

基于网络药理学和分子对接技术探讨柴银颗粒抗冠状病毒感染潜在分子机制

孙元芳¹, 李冰冰^{2#}, 关永霞², 叶士莉², 严诗楷^{1*}, 支运霞², 张贵民^{2*}

1. 上海交通大学药学院, 上海 200240

2. 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276000

摘要: **目的** 基于网络药理学和分子对接分析柴银颗粒抗冠状病毒感染的分子机制。**方法** 从 TCMSP 数据库中获取柴银颗粒成分, 其潜在靶点以及冠状病毒作用靶点分别利用 SwissTargetPrediction 数据库和 GeneCards 数据库获取。通过绘制韦恩图发现柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在药效成分和作用靶点。潜在药效成分-作用靶点网络和潜在作用靶点的互作网络可视化由 Cytoscape 3.7.0 软件完成。GO 功能和 KEGG 通路分析在 String 数据库中进行。潜在药效成分和关键靶点的分子对接由 autodock vina 1.1.2 实现。**结果** 发现了柴银颗粒抗冠状病毒感染的 51 个潜在药效成分和 14 个潜在作用靶点。生物信息学分析发现 PI3K-Akt、IL-17 等信号通路与柴银颗粒抗冠状病毒感染的分子机制相关。分子对接结果显示柴银颗粒中的黄芩苷等成分与 NTRK2 等靶点的亲和力强。**结论** 柴银颗粒中的黄芩苷、葎澄茄素、黄连碱等作用于 NTRK2、PRKCa、TNF 等, 调节 PI3K-Akt/mTOR、ErbB/Ras 和 IL-17 等信号通路抑制冠状病毒的侵袭和复制, 增强宿主免疫能力, 实现抗冠状病毒感染。**关键词:** 柴银颗粒; 冠状病毒; 网络药理学; 分子对接; 分子机制; 黄芩苷; 葎澄茄素; 黄连碱

中图分类号: R285.52 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)19-4999-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.019

Potential molecular mechanism for Chaixin Granules against coronavirus infection based on network pharmacology and molecular docking

SUN Yuan-fang¹, LI Bing-bing², GUAN Yong-xia², YE Shi-li², YAN Shi-kai¹, ZHI Yun-xia², ZHANG Gui-min²

1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Linyi 276000, China

Abstract: Objective To reveal the molecular mechanism of Chaixin Granules in treatment of coronavirus infection based on network pharmacology and molecular docking. **Methods** The chemical constituents of Chaixin Granules were collected by TCMSP database. SwissTargetPrediction database and GeneCards database were used to predict the potential targets of active ingredients and coronavirus. The potential active ingredients and its targets of Chaixin Granules in the treatment of coronavirus infection were found through Venn diagram. The potential active compounds-targets network and the PPI network were visualized by Cytoscape 3.7.0. GO-enriched analysis and KEGG pathways analysis were constructed on STRING database. The molecular docking of potential active compounds and key targets was achieved by autodock vina 1.1.2. **Results** Fifty-one potential active ingredients and 14 potential targets for Chaixin Granules on treatment of coronavirus infection were obtained. KEGG pathways analysis showed that 44 metabolic pathways were involved to Chaixin Granules effect on coronavirus infection, including MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, mTOR signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway and IL-17 signaling pathway. The results of molecular docking showed that baicalin, cubebin, coptisine, daidzein-4,7-diglucoside, linarin, liquiritin, luteolin and wogonin in Chaixin Granules had strong affinity with NTRK2, PRKCa, TNF, VEGFA, GSK3 β . **Conclusion** This study elaborated that baicalin, cubebin and coptisine in Chaixin Granules interacted with NTRK2, PRKCa, TNF, VEGFA, GSK3 β and regulated PI3K-Akt/mTOR, ErbB/Ras and IL-17 signaling pathways to inhibit the invasion and replication of coronavirus and enhance immunity to battle against coronavirus infection. This study provides a

收稿日期: 2020-07-14

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目 (2017CXGC1308); 山东省重大科技创新工程项目 (2018CXGC1305)

作者简介: 孙元芳 (1994—), 女, 在读研究生, 研究方向为中医药临床系统生物学。E-mail: syf8381@163.com

*通信作者 张贵民, 男, 研究员, 博士生导师, 从事药物研发工作。E-mail: lunanzhangguimin@163.com

严诗楷, 男, 副研究员, 研究方向为中医药临床系统生物学。E-mail: shkyan@126.com

#并列第一作者: 李冰冰 (1986—), 博士, 研究方向为中药药效与作用机制。E-mail: libingt@126.com

research basis and theoretical basis for the application of Chaixin Granules in the treatment of anti-coronavirus infection.

Key words: Chaixin Granules; coronavirus; network pharmacology; molecular docking; molecular mechanism; baicalin; cubebin; coptisine

冠状病毒是一种严重威胁人类和动物健康的病原体,可分为 α 型、 β 型、 γ 型和 σ 型。目前已知可感染人类的冠状病毒有 7 种,包括 HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2^[1]。2003 年由 SARS-CoV 感染诱发的传染性非典型肺炎导致全球 20 多个国家共计 8 000 多病例报告和 10% 的死亡率,2012 年由 MERS-CoV 感染诱发的中东呼吸综合征的死亡率更是达到了 30%。而 2019 年 12 月—2020 年 4 月,全球累计确诊 SARS-CoV-2 感染所致新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的人数已逾 300 万人,累计死亡人数超 20 万,给全球的卫生安全与经济造成了巨大的损失^[2]。然而目前针对这些强致病性的冠状病毒尚无高效、特异性的疫苗和药物上市。从中国抗击 COVID-19 疫情的过程中可以看到中医药发挥着重要作用,这为治疗冠状病毒感染提供了一种新思路^[3]。

柴银颗粒是由柴胡、金银花、黄芩、葛根、荆芥、青蒿、连翘、桔梗、苦杏仁、薄荷、鱼腥草制备而成的中成药。该方中柴胡疏散风热、透邪外出,为君药;金银花、连翘清热解毒、疏散风热、消肿散结;鱼腥草、黄芩清肺泻火、消痈排脓、除湿解毒,共为臣药;葛根、薄荷辛凉解表、疏风散热;荆芥辛温,增强柴胡、葛根、薄荷的解表之功;青蒿苦寒清热、辛香透散;苦杏仁宣肺止咳化痰,为佐药;桔梗宣肺止咳且归肺经,为使药,全方具有清热解毒、利咽止咳的功效,用于上呼吸道感染外感风热证。此外,柴银颗粒还可用于治疗手足口病、流行性感、人禽流感、传染性非典型肺炎等传染性疾病。而且最新研究也表明柴银颗粒通过调节免疫功能对人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证具有治疗作用^[4]。临床与药理学研究都提示柴银颗粒可用于抗冠状病毒感染,然而其作用机制尚不完全明确。

由于中药复方制剂组方复杂,成分众多,常规的药理学研究难以全面揭示其潜在的作用机制,而网络药理学通过构建成分-靶点-通路的多层次网络被广泛应用于研究中药的复杂机制。本研究拟采用网络药理学技术研究柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在药效成分和靶点。结合基因本体论 (gene ontology, GO) 功能和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)

通路分析结果探讨柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在分子机制。此外,针对关键药效成分和靶点开展分子对接研究,进一步探讨柴银颗粒抗冠状病毒感染的分子机制,旨在为柴银颗粒应用于抗冠状病毒感染治疗提供研究基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 柴银颗粒药效成分及其靶点

从 TCMSP 数据库 (<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>) 中获取柴胡、金银花、黄芩、葛根、荆芥、青蒿、连翘、桔梗、苦杏仁、薄荷、鱼腥草的化学成分。设置口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) > 30% 和类药性 (drug-likeness, DL) > 0.18, 建立柴银颗粒的药效成分库。利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) 获取药效成分的 Canonical SMILES 序列, 在 Swiss TargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库中检索, 取可能性分值大于 0.1 且排名前 15 的靶点作为柴银颗粒药效成分靶点。

1.2 冠状病毒作用靶点

利用 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>), 分别搜索“corona virus”“severe acute respiratory syndrome”“Middle East respiratory syndrome”和“novel coronavirus pneumonia”, 将 SARS、MERS 和 NCP 的相关性分数大于 30 的共有靶点与“corona virus”的相关性分数大于 30 的靶点合并, 共同作为冠状病毒作用靶点。

1.3 网络构建

对柴银颗粒成分靶点与冠状病毒作用靶点绘制韦恩图, 得到柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在作用靶点。将其导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 得到潜在作用靶点互作关系。随后在 Cytoscape 3.7.0 软件中构建柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在作用靶点互作网络和柴银颗粒潜在药效成分-作用靶点网络。利用 STRING 数据库对柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在作用靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.4 分子对接分析

柴银颗粒的潜在药效成分和关键作用靶点的 3D 结构分别从 PubChem 数据库和 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中下载。对潜在药效成分和

关键作用靶点的 3D 结构进行去水、加氢, 转换成 pdbqt 格式。由 autodock vina 1.1.2 软件完成分子对接分析。

2 结果

2.1 柴银颗粒的药效成分及其靶点

TCMSP 数据库中得到柴胡、金银花、黄芩、葛根、荆芥、青蒿、连翘、桔梗、苦杏仁、薄荷、鱼腥草的化学成分, 经 $OB > 30\%$ 和 $DL > 0.18$ 的筛选, 共确定柴银颗粒的药效成分 132 个, 见表 1。利用 PubChem 数据库和 SwissTargetPrediction 数据库共找到柴银颗粒中 95 个药效成分的 311 个靶点。

2.2 柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在作用靶点

通过 GeneCards 数据库检索得到 109 个冠状病毒作用靶点。对 311 个柴银颗粒的药效成分靶点与 109 个冠状病毒作用靶点绘制韦恩图, 得到柴银颗粒抗冠状病毒感染的 14 个潜在作用靶点。这 14 个潜在作用靶点分别为肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF)、糖原合酶激酶 3 β (Glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3 β)、血管内皮生长因子 A (Vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)、 β 淀粉样 A4 蛋白 (Beta amyloid A4 protein, APP)、微管相关蛋白 tau (Microtubule-associated protein tau, MAPT)、神经营养性酪氨酸激酶受体 2 型

(Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2, NTRK2)、细胞色素 P450 家族 19 亚科 A 成员 1 (Cytochrome P450 19A1, CYP19A1)、血清素转运体 (Serotonin transporter, SLC6A4)、3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGCR)、细胞色素 P450 家族 2 亚科 D 成员 6 (Cytochrome P450 2D6, CYP2D6)、半乳糖凝集素 3 (Galectin-3, LGALS3)、蛋白激酶 C α (Protein kinase C alpha, PRKC α) 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PLK4 (Serine/threonine-protein kinase PLK4, PLK4)。将 14 个潜在作用靶点输入 STRING 数据库得到潜在作用靶点互作关系, 导入 Cytoscape 3.7.0 软件进行可视化, 得到 14 个潜在作用靶点的互作网络, 见图 1。网络分析显示该网络中共包含 14 个节点, 66 条边和 182 条最短路径, 网络中心度为 0.321, 平均邻居节点数为 9.429。

2.3 柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在药效成分-作用靶点网络

柴银颗粒的 14 个潜在作用靶点与 51 个柴银颗粒药效成分存在相关性。将其导入 Cytoscape 3.7.0 软件绘制柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在药效成分-作用靶点网络, 见图 2。网络分析发现该网络中共包含 65 个节点, 71 条边和 2 896 条最短路径, 网络中心度为 0.448, 平均邻居节点数为 2.185。

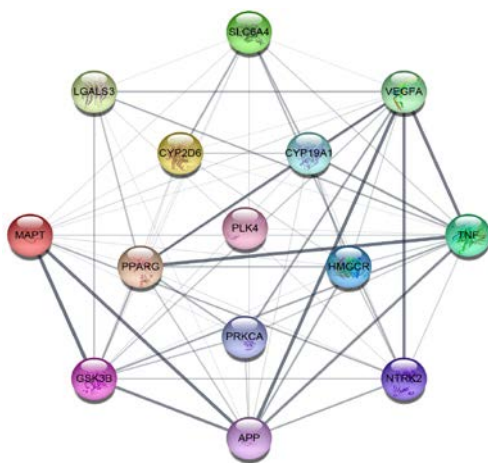
表 1 柴银颗粒药效成分信息

Table 1 Detailed information of medicinal ingredients of Chaixin Granules

编号	英文名	中文名	CAS 号	来源	编号	英文名	中文名	CAS 号	来源
CH-01	linoleyl acetate	(9E,12E)-9,12-十八碳二烯-1-基乙酸酯	5999-95-1	柴胡	HQ-10	5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone	5,7,2',6'-四羟基黄酮	82475-00-1	黄芩
CH-02	baicalin	黄芩苷	21967-41-9	柴胡	HQ-11	rivularin	黄芩黄酮	70028-59-0	黄芩
CH-03	stigmasterol	豆甾醇	83-48-7	柴胡	HQ-12	dihydrooroxilin A	二氢木蝴蝶素 A	18956-18-8	黄芩
CH-04	isorhamnetin	异鼠李素	480-19-3	柴胡	HQ-13	11,13-eicosadienoic acid, methyl ester	11,13-二十碳二烯酸甲酯	56599-57-6	黄芩
CH-05	kaempferol	山柰酚	520-18-3	柴胡	HQ-14	norwogonin	5,7,8-三羟基黄酮	4443-09-8	黄芩
CH-06	3',4',5',3,5,6,7-heptamethoxyflavone	3',4',5',3,5,6,7-庚甲氧基黄酮	17245-30-6	柴胡	HQ-15	(2S)-dihydrobaicalein	(2S)-二氢黄芩素	35683-17-1	黄芩
CH-07	arcapillin	茵陈蒿黄酮	83162-82-7	柴胡	HQ-16	carthamidin	红花素	479-54-9	黄芩
CH-08	cubebin	华澄茄素	18423-69-3	柴胡	HQ-17	oroxilin A	千层纸素	480-11-5	黄芩
CH-09	sainfuran		90664-32-7	柴胡	HQ-18	epiberberine	表小檗碱	6873-09-2	黄芩
CH-10	troxerutin	曲克芦丁	7085-55-4	柴胡	HQ-19	bis [(2S)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate	双[(2S)-2-乙基己基]苯-1,2-二甲酸酯	117-81-7	黄芩
CH-11	(+)-anomalin	(+)-川白芷内酯	73069-28-0	柴胡	HQ-20	diisooctyl phthalate	邻苯二甲酸二异辛酯	42925-96-2	黄芩
CH-12	α -spinasterol	α -菠甾醇	481-18-5	柴胡	HQ-21	moslosooflavone	5-羟基-7,8-二甲氧基黄酮	3570-62-5	黄芩
CH-13	petunidin	矮牵牛色素	1429-30-7	柴胡	HQ-22	viscidulin II	粘毛黄芩II	92519-93-2	黄芩
CH-14	quercetin	槲皮素	117-39-5	柴胡					

续表 1

编号	英文名	中文名	CAS 号	来源	编号	英文名	中文名	CAS 号	来源
JYH-01	all- <i>trans</i> -rhodoxanthin	全反式红黄素	116-30-3	金银花	HQ-23	salvigenin	三裂尾草素	19103-54-9	黄芩
JYH-02	chryseriol	金圣草素	491-71-4	金银花	HQ-24	(2 <i>R</i>)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	(2 <i>R</i>)-7-羟基-5-甲氧基-2-苯基苯并吡喃-4-酮		黄芩
JYH-03	luteolin	木犀草素	491-70-3	金银花	HQ-25	skullcapflavone II	黄芩新素	55084-08-7	黄芩
JYH-04	β -sitosterol	β -谷甾醇	83-46-5	金银花	HQ-26	skullcapflavone I	黄芩黄酮I	41060-16-6	黄芩
JYH-05	eriodictiol (flavanone)	黄烷酮	4049-38-1	金银花	GG-01	formononetin	刺芒柄花素	485-72-3	葛根
JYH-06	mandenol	亚油酸乙酯	544-35-4	金银花	GG-02	3'-methoxydaidzein	7,4'-二羟基-3'-甲氧基异黄酮	21913-98-4	葛根
JYH-07	xylostosidine	木犀草碱	74518-57-3	金银花	GG-03	daidzein-4,7-diglucoside	黄豆苷元-4,7-二葡萄糖苷	53681-67-7	葛根
JYH-08	ethyl linolenate	亚麻酸乙酯	1191-41-9	金银花	BH-01	fortunellin	金柑苷	20633-93-6	薄荷
JYH-09	7- <i>epi</i> -vogeloside	表断马钱子苷半缩醛内酯	118627-52-4	金银花	BH-02	linarin	蒙花苷	480-36-4	薄荷
JYH-10	corymbosin	伞房花耳草素	18103-41-8	金银花	BH-03	diosmetin	香叶木素	520-34-3	薄荷
LQ-01	wogonin	汉黄芩素	632-85-9	连翘	BH-04	naringenin	柚皮素	480-41-1	薄荷
LQ-02	arctiin	牛蒡子苷	20362-31-6	连翘	BH-05	eriodictyol	圣草酚	552-58-9	薄荷
LQ-03	phillyrin	连翘苷	487-41-2	连翘	BH-06	genkwanin	4',5'-二羟基-7-甲氧基黄酮	437-64-9	薄荷
LQ-04	β -amyrin acetate	β -香树脂醇乙酸乙酯	1616-93-9	连翘	JJ-01	schizonepetoside B	荆芥苷 B	78897-60-6	荆芥
LQ-05	hyperforin	贯叶金丝桃素	11079-53-1	连翘	JJ-02	campesterol	菜油甾醇	474-62-4	荆芥
LQ-06	adhyperforin	加贯叶金丝桃素	143183-63-5	连翘	JJ-03	(<i>Rac</i>)-hesperetin	(<i>Rac</i>)-橙皮素	69097-99-0	荆芥
LQ-07	dimethylmatairesinol	甲基牛蒡酚	25488-59-9	连翘	QH-01	eupatin	泽兰黄醇	19587-65-6	青蒿
LQ-08	mairin	白桦脂酸	472-15-1	连翘	QH-02	tamarixetin	怪柳黄素	603-61-2	青蒿
LQ-09	isolaricresinol	异落叶松脂素	548-29-8	连翘	QH-03	patuletin	万寿菊素	519-96-0	青蒿
LQ-10	bicuculline	荷包牡丹碱	485-49-4	连翘	QH-04	artemetin	艾黄素	479-90-3	青蒿
LQ-11	onjixanthone I	7-羟基-1,2,3-三甲氧基黄原酮	136083-92-6	连翘	QH-05	cirsimaritin	菊黄素	6601-62-3	青蒿
LQ-12	pinoresinol monomethyl ether	松脂醇单甲醚	29395-87-7	连翘	QH-06	artemisiten	青蒿烯	101020-89-7	青蒿
LQ-13	sylvatesmin	连翘脂素	487-39-8	连翘	QH-07	cirsiliol	条叶菊素	34334-69-5	青蒿
YXC-01	1-methyl-2-nonacosylqui nolin-4-one	1-甲基-2-壬酰基喹啉-4-酮		鱼腥草	KXR-01	estrone	雌酚酮	53-16-7	苦杏仁
HQ-01	coptisine	黄连碱	3486-66-6	黄芩	KXR-02	diisooctyl succinate	丁二酸二异辛酯	28880-24-2	苦杏仁
HQ-02	tenaxin I	芩黄素-I	86926-52-5	黄芩	KXR-03	11,14-eicosadienoic acid	顺-11,14-二十碳二烯酸	2091-39-6	苦杏仁
HQ-03	baicalein	黄芩素	491-67-8	黄芩	KXR-04	11-eicosenoic acid	顺式-11-二十碳烯酸	5561-99-9	苦杏仁
HQ-04	squalene	角鲨烯	111-02-4	黄芩	KXR-05	cholesterol	胆固醇	57-88-5	苦杏仁
HQ-05	5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮	160389-07-1	黄芩	KXR-06	glycyrol	甘草酚	23013-84-5	苦杏仁
HQ-06	acacetin	金合欢素	480-44-4	黄芩	KXR-07	licochalcone B	甘草查尔酮 B	58749-23-8	苦杏仁
HQ-07	4'-hydroxywogonin	4'-羟基汉黄芩素	57096-02-3	黄芩	KXR-08	liquiritin	甘草苷	551-15-5	苦杏仁
HQ-08	5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄烷酮	81524-08-5	黄芩	KXR-09	glabridin	光甘草定	59870-68-7	苦杏仁
HQ-09	5,8,2'-trihydroxy-7-methoxyflavone	5,8,2'-三羟基-7-甲氧基黄酮	77056-20-3	黄芩	KXR-10	machiline	乌药碱	486-39-5	苦杏仁
					KXR-11	l-stepholidine	左旋千金藤啶碱	16562-13-3	苦杏仁
					JG-01	robinin	刺槐素	301-19-9	桔梗

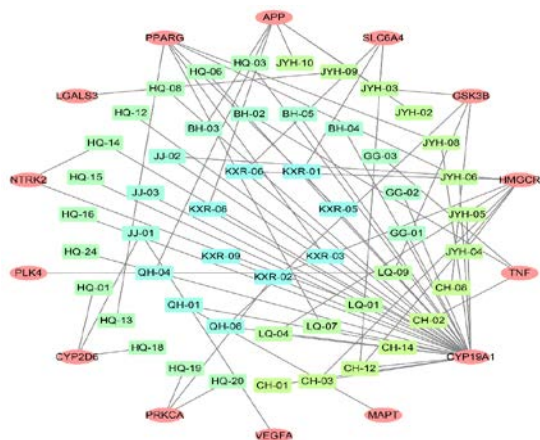


节点的不同颜色表示不同的靶点，节点内填充内容为靶点的 3D 结构；边的粗细表示相互作用得分，边越粗代表相互作用得分越高，说明这两个节点的相互作用证据越多

different colors of nodes indicate different targets, and the filling content in the nodes is the 3D structure of the target; the thickness of the line indicates the interaction score, the thicker the line indicates the higher the representative interaction score, the more evidence that the two nodes interacted

图 1 柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在作用靶点互作网络

Fig. 1 Interaction diagram of potential role of Chaiyin Granules against coronavirus infection



CH 表示来源于柴胡的成分，JYH 表示来源于金银花的成分，LQ 表示来源于连翘的成分，HQ 表示来源于黄芩的成分，GG 表示来源于葛根的成分，BH 表示来源于薄荷的成分，JJ 表示来源于荆芥的成分，QH 表示来源于青蒿的成分，KXR 表示来源于苦杏仁的成分

CH represents the components derived from *Bupleurum chinense*, JYH represents the component derived from honeysuckle, LQ represents the component derived from *Forsythia suspensa*, HQ represents the component derived from *Scutellaria baicalensis*, GG represents the component derived from *Pueraria lobata*, BH represents the component derived from mint, JJ represents the component derived from *Schizonepeta tenuifolia*, QH means ingredients derived from *Artemisia annua*, KXR means ingredients derived from bitter almond

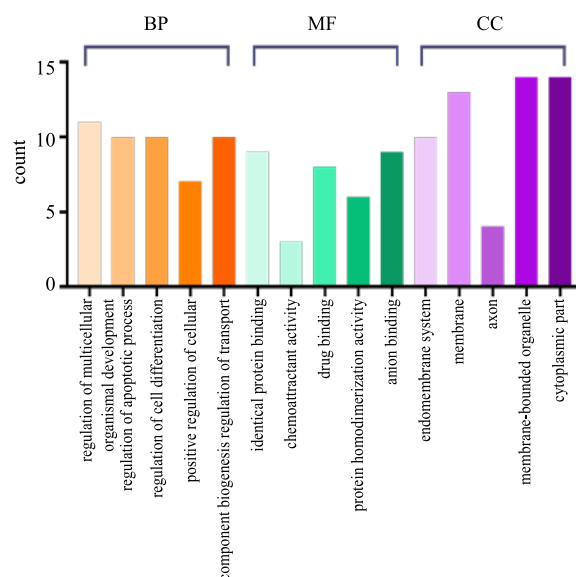
图 2 柴银颗粒抗冠状病毒感染的关键药效成分-作用靶点网络

Fig. 2 Diagram of key pharmacodynamic components -targets network of Chaiyin Granules against coronavirus infection

2.4 生物信息学分析

利用 STRING 数据库对柴银颗粒抗冠状病毒感染的 14 个潜在作用靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析。在 GO 功能富集分析过程中，共确定了 483 个 GO 条目，包括多细胞生物的发育调节、凋亡过程的调控、细胞分化的调节、细胞成分生物合成的正调控和运输调节等 410 条生物过程；蛋白聚合、化学引诱物活性、药物结合、蛋白质均二聚活性和阴离子结合等 37 个分子功能；内膜系统、膜、轴突、膜结合细胞器和细胞质片段等 36 条与细胞组成相关功能。图 3 展示了显著性前 15 的 GO 功能与其涉及靶点数的对应关系。

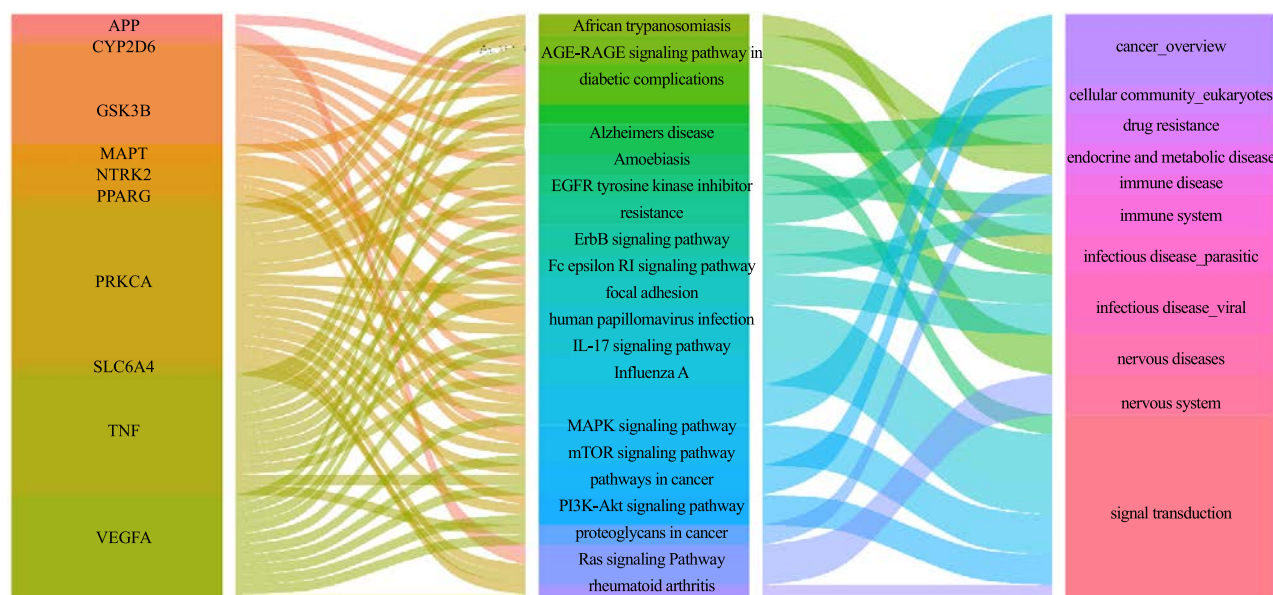
KEGG 通路富集分析显示共有 44 条代谢通路可能与柴银颗粒抗冠状病毒感染的分子机制相关，图 4 展示了显著性前 20 的代谢通路与 14 个潜在作用靶点之间的对应关系。结果显示这 20 条代谢通路主要富集于信号传递、免疫系统、病毒感染、神经系统和癌症等通路。既往研究表明信号传递、免疫系统相关通路与柴银颗粒抗冠状病毒感染的分子机制紧密相关。因此将重点关注 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、mTOR 信号通路、Ras 信号通



橙色柱代表生物过程相关功能，绿色柱代表分子功能相关功能，紫色柱代表细胞组分相关功能；颜色的不同明亮程度代表不同的功能
orange bars represent functions related to biological processes, green bars represent functions related to molecular functions, purple bars represent functions related to cell components; different colors are bright degrees represent different functions

图 3 柴银颗粒抗冠状病毒感染潜在作用靶点 GO 功能富集分析

Fig. 3 Results of GO functional analysis of potential targets of Chaiyin Granules against coronavirus infection



第 1 列展示的是靶点，不同的靶点用不同的颜色显示；第 2 列展示的是二级代谢通路，第 3 列展示的是一级代谢通路，不同的颜色表示不同的代谢通路；列与列之间的连线代表其所属关系，富集到越多通路的靶点所在长方形越高

the first column shows the target, different targets are shown in different colors; The second column shows the secondary metabolic pathway; The third column shows the first-level metabolic pathways, different colors indicate different metabolic pathways; The line between the columns represents its belonging relationship, and the more enriched pathways, the higher the rectangle is

图 4 柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在作用靶点 KEGG 通路富集分析结果

Fig. 4 Results of KEGG pathway enrichment analysis of potential targets of Chaiyin Granules against coronavirus infection

路、VEGF 信号通路、ErbB 信号通路、Fc epsilon RI 信号通路和 IL-17 信号通路在柴银颗粒抗冠状病毒感染机制中的作用，以及关键作用靶点 MAPT、NTRK2、PRKCa、TNF、VEGFA、GSK3 β 与药效成分之间的作用。

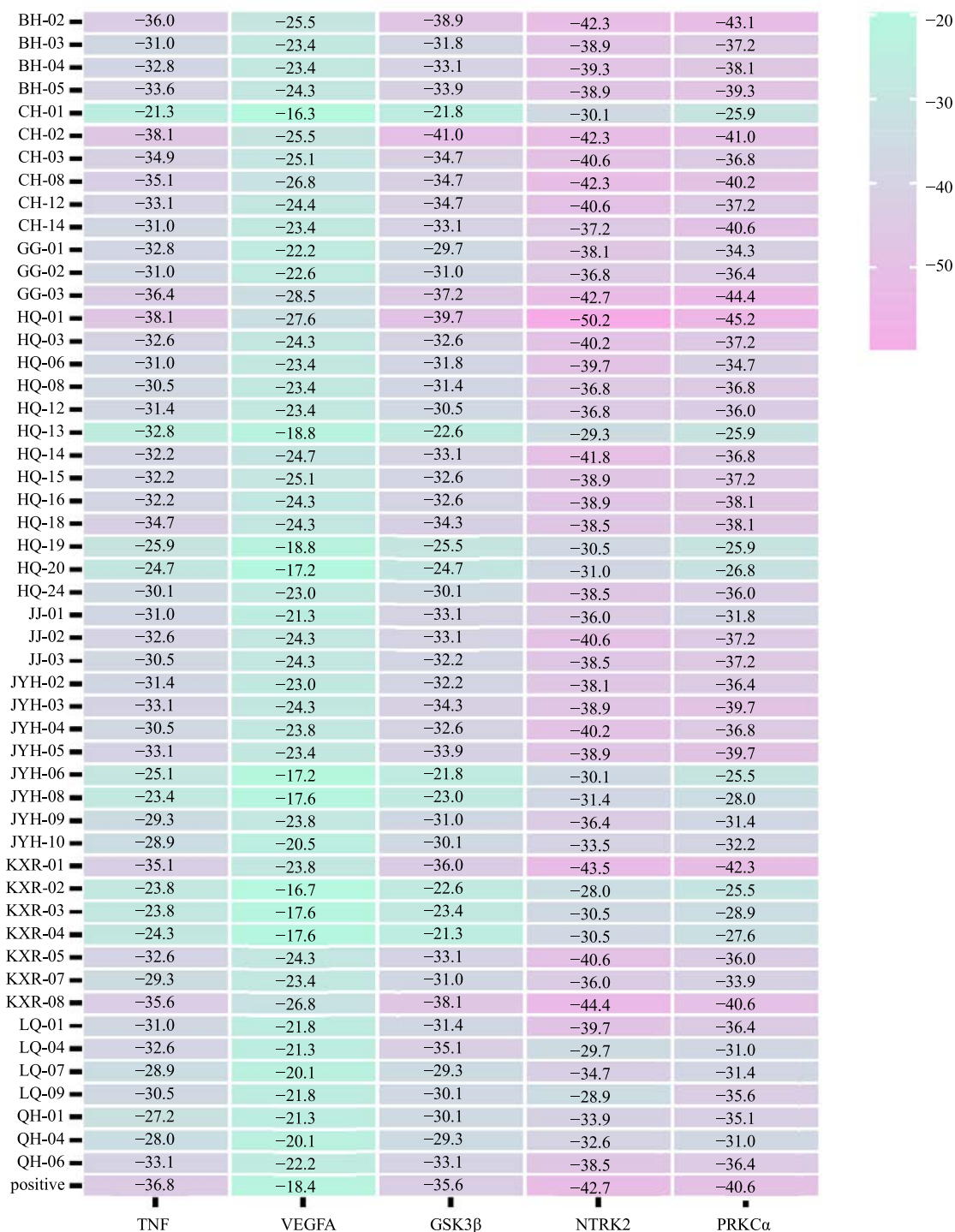
2.5 分子对接分析

对柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在药效成分和关键作用靶点进行分子对接分析。首先从 Pubchem 数据库和 PDB 数据库中分别获取 51 个潜在药效成分的 3D 结构和 5 个作用靶点的晶体结构 (MAPT 无合适晶体结构)。NTRK2 晶体结构的 PDB 号为 4AT3，配体为 LTI；PRKCa 晶体结构的 PDB 号为 3IW4，配体为 LW4；TNF 晶体结构的 PDB 号为 2AZ5，配体为 307；VEGFA 晶体结构的 PDB 号为 4KZN，配体为 NAG；GSK3 β 晶体结构的 PDB 号为 4J1R，配体为 I5R。将潜在药效成分和关键作用靶点的 3D 结构加氢去水去配体，再由 autodock vina 1.1.2 软件对其进行批量分子对接分析，结果如图 5、6 所示。结果表明柴银颗粒中的黄芩苷 (CH-02)、葎澄茄素 (CH-08)、黄连碱 (HQ-01)、黄豆苷元-4,7-二葡萄糖苷 (GG-03)、蒙花苷 (BH-02) 和甘草苷

(KXR-08) 与 NTRK2、PRKCa、TNF、VEGFA、GSK3 β 的结合能均小于与其原配体。而木犀草素 (JYH-03) 与 PRKCa 的结合能小于与其原配体、汉黄芩素 (LQ-01) 与 NTRK2 的结合能小于与其原配体。黄芩苷、葎澄茄素、黄连碱、黄豆苷元-4,7-二葡萄糖苷、蒙花苷、甘草苷、木犀草素、汉黄芩素为柴银颗粒抗冠状病毒感染的关键药效成分。

3 讨论

冠状病毒如 SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 均对人类公共卫生安全造成了巨大的打击，然而目前缺乏抗冠状病毒感染的高效药物。实践表明中医药对冠状病毒感染具有较好的疗效，因此寻找有效抗冠状病毒的中药是一项意义非常的课题。本实验通过网络分析发现柴银颗粒中的 51 个关键药效成分与 14 个蛋白靶点可能存在效应关系。对 14 个蛋白靶点进行生物信息学分析得到与柴银颗粒抗冠状病毒感染机制相关的通路有 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、mTOR 信号通路、Ras 信号通路、VEGF 信号通路、ErbB 信号通路、Fc epsilon RI 信号通路和 IL-17 信号通路，这些通路由 MAPT、NTRK2、PRKCa、TNF、VEGFA、GSK3 β

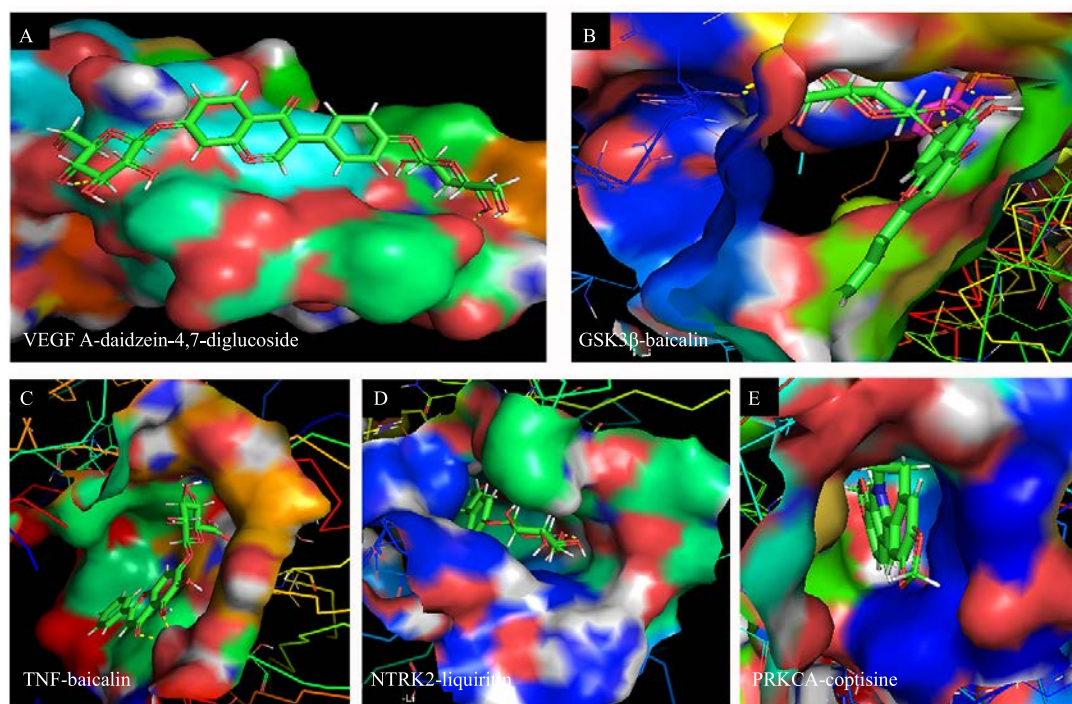


纵坐标为药效成分, CH、JYH、LQ、HQ、GG、BH、JJ、QH、KXR 分别表示来源于柴胡、金银花、连翘、黄芩、葛根、薄荷、荆芥、青蒿、苦杏仁的成分, positive 表示相应蛋白复合晶体中的内源性配体; 绿色表示结合能为-20 kJ/mol, 粉色表示结合能为-50 kJ/mol, 图中小方块内的数据即为成分与靶点的结合能数值

the ordinate is the active ingredient, CH, JYH, LQ, HQ, GG, BH, JJ, QH, KXR respectively represent the ingredients derived from *Bupleurum chinense*, honeysuckle, *Forsythia suspensa*, *Scutellaria*, *Pueraria lobata*, Mint, Nepeta, *Artemisia annua*, bitter almond. Positive represents the endogenous ligand in the corresponding protein composite crystal; Green represents the binding energy is -20 kJ/mol, pink means the binding energy is -50 kJ/mol, the data in the small square in the Fig. is the binding energy value of the component and the target

图 5 柴银颗粒抗冠状病毒感染的关键药效成分与作用靶点的分子对接结果-热图

Fig. 5 Heat map of molecular docking results of key targets and key targets Chaixin Granules against coronavirus infection



展示了 5 个结合能最低的药效成分-靶点作用模式, A 为 VEGFA 与黄豆苷元-4,7-二葡萄糖苷的对接模式图, B 为 GSK3 β 与黄芩苷的对接模式图, C 为 TNF 与黄芩苷的对接模式图, D 为 NTRK2 与甘草苷的对接模式图, E 为 PRKCA 与黄连碱的对接模式图

showing five pharmacodynamic components with the lowest binding energy-target action mode, A is VEGFA and daidzein-4,7-diglucoside docking mode diagram; B is the docking mode diagram of GSK3 β and baicalin; C is the docking mode diagram of TNF and baicalin; D is the docking mode diagram of NTRK2 and liquiritin; E is the docking mode diagram of PRKCA and coptisine

图 6 柴银颗粒抗冠状病毒感染的关键药效成分与作用靶点的分子对接模式图

Fig. 6 Molecular docking mode diagram of key pharmacodynamic components and target of Chaiyin Granules against coronavirus infection

富集得到。为了探究柴银颗粒的药效成分与蛋白靶点间的作用,分子对接实验结果表明黄芩苷、葎澄茄素、黄连碱、黄豆苷元-4,7-二葡萄糖苷、蒙花苷、甘草苷、木犀草素和汉黄芩素是柴银颗粒发挥抗冠状病毒感染的关键药效物质基础。

3.1 柴银颗粒药效成分抗冠状病毒的药理作用分析

网络分析发现柴银颗粒抗冠状病毒感染的 51 个关键药效成分主要来自柴胡、金银花、黄芩、连翘、葛根、薄荷、荆芥、青蒿和苦杏仁。研究已表明这些药材均存在一定的抗病毒活性。在我国 COVID-19 疫情爆发期间,小柴胡汤被推荐为治疗 COVID-19 的清肺排毒组方之一^[5-7]。黄芪、金银花、连翘和苦杏仁等药材在抗 COVID-19 中使用频率也较高^[8-10]。而且已有研究表明葛根、薄荷、荆芥和青蒿具有抗病毒的作用^[11-14]。

已有研究表明黄芩苷具有抗多种病毒(呼吸道合胞病毒、传染性法氏囊病毒和 SARS-CoV)的作用,其抗病毒机制可能是干扰病毒的复制和阻滞^[15-16]。葎澄茄素具有抗炎、抗癌、抗菌等多重功效,而且研

究表明葎澄茄素具有一定的抗疱疹病毒的活性^[17],结合本实验结果可以推断葎澄茄素可能也具有抗冠状病毒的作用。黄连碱作为甲型流感病毒神经氨酸酶的抑制剂,为抗甲型流感病毒感染治疗药物提供补充^[18]。另一方面黄连碱与氢氧化铝配伍可显著提高甲肝疫苗诱导小鼠的体液免疫应答,增强机体抗病毒的能力^[19]。黄豆苷元和黄豆苷元-糖苷作为抗流感病毒或轮状病毒(RNA 病毒)制剂已被申请了专利^[20],而且有研究表明黄豆苷元可通过 5-脂氧合酶产物的信号转导阻碍病毒复制,蒙花苷刺激外周血单核细胞产生 V-delta 1⁺ T 细胞,抑制 R5-HIV 病毒在 CD4⁺ NKT 细胞中的复制,这种作用呈现剂量依赖性^[21]。石钺等^[22]发现甘草苷是银翘散抗流感病毒的药效成分之一。学者成功利用木犀草素制备出抗登革热病毒药物和抗乙型肝炎病毒药物,其中木犀草素抑制了乙型肝炎表面抗原和乙型肝炎 E 抗原在乙型肝炎病毒中的表达^[23-24]。汉黄芩素已被报道具有抑制带状疱疹病毒、乙肝病毒和流感病毒的作用,其作用机制主要与单磷酸腺苷活化蛋白激酶信号通

路的调控相关^[25-27]。上述已有文献报道为本实验结果提供支持,即黄芩苷、荜澄茄素、黄连碱、黄豆苷元-4,7-二葡萄糖苷、蒙花苷、甘草苷、木犀草素和汉黄芩素可作为柴银颗粒发挥抗冠状病毒感染的关键药效物质基础。

3.2 核心靶点与抗冠状病毒感染机制的关联分析

基于网络药理学和生物信息学分析结果发现柴银颗粒抗冠状病毒感染的关键靶点包括 MAPT、NTRK2、PRKCa、TNF、VEGFA、GSK3 β 。研究发现过表达的 MAPT 通过抑制自噬体-溶酶体融合显著增加 SQSTM1/p62 蛋白质含量,而 p62 的稳定过表达可显著抑制登革热病毒复制^[28-29]。研究发现乙型肝炎的核心蛋白质可结合 DNA 启动子,诱导 NTRK2 的表达,但 NTRK2 在病毒感染过程中的具体作用尚不清晰。根据对不同信号通路的激活动力学和各种 PRKCa 抑制剂作用的研究,得到 PRKCa 的激活在呼吸道合胞体病毒感染的早期阶段非常重要,尤其是融合和复制阶段。呼吸道合胞体病毒可诱导 PRKCa 的磷酸化、活化和胞质到膜的转位。此外,PRKCa 与病毒颗粒共定位,是呼吸道合胞体病毒与细胞膜融合所必需的^[30]。因此 PRKCa 是抗呼吸道合胞体病毒的重要靶点。然而 PRKCa 是否在冠状病毒感染过程中发挥作用无文献报道。对 SARS-CoV 感染患者的血清分析发现感染期内 IFN γ 和 TNF- α 的水平显著升高,提高其在

SARS-CoV 的致病与免疫过程中可能起重要作用^[31]。另一项研究则提出 TNF- α 抑制剂可改善 SARS-CoV 感染引起的免疫性肺损伤^[32]。这提示 TNF- α 是治疗冠状病毒感染的关键药效靶点。已知血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 是治疗 HCoV-NL63、SARS-CoV、SARS-CoV-2 感染的关键靶标^[33]。VEGFA 则是 ACE2 的下游靶蛋白^[34],那么对 VEGFA 产生的调控是否对冠状病毒感染具有防御作用值得深究。甲型流感病毒感染血管内皮细胞诱导 GSK3 β 介导的连环蛋白在贴壁连接处的降解,使血管通透性增加,是甲型流感病毒致病的重要环节。GSK3 β 介导的连环蛋白降解在冠状病毒感染中的作用不得而知。

3.3 柴银颗粒抗冠状病毒感染机制分析

本研究通过网络药理学和分子对接技术揭示了柴银颗粒抗冠状病毒感染的潜在分子机制如图 7 所示。从生物信息学分析结果可以推断柴银颗粒抗冠状病毒感染的分子机制可能与以下通路相关: MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、mTOR 信号通路、Ras 信号通路、VEGF 信号通路、ErbB 信号通路、Fc epsilon RI 信号通路和 IL-17 信号通路。文献调研显示从 SARS-CoV 感染到细胞死亡, MAPK 信号通路是决定细胞死亡和存活的关键参与者。AKT 信号通路对于 SARS-CoV 建立持续感染也是非常重要的。细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK)/MAPK 和 PI3K-AKT/

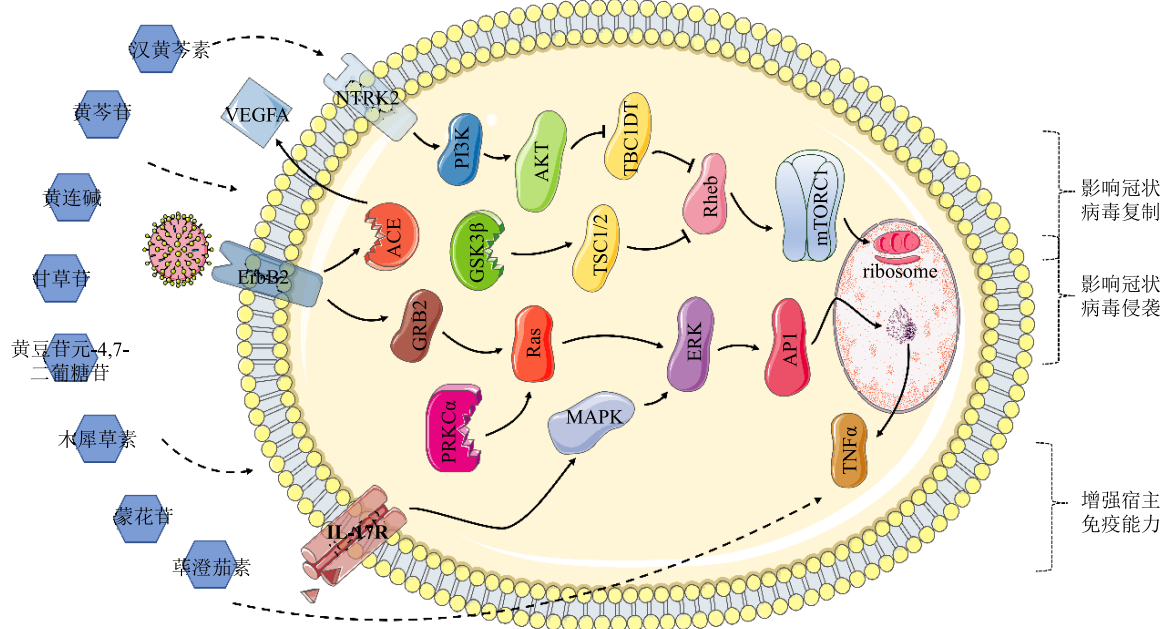


图 7 柴银颗粒抗冠状病毒感染的分子机制示意图

Fig. 7 Schematic diagram of molecular mechanism of Chaiyin Granules against coronavirus infection

mTOR 信号传导的调控具有抗 MERS-CoV 感染的潜能, 而且在病毒感染之前或之后添加一组靶向 ERK/MAPK 和 PI3K-AKT/mTOR 通路的激酶抑制剂, 都能显著抑制 MERS-CoV 在体外的复制^[35]。Chen 等^[36]的研究结果表明 SARS-CoV 的刺突蛋白会通过 ErbB2 触发 ACE2 激活, 并通过 Ras-ERK-AP1 途径激活纤维化相关的 CCL2 表达, 引起严重急性呼吸道综合征。已知凋亡在猫传染性腹膜炎病毒 (FIPV) 感染中起重要作用, Omar AbdulRahman 的研究则表明 MAPK 和 VEGF 等信号通路可能参与了凋亡过程, 对 FIPV 感染起调节作用^[37]。Fc epsilon RI 可能参与猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 感染过程中的抗原呈递过程和炎症反应的调控^[38]。SARS-CoV 和 MERS-CoV 都可诱导模式识别受体和 IL-17 信号通路激活, 产生的 IL-17 与抗病毒信号协同增强机体促炎反应, 造成机体的过度炎症, 对宿主具有破坏性^[39-40]。

综上所述, 柴银颗粒中的黄芩苷、萆薢茄素、黄连碱、黄豆苷元-4,7-二葡萄糖苷、蒙花苷、甘草苷、木犀草素和汉黄芩素与 NTRK2、PRKCa、TNF、VEGFA、GSK3 β 作用, 调节 PI3K-Akt/mTOR、ErbB/Ras 和 IL-17 信号通路抑制冠状病毒的侵袭和复制, 增强宿主免疫能力, 从而抗冠状病毒感染。

参考文献

- [1] 汪 婷, 项 前, 金培培, 等. 冠状病毒生物学特性、基因组结构及其诱导的免疫应答研究进展 [J]. 山东医药, 2020, 60(11): 102-105.
- [2] World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) situation report-100 [R]. 2020.
- [3] Luo E D, Zhang D Y, Luo H, *et al.* Treatment efficacy analysis of traditional Chinese medicine for novel coronavirus pneumonia (COVID-19): An empirical study from Wuhan, Hubei Province, China [J]. *Chin Med*, 2020, 15(1): 34.
- [4] 鲍岩岩, 时宇静, 郭姗姗, 等. 基于对免疫功能的调节探讨柴银颗粒对人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证的治疗作用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(13): 3020-3027.
- [5] 吕文亮. 基于《湖北省新型冠状病毒肺炎中医药防治指引 (试行)》的解读 [J]. 世界中医药, 2020, 15(2): 125-128.
- [6] 孙凯滨, 张新雨, 刘 静, 等. 小柴胡汤治疗早期新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 邪热郁肺、枢机不利证功效网络分析与机制预测 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1750-1760.
- [7] 杨 璐, 崔换天, 刘相国, 等. 基于网络药理学的小柴胡汤治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 发热的可行性探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1761-1775.
- [8] 刘子豪, 邢文龙, 曹新福, 等. 国医大师防治新型冠状病毒肺炎处方分析 [J]. 北京中医药, 2020, 39(3): 230-235.
- [9] 陈亚楠, 朱星昊, 苗明三, 等. 中医药防治新型冠状病毒肺炎的用药规律分析 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(5): 542-548.
- [10] 张美玲, 李 峰, 王聪聪, 等. 连翘抗病毒作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(10): 130-132.
- [11] Geng Z K, Li Y Q, Cui Q H, *et al.* Exploration of the mechanisms of Ge Gen Decoction against influenza A virus infection [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(9): 650-662.
- [12] 陈 飞. 薄荷抗呼吸道合胞病毒的有效物质基础研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [13] 何 婷, 汤 奇, 曾 南, 等. 荆芥挥发油及其主要成分抗流感病毒作用与机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1772-1777.
- [14] 张军峰, 郑鸿燕, 谭 健, 等. 青蒿鞣质抗单纯疱疹病毒机理初探 [J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13(1): 11-14.
- [15] Chen F, Chan K H, Jiang Y, *et al.* *In vitro* susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds [J]. *J Clin Virol*, 2004, 31(1): 69-75.
- [16] 丁 婵, 褚秀玲, 苏建青, 等. 黄芩苷抗病毒作用研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2016, 35(2): 27-29.
- [17] Sritularak B, Boonplod N, Lipipun V, *et al.* Chemical constituents of *Canarium subulatum* and their anti-herpetic and DPPH free radical scavenging properties [J]. *Rec Nat Prod*, 2013, 7(2): 129-132.
- [18] Zhou X L, Li H T, Shi Z L, *et al.* Inhibition activity of a traditional Chinese herbal formula Huang-Lian-Jie-Du-Tang and its major components found in its plasma profile on neuraminidase-1 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15549.
- [19] 李思瑾, 胡凝珠, 李彦涵, 等. 氢氧化铝与黄连碱复合佐剂对甲肝疫苗诱导小鼠体液免疫影响 [J]. 中国公共卫生, 2017, 33(5): 734-736.
- [20] Isekawa Y. Anti-RNA-virus agent with respect to influenza virus or rotavirus comprises daidzein, daidzein glycoside, glycitein, glycitein glycoside, soybean processed goods, *Secale cereale* processed goods, and adlay processed goods: Japan, JP2017088567A [P]. 2017-05-25.
- [21] Yonekawa M, Shimizu M, Kaneko A, *et al.* Suppression of R5-type of HIV-1 in CD4 + NKT cells by V δ 1 + T cells activated by flavonoid glycosides, hesperidin and linarin [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1-12.
- [22] 石 钺, 石任兵, 刘 斌, 等. 银翘散抗流感病毒有效部位群化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国中药杂志,

- 2003, 28(1): 43-47.
- [23] 李晓波, 陆雪莹, 祁红学, 等. 一种天然化合物木犀草素在抗乙型肝炎病毒中的用途: 中国, CN103142581A [P]. 2013-06-12.
- [24] 李 耿, 彭敏桦, 吴建国, 等. 木犀草素在制备防治登革热病毒感染的药物中的应用: 中国, CN106692127A [P]. 2017-05-24.
- [25] Choi E J, Lee C H, Kim Y C, *et al.* Wogonin inhibits Varicella-Zoster (shingles) virus replication via modulation of type I interferon signaling and adenosine monophosphate-activated protein kinase activity [J]. *J Funct Foods*, 2015, 17: 399-409.
- [26] Guo Q L, Zhao L, You Q D, *et al.* Anti-hepatitis B virus activity of wogonin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antivir Res*, 2007, 74(1): 16-24.
- [27] Seong R K, Kim J A, Shin O S. Wogonin, a flavonoid isolated from *Scutellaria baicalensis*, has anti-viral activities against influenza infection via modulation of AMPK pathways [J]. *Acta Virol*, 1900, 62(1): 78-85.
- [28] Feng Q, Luo Y, Zhang X N, *et al.* MAPT/Tau accumulation represses autophagy flux by disrupting IST1-regulated ESCRT-III complex formation: A vicious cycle in Alzheimer neurodegeneration [J]. *Autophagy*, 2020, 16(4): 641-658.
- [29] Metz P, Chiramel A, Chatel-Chaix L, *et al.* Dengue virus inhibition of autophagic flux and dependency of viral replication on proteasomal degradation of the autophagy receptor p62 [J]. *J Virol*, 2015, 89(15): 8026-8041.
- [30] San-Juan-vergara H, Peebles M E, Lockey R F, *et al.* Protein kinase C- α activity is required for respiratory syncytial virus fusion to human bronchial epithelial cells [J]. *J Virol*, 2004, 78(24): 13717-13726.
- [31] 江振友, 周经姣, 方丹云, 等. SARS-CoV 感染者血清 IFN- γ 和 TNF- α 的动态变化及其意义 [J]. 免疫学杂志, 2004, 20(4): 285-287.
- [32] Tobinick E. TNF- α inhibition for potential therapeutic modulation of SARS coronavirus infection [J]. *Curr Med Res Opin*, 2004, 20(1): 39-40.
- [33] Li W H, Sui J H, Huang I C, *et al.* The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2 [J]. *Virology*, 2007, 367(2): 367-374.
- [34] Feng Y, Wan H Y, Liu J L, *et al.* The angiotensin-converting enzyme 2 in tumor growth and tumor-associated angiogenesis in non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(4): 941-948.
- [35] Kindrachuk J, Ork B, Hart B J, *et al.* Antiviral potential of ERK/MAPK and PI₃K/AKT/mTOR signaling modulation for Middle East respiratory syndrome coronavirus infection as identified by temporal kinome analysis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(2): 1088-1099.
- [36] Chen I Y, Chang S C, Wu H Y, *et al.* Upregulation of the chemokine (C-C motif) ligand 2 via a severe acute respiratory syndrome coronavirus spike-ACE2 signaling pathway [J]. *J Virol*, 2010, 84(15): 7703-7712.
- [37] Shuid A N, Safi N, Haghani A, *et al.* Apoptosis transcriptional mechanism of feline infectious peritonitis virus infected cells [J]. *Apoptosis*, 2015, 20(11): 1457-1470.
- [38] Shi P D, Zhang L L, Wang J S, *et al.* Porcine Fc ϵ RI mediates porcine reproductive and respiratory syndrome virus multiplication and regulates the inflammatory reaction [J]. *Virol Sin*, 2018, 33(3): 249-260.
- [39] Josset L, Menachery V D, Gralinski L E, *et al.* Cell host response to infection with novel human coronavirus EMC predicts potential antivirals and important differences with SARS coronavirus [J]. *mBio*, 2013, 4(3): e00165-e00113.
- [40] Ryzhakov G, Lai C C K, Blazek K, *et al.* IL-17 boosts proinflammatory outcome of antiviral response in human cells [J]. *J Immunol*, 2011, 187(10): 5357-5362.