

基于网络药理学和分子对接技术探讨生脉注射液抗新型冠状病毒肺炎的作用机制

王梁凤¹, 李慧婷³, 王 尧², 柳小莉³, 陈青垚¹, 徐 杰¹, 杨 明^{1,3}, 张小飞^{1,2*}, 王 芳^{1*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

摘要: 目的 采用网络药理学与分子对接技术探讨生脉注射液的活性成分和治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在作用机制。方法 利用 TCMSP 及 BATMAN-TCM 数据库筛选生脉注射液的活性化合物, 通过 TCMSP 及 Targetnet 在线数据库预测作用靶点, 通过 Cytoscape 3.7.1 构建活性成分-作用靶点网络图; 在 GeneCards 及 OMIM 数据库中以“coronavirus pneumonia”为关键词搜索冠状病毒肺炎相关疾病靶点, 与生脉注射液化合物靶点进行交集筛选出共同靶点作为研究靶点, 将共同靶点导入 STRING 数据库获取数据后在 Cytoscape 3.7.1 软件中构建蛋白质-蛋白质相互作用网络图; 利用 R 语言进行 GO (gene ontology) 功能、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路富集分析, 预测其作用机制, 并构建“成分-靶点-通路”网络图; 通过 DiscoveryStudio 2.5 软件对关键靶点进行分子对接分析。结果 生脉注射液筛选得到 22 个活性化合物, 分别为邻苯二甲酸二辛酯、β-谷甾醇、当归酰基戈米辛 O、戈米辛 A、戈米辛 R、五味子丙素、内南五味子酯乙、长南酸、南五味子内酯、香蒲木脂素 B、新杜松烷酸 A、新杜松烷酸 B、新杜松烷酸 C、新南五味子木脂宁、五味子内酯 A、五味子内酯 E、五味子酸、尿苷、薯蓣皂苷元、鸟嘌呤核苷、N-反式阿魏酰酪胺、豆甾醇。相应作用靶点 224 个, 与 COVID-19 的共同靶点 16 个, 分别为 CASP3、CASP8、PTGS2、BCL2、BAX、PRKCA、PTGS1、PIK3CG、F10、NOS3、DPP4、NOS2、TLR9、ACE、ICAM1、PRKCE, 关键靶点涉及 CASP3、PTGS2、NOS2、NOS3、ICAM1。GO 功能富集分析得到生物过程 (BP) 条目 771 个, 细胞组成 (CC) 条目 11 个, 分子功能 (MF) 条目 79 个。KEGG 通路富集分析筛选得到 67 条 ($P < 0.05$) 信号通路, 主要涉及糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、凋亡通路、P53 信号通路、小细胞肺癌通路等。分子对接结果显示与关键靶点对接较好的成分有五味子内酯 E、豆甾醇、N-反式阿魏酰酪胺。结论 生脉注射液中的活性化合物五味子内酯 E、豆甾醇、N-反式阿魏酰酪胺等能作用于 CASP3、PTGS2、NOS2、NOS3 等靶点调节多条信号通路发挥抗炎、免疫调节、抗休克、增加血氧饱和度等作用, 从而可能发挥对 COVID-19 的治疗作用。

关键词: 生脉注射液; 新型冠状病毒肺炎; 网络药理学; 分子对接; KEGG 通路富集分析; 成分-靶点-通路; CASP3; PTGS2; NOS2; NOS3; ICAM1; 五味子内酯 E; 豆甾醇; N-反式阿魏酰酪胺; 抗炎; 免疫调节; 抗休克; 增加血氧饱和度

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)11-2977-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.016

Study on mechanism of Shengmai Injection against novel coronavirus pneumonia based on network pharmacology and molecular docking technology

WANG Liang-feng¹, LI Hui-ting³, WANG Yao², LIU Xiao-li³, CHEN Qing-yao¹, XU Jie¹, YANG Ming^{1,3}, ZHANG Xiao-fei^{1,2}, WANG Fang¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

收稿日期: 2020-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81960714); 江西中医药大学双一流学科建设项目 (JXSYLXK-ZHYAO083); 江西中医药大学双一流学科建设项目 (JXSYLXK-ZHYAO084)

作者简介: 王梁凤, 在读硕士, 从事中药新剂型研究。Tel: 18702502758 E-mail: 849335729@qq.com

*通信作者 张小飞, 博士, 副教授, 主要从事中药新技术与新剂型研究。Tel: (029)38185175 E-mail: zhangxiaofei830@163.com

王 芳, 博士, 副教授, 从事中药制剂学研究。Tel: (0791)87118645 E-mail: cat689apple@163.com

Abstract: Objective To explore the potential material basis of Shengmai Injection for the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) through network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The active compounds of Shengmai Injection were screened by TCSP and BATMAN-TCM database. The action target was predicted by TCSP and Targetnet online database, and the active component-action target network diagram was constructed by Cytoscape 3.7.1; Taking “coronavirus pneumonia” as the keyword, coronavirus-related disease targets were searched in GeneCards database and OMIM database. The common target was selected by intersection with the target of Shengmai Injection as the research target. The common target was imported into STRING database to obtain data, and then the protein-protein interaction network map was constructed in Cytoscape 3.7.1 software; The enrichment analysis of GO function and KEGG pathway was carried out by using R language to predict its action mechanism and construct the “component-target-pathway” network diagram; Molecular docking analysis of key targets was carried out by DiscoveryStudio 2.5 software. **Results** A total of 22 active compounds were obtained from Shengmai Injection. They were DNOP, β -sitosterol, angeloylgomisin O, gomisin A, gomisin R, wuweizisu C, interiotherin B, changnanic acid, kadsulactone, kadsulignan B, neokadsuranic acid A, neokadsuranic acid B, neokadsuranic acid C, neokadsuranin, schisanlactone A, schisanlactone E, schizandronic acid, uridine, diosgenin, guanosine, *N-trans*-feruloyltyramine and stigmaterol. There were 224 corresponding targets and 16 common targets with COVID-19, namely CASP3, CASP8, PTGS2, BCL2, BAX, PRKCA, PTGS1, PIK3CG, F10, NOS3, DPP4, NOS2, TLR9, ACE, ICAM1 and PRKCE. The key targets were CASP3, PTGS2, NOS2, NOS3 and ICAM1. GO functional enrichment analysis showed that there were 771 entries for biological processes, 11 entries for cell composition and 79 items for molecular function. A total of 67 signal pathways were screened by KEGG pathway enrichment analysis, which were mainly related to AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, apoptosis-multiple species, p53 signaling pathway, small cell lung cancer, and so on. The results of molecular docking showed that the components with better docking with the key targets were schisanlactone E, stigmaterol and *N-trans*-feruloyltyramine. **Conclusion** The active compounds in Shengmai Injection, such as schisanlactone E, stigmaterol, *N-trans*-feruloyltyramine, can act on CASP3, PTGS2, NOS2, NOS3 and other targets to regulate multiple signaling pathways for anti-inflammatory, immune regulation, anti-shock and increasing blood oxygen saturation. This may play a role in the treatment of COVID-19.

Key words: Shengmai Injection; novel coronavirus pneumonia; network pharmacology; molecular docking; KEGG pathway enrichment analysis; composition-target-pathway; CASP3; PTGS2; NOS2; NOS3; ICAM1; schisanlactone E; stigmaterol; *N-trans*-feruloyltyramine; anti-inflammation; immune regulation; anti-shock; increase blood oxygen saturation

自 2019 年 12 月以来, 由新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 引起的新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 已蔓延全球, 感染超过 442 万人并造成 30 万人死亡, 给全球公共卫生安全带来巨大挑战。大多数 COVID-19 患者表现轻度至中度症状, 少部分为无症状患者, 然而约 51% 有一或多种基础病 (糖尿病、冠心病等) 的患者易诱发炎症风暴, 出现全身炎症反应, 导致严重的急性呼吸窘迫综合征、感染性休克和多器官衰竭^[1-3]。目前, 针对重症、危重患者, 临床治疗主要采取支持治疗方式, 尚无治疗特效药物。

曹雪涛院士^[4]及 Schett 等^[5]研究表明, 在 COVID-19 重症患者中均发现了 T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞等淋巴细胞数量急剧减少, 中性粒细胞显著增加, 抗体 IgG 水平显著提高, 提示免疫介导的慢性炎症在 COVID-19 病程发展中发挥了重要作用, 在治疗过程中除关注病毒导致的细胞病变、组织损伤外, 感染过程中免疫系统紊乱更值得关注。因此, 若在 COVID-19 重症患者早期给予抑制免疫

炎症反应相关药物, 将有效防止病情恶化, 极大提高重症患者救治质量, 在这方面中药复方制剂可提供新的思路。

生脉散源于金代《内伤外感辨惑论》, 由人参、麦冬、五味子组成, 具有补气固脱、生津复脉之功效, 数千年来广泛用于休克脱证救治。生脉注射液是生脉散经现代工艺制作的注射用冻干粉针制剂, 被列为《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》(第四~七版) 重型患者救治推荐用药^[6]。2020 年 3 月 23 日, 张伯礼院士在国务院新闻办就中医药防治 COVID-19 的重要作用及有效药物举行发布会上指出, 生脉注射液对稳定重症病人的血氧饱和度、提高氧合水平具有确切作用^[7]。韩晶岩教授团队研究表明^[8-9], 内毒素引起的休克脱证是重症和危重症的病理基础, 而内毒素引起的休克脱证与内毒素引起的全身微血管渗出相关。

生脉注射剂中的补气固摄成分人参皂苷 Rb₁ 和收涩固摄成分五味子醇甲可通过跨细胞途径和细胞旁途径抑制全身微血管渗出, 补气收涩固脱, 对

COVID-19 重症早期出现的大面积肺水肿、呼吸窘迫及低血压等发挥重要作用^[10]。目前,虽然生脉注射液在 COVID-19 重型患者早期救治中疗效确切,但尚缺乏从分子水平对其干预 COVID-19 重症期作用机制的研究。因此,有必要对生脉注射液治疗 COVID-19 潜在的活性成分、作用靶点及分子机制进行进一步探讨。

本研究基于系统生物学理论,通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)及 BATMAN-TCM 数据库收集生脉注射液中的化合物,结合数据库 TCMSP、

Targetnet 收集化合物相关靶点,通过数据库 Genecards、OMIM 收集疾病靶点,利用 R 语言进行 GO (gene ontology) 功能分析和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 信号通路富集分析,通过 DiscoveryStudio 2.5 软件对关键靶点进行分子对接,并构建“成分-靶点-通路”网络,预测生脉注射液的活性化合物与靶点之间的关系,探究生脉注射液多成分、多靶点、多通路抗 COVID-19 的作用机制,以为生脉注射液治疗 COVID-19 提供科学依据与临床应用参考,方案路线见图 1。

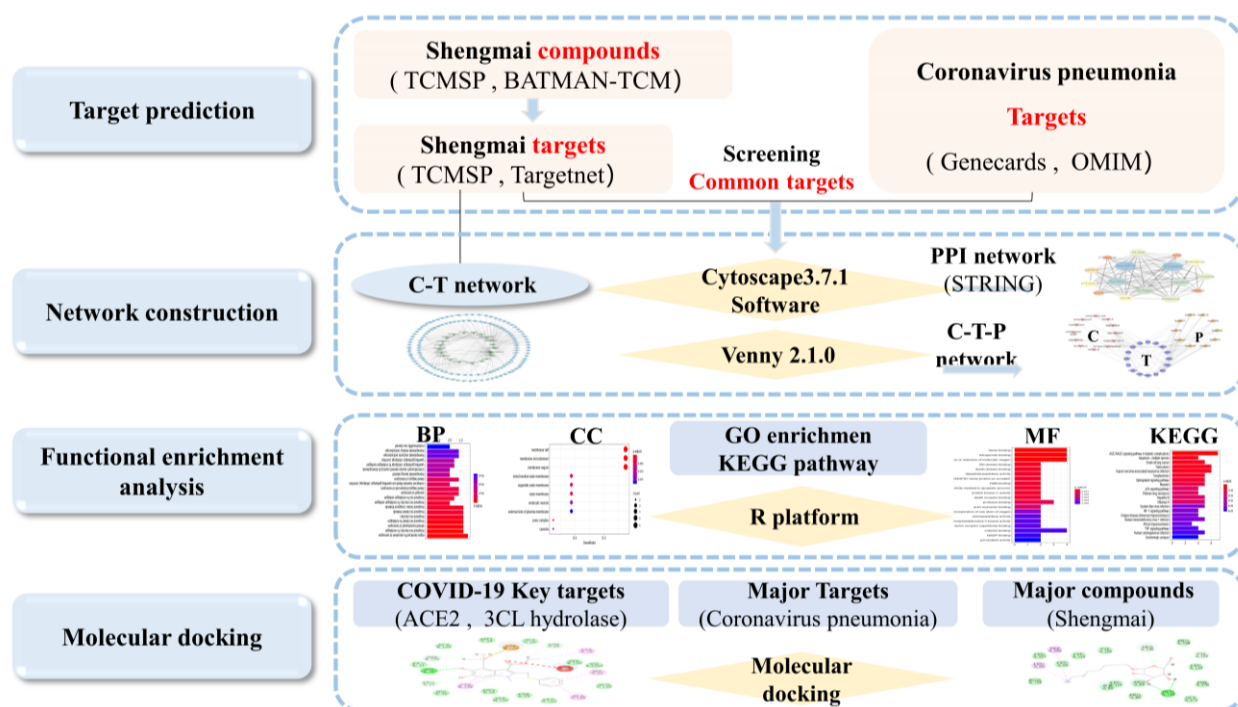


图 1 生脉注射液网络药理学及分子对接研究流程

Fig. 1 Research process of network pharmacology and molecular docking in Shengmai Injection

1 方法

1.1 生脉注射液的活性成分和靶蛋白筛选

应用 TCMSP (<http://tcmsp.com>) 检索人参、五味子的化合物成分。利用 BATMAN-TCM (A Bioinformatics Analysis Tool for Molecular MechANis of Traditional Chinese Medicine, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 数据库搜索麦冬的化学成分。类药性 (drug like index, DL) 值代表成分与已知化学药的相似性,通常 $DL \geq 0.18$ 的成分对机体产生活性具有重要意义^[11]。用相对分子质量 (molecular weight, MW) ≤ 500 、 $DL \geq 0.18$ 和药物半衰期 (half life, HL) ≥ 4 h 进行筛选,得到生脉注射液的有效成分。然后在 TCMSP 数据库获取

化合物对应的靶蛋白,其中 TCMSP 未收录成分则通过 Targetnet 数据库 (<http://targetnet.scbdd.com/>) 在线预测靶点。

1.2 靶标蛋白基因名的确定及“成分-靶点”网络的构建

利用数据库 UniProt 中 UniProtKB 搜索功能 (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) 查找所有靶点的基因名及 Unitprot 编号,将查询到的靶点蛋白名称转化为相应基因简称。将生脉注射液的活性成分及其相应靶点数据导入 Cytoscape 3.7.1 软件中,构建生脉注射液成分-靶点网络图,利用“Network Analyzer”插件分析并导出其度值、介数等拓扑属性。

1.3 冠状病毒肺炎疾病靶点筛选

在 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org>) 和 OMIM 数据库 (<http://omim.org/>) 中输入关键词 “coronavirus pneumonia”, 搜索疾病靶点。去除重复靶点, 并经 Uniprot 校正整合, 收集与冠状病毒肺炎相关的作用靶点作为疾病靶点。运用 Venny 平台 (版本 2.1, <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 将生脉注射液有效成分的靶蛋白与冠状病毒肺炎疾病靶点进行映射, 得到生脉注射液治疗冠状病毒肺炎的交集靶点。

1.4 蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建

String 数据库 (<https://string-db.org/>) 是一种包含已知和预测的 PPI 的数据库^[12], 收集了包括实验验证得到的以及通过生物信息学方法预测得到在内的大量 PPI 数据。将生脉注射液与冠状病毒肺炎的共同靶点导入 String 数据库, 并将限定物种为 “人” 进行筛选, 获取交互作用。结果保存成 RTF 格式, 保留文件中节点 (node1, node2) 和结合率评分 (combined score) 信息, 并导入到 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建靶点 PPI 图。

1.5 GO 富集分析、KEGG 通路分析及 “成分-靶点-通路” 网络构建

利用 R 语言 (ClusterProfiler 包)^[13] 进行 GO 分析及 KEGG 分析, 对潜在作用靶点从生物过程、分子水平、细胞水平 3 个方面分别进行富集分析, 并进一步对其进行 KEGG 通路富集分析。设定阈值 $P < 0.05$ 为标准进行筛选, 并将结果以条形图和气泡图形式输出。利用 Cytoscape version 3.7.1 软件, 构建 “成分-靶点-通路” 网络图。

1.6 分子对接

血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 是 SARS-CoV-2 的宿主细胞受体, 并且 SARS-CoV-2 是通过其棘突 S 蛋白与人体细胞表面的 ACE2 受体结合, 从而导致病毒侵入机体而致病。因此, 本研究选取 “成分-靶点-通路” 网络中度值 (degree) 排名前 3 的靶点蛋白与对应的成分以及 COVID-19 关键靶点 SARS-CoV-2 3CL 水解酶 (Mpro)、ACE2 进行分子对接, 在 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中下载靶点蛋白及 Mpro、ACE2 的 3D 结构 pdb 格式文件。在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载化合物 2D 结构的 sdf 格式。同时以目前临床上治疗 COVID-19 有效的化学药阿比多尔及

利巴韦林对接作阳性对照。利用 DiscoveryStudio 2.5 软件对生脉注射液治疗 COVID-19 的活性成分及其核心靶点进行分子对接, 比较活性化合物与阳性对照分子的得分值。

2 结果

2.1 生脉注射液主要活性化合物及作用靶点筛选

利用 TCMSP 和 BATMANTCM 数据库, 根据其 MW、DL 和 HL 值筛选出 22 个化合物, 其中人参化合物 2 个, 五味子化合物 15 个, 麦冬化合物 5 个。虽然尿苷 (uridine)、薯蓣皂苷元 (diosgenin)、鸟嘌呤核苷 (guanosine) 这 3 个成分的 HL 值均小于 4, 但作为主要成分仍被保留, 结果见表 1。采用 TCMSP、Targetnet 数据库预测作用靶点, 其中 1 个候选化合物未能匹配到相关靶点, 经 Uniprot 校正后共获取成分对应靶点 224 个。

2.2 生脉注射液 “成分-靶点” 网络图

将生脉注射液的候选化合物与对应的靶蛋白导入 Cytoscape 3.7.1 软件构建 “成分-靶点” 网络, 结果见图 2。图中间箭头部分代表生脉注射液的化合物, 共有 21 个化学成分。圆形部分代表作用靶点, 共有 139 个靶点。网络中 223 条边代表了成分与靶点之间的作用关系。每个候选化合物平均作用于 6.619 (139/21) 个靶点, 而每个靶蛋白平均连接化合物的数量为 1.604 (223/139), 体现了生脉注射液多成分、多靶点的整体协同作用。运用 Cytoscape 3.7.1 中的 Network Analyzer 插件进行网络拓扑学分析, 节点的度值和介值中心度 (betweenness centrality) 为描述网络节点重要性的指标^[14]。节点的平均度值为 2.662, 度值排名前 10 的成分及靶点见表 2。

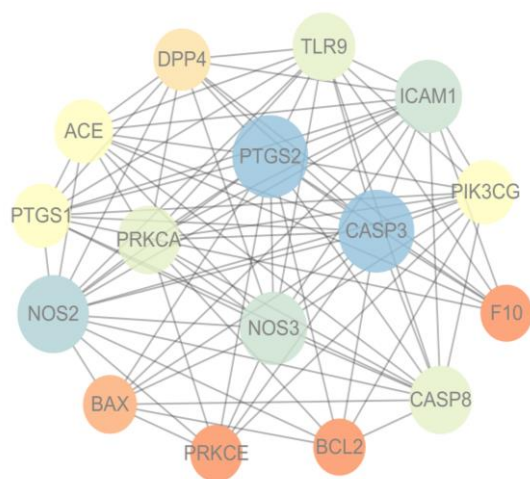
2.3 生脉注射液治疗冠状病毒肺炎作用靶点预测及 PPI 网络构建

以 “coronavirus pneumonia” 为关键词, 在 Genecards 数据库和 OMIM 数据库中共得到冠状病毒肺炎相关靶点 448 个。生脉注射液的 224 个药物靶点与 448 个冠状病毒肺炎相关靶点经 Venny 2.1.0 映射后得出 16 个共同靶点。为了进一步探讨生脉注射液的成分靶点和冠状病毒肺炎疾病靶点在蛋白水平上的作用机制, 将涉及的 16 个共同靶蛋白导入 STRING 平台中进行 PPI 网络分析, 并导入 Cytoscape 3.7.1 绘制 PPI 网络, 结果见图 3, 其中度值较大的靶点为 CASP3、PTGS2、NOS2、NOS3、ICAM1、CASP8、PRKCA。

表 2 生脉注射液的主要活性成分及靶点 (度值排名前 10)

Table 2 Major compositions and targets in Shengmai Injection (top 10)

成分	度值	介值中心度	靶点	度值	介值中心度
<i>N</i> -反式阿魏酰酪胺	56	0.503 5	ACHE	10	0.130 7
β -谷甾醇	38	0.307 6	AR	6	0.048 5
豆甾醇	31	0.240 2	PGR	5	0.057 0
鸟嘌呤核苷	20	0.173 0	CDC25B	5	0.018 4
五味子酸	13	0.210 1	NOS2	5	0.057 0
南五味子内酯	10	0.074 5	CHRM1	4	0.077 7
戈米辛 R	9	0.086 5	PTGS1	4	0.121 6
新杜松烷酸 B	7	0.083 5	PTGS2	4	0.032 9
五味子内酯 A	6	0.024 6	ADRB2	3	0.004 2
五味子内酯 E	5	0.006 4	CHRM3	3	0.004 2



靶点度值随图形大小及颜色深浅变化

The value of target degree changes with the size and color of the figure

图 3 PPI 网络

Fig. 3 PPI network

2.4 GO 富集分析和 KEGG 信号通路富集分析

利用 R 语言 (clusterProfiler 包) 对筛选出的 16 个作用靶点进行 GO 富集分析及 KEGG 信号通路富集 ($P < 0.05$) 分析。GO 富集分析中共得到 GO 生物进程 (biological process, BP) 771 个, 分子功能 (molecular function, MF) 79 种, 细胞组分 (cellular component, CC) 11 种。根据校正后 P 值进行排序, 选择前 20 个进行图形展示, 结果见图 4。

KEGG 通路富集筛选得到 67 条信号通路 ($P < 0.05$), 主要涉及糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、凋亡 (apoptosis-multiple species)、P53 信号通路 (p53 signaling pathway)、小细胞肺癌 (small cell lung cancer) 等, 结果见图 5。其中排序

越靠前, 提示越可能是生脉注射液治疗 COVID-19 的主要生物学功能及作用机制。

2.5 “成分-靶点-通路”网络构建

将生脉注射液治疗冠状病毒肺炎 16 个关键靶点蛋白及其对应的 12 个潜在成分与 KEGG 信号通路富集分析的前 10 条通路制作“成分-靶点-通路”的网络关系表, 将其导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建出生脉注射液治疗冠状病毒肺炎的“成分-靶点-通路”网络图, 见图 6。体现了生脉注射液中“多成分-多靶点-多通路”对冠状病毒肺炎起到综合作用特点。

2.6 生脉注射液主要成分与关键靶点进行分子对接

为了更好地阐述生脉注射液治疗 COVID-19 的潜在靶点与相对应的活性成分之间的结合活性, 以“成分-靶点-通路”网络中度值排名前 3 的靶点蛋白与对应的化合物进行对接, 分别把 3 个靶点蛋白对接分数最高的成分与 SARS-CoV-23CL 水解酶和 ACE2 进行分子对接, 同时以 2 种临床治疗药物作为阳性对照, 结果见表 3 及图 7, 阳性药进行分子对接对照结果见表 4。将表 3 中的靶蛋白与其对应的小分子化合物的对接得分与表 4 中阳性对照的得分进行对比, 结果表明潜在靶点 NOS2 与五味子内酯 E, PTGS2 与豆甾醇, PTGS1、Mpro、ACE2 与 *N*-反式阿魏酰酪胺等具有较好的结合活性, 而且结合体构象稳定, 表明这些可能为生脉注射液治疗 COVID-19 的关键成分和靶点。

3 讨论

中医药在 2 000 多年与疫病斗争的实践中积累了丰富的经验, 张仲景的《伤寒杂病论》、吴又可的《温疫论》、吴鞠通的《温病条辨》等经典著作, 系统总

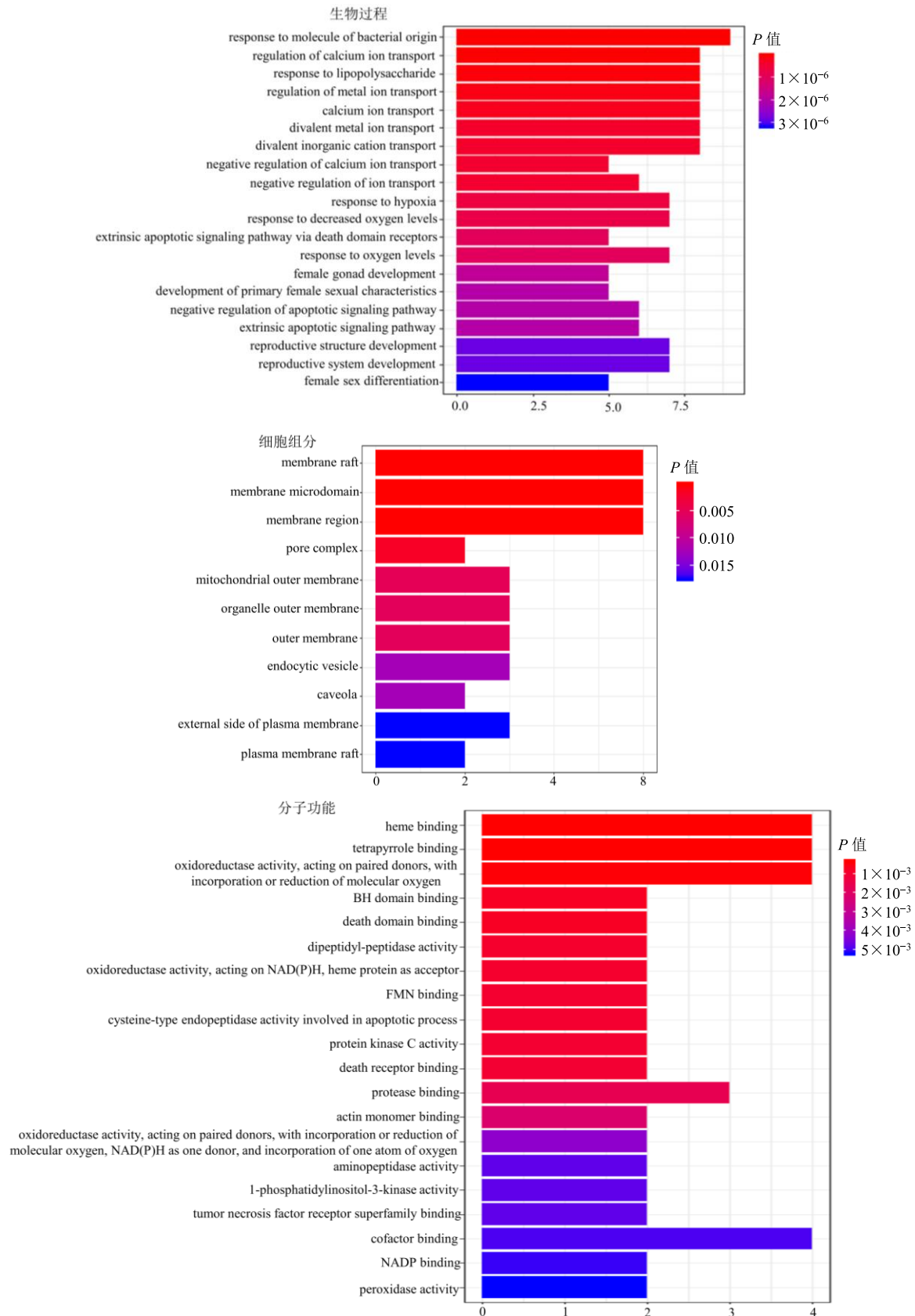


图 4 生脉注射液活性成分治疗冠状病毒肺炎潜在靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO functional enrichment analysis of potential targets of active components of Shengmai Injection in treatment of coronavirus pneumonia

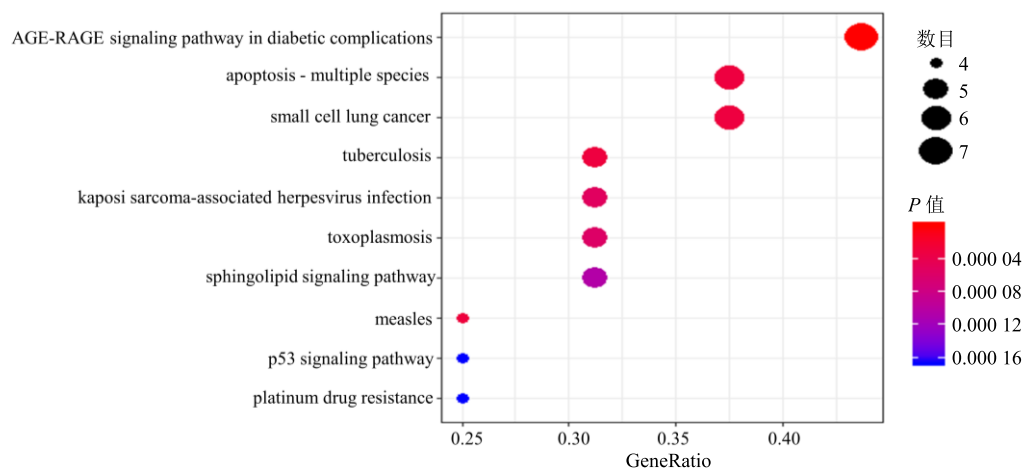


图 5 生脉注射液活性成分治疗冠状病毒肺炎潜在靶点的 KEGG 信号通路富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of KEGG signal pathway of potential targets of active components of Shengmai Injection in treatment of coronavirus pneumonia

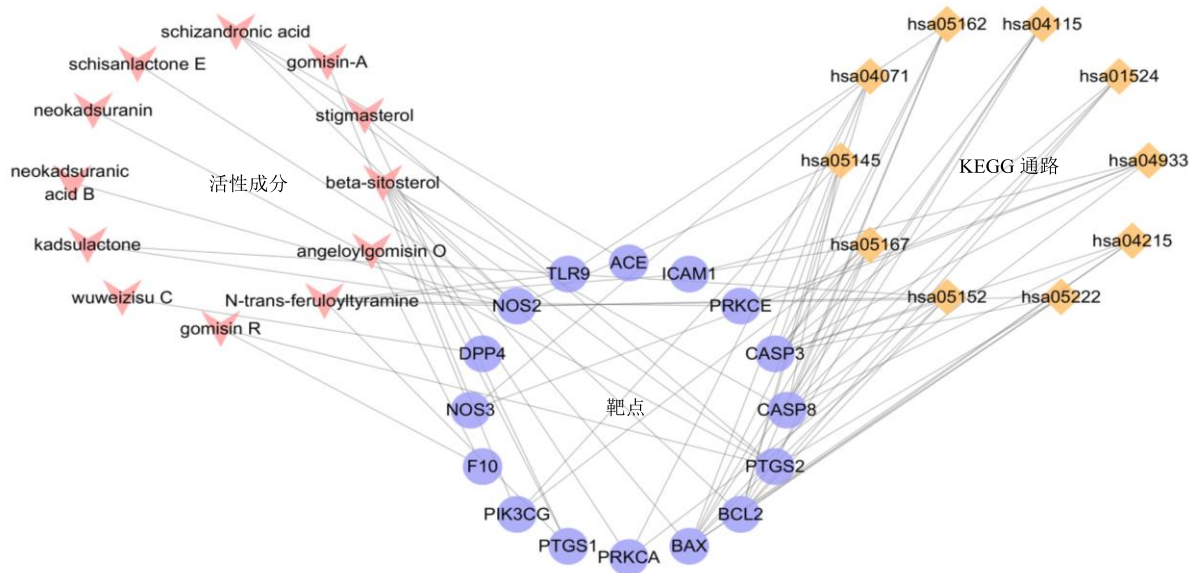


图 6 “成分-靶点-通路”网络

Fig. 6 Interaction network of “composition-target-pathway”

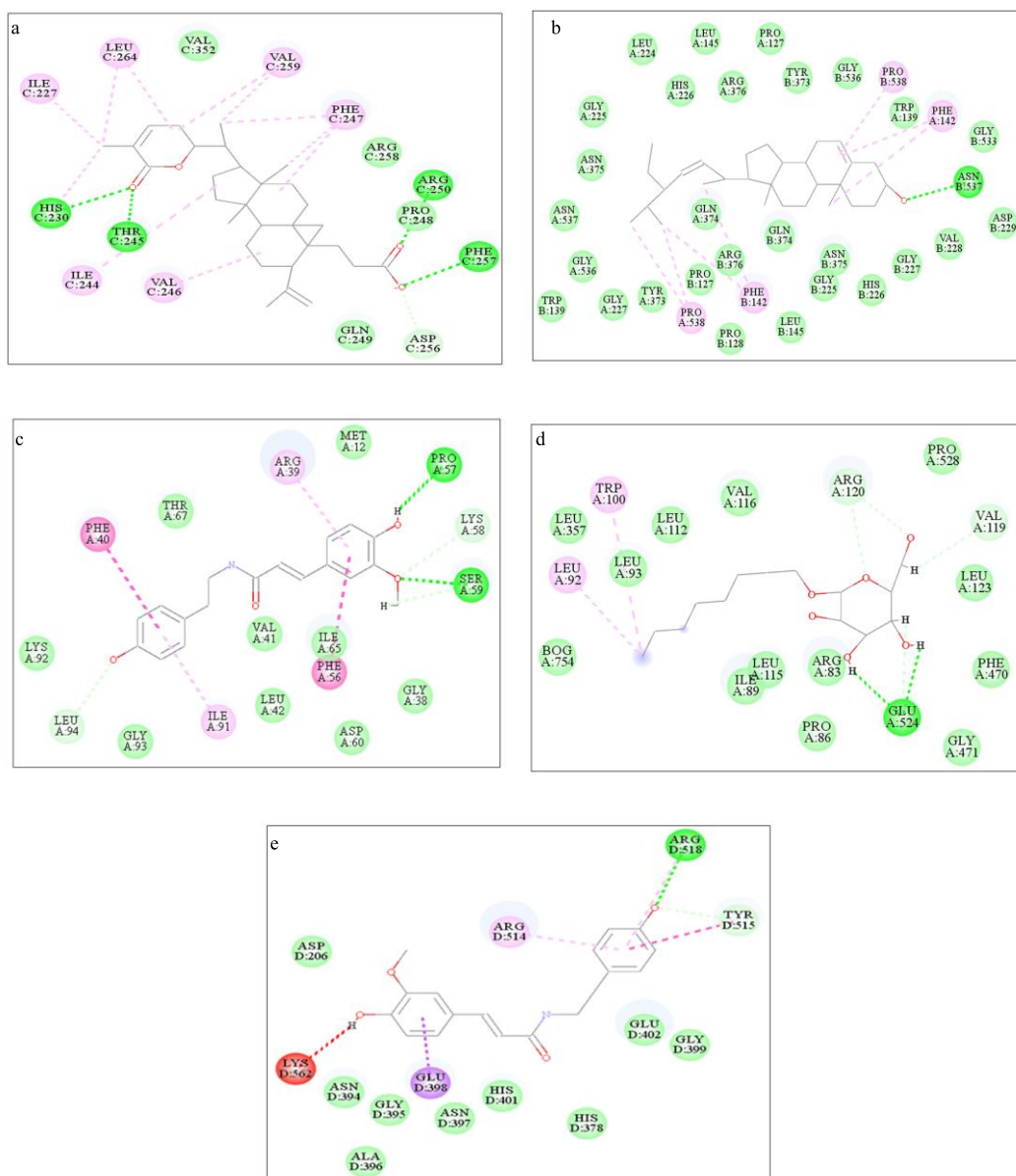
表 3 靶蛋白及与其对应的小分子化合物的对接得分

Table 3 Docking scores of target protein and its corresponding small molecular compounds

靶点	化合物	得分	靶点	化合物	得分	靶点	化合物	得分
NOS2	南五味子内酯	112.64	PTGS2	新南五味子木脂宁	92.35	Mpro	豆甾醇	116.42
NOS2	五味子内酯 E	117.60	PTGS2	豆甾醇	137.07	Mpro	N-反式阿魏酰酰胺	117.47
NOS2	五味子酸	97.35	PTGS1	β-谷甾醇	62.68	ACE2	五味子内酯 E	101.36
NOS2	N-反式阿魏酰酰胺	105.61	PTGS1	N-反式阿魏酰酰胺	132.14	ACE2	豆甾醇	99.06
PTGS2	β-谷甾醇	136.45	PTGS1	豆甾醇	96.57	ACE2	N-反式阿魏酰酰胺	115.41
PTGS2	戈米辛 R	83.11	Mpro	五味子内酯 E	112.99			

总结了中医药防治传染病的基础理论、临床实践、方剂药物和技术方法，凝结了古人对疫病防治的智慧经验。新中国成立以来，在麻疹、流脑、猩红热等

传染病救治中，特别是 2003 年以来在 SARS、H1N1 等重大疫情防控中，中医药均发挥了重要作用。本次新冠疫情临床救治充分证实^[7]，中医药在 COVID-



a-NOS2 与五味子内酯 E 分子对接 b-PTGS2 与豆甾醇分子对接 c-PTGS1 与 *N*-反式阿魏酰酪胺分子对接 d-Mpro 与 *N*-反式阿魏酰酪胺分子对接 e-ACE2 与 *N*-反式阿魏酰酪胺分子对接
a-NOS2 docking with schisanlactone E b-PTGS2 docking with stigmasterol c-PTGS1 docking with *N*-trans-feruloyltyr amine d-Mpro docking with *N*-trans-feruloyltyramine e-ACE2 docking with *N*-trans-feruloyltyramine

图 7 生脉注射液关键成分与关键靶点对接模型图

Fig. 7 Model diagram of docking between key compounds of Shengmai Injection and key targets

表 4 阳性对照的得分对比

Table 4 Comparison of scores of positive controls

靶点	阳性对照	得分	靶点	阳性对照	得分
NOS2	阿比多尔	92.91	PTGS2	利巴韦林	108.96
NOS2	利巴韦林	95.23	PTGS1	阿比多尔	98.95
PTGS2	阿比多尔	122.63	PTGS1	利巴韦林	120.55

19 治疗全疗程发挥了重要作用, 中药的整体调节能够增强人体免疫力, 同时还有抑制和杀灭病毒的作用

用^[15-19]。因此, 基于临床实践筛选抗 COVID-19 的有效中药方药对抗击疫情有重要意义。

COVID-19 重症期患者机体处于正气虚损耗竭状态, 分为气阴耗竭之亡阴及阳气暴脱亡阳, 气阴耗竭者采用生脉养阴, 益气固脱的治法, 而生脉注射剂是临床治疗感染性休克及心力衰竭等急症的必备用药, 具有抗休克、“回阳救逆”、保护心功能、提高免疫功能等作用, 在危重疾病临床治疗中发挥

了重要作用^[20]。大量临床研究数据证实,生脉注射液可有效降低感染性休克患者体内血清 C-反应蛋白、降钙素原及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平^[21],并可通过调节精氨酸及脯氨酸代谢、牛磺酸及亚牛磺酸代谢,发挥抗氧化、抗炎及改善微循环,对脓毒症患者的治疗有积极作用^[22]。夏远利等^[23]研究表明,生脉注射剂对脂多糖(LPS)引起的小鼠肺损伤模型作用,证明了生脉注射剂可明显抑制 LPS 气管滴注后 24 h 的小鼠肺干湿比,通过抑制肺泡盥洗液中的炎性因子含量、总蛋白含量、炎性细胞数量和氧化应激损伤及 Toll-样受体 4 (TLR-4)、髓样分化因子(MyD88)表达,有效改善了小鼠肺损伤和渗出。

本研究基于系统生物学理论,采用网络药理学构建了生脉注射液中“疾病-基因-靶标-药物”的互作网络,结合生物信息学对生脉注射液治疗冠状病毒肺炎的有效成分、潜在靶点及分子机制进行了探究。结果发现,生脉注射液中人参、五味子、麦冬的有效成分数量经筛选后分别为 2、15、5,共计 22 个,预测活性成分靶点 139 个,冠状病毒肺炎靶点 448 个,最终得到生脉注射液化合物-疾病互作靶点 16 个,其中活性成分中作用最显著的是 β -谷甾醇、*N*-反式阿魏酰酪胺、五味子酸、五味子内脂 E、豆甾醇。有研究表明 β -谷甾醇具有免疫调节、抗氧化及抗肿瘤等作用^[24],并可通过抑制 NO 合成及白介素-6 (IL-6) 活性,减少 IL-1、TNF- α 等炎性因子分泌发挥抗炎作用^[25];五味子内脂 E 具有抗 HIV 病毒作用^[26]。将关键靶点一氧化氮合酶 2 (NOS2)、环氧合酶 2 (PTGS2)、PTGS1 及 SARS-CoV-23CL 水解酶、ACE2 与靶点对应的成分进行分子对接,显示其结合能力与临床推荐用化学药阿比多尔及利巴韦林相近,进一步证实了网络药理学的成分筛选结果,表明生脉注射液中五味子内酯 E、豆甾醇、*N*-反式阿魏酰酪胺为抗 COVID-19 的潜在活性成分。

PPI 网络结果显示,生脉注射液治疗 COVID-19 的靶点涉及胱天蛋白酶 3 (CASP3)、PTGS2/COX-2、NOS2、一氧化氮合酶 3 (NOS3) 等,上述靶点均存在于 CASP、PTGS、NOS 等信号通路中。有研究表明^[27],与 CASP3 密切相关的 NF- κ B 信号通路在免疫应答中起到关键性作用,此外, CASP3 还与糖尿病并发症相关信号路径的 MAPK 信号通路密切相关^[28]; PTGS2/COX-2 是炎症中催化前列腺素合成的一种关键诱导酶,在炎症刺激、组织损伤等情

况下表达增强并参与炎症反应^[29-31]; NOS2 参与心肌梗死、心力衰竭等心肌损伤^[32]。通过对生脉注射剂化合物-疾病靶点进行 GO 及 KEGG 分析,发现生脉注射液治疗 COVID-19 共涉及糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、凋亡等 67 条信号通路,提示生脉注射剂对有糖尿病等基础病的新冠肺炎患者进行早期干预有一定效果。此外,生脉注射剂具有增强血红素结合、分子氧结合等功能,提示生脉注射液可能对 COVID-19 所致低血氧饱和度具有改善作用。

综上所述,基于网络药理学分析认为生脉注射液中的五味子内酯 E、豆甾醇、*N*-反式阿魏酰酪胺可能通过糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、凋亡、P53 信号通路、小细胞肺癌等通路作用于 CASP3、PTGS2、NOS2、NOS3 等靶点,发挥抗炎、免疫调节、抗休克、增加血氧饱和度等作用。因此,生脉注射液通过“多成分-多靶点-多通路”的共同作用治疗 COVID-19。鉴于网络药理学的局限性,后期还需进一步对生脉注射液的潜在活性成分、作用靶点及通路进行实验验证。

参考文献

- [1] 龚普阳,郭瑜婕,李晓朋,等. 基于网络药理学与分子对接技术的金花清感颗粒防治新型冠状病毒肺炎的潜在药效物质研究 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1685-1693.
- [2] 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, 323(11): 1-9.
- [3] 朱 峥,陈 刚. 新型冠状病毒肺炎临床研究前后对比及特殊人群临床特点 [J]. 福建医药杂志, 2020, 42(2): 7-11.
- [4] Cao X T. COVID-19: Immunopathology and its implications for therapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0308-3.
- [5] Schett G, Sticherling M, Neurath M F. COVID-19: Risk for cytokine targeting in chronic inflammatory diseases? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0312-7.
- [6] 柴瑞平,张晏航,路 娟,等. 基于代谢组学的生脉注射液治疗脓毒症作用机制研究 [J]. 中国药物经济学, 2019, 14(1): 30-34.
- [7] 中国政府网. 国新办举行中医药防治新冠肺炎重要作用及有效药物发布会 [EB/OL]. [2020-03-23]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-03/23/content_5494694.htm.
- [8] Zhang Y P, Pan C S, Yan L, *et al.* Catalpol restores

- LPS-elicited rat microcirculation disorder by regulation of a network of signaling involving inhibition of TLR-4 and SRC [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 311(6): G1091-G1104.
- [9] Li D T, Sun K, Huang P, *et al.* Yiqifumai Injection and its main ingredients attenuate lipopolysaccharide-induced cerebrovascular hyperpermeability through a multi-pathway mode [J]. *Microcirculation*, 2019, 26(7): 1-15.
- [10] 韩晶岩. 麻杏石甘汤改善肺间质水肿、注射用益气复脉(冻干)改善休克脱证的作用机理 [J/OL]. 世界科学技术—中医药现代化, [2020-04-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5699.R.20200221.1125.002.html>.
- [11] Tao W, Xu X, Wang X, *et al.* Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal *Radix Curcumae* formula for application to cardiovascular disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 1-10.
- [12] Snel B, Lehmann G, Bork P, *et al.* STRING: A web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(18): 3442-3445.
- [13] Yu G, Wang L, Han Y, *et al.* ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *Omic*s, 2012, 16(5): 284-287.
- [14] 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.
- [15] 李贝金, 李 潇, 薛嘉睿, 等. 新冠肺炎炎症风暴的机制探讨及中医药的干预作用 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志, [2020-04-22]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20201323>.
- [16] 廖 源, 吴建华, 马丽娟, 等. 基于网络药理学的中期诊疗方干预新型冠状病毒肺炎(COVID-19)作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1776-1784.
- [17] 霍志鹏, 刘元雪, 郝 磊, 等. 藿香正气防治新型冠状病毒肺炎潜在应用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 405-410.
- [18] 万梅绪, 张燕欣, 李德坤, 等. 注射用益气复脉(冻干)治疗新型冠状病毒肺炎合并心血管疾病的可行性探讨 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(3): 384-391.
- [19] 陶晓倩, 柯志鹏, 张新庄, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的金振口服液干预新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2326-2333.
- [20] 朱运贵, 邓紫薇, 刘丽华, 等. 新冠肺炎诊疗方案治疗药物信息汇编(第一版) [J]. 中南药学, 2020, 18(3): 345-358.
- [21] 刘龙群, 张伟文. 生脉注射液对感染性休克患者血清C-反应蛋白、降钙素原及TNF- α 的影响 [J]. 中国现代医生, 2013, 51(17): 88-90.
- [22] 李思聪, 冯 祥, 毕 磊, 等. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案中成药选用分析与药理研究进展 [J]. 中药材, 2020, 43(3): 764-771.
- [23] 夏远利, S Dolgor, 吴云皓, 等. 注射用益气复脉(冻干)改善脂多糖诱导小鼠急性肺损伤作用研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 372-379.
- [24] 刘威良, 姬 昱, 黄艾祥. β -谷甾醇的研究及开发进展 [J]. 农产品加工, 2019, 18(1): 77-79.
- [25] Jn C, Yh C, Jm L, *et al.* Anti-inflammatory effects of β -sitosterol- β -D-glucoside from *Trachelospermum jasminoides* (Apocynaceae) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophages [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(24): 2340-2343.
- [26] 李晓光, 罗焕敏. 南五味子属植物化学成分及其活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2003, 49(12): 20-25.
- [27] 何天目, 段灿灿, 李晓飞, 等. 基于网络药理学和分子对接探索血必净注射液治疗冠状病毒肺炎的潜在机制 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(4): 398-405.
- [28] 王雪莹, 许嘉慧, 薛 艳, 等. 基于数据挖掘和网络药理学方法探究新型冠状病毒肺炎验案核心组方的中药特性及分子机制 [J/OL]. 上海中医药杂志, [2020-04-22]. <https://doi.org/10.16305/j.1007-1334.2020.07.098>.
- [29] Hsu P S, Lin C M, Chang J F, *et al.* Participation of NADPH oxidase-related reactive oxygen species in leptin-promoted pulmonary inflammation: Regulation of cPLA2 α and COX-2 expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1-15.
- [30] Teng R J, Jing X, Michalkiewicz T, *et al.* Attenuation of endoplasmic reticulum stress by caffeine ameliorates hyperoxia-induced lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 312(5): L586-L598.
- [31] 王训翠, 储明星, 陈宏权. 前列腺素内过氧化物合酶 2 基因的研究进展 [J]. 生命科学, 2004, 16(1): 31-34.
- [32] 金春花, 刘文博, 关宏铜, 等. 一氧化氮合酶各种亚型的信号通路对心力衰竭的作用机制与治疗的研究进展 [J]. 中国循环杂志, 2017, 32(8): 830-832.