

• 药理与临床 •

基于网络药理学和分子对接的清开灵注射液治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制探寻

张英睿^{1,3}, 千志强^{1,3}, 刘紫轩^{1,2}, 罗婕^{1,2}, 唐策^{1,2}, 刘川^{1,2}, 苏锦松^{1,2}, 黄潇⁴, 李楠³, 张艺^{1,2*}

1. 成都中医药大学 民族医药学术传承创新研究中心, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137

3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

4. 神威药业集团有限公司, 河北 石家庄 051430

摘要: **目的** 初步探寻清开灵注射液治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制。**方法** 通过文献检索及中药系统药理学分析平台(TCMSP)得到清开灵注射液组方药材栀子、板蓝根、金银花等的活性成分及靶标蛋白。借助Uniprot数据库查询活性成分对应靶点基因,应用Cytoscape 3.7.2构建药物-化合物-靶点网络。借助DAVID数据库进行KEGG通路富集分析,预测其作用机制。对核心活性成分与抗COVID-19药物潜在作用靶点血管紧张素转化酶II(ACE2)、3C类似蛋白酶(3CLpro)、RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)进行分子对接验证。**结果** 药物-化合物-靶点网络共包含5种药物、62个化合物以及70个靶点。KEGG通路富集分析得到信号通路41条($P < 0.05$),主要涉及细胞凋亡、Fc epsilon RI信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路等。分子对接结果显示,刺槐素、丁香苷等与抗COVID-19药物潜在作用靶点具有较强的亲和力。**结论** 清开灵注射液具有多成分、多靶点、多途径的作用特点,其活性成分刺槐素等可通过作用于CASP3、CASP8、FASLG等靶点调节细胞凋亡通路及TNF通路,从而实现对COVID-19的潜在治疗作用。

关键词: 清开灵注射液; 新型冠状病毒肺炎; 网络药理学; 分子对接; 血管紧张素转化酶II; 刺槐素; 丁香苷

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)12-3201-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.012

Exploring mechanism of Qingkailing Injection in treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) based on network pharmacology and molecular docking

ZHANG Ying-rui^{1,3}, GAN Zhi-qiang^{1,3}, LIU Zi-xuan^{1,2}, LUO Jie^{1,2}, TANG Ce^{1,2}, LIU Chuan^{1,2}, SU Jin-song^{1,2}, HUANG Xiao⁴, LI Nan³, ZHANG Yi^{1,2}

1. Research Center for Academic Inheritance and Innovation of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

4. Shenwei Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shijiazhuang 051430, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Qingkailing Injection in the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Methods** The active components and target proteins of *Gardeniae Fructus*, *Isatidis Radix*, *Lonicerae Japonicae Flos*, and other materials in Qingkailing Injection were obtained by means of literature search and TCMSP. Uniprot database was used to search the target genes corresponding to the active ingredients, and Cytoscape 3.7.2 was used to construct the drug-compound-target network. The enrichment analysis of KEGG pathway was carried out with the help of DAVID database to predict its mechanism. Core active components and potential targets of anti-COVID-19 drugs were verified by molecular docking. **Results** The drug-compound-

收稿日期: 2020-03-29

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1703900); 国家实验室药品监督管理局中成药质量评价重点实验室项目; 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划新冠病毒应急专项(XGZX2010)

作者简介: 张英睿(1998—), 女, 在读本科生, 研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: 1095353981@qq.com

*通信作者 张艺, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药民族药药效物质基础研究。E-mail: zhangyi@cdutcm.edu.cn

target network consisted of five drugs, 62 compounds and 70 targets. The KEGG pathway enrichment analysis included 41 signaling pathways ($P < 0.05$), which were mainly involved in cell apoptosis, Fc epsilon RI signaling pathway, TNF signaling pathway, etc. Molecular docking results showed that acacetin and syringin had strong affinity with potential targets of anti-COVID-19 drugs.

Conclusion In this study, the effect of Qingkailing Injection has the characteristics of multiple components, multiple targets and multiple pathways. The active component, acacetin, can regulate the apoptosis pathway and TNF pathway by acting on CASP3, CASP8, FASLG, and other targets, so as to realize the potential therapeutic effect on COVID-19.

Key words: Qingkailing Injection; COVID-19; network pharmacology; molecular docking; ACE II; acacetin; syringin

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19), 由于其具有较高的传染性和人群易感性, 目前全球多个国家发生 COVID-19 疫情, 引起了世界卫生组织的极度关注^[1]。COVID-19 是 21 世纪发生的第 3 起冠状病毒感染事件。冠状病毒主要通过表面的 S 蛋白识别靶细胞上的相应受体进入细胞, 引发感染^[2]。新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 是目前发现的第 7 种可感染人类的冠状病毒^[3], 它与严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 同源性达 79.5%^[4]。研究已证实 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 均可与血管紧张素转化酶 II (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 结合进入细胞^[5], ACE2 是 SARS-CoV-2 感染细胞的必需蛋白^[6]。

SARS-CoV-2 进入宿主细胞后, 释放 RNA 与细胞中核糖体结合, 翻译出病毒复制所需的 3C 类似蛋白酶 (protease 3C-like, 3CLpro) 等蛋白酶, 并依赖病毒自身的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 进行 RNA 复制过程^[7]。因此 3CLpro 与 RdRp 在 SARS-CoV-2 的致病过程中同样起到关键作用。目前尚未发现治疗 COVID-19 的特效药物, 但临床用药结果显示中西医结合疗法具有较好疗效^[8], 《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案 (试行第七版)》亦收载有中医特色治疗方案。

根据中医理论, COVID-19 为疫病之邪致病, 属于中医“温病-疫病”范畴。中医典籍对疫病记载甚多。如《素问·刺法论》:“五疫之至, 皆相染易, 无问大小, 病状相似”。《温疫论》:“温疫之为病, 非风非寒, 非暑非湿, 乃天地间别有一种异气所感”。COVID-19 患者外感疫病之气, “湿、热、毒、瘀”之邪侵犯机体, 湿困脾闭肺, 气机升降失司, 湿毒化热, 而瘀热内闭, 热深厥亦深。本病早期以“湿热伤肺”为主要病因病机, 轻症可以以中成药治之^[9]。清开灵注射液作为我国中医院急诊科 (室) 必备中成药之一, 具有抗病毒、抗炎、解热、免疫调节等多种药理作用, 广泛应用于急性肺炎、上呼吸道感染, 高热等疾病的临床治疗。本方由安宫牛黄丸拆方改制而成, 安宫牛黄丸出自清代温病大家吴瑭所

著《温病条辨》, 应湿热之邪内陷心包之证而设, 有清热解毒、豁痰开窍之功。清开灵注射液在保留原方治病精髓的同时又加以改制, 以牛黄、猪胆二者提取物 (胆酸、猪去氧胆酸) 为治病之要, 牛黄、猪胆味苦性凉, 共奏清热解毒、镇咳平喘、豁痰开窍之效; 金银花清热解毒、疏散风热, 水牛角清热泻火、凉血解毒, 黄芩 (黄芩苷) 清热燥湿、泻火解毒, 三者为臣, 清热燥湿解毒, 泻肺之实火, 并助君药清泻心包热毒; 栀子、板蓝根为佐药, 苦寒清降利湿, 善清热解毒、凉血利咽; 珍珠母镇惊安神^[10]。综观全方, 清热解毒, 镇咳平喘, 燥湿豁痰, 湿邪得去, 则诸症自除。清开灵注射液目前已被辽宁、河北、陕西、上海等省市的“新型冠状病毒肺炎防治方案”以及湖北武汉同济医院制定的最新版《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案及预防方案》列为推荐用药, 对于治疗 COVID-19 具有极大的应用价值。但是清开灵注射液治疗 COVID-19 的具体作用机制目前尚不明晰。本研究运用网络药理学构建清开灵注射液的药物-化合物-靶点网络, 并进行代谢通路分析以及分子对接验证, 初步探寻清开灵注射液治疗 COVID-19 的作用机制, 以期为今后的临床应用以及新药研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 清开灵注射液中化学成分收集

文献检索“珍珠母”“水牛角”的化学成分以及“猪去氧胆酸”的化学结构式, 利用 Molinspiration Cheminformatics (<https://www.molinspiration.com/>) 数据库, 获得猪去氧胆酸的分子信息; 借助 TCMSP (<http://tcmsp.com/>), 检索“胆酸”“黄芩苷”的分子信息, 并以“栀子”“金银花”“板蓝根”为关键词检索 3 者的化学信息。将简化的 Lipinski 五规则, 即相对分子质量 (M_w) ≤ 500 、脂水分配系数 ($miLogP$) ≤ 5 、氢键给体数目 ($nOHNH$) ≤ 5 、氢键受体数目 (nOH) ≤ 10 以及类药性 (DL) ≥ 0.18 作为活性化学成分的筛选依据, 同时得到各活性成分相关靶标蛋白。

1.2 药材-化合物-靶点网络及蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络构建

将猪去氧胆酸的 SMILES 格式导入 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库, 得到对应基因靶点。将“1.1”项得到的靶标蛋白导入 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库, 选择物种为“Human”, 得到蛋白对应基因。将所得基因靶点与 COVID-19 疾病相关靶点 (通过文献检索得到结肠上皮细胞中与 ACE2 共表达的基因) 进行交集分析, 并用 Cytoscape 3.7.2 (<http://www.cytoscape.org/>) 软件构建药物-化合物-靶点网络。

1.3 靶点的通路分析

借助 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库查询靶点基因对应 ID, 导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库, 进行 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路富集分析, 将结果导入 OmicShare Tools (<http://www.omicshare.com/tools/index.php/>) 绘制高级气泡图使结果可视化。

1.4 分子对接验证

选择 ACE2、RdRp、3CLpro 作为抗 COVID-19 药物潜在作用靶点, 与核心活性成分及临床推荐用药 (洛匹那韦、利托那韦、利巴韦林) 进行分子对接。

借助 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库下载靶点的 3D 结构的 pdb 格式文件。借助 ZINC (<http://zinc.docking.org/>) 数据库下载化合物 3D 结构的 mol2 格式文件。在软件 MAESTRO version 11.5 中导入靶点的 3D 结构, 经过去水、加氢、能量最小化等系列操作, 运用 Glide 模块 Ligand Docking 面板进行分子对接, 对接方式选择柔性对接, 以对接评分 Docking Score 为依据评价化合物与受体的匹配情况。

2 结果

2.1 活性化合物的筛选

保留胆酸、猪去氧胆酸、黄芩苷以及栀子、板蓝根、金银花中质量控制指标成分 (栀子苷、*R,S*-告依春、绿原酸、木犀草苷) 作为活性化合物。对栀子、板蓝根、金银花、珍珠母、水牛角中其他化学成分进行筛选, 以简化的 Lipinski 五规则 ($M_w \leq 500$ 、 $miLogP \leq 5$ 、 $nOHNH \leq 5$ 、 $nOH \leq 10$)、 $DL \geq 0.18$ 为指标, 筛选出活性化合物 67 个, 其中 9 个来自栀子、36 个来自板蓝根、26 个来自金银花, 栀子与金银花共有成分 3 个, 板蓝根与金银花共有成分 1 个。珍珠母、水牛角中蛋白质、氨基酸等成分因不符合指标要求被剔除。清开灵注射液中部分活性化合物的基本信息见表 1。

表 1 清开灵注射液中部分活性化合物的基本信息

Table 1 Basic information of some active compounds in Qingkailing Injection

药物	分子 ID	化学成分	Mw	miLogP	nOHNH	nOH	DL
栀子	MOL001941	欧前胡素 (ammidin)	270.30	3.65	0	4	0.22
栀子	MOL001406	藏红花酸 (croctin)	328.44	4.58	2	4	0.26
栀子	MOL001942	异欧前胡素 (isoimperatorin)	270.30	3.65	0	4	0.23
栀子	MOL004557	栀子苷 (geniposide)	388.41	-2.25	5	10	0.44
栀子	MOL002560	白杨素 (chrysin)	254.25	2.60	2	4	0.18
板蓝根	MOL001689	刺槐素 (acacetin)	284.28	2.59	2	5	0.24
板蓝根	MOL001733	半齿泽兰素 (eupatorin)	344.34	2.55	2	7	0.37
板蓝根	MOL000347	丁香苷 (syriigin)	372.41	-0.51	5	9	0.32
板蓝根	MOL000472	大黄素 (emodin)	270.25	2.49	3	5	0.24
板蓝根	MOL001808	色胺酮 (tryptanthrin)	248.25	2.33	0	4	0.29
板蓝根	MOL000416	落叶松脂素 (lariciresinol)	360.44	2.46	3	6	0.38
板蓝根	MOL001779	清风藤碱 (sinoacutine)	327.41	1.56	1	5	0.46
板蓝根	MOL001721	依靛蓝酮 (isaindigodione)	326.38	1.36	2	6	0.41
板蓝根	MOL001792	甘草素 (liquiritigenin)	256.27	2.57	2	4	0.18
板蓝根	MOL001803	橙黄酮 (sinensetin)	372.40	3.06	0	7	0.45
金银花	MOL000006	木犀草素 (luteolin)	286.25	2.07	4	6	0.25
金银花	MOL002083	小麦黄素 (tricin)	330.31	2.30	3	7	0.34
金银花	MOL003044	高圣草素 (chryseriol)	300.28	2.32	1	7	0.41
金银花	MOL001680	马钱苷 (loganin)	390.43	-2.08	5	10	0.44
栀子、金银花	MOL000098	槲皮素 (quercetin)	302.25	1.50	5	7	0.28
栀子、金银花	MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	286.25	1.77	4	6	0.24
板蓝根、金银花	MOL000008	芹菜素 (apigenin)	270.25	2.33	3	5	0.21

2.2 药物-化合物-靶点网络的建立

在 TCMSP 数据库中检索各活性成分对应靶标蛋白，导入 Uniprot 数据库进行基因名称矫正。因 TCMSP 中未收录猪去氧胆酸，将猪去氧胆酸的 SMILES 格式导入 Swiss Target Prediction 数据库，选择物种为“Homo sapiens”，筛选出 possibility > 0.7 的靶点基因^[10]。共得到活性成分对应的靶点基因 247 个。

现代药理研究表明，SARS-CoV-2 与 ACE2 结合是病毒感染细胞的关键环节。Wang 等^[11]应用单细胞测序识别技术得到结肠上皮细胞中与 ACE2 共表达的 5 566 个基因，将这 5 566 个基因与 247 个靶点基因进行交集分析，得到 70 个靶标与 ACE2 共表达。提示清开灵注射液中活性成分可能通过作用于这 70 个靶标，影响 SARS-CoV-2 与 ACE2 结合，发挥对 COVID-19 的治疗作用。筛选出上述 70 个靶点所对应的化学成分，共筛选得到 62 个化学成分。

构建的药物-化合物-靶点网络包括 5 个药物节点，62 个化合物节点，70 个靶点节点以及 322 条边。结果见图 1。每个靶点平均与 4.6 个化合物相互作用，

每个化合物平均与 5.2 个靶点相互作用，说明清开灵注射液可通过多成分、多靶点的协同作用发挥疗效。

2.3 PPI 网络构建

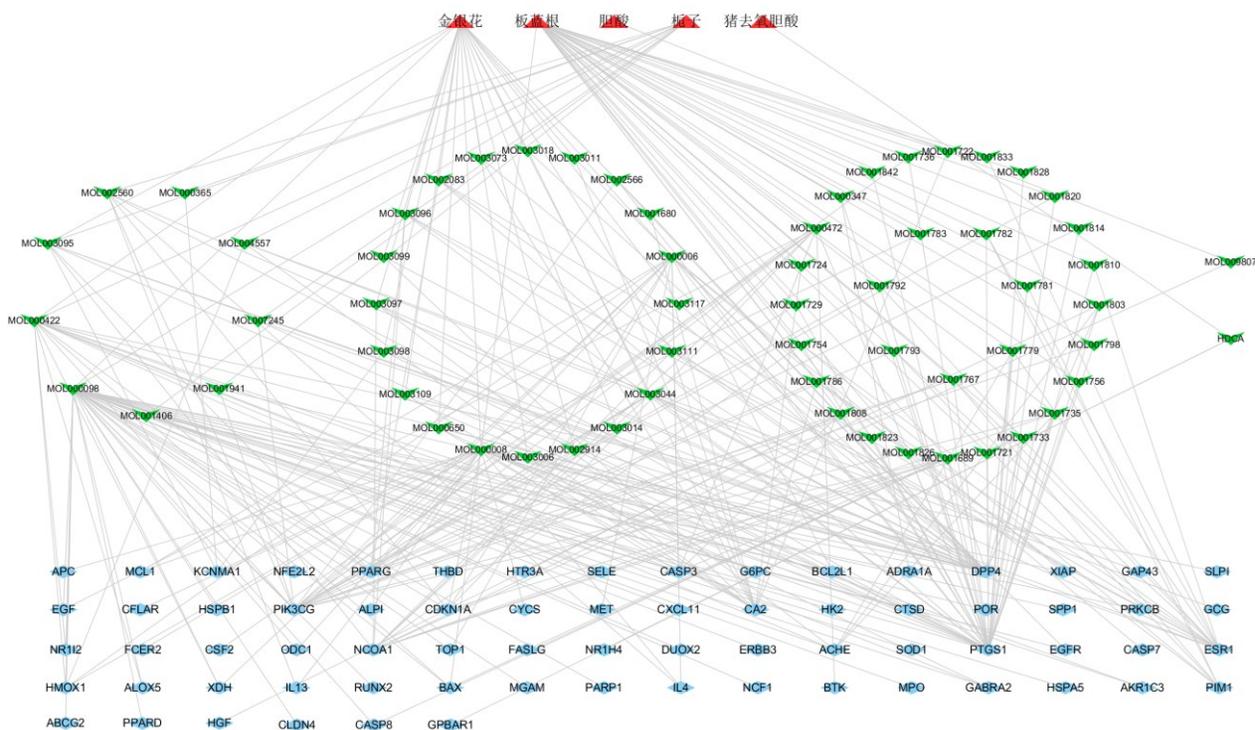
将上述 70 个药物作用靶点导入 STRING 11.0 数据库，绘制 PPI 网络图，结果见图 2。节点代表靶标蛋白，边代表蛋白之间的相互作用关系，线条多少代表蛋白之间相互关联的强度大小。其中度 (degree) 值 ≥ 2 倍中位数的靶点有 12 个，见表 2。提示这 12 个靶蛋白可能是 PPI 网络中的核心靶点，清开灵注射液很可能是通过作用于这些靶点发挥对 COVID-19 的治疗作用^[12]。

2.4 靶点 KEGG 通路富集分析

对“2.3”项中筛选得到的 70 个靶点基因进行 KEGG 通路富集分析，筛选得到 41 条信号通路 ($P < 0.05$)，主要涉及细胞凋亡、Fc epsilon RI 信号通路、TNF 信号通路等，见图 3。

2.5 清开灵注射液中活性成分与抗 COVID-19 药物潜在作用靶点的分子对接验证结果

在“2.2”项下得到的 62 个化学成分中，



猪去氧胆酸无分子 ID，图中以“HDCA”代表猪去氧胆酸分子

Hyodeoxycholic acid has no molecular ID. In the figure, "HDCA" represents hyodeoxycholic acid

图 1 清开灵注射液药物-化合物-靶点网络

Fig. 1 Drug-compound-target network for Qingkailing Injection

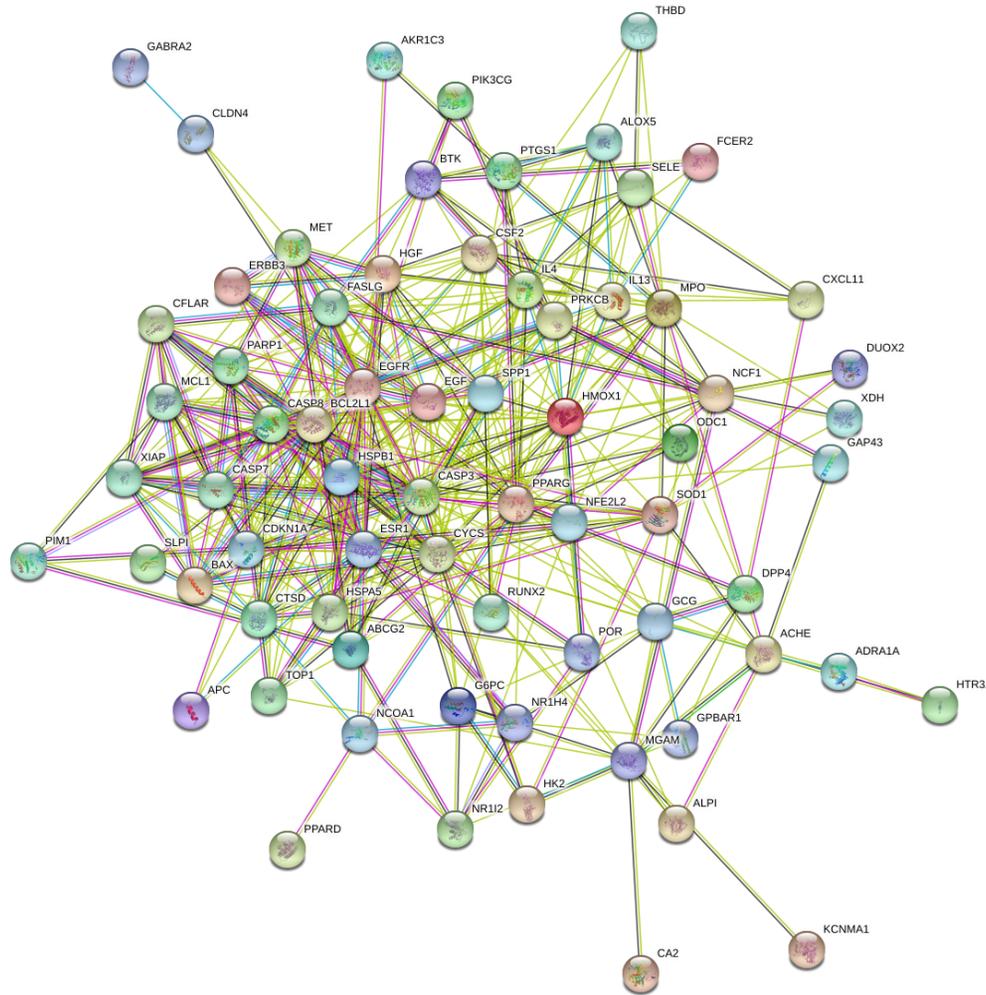


图 2 清开灵注射液作用于 ACE2 的靶蛋白 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of target protein of ACE2 treated by Qingkailing Injection

表 2 清开灵注射液核心靶点信息

Table 2 Information on core targets of Qingkailing Injection

靶标蛋白	靶点基因	度值
caspase-3	CASP3	43
epidermal growth factor receptor	EGFR	35
cytochrome c	CYCS	34
pro-epidermal growth factor	EGF	32
bcl-2-like protein 1	BCL2L1	26
estrogen receptor	ESR1	25
caspase-8	CASP8	24
heme oxygenase 1	HMOX1	24
interleukin-4	IL4	24
peroxisome proliferator activated receptor gamma	PPARG	22
induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1	MCL1	20
tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	FASLG	19

选择其中度值 ≥ 2 倍中位数的化学成分以及《中国药典》2015 年版规定的清开灵注射液含量测定指标（胆酸、猪去氧胆酸、栀子苷）作为核心成分^[13]。将得到的 17 个核心成分与抗 COVID-19 药物潜在作用靶点 ACE2 (PDB ID: 1R42)、RdRp (PDB ID: 6NUR)、3CLpro (PDB ID: 6LU7) 进行分子对接验证^[3]。RdRp 抑制剂利巴韦林, 3CLpro 抑制剂洛匹那韦、利托那韦已被《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案（试行第七版）》收录, 并广泛应用于临床治疗^[7]。因此选择利巴韦林、洛匹那韦、利托那韦分别与对应靶点对接, 作为对照, 结果见表 3。

一般认为进行分子对接时对接评分的绝对值越大, 化合物与靶点亲和力越强, 构象越稳定。绝对值大于 4.25 表示具有一定的结合活性, 大于 5.0 表示具有较好的结合活性, 大于 7.0 表示具有强烈的结合活性^[14]。分子对接结果显示, 刺槐素、丁香苷

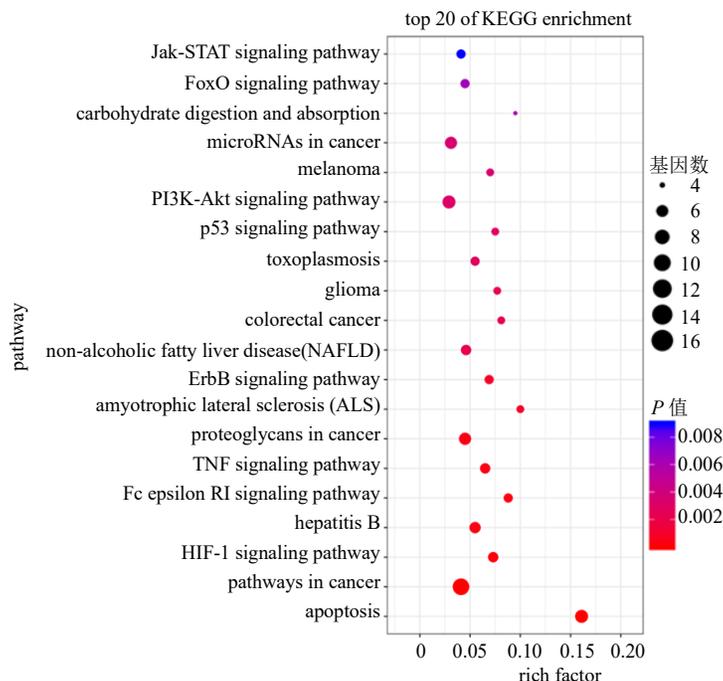


图 3 清开灵注射液靶标的 KEGG 通路富集分析

Fig. 3 KEGG pathway enrichment analysis of Qingkailing Injection target

表 3 清开灵注射液活性成分、推荐药物与抗 COVID-19 药物潜在作用靶点的分子对接结果

Table 3 Molecular docking results of active ingredients of Qingkailing Injection and recommended drugs with potential targets of anti-COVID-19 drugs

化合物	对接评分		
	ACE2	RdRp	3CLpro
槲皮素	-5.082	-5.813	-4.462
芹菜素	-5.620	-5.146	-3.671
山柰酚	-5.418	-5.190	-4.271
木犀草素	-5.694	-5.511	-4.733
大黄素	-3.738	-5.486	-3.791
刺槐素	-6.158	-4.899	-4.507
色胺酮	-5.105	-5.351	-4.478
5-羟基-7-甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧苯基) 色酮	-5.660	-5.958	-4.520
2-(3,4-二甲氧基苯基)-5-羟基-7-甲氧基色酮	-5.628	-5.818	-4.868
5-羟基-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基) 色酮	-5.949	-5.906	-4.186
丁香苷	-6.492	-5.809	-5.000
白杨素	-4.409	-5.566	-3.686
小麦黄素	-5.086	-4.911	-3.867
甜橙黄酮	-4.472	-5.323	-5.103
胆酸	-5.091	-3.982	-3.920
猪去氧胆酸	-4.250	-4.481	-3.952
栀子苷	-4.921	-4.761	-3.839
洛匹那韦	-6.076	—	-5.038
利托那韦	-7.839	—	-5.464
利巴韦林	-6.613	-4.849	—

与 ACE2 的结合能力强于洛匹那韦；除胆酸、猪去氧胆酸、栀子苷外其余核心成分与 RdRp 的结合能均高于利巴韦林；甜橙黄酮与 3CLpro 的亲合力较洛匹那韦更强。综合分析，刺槐素、丁香苷、甜橙黄酮可能是清开灵注射液治疗 COVID-19 的关键成分。

3 个靶点中刺槐素与 ACE2 的对接评分绝对值最大；靶点 ACE2、RdRp、3CLpro 分别与丁香苷、5-羟基-7-甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧苯基)色酮、甜橙黄酮的亲合力最强。分子对接 3D 模式及 2D 模式见图 4。

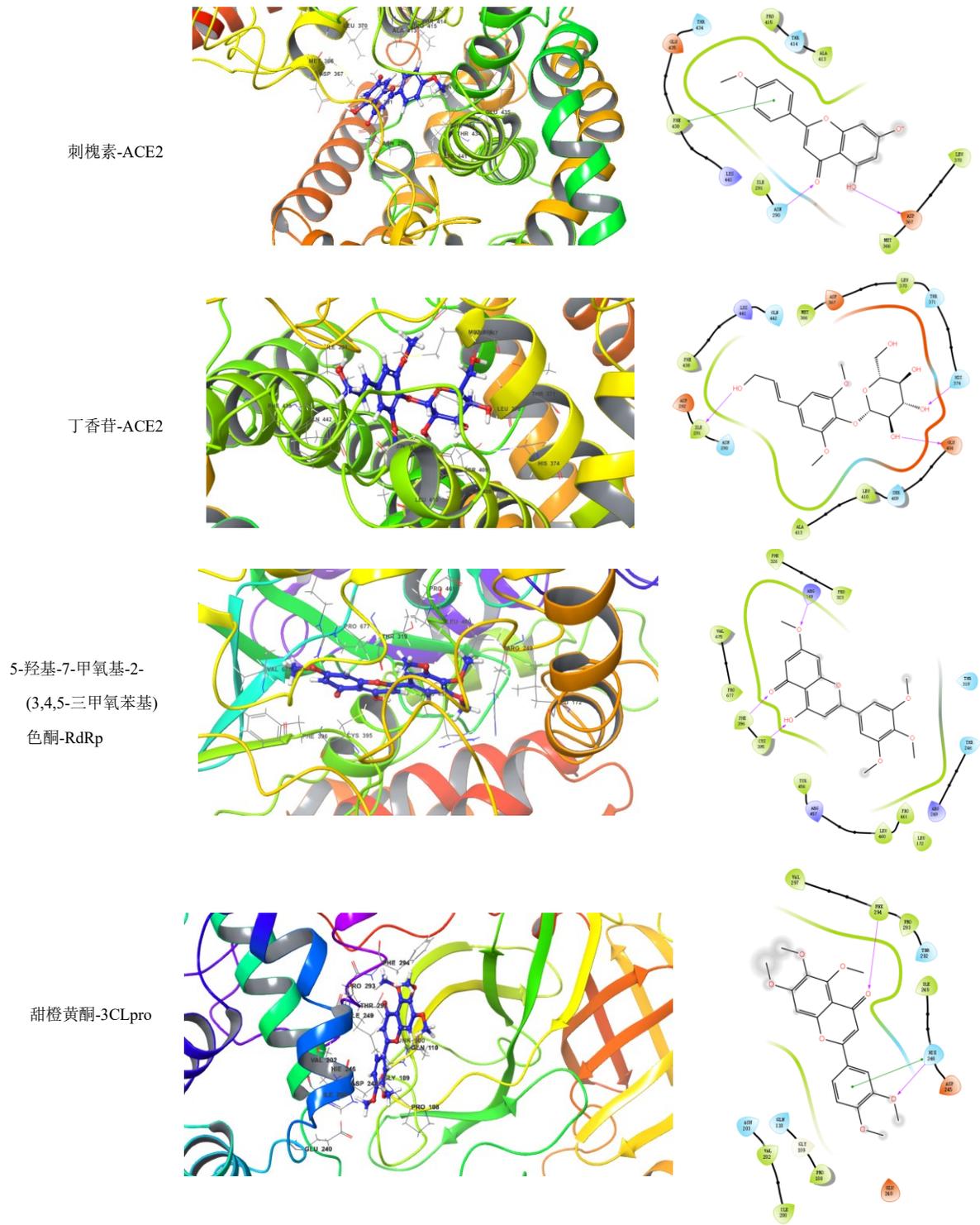


图 4 分子对接模式图

Fig. 4 Molecular docking pattern

3 讨论

COVID-19 属于中医疫病范畴, 具有起病急、变化快、病情凶险的特点, 极大危害人民生命健康, 严重影响社会秩序。中医药因其辨证论治、整体合参、未病先防, 既病防变等特点, 在 COVID-19 临床各阶段治疗中发挥了独特优势, 取得了良好的效果。结合临床症状、地域特点等进行综合考量, 本次“疫病”当属“湿疫”, 全国各地中医诊疗方案以清热解毒祛湿为主。清开灵注射液长于清热解毒燥湿, 其抗病毒、调节免疫的功效也符合中医对疫病“扶正驱邪”的治疗原则^[15-16]。清开灵注射液临床以静脉注射途径给药, 可直达病位, 迅速起效, 宜在疫毒闭肺阶段应用。疫毒闭肺系湿毒郁肺, 入里化热所致, 重症 COVID-19 患者可见疫毒闭肺、弥漫三焦、气血两燔, 危重患者可发展为疫毒闭肺、正气虚脱之证^[17], 因此清开灵注射液主要适用于重型、危重型 COVID-19 的治疗。

3.1 核心成分的治疗作用分析

本研究运用网络药理学构建清开灵注射液的药物-化合物-靶点网络, 得到活性成分 62 个以及对应靶点 70 个。筛选出其中 17 个活性成分作为清开灵注射液治疗 COVID-19 核心成分, 其中多数属于黄酮类化合物。现代药理研究结果表明, 黄酮类化合物具有抗炎、抗病毒、免疫调节等作用。它可以通过影响花生四烯酸代谢酶及其代谢产物, 抑制炎症介质释放, 发挥抗速发型过敏反应的作用^[18-19], 推测其对 SARS-CoV-2 感染产生的细胞因子风暴(病毒感染机体后, 炎症因子大量分泌引发细胞因子级联反应, 免疫系统受到干扰造成的机体过度免疫现象)可能具有抑制效果^[20]。有研究表明, 荔枝核中的黄酮类成分对 SARA-CoV 3CLpro 蛋白具有很强的抑制作用, 已知 SARS-nCoV 和 SARS-CoV-2 的 3CLpro 蛋白的氨基酸序列具有 96% 同源性, 提示黄酮类成分可能具有一定的抗 SARS-CoV-2 作用^[7,21]。此外, 黄酮类化合物是天然高效的免疫调节剂, 可以增强 NK 细胞和 T 细胞的杀伤能力, 提高抗体效价和免疫器官指数, 应用于 COVID-19 治疗时与中医“扶正祛邪”的思路相吻合^[22]。

分子对接结果显示, 上述 17 个核心成分中刺槐素、丁香苷、甜橙黄酮可能是清开灵注射液治疗 COVID-19 的关键成分。刺槐素属于黄酮类成分, 具有明显的抗炎镇痛、抗流感病毒活性^[23-24], 也是潜在的脓毒症保护剂。SARS-CoV-2 感染机体后,

部分重症患者可在短期内迅速发展为脓毒症休克, 脓毒症诱导肺损伤, 使病情进一步加重。刺槐素可以通过发挥抗炎、抗氧化作用, 显著减轻脓毒症及其所致肺损伤^[25], 对 COVID-19 病程进展起到一定的干预作用。丁香苷可以通过抑制炎症因子前列腺素和 NO 的合成与释放, 减轻急性炎症早期的毛细血管扩张及渗出水肿, 以及抑制炎症中后期纤维组织增生和肉芽形成, 提示其对 SARS-CoV-2 所致细胞因子风暴可能具有一定的缓解作用。此外, 丁香苷还可以增强非特异性免疫、体液免疫及细胞免疫功能, 增强机体抵抗疾病的能力^[26]。甜橙黄酮可以抑制诱导性一氧化氮合酶(iNOS)、环氧化酶-2(COX-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等细胞因子及炎症介质的产生与表达, 从而发挥抗炎、改善细胞因子风暴的作用^[27]。

胆酸、猪去氧胆酸在清开灵注射液方中发挥君药作用, 具有清热解毒、镇咳祛痰以及显著的抗炎功效^[28], 在清开灵注射液治疗 COVID-19 的过程中同样发挥关键作用。然而分子对接验证结果显示, 二者与 ACE2、RdRp、3CLpro 的亲合力较弱。已知胆酸、猪去氧胆酸属于甾体类化合物, 对应靶标较多^[29]。二者进入血液后, 部分与血浆蛋白结合成为结合型药物, 未参与结合的游离型药物可直接作用于疾病相关靶位发挥药效^[30]。推测胆酸、猪去氧胆酸与血浆蛋白等其他靶点的亲合力可能较 ACE2、RdRp、3CLpro 更强, ACE2、RdRp、3CLpro 并非二者治疗 COVID-19 的最佳作用位点。因此, 清开灵注射液中胆酸、猪去氧胆酸治疗 COVID-19 的具体作用机制有待进一步研究。

3.2 核心靶点表达与 COVID-19 的关联分析

PPI 网络结果显示, 得到的 12 个核心靶点主要涉及细胞凋亡、癌症、炎症、免疫调节等。其中 CASP3、CASP8 对应蛋白 caspase-3、caspase-8 属于半胱氨酸蛋白酶家族, 与细胞凋亡相关。细胞凋亡可通过 3 种途径(死亡受体途径、线粒体途径、内质网途径)实现, caspase-8 介导死亡受体途径, 并激活 caspase-3, 被激活的 caspase-3 作用于 bcl-2 家族成员, 破坏宿主细胞内的结构蛋白及 DNA 稳定, 最终导致细胞凋亡^[31]。研究表明^[32], 冠状病毒感染细胞后, caspase-3、caspase-8 被激活从而介导细胞凋亡。

EGFR 是表皮生长因子受体家族成员之一, 其介导的信号转导与细胞生存、增殖以及分化密切相关。有研究表明, 非小细胞肺癌中 EGFR 存在过表

达现象^[33], 细胞凋亡受抑。此外, SARS-CoV 感染机体后, EGFR 信号介导的宿主对肺损伤的过度反应可诱导肺纤维化症状^[34]。BCL2L1 是 bcl-2 家族蛋白成员中主要的抗凋亡分子, SARS 患者的标志性发现是淋巴细胞减少, BCL2L1 在无生长因子的条件下可以抑制 SARS-CoV E 蛋白诱导的 T 细胞凋亡^[35]。提示抑制 EGFR 信号或诱导 BCL2L1 表达可以作为 COVID-19 诊断和治疗的思路之一。

3.3 涉及主要信号通路及 COVID-19 的关联分析

KEGG 通路富集分析结果显示, 涉及通路多集中在细胞凋亡、炎症、癌症等方面。其中细胞凋亡通路及病毒感染后的临床表现相关。SARS-CoV 可通过多种途径诱导细胞凋亡, 如 M 膜蛋白和 N 核衣壳蛋白分别通过启动 caspase-8、caspase-9 以及激活线粒体途径诱导细胞凋亡^[36-37]。这些都可能引起 SARS-CoV 感染后的临床表现。呼肠弧病毒 BYD1 可能在 SARS-CoV 感染机体的过程中发挥辅助作用, 多器官损伤症状即由其外衣壳蛋白 μ -1 和细胞黏附蛋白 σ -1 诱导的细胞凋亡所致^[38]。COVID-19 发病早期可见外周血白细胞、淋巴细胞计数减少, 提示可能与细胞凋亡通路有关。

肥大细胞是免疫致敏因子 IgE 必不可少的效应细胞。高亲和力 IgE 受体 Fc epsilon RI 聚集在肥大细胞上, 它可以激活肥大细胞以及 NF- κ B 炎症信号通路, 诱导肥大细胞脱颗粒并合成促炎细胞因子^[39-40]。TNF- α 作为促炎因子, 可以介导炎症的发生和发展, 机体内 TNF- α 水平上升同样可以激活 NF- κ B 信号通路, 促进更多炎症因子和细胞因子的分泌。提示 Fc epsilon RI 通路和 TNF 通路可能与 SARS-CoV-2 诱导的细胞因子风暴有关^[41]。

综上, 本研究得到清开灵注射液治疗 COVID-19 的核心成分、相关靶点以及关键通路主要与炎症、细胞因子风暴、免疫、细胞凋亡等有关。其中细胞因子风暴若是不加以干预, 可以导致炎症进一步弥散、肺损伤加剧, 最后发展为急性呼吸窘迫综合征、多器官衰竭等重型、危重型 COVID-19 症状^[42]。清开灵注射液可以通过发挥抗炎、缓解细胞因子风暴、提高机体免疫力等作用, 改善现阶段症状, 阻止疾病向重症方向转变。因此, 本研究结果符合清开灵注射液应用于疫毒闭肺阶段的临床使用现状, 可以为今后的临床用药提供一定依据。

综合分析, 发现刺槐素对应的核心靶点基因 CASP3、CASP8、FASLG 在细胞凋亡通路及 TNF

通路中均有表达。因此刺槐素等成分通过作用于 CASP3、CASP8、FASLG 等靶点调节细胞凋亡通路及 TNF 通路等, 可能是清开灵注射液抗 COVID-19 的作用机制之一。后续研究本课题组拟设计动物体内外药理实验, 对清开灵注射液治疗 COVID-19 的作用机制进行深入探讨, 以期为其临床应用和新药研发提供更多参考。

参考文献

- [1] World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak situation [EB/OL]. [2020-03-28]. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- [2] 赵军宁, 戴 瑛, 华 桦, 等. 治疗新冠病毒肺炎 (COVID-19) 中药“药理谱-云”特点与有效性评价要素 [J/OL]. 中药药理与临床, [2020-03-16]. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20200313.002>.
- [3] Elfiky A A. Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19 [J]. *Life Sci*, 2020, 248: 117477.
- [4] Li J Y, You Z, Wang Q, et al. The epidemic of 2019-novel-coronavirus (2019-nCoV) pneumonia and insights for emerging infectious diseases in the future [J]. *Microbes Infect*, 2020, 22(2): 80-85.
- [5] 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.
- [6] Wrapp D, Wang N S, Corbett K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [7] 邓卫宁, 王利娜, 崔艳丽. 抗新型冠状病毒肺炎药物靶点的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 401-404.
- [8] 韩园园, 赵梦冉, 石 焱, 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] 杨华升, 王 兰, 姜良铎. 姜良铎教授防治新型冠状病毒肺炎遣方用药思路 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12): 23-27.
- [10] 吴嘉瑞, 蔺梦娟, 刘鑫馥. 基于网络药理学的清开灵注射液作用机制研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(1): 23-29.
- [11] Wang J, Zhao S, Liu M, et al. ACE2 expression by colonic epithelial cells is associated with viral infection, immunity and energy metabolism [J]. *medRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.02.05.20020545.
- [12] 黄浪浪, 王建安, 徐 骝, 等. 基于网络药理学的黄连解毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制研究 [J/OL]. 中药材, [2020-02-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1286>.

- R.20200228.1830.008.html.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [14] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [15] 王 登, 闫抗抗, 曹 青, 等. 基于数据挖掘各地区中医药预防新型冠状病毒肺炎方案用药规律研究 [J/OL]. 中药材, [2020-02-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1286.r.20200228.1759.004.html>.
- [16] 赵 琦, 吴 莹, 席 榕, 等. 中药治疗病毒性肺炎的研究进展 [J]. 当代医药论丛, 2017, 15(12): 14-15.
- [17] 吴 伟, 温敏勇, 詹少锋, 等. 基于中医瘟疫火热病机探讨新型冠状病毒肺炎辨证论治 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(3): 272-274.
- [18] 赵雪巍, 刘培玉, 刘丹, 等. 黄酮类化合物的构效关系研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3264-3271.
- [19] 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.
- [20] 刘闰平, 葛俊德, 钟 颖, 等. 基于干预细胞因子风暴文献挖掘的中医药治疗重症新型冠状病毒肺炎探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1096-1105.
- [21] 龚受基, 苏小建, 虞海平, 等. 荔枝核黄酮类化合物对 SARS-CoV 3CL 蛋白酶抑制作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(5): 699-700.
- [22] 杨 杰, 沙金丹, 高 翔, 等. 黄酮类化合物的免疫调节作用及机制 [J]. 动物营养学报, 2017, 29(12): 4295-4300.
- [23] Carballo-Villalobos A I, González-Trujano M E, López-Muñoz F J. Evidence of mechanism of action of anti-inflammatory/antinociceptive activities of acacetin [J]. *Eur J Pain*, 2014, 18(3): 396-405.
- [24] 周媛媛, 仲伯华, 史卫国. 刺槐素的生物活性研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(9): 1053-1056.
- [25] Sun L C, Zhang H B, Gu C D, et al. Protective effect of acacetin on Sepsis-induced acute lung injury via its anti-inflammatory and antioxidative activity [J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(12): 1199-1210.
- [26] 宋媛媛. 丁香苷的抗炎免疫作用及部分机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2011.
- [27] Laavola M, Nieminen R, Yam M F, et al. Flavonoids eupatorin and sinenstin present in *Orthosiphon stamineus* leaves inhibit inflammatory gene expression and STAT1 activation [J]. *Planta Med*, 2012, 78(8): 779-786.
- [28] 黄漠然, 赵文靖, 李晋生, 等. 牛黄及其代用品化学成分、分析方法和药理作用研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(7): 1116-1123.
- [29] 党晓雪. 基于分子模拟方法的甾体类化合物靶蛋白筛选研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [30] 张晓静. 胆酸类成分稳定性及与蛋白相互作用研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [31] Nomura J, Matsumoto K, Iguchi-Ariga S M, et al. Mitochondria-independent induction of Fas-mediated apoptosis by MSSP [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(5): 1305-1309.
- [32] Suzuki K, Matsui Y, Miura Y, et al. Equine coronavirus induces apoptosis in cultured cells [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 129(3/4): 390-395.
- [33] 张连美, 仲纪祥, 孙苏安. EGFR、ALK 和 Ki-67 在非小细胞肺癌中的表达及相关性分析 [J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(1): 4-7.
- [34] Venkataraman T, Frieman M B. The role of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in SARS coronavirus-induced pulmonary fibrosis [J]. *Antiviral Res*, 2017, 143: 142-150.
- [35] Yang Y, Xiong Z Y, Zhang S, et al. Bcl-xL inhibits T-cell apoptosis induced by expression of SARS coronavirus E protein in the absence of growth factors [J]. *Biochem J*, 2005, 392(Pt 1): 135-143.
- [36] Zhang L, Wei L, Jiang D, et al. SARS-CoV nucleocapsid protein induced apoptosis of COS-1 mediated by the mitochondrial pathway [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2007, 35(2): 237-253.
- [37] Yue Y, Nabar N R, Shi C S, et al. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-3a drives multimodal necrotic cell death [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 904-918.
- [38] Song L H, Lu Y F, He J, et al. Multi-organ lesions in suckling mice infected with SARS-associated mammalian reovirus linked with apoptosis induced by viral proteins $\mu 1$ and $\sigma 1$ [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92678.
- [39] Klemm S, Ruland J. Inflammatory signal transduction from the Fc ϵ RI to NF-kappa B [J]. *Immunobiology*, 2006, 211(10): 815-820.
- [40] Nishida K, Yamasaki S, Ito Y, et al. Fc ϵ RI-mediated mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane [J]. *J Cell Biol*, 2005, 170(1): 115-126.
- [41] 李 娟. TNF- α 、IFN- γ 通过激活骨髓间充质干细胞 NF- κ B/STAT3 通路调控 DSS 诱导小鼠结肠炎的炎症反应 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
- [42] 何黎黎, 龚普阳, 封 玥, 等. 中药在抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)引起的细胞因子风暴中的应用分析 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1375-1385.