscape 3.6.1 软件将 PPI 网络可视化 (图 1), 并进行网络拓扑分析, 根据节点的度值 ≥ 20 筛选出关键靶点, 包括 TNF、EGFR、NOS3、PTGS2、APP、JUN、HRAS、REN、MMP2、MAPK14、VCAM1 等 23 个 (表 2), 这些蛋白涉及炎症反应、免疫调



圆节点代表蛋白靶点，圆圈大小和颜色深浅代表靶点蛋白相互作用的紧密程度

Circle nodes represent protein targets, circle size and color depth represent closeness interaction between targets and proteins

图 1 痰热清胶囊相关蛋白靶点的 PPI 网络

Fig. 1 PPI network of related protein targets in TRQC

表 2 痰热清胶囊相关核心蛋白靶点信息

Table 2 Information of 23 key protein targets related to TRQC

靶点	通用名称	度值	Uniprot ID
tumor necrosis factor	TNFA	50	P01375
epidermal growth factor receptor erbB1	EGFR	46	P00533
nitric-oxide synthase, endothelial	NOS3	41	P29474
prostaglandin G/H synthase 2	PTGS2	41	P35354
beta amyloid A4 protein	APP	39	P05067
transcription factor AP-1	JUN	38	P05412
transforming protein p21/H-Ras-1	HRAS	30	P01112
renin, renal	REN	29	P00797
matrix metalloproteinase 2	MMP2	28	P08253
MAP kinase p38 alpha	MAPK14	25	Q16539
vascular cell adhesion protein 1	VCAM1	24	P19320
androgen receptor	AR	23	P10275
nitric-oxide synthase, brain	NOS1	22	P29475
interleukin-2	IL2	22	p60568
plasminogen	PLG	22	P00747
beta-2 adrenergic receptor	ADRB2	21	P07550
adrenergic receptor alpha-2	ADRA2C	21	P18825
GABA-B receptor	GABBR1	21	Q9UBS5
alpha-2A adrenergic receptor	ADRA2A	21	P08913
maltase-glucoamylase	MGAM	21	O43451
acetylcholinesterase	ACHE	20	P22303
leukocyte common antigen	PTPRC	20	P08575
alpha-1B adrenergic receptor	ADRA1B	20	P35368

节、抗菌、抗病毒、解热、止痛、镇静、化痰、镇咳平喘等方面，提示痰热清胶囊清热、化痰、解毒功效机制可能与这些蛋白靶点有关。

为了进一步了解 PPI 网络的生物作用，使用 Cytoscape 3.6.1 的 MCODE 插件对网络进行 Cluster 模块分析，共获得 8 个 Cluster 模块，结果见图 2，具体模块信息见表 3。对 8 个模块分别进行 GO 分析，发现 Cluster1 主要与平滑肌收缩的调节、免疫应答调节、调节血管收缩、胆碱能突触传递等生物过程有关；Cluster2 主要与正调控发热的产生、免疫应答、

调节 NO 的生物合成等通路过有关；Cluster3 主要与刺激神经组织的配体-受体相互作用、谷氨酸能突触、全身性红斑狼疮等通路过有关；Cluster4 主要与炎症反应、抗氧化应激、镇静等生物过程有关；Cluster5 主要与花生四烯酸分泌与代谢、脂氧合酶途径、脂质分解代谢等生物过程有关；Cluster6 主要与免疫炎症过程、脂质代谢、蛋白质代谢等生物过程有关；Cluster7 主要与刺激神经组织的配体-受体相互作用、血管平滑肌收缩等通路过有关；Cluster8 主要与氨基酸的合成与代谢有关。

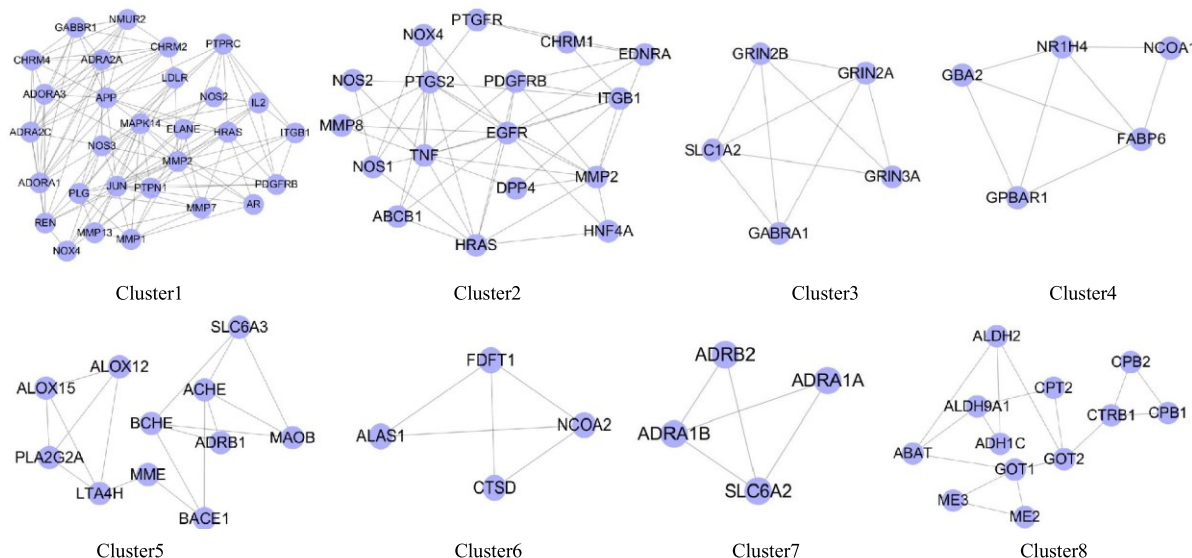


图 2 痰热清胶囊相关蛋白靶点的 Cluster 模块的 PPI 网络
Fig. 2 PPI network of related protein target Clusters of TRQC

表 3 痰热清胶囊相关蛋白靶点的 PPI 网络 Cluster 数据
Table 3 Cluster data of related protein targets of TRQC

Cluster	节点	边	靶点蛋白
1	23	87	ADORA1、CHRM2、MMP7、GABBR1、PLG、MMP13、CHRM4、NOS3、PTPN1、ADRA2A、ADORA3、REN、MMP1、MAPK14、JUN、LDLR、ADRA2C、APP、NMUR2、ELANE、PTPRC、IL2、AR
2	17	50	PDGFRB、NOX4、NOS1、NOS2、DPP4、ITGB1、PTGS2、TNF、EDNRA、HNF4A、MMP8、ABCB1、PTGFR、CHRM1、EGFR、HRAS、MMP2
3	5	9	GRIN2A、GRIN3A、GRIN2B、GABRA1、SLC1A2
4	5	8	NCOA1、NR1H4、GPBAR1、GBA2、FABP6
5	11	17	BCHE、LTA4H、SLC6A3、MME、ADRB1、BACE1、ACHE、ALOX12、MAOB、PLA2G2A、ALOX15
6	4	5	CTSD、ALAS1、FDFT1、NCOA2
7	4	5	SLC6A2、ADRA1B、ADRA1A、ADRB2
8	12	16	ADH1C、ME2、ME3、CPT2、CTRB1、CPB1、GOT2、ALDH9A1、ABAT、GOT1、CPB2、ALDH2

3.2 生物信息学分析

利用 OmicsBean 分析软件对相关靶点蛋白进行功能注释分析(GO 分析),包含细胞组分(CC)、分子功能(MF)和生物过程(BP)3个方面,选取 P 值最小的前 10 个进行作图呈现(图 3)。结果发现,这些蛋白在 BP 方面主要涉及白细胞活

化参与的炎症反应、内源性刺激反应、外源性刺激反应等过程;在 CC 方面主要参与谷氨酸能突触、树突树结构、细胞外间隙等过程;在 MF 方面主要参与蛋白结合绑定、酶结合、药物结合等过程。推测痰热清胶囊清热化痰解毒功效可能与以上功能过程相关。

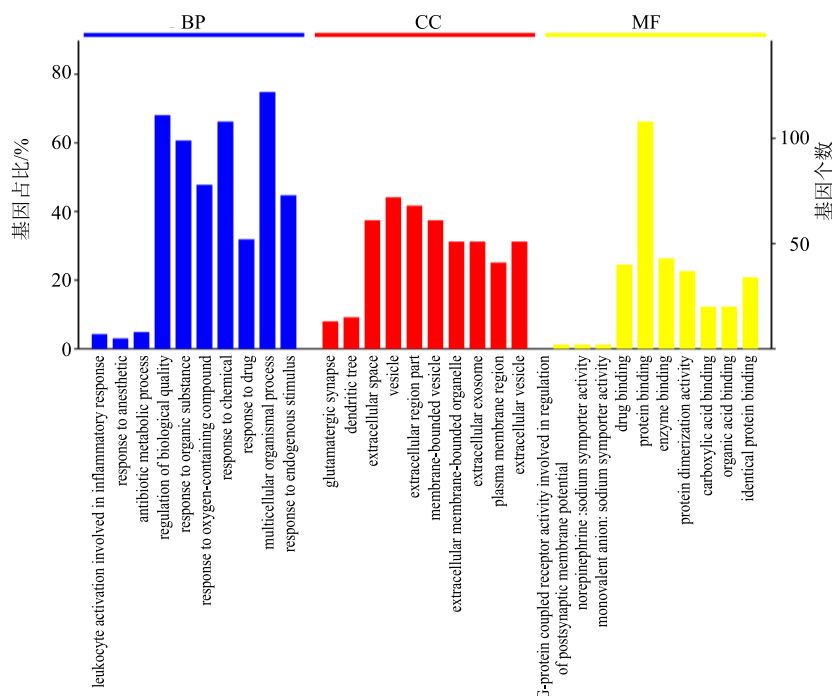


图 3 痰热清胶囊相关蛋白靶点的 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of related protein targets of TRQC

3.3 通路分析

在 STRING 10 数据库中得到 106 条通路(false discovery rate<0.01),对其进行 KEGG 分析及相关文献查阅,得到 68 条相关信号通路,具体信息见表 4,通过 OmicsShare 在线平台对 false discovery rate (FDR) 值前 20 的通路进行可视化处理(图 4),其中 rich factor 表示相关基因中位于该通路的基因数目与所有注释基因中位于该通路的基因总数的比值,该值越大代表富集程度越高。

分析富集的通路发现,主要涉及与炎症免疫相关的通路,如花生四烯酸代谢(arachidonic acid metabolism)、白细胞介素-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、肿瘤坏死因子- α 信号通路(TNF- α signaling pathway)等;与解热止痛相关的通路,如环磷酸腺苷信号通路(cAMP signaling pathway)、钙信号通路(calcium signaling pathway)等;与化痰镇咳平喘相关的通路,如环磷酸鸟苷-

蛋白激酶 G 信号通路(cGMP-PKG signaling pathway)、cAMP signaling pathway 等;与镇静相关的通路,如神经活性配体-受体相互作用(neuroactive ligand-receptor interaction)等。

3.4 “化合物-靶点-通路-药理作用-功效”网络构建与拓扑学属性分析

根据对应关系在 Cytoscape 3.6.1 软件中,构建“化合物-靶点-通路-药理作用-功效”的网络关系图(图 5),通过拓扑属性分析发现,该网络有 67 340 条边,且构建网络的节点度分布服从幂分布 [$P(x)=106.67 \times x^{-1.275}$ ($r^2=0.81$)],表明痰热清胶囊网络为无标度网络。特征路径长度 3.331,即网络路径长度为 3 步,大多数蛋白的联系非常密切,表明该网络具有较快的传播速度和较短的反应时间,具有小世界性质。网络异质性为 0.883,平均相邻节点数目 7.169,网络中心度 0.155。提示痰热清胶囊网络具有无标度、小范围的体系结构。分析发现,网络

表 4 68 条富集通路信息
Table 4 Information of 68 related pathways

通路	基因数量	FDR	通路	基因数量	FDR
metabolic pathways	45	1.33×10^{-14}	gap junction	6	6.40×10^{-4}
calcium signaling pathway	19	4.76×10^{-13}	dopaminergic synapse	7	6.70×10^{-4}
neuroactive ligand-receptor interaction	22	4.76×10^{-13}	protein digestion and absorption	6	7.20×10^{-4}
arginine and proline metabolism	10	2.11×10^{-9}	IL-17 signaling pathway	6	7.80×10^{-4}
cAMP signaling pathway	15	9.78×10^{-9}	steroid hormone biosynthesis	5	8.10×10^{-4}
relaxin signaling pathway	11	6.77×10^{-7}	MAPK signaling pathway	10	9.70×10^{-4}
arginine biosynthesis	6	1.34×10^{-6}	T cell receptor signaling pathway	6	1.00×10^{-3}
estrogen signaling pathway	10	6.08×10^{-6}	phospholipase D signaling pathway	7	1.10×10^{-3}
serotonergic synapse	9	1.24×10^{-5}	alanine, aspartate and glutamate metabolism	4	1.20×10^{-3}
tyrosine metabolism	6	1.88×10^{-5}	cholinergic synapse	6	1.60×10^{-3}
cGMP-PKG signaling pathway	10	2.28×10^{-5}	biosynthesis of amino acids	5	1.70×10^{-3}
renin secretion	7	2.51×10^{-5}	PPAR signaling pathway	5	1.70×10^{-3}
pancreatic secretion	8	2.97×10^{-5}	leukocyte transendothelial migration	6	1.70×10^{-3}
insulin resistance	8	5.88×10^{-5}	glutamatergic synapse	6	1.70×10^{-3}
sphingolipid signaling pathway	8	9.42×10^{-5}	neurotrophin signaling pathway	6	1.80×10^{-3}
PI3K-Akt signaling pathway	13	1.00×10^{-4}	pertussis	6	1.00×10^{-3}
Rap1 signaling pathway	10	1.10×10^{-4}	vascular smooth muscle contraction	6	2.00×10^{-3}
regulation of actin cytoskeleton	10	1.20×10^{-4}	cysteine and methionine metabolism	5	2.20×10^{-3}
starch and sucrose metabolism	5	1.30×10^{-4}	other glycan degradation	4	2.20×10^{-3}
GnRH signaling pathway	7	1.30×10^{-4}	sphingolipid metabolism	3	2.30×10^{-3}
VEGF signaling pathway	6	1.40×10^{-4}	ErbB signaling pathway	5	2.50×10^{-3}
arachidonic acid metabolism	6	1.60×10^{-4}	valine, leucine and isoleucine degradation	4	2.80×10^{-3}
phenylalanine metabolism	4	1.90×10^{-4}	hepatitis C	6	3.00×10^{-3}
glycine, serine and threonine metabolism	5	2.20×10^{-4}	inflammatory mediator regulation of TRP channels	5	3.80×10^{-3}
pyruvate metabolism	5	2.20×10^{-4}	phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	2	4.00×10^{-3}
ras signaling pathway	10	2.20×10^{-4}	HTLV-I infection	8	4.00×10^{-3}
tryptophan metabolism	5	2.30×10^{-4}	endocrine resistance	5	4.10×10^{-3}
carbohydrate digestion and absorption	5	2.70×10^{-4}	human papillomavirus infection	9	4.40×10^{-3}
bile secretion	6	2.70×10^{-4}	glycerolipid metabolism	4	5.00×10^{-3}
fatty acid degradation	5	3.20×10^{-4}	TNF signaling pathway	5	6.50×10^{-3}
focal adhesion	9	3.30×10^{-4}	Fc epsilon RI signaling pathway	4	7.20×10^{-3}
histidine metabolism	4	3.90×10^{-4}	influenza A	6	8.20×10^{-3}
regulation of lipolysis in adipocytes	5	6.30×10^{-4}	pentose and glucuronate interconversions	3	8.70×10^{-3}
salivary secretion	6	6.30×10^{-4}	tuberculosis	6	8.80×10^{-3}

中既存在一个分子与多个靶点蛋白的相互作用,也存在不同分子作用于同一个靶点蛋白的现象,显示了痰热清胶囊的多成分、多靶点、多通路的作用特点,初步阐释了痰热清胶囊清热、化痰、解毒药效物质基础和作用机制。

4 讨论

本实验通过网络药理学手段探讨痰热清胶囊治疗

COVID-19 的作用机制,结果发现,痰热清胶囊可通过干预与抗炎、免疫调节、解热、止痛、化痰、镇咳哮喘、抗菌、抗病毒等相关的蛋白及通路发挥治疗作用。

4.1 抗炎及免疫调节作用

COVID-19 通过作用于呼吸道和肺部细胞上的 ACE2 受体,经受体介导的内吞作用进入细胞,导致细胞因子释放及肺部炎症,感染导致的“细胞因

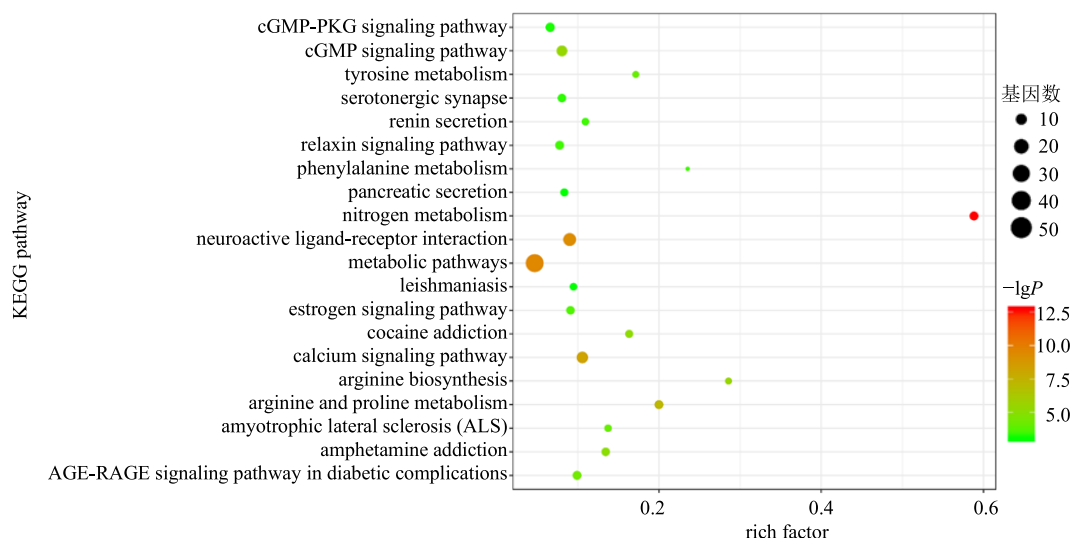


图 4 痰热清胶囊相关蛋白靶点 KEGG 通路富集分析的前 20 条通路

Fig. 4 Top 20 channels of related protein targets by KEGG enrichment analysis of TRQC

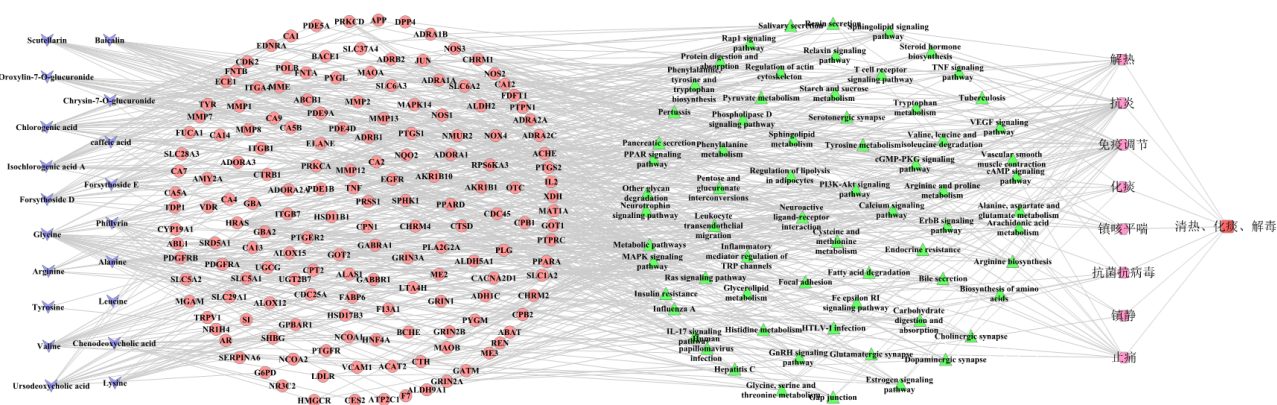


图 5 痰热清胶囊“化合物-靶点-通路-药理作用-功效”网络

Fig. 5 Compound-target-pathway-pharmacological action-efficacy network of TRQC

子风暴”会进一步加重炎症反应^[7]。临床研究显示，COVID-19 患者的淋巴细胞计数显著降低，中性粒细胞异常增多，同时伴随着细胞因子大量累积^[8]，如 TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10、粒细胞集落刺激因子（G-CSF）、趋化因子 10（IP10）、人单核细胞趋化蛋白-1（MCP-1）等^[7]。IL-2 的主要生物学功能是促进 T 细胞的增殖与分化，同时又可限制 T 细胞反应增强机体免疫耐受^[9]。TNF- α 是细胞因子网络的启动因子，能诱导其他细胞因子如 IL-6、IL-1 β 等的释放，共同对组织造成损伤^[10]。IL-6 是造成细胞因子风暴的典型促炎因子^[11]。

本实验发现，野黄芩苷、黄芩苷、千层纸素-7-O-葡萄糖醛酸苷、连翘酯苷 D 可作用于 IL-2 和 TNF- α ；连翘酯苷 E、鹅去氧胆酸、千层纸素-7-O-葡萄糖醛

酸苷、赖氨酸、甘氨酸可分别通过干预 HRAS、JUN、VCAM1、MAPK14、PTPRC、PLA2G2A 和 LTA4H 调节与炎症和免疫相关的信号通路，如花生四烯酸代谢、PI3K-Akt、MAPK、TNF、T 细胞受体、IL-17 信号通路等。另外，山羊角中含有的多种功能性氨基酸在 T 细胞活化中发挥重要作用，如精氨酸^[12]、亮氨酸^[13]可促进 T 细胞的分化成熟。

4.2 解热止痛作用

发热是 COVID-19 进展过程中重要的临床表现之一，当外源性致热原进入机体作用于免疫活性细胞，产生内源性致热原，包括 IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF 等。这些细胞因子直接或间接通过中枢正调节介质 PGE2 等作用于体温调节中枢，体温调定点上移，引起产热增加，散热减少，使体温升高^[14]。同

时, 这些致热性细胞因子也可通过增加神经元和胶质细胞上 PGE2 的表达水平参与外周敏化^[15], 从而在持续性痛或病理性痛中起到关键性作用。

网络药理研究结果表明, 野黄芩苷^[16]、黄芩苷^[17]、千层纸素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、白杨素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、绿原酸^[18]、咖啡酸^[19]、鹅去氧胆酸、甘氨酸^[20]、缬氨酸^[21]、酪氨酸可作用于前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2); 白杨素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、咖啡酸、甘氨酸、丙氨酸、赖氨酸可作用于 PTGS1, 从而减少前列腺素生成。熊去氧胆酸可作用于前列腺素 EP2 受体 (PTGER2), 参与 inflammatory mediator regulation of TRP channels 和 AMP 信号通路来发挥解热止痛作用。

4.3 化痰及镇咳作用

COVID-19 会造成气道黏液高分泌^[22], 致使本已严重障碍的通气功能更加受损, 成为患者病情恶化的促动因素^[23]。气道黏液中高度糖基化的高分子量黏蛋白是气道黏液的最主要成分^[24], 其表达和分泌受细胞因子的正性调节, 如 IL-1 β 、IL-4、IL-13、TNF- α 、EGF 等^[25-29]。本实验发现, 痰热清胶囊中黄芩苷、连翘酯苷 E、熊去氧胆酸等多个化合物可通过干预 cAMP、PI3K-Akt 等多条信号通路调节细胞因子的高表达, 减少气道黏液分泌。另外, 气道黏膜有丰富的副交感神经 (胆碱能), 其激动后可使黏液和浆液细胞的释放均增加^[30]。网络药理结果表明, 野黄芩苷、黄芩苷^[31]、千层纸素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、白杨素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷可作用于乙酰胆碱酯酶 (AChE), 促进乙酰胆碱降解, 影响胆碱能受体活性, 抑制气道黏液分泌。白杨素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、咖啡酸、酪氨酸、亮氨酸亦可与 ADRB2 结合, 推测可能为 β_2 受体的潜在激动剂, 通过激活该受体在一定程度上发挥止咳作用。

4.4 抗菌、抗病毒作用

已有文献表明^[32], 痰热清胶囊能显著降低流感病毒 FM1 感染小鼠的肺指数, 明显降低小鼠死亡率, 且对上呼吸道感染的包括金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、流感杆菌等在内的 9 种细菌有显著的抗菌活性^[33]。本实验网络药理学结果发现, 痰热清胶囊中的野黄芩苷、黄芩苷、千层纸素-*O*-葡萄糖醛酸苷、咖啡酸、鹅去氧胆酸、连翘酯苷 D 等可作用于 EGFR、PLG、PTGS2、JUN、MAPK14 等蛋白干预由细菌或病毒引起的多种疾病信号通路, 如百日咳、丙型肝炎、甲型流感、肺结核等。由此提示, 痰热

清胶囊对 COVID-19 有潜在治疗作用。

4.5 镇静作用

COVID-19 患者在治疗过程中往往会感到焦虑, 影响到自身的睡眠及身体的恢复, 有研究表明^[34], 睡眠时人体的免疫系统能够得到某种程度上的修复和提升。本实验结果发现, 熊去氧胆酸、赖氨酸和甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸可分别作用于中枢神经系统内主要抑制性受体- γ 氨基丁酸受体 (GABA) ^[35] 的 2 个亚型 GABBR1、GABRA1, 干预 neuroactive ligand-receptor interaction 信号通路发挥镇静催眠作用。

综上, 痰热清胶囊可通过多成分、多靶点、多通路的共同作用治疗 COVID-19。但鉴于网络药理学的局限性, 后期还将对关键靶点及通路进行验证实验, 以期为痰热清胶囊治疗 COVID-19 提供更充足的实验依据。

参考文献

- [1] 凌馨, 刘曲. 世卫组织将新冠肺炎疫情全球风险级别上调至“非常高” [EB/OL]. [2020-02-29]. <http://world.people.com.cn/n1/2020/0229/c1002-31610462.html>.
- [2] 国家卫生健康委办公厅, 国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案 (试行第七版) 的通知 (国卫办医函 (2020) 184 号) [EB/OL]. [2020-03-04]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [3] 上海市卫生健康委员会. 上海市新型冠状病毒肺炎中医诊疗方案 (试行第二版) [EB/OL]. [2020-02-24]. <http://wsjkw.sh.gov.cn/zyygz2/20200224/a1f1aab9745e4490867cb4aaf40eaad0.html>.
- [4] 广东省中医药局. 广东省新型冠状病毒肺炎中医药治疗方案 (试行第二版) [EB/OL]. [2020-02-18] [2020-02-18]. http://szyygj.gd.gov.cn/zwgk/gsgg/content/post_2902010.html.
- [5] 钟萃萃, 刘绍勇, 张小利, 等. 痰热清胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 江苏科技信息, 2016(20): 37-40.
- [6] 李梢. 从维度与阶度探讨中医证候的特征及标准化方法 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(3): 1-4.
- [7] Huang C, Wang Y, Li X, *et al*. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [8] Wang D, Hu B, Hu C, *et al*. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China [J]. *JAMA*, 2020, doi: 10.1001/jama.2020.1585.
- [9] 常瑞雪, 颜天华, 王秋娟, 等. 白细胞介素-2 及其相关

- 药物的应用研究进展 [J]. 药学进展, 2011, 35(1): 1-7.
- [10] Sedger L M, McDermott M F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants-past, present and future [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, 25(4): 453-472.
- [11] 杨晨茜, 瞿 娇, 刘怡彤, 等. 新型冠状病毒肺炎的免疫失衡及干预策略 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(4): 445-453.
- [12] Geoghegan V, Guo A L, David T, *et al.* Comprehensive identification of arginine methylation in primary T cells reveals regulator-y roles in cell signalling [J]. *Nat Commun*, 2015, doi: 10.1038/ncomms7758.
- [13] Ananieva E A, Powell J D, Hutson S M. Leucine metabolism in T cell activation: mTOR signaling and beyond [J]. *Adv Nutr*, 2016, 7(4): 798S-805S.
- [14] 李楚杰. 发热时体温的正调节和负调节 [J]. 中国病理生理杂志, 1994, 10(5): 553-557.
- [15] Bastien D, Lacroix S. Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury [J]. *Exper Neurol*, 2014, doi: 10.1016/j.expneurol.2014.04.006.
- [16] Luo Z C, Hu Z C, Bian Y J, *et al.* Scutellarin attenuates the IL-1 β -induced inflammation in mouse chondrocytes and prevents osteoarthritic progression [J]. *Front Pharmacol*, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00107.
- [17] 李 岩, 李 明, 邝枣园, 等. 黄芩苷对小鼠巨噬细胞环加氧酶-2 和前列腺素 E2 表达的影响 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(24): 4129-4131.
- [18] Hwang S J, Kim Y W, Park Y, *et al.* Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 cells [J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(1): 81-90.
- [19] Le B, Anh P T N, Yang S H. Enhancement of the anti-inflammatory effect of mustard kimchi on RAW 264. 7 macrophages by the *Lactobacillus plantarum* fermentation-mediated generation of phenolic compound derivatives [J]. *Foods*, 2020, 9(2): 1-13.
- [20] Gómez-Zamudio J H, García-Macedo R, Lázaro-Suárez M, *et al.* Vascular endothelial function is improved by oral glycine treatment in aged rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2015, 93(6): 465-473.
- [21] Lee J H, Park E, Jin H J, *et al.* Anti-inflammatory and anti-genotoxic activity of branched chain amino acids (BCAA) in lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW 264. 7 macrophages [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2017, 26(5): 1371-1377.
- [22] Rogers D F. Mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Novartis Found Symp*, 2001, doi: 10.1002/0470868678.ch5.
- [23] 鄧海桥. 气道粘液纤毛清除功能与粘液高分泌 [J]. 重庆医学, 2002, 31(9): 873-874.
- [24] 杨 峰, 敖素华. 中医药对慢性阻塞性肺疾病气道粘液高分泌粘蛋白 Muc5ac 的影响研究概况 [J]. 四川中医, 2012, 30(8): 157-159.
- [25] Kim Y D, Kwon E J, Kwon T K, *et al.* Regulation of IL-1 β -mediated MUC2 gene in NCI-H292 human airway epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274(1): 112-116.
- [26] Temann U A, Prasad B, Gallup M W, *et al.* A novel role for murine IL-4 *in vivo*: Induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 16(4): 471-478.
- [27] Shim J J, Dabbagh K, Ueki I F, *et al.* IL-13 induces mucin production by stimulating e-pidermal growth factor receptors and by activating neutrophils [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280(1): 134-140.
- [28] Fischer B M, Rochelle L G, Voynow J A, *et al.* Tumor necrosis factor- α stimulates mucin secretion and cyclic GMP production by guinea pig tracheal epithelial cells *in vitro* [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 20(3): 413-422.
- [29] Takeyama K, Dabbagh K, Lee H M, *et al.* Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(6): 3081-3086.
- [30] 黄建民, 何韶衡, 赵卫华. 气道粘液、粘蛋白及其分泌调节 [J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(9): 116-120.
- [31] Ma P, Mao X, Li X, *et al.* Baicalin alleviates diabetes-associated cognitive deficits via modulation of mitogen-activated protein kinase signaling, brain-derived neurotrophic factor and apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 6377-6383.
- [32] 徐晓月, 李 展, 张广伟, 等. 3 种痰热清胶囊小鼠体内抗流感病毒作用的比较 [J]. 抗感染药学, 2008, 5(3): 142-144.
- [33] 张黎莉, 李 展, 徐晓月, 等. 痰热清胶囊的主要药效学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(3): 37-40.
- [34] Everson C A, Crowley W R. Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286(6): 1060-1070.
- [35] Licata S C, Rowlett J K. Abuse and dependence liability of benzodiazepine-type drugs: GABAA receptor modulation and beyond [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 90(1): 74-89.