

基于网络药理学和分子对接技术探讨儿童回春颗粒治疗呼吸道感染疾病的作用机制

张辛宁^{1,2}, 陈文璐^{2,3#}, 屠国丽⁴, 严诗楷¹, 李莎莎^{2*}, 马贤鹏^{4*}, 万力生³, 肖雪⁵

1. 上海交通大学药学院, 上海 200240

2. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120

3. 广州中医药大学深圳市儿童医院, 广东 深圳 518038

4. 贵州景诚制药有限公司, 贵州 贵阳 550200

5. 广东药科大学中医药研究院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 利用网络药理学及分子对接技术探索儿童回春颗粒治疗呼吸道感染疾病的作用机制。方法 通过 TCMIP、TCMSP、BATMAN-TCM 数据库, 结合文献检索汇总儿童回春颗粒的药材归经及其成分信息; 在 PubChem、Swiss target prediction、GeneCards 等数据库查询呼吸道感染相关靶点及药物成分对应的靶点; 利用 DAVID 数据库对共有靶点进行 KEGG 通路和 GO 生物过程富集分析; 用 Cytoscape 构建相关网络图, 根据网络图分析结果选取成分、靶点进行分子对接。结果 中药-归经网络分析发现儿童回春颗粒组方药材大多归经于肺、胃、肝经, 针对儿童回春颗粒中的 126 个中药成分和 55 个潜在靶点构建网络, KEGG 通路分析和 GO 功能分析表明儿童回春颗粒治疗呼吸道感染主要包括癌症、肝炎相关通路、PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路和 HIF-1 信号通路等关键通路, 主要涉及炎症反应、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、缺氧反应等生物过程。分子对接结果显示升麻中的 7,8-二羟基升麻醇、升麻素苷、升麻醇与关键靶点 PTGS2、MAPK、ACE2 和 3CL 水解酶 (3CLpro) 的结合能力较强, 具有潜在抗呼吸道感染作用。结论 儿童回春颗粒中没食子酸、7,8-二羟基升麻醇、升麻素苷、升麻醇、珊瑚菜素等成分通过 PTGS2、EGFR、MAPK、IL2、ACE2、3CLpro 等靶点干扰病毒入侵宿主、阻止病毒复制、降低炎症反应而发挥治疗呼吸道感染性疾病的作用。

关键词: 儿童回春颗粒; 呼吸道感染疾病; 网络药理学; 分子对接; 作用机制; 7,8-二羟基升麻醇; 升麻素苷; 升麻醇
中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)19-5010-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.020

Mechanisms of Ertong Huichun Granules in treatment of respiratory virus infection diseases by network pharmacology and molecular docking

ZHANG Xin-ning^{1,2}, CHEN Wen-lu^{2,3}, TU Guo-li⁴, YAN Shi-kai¹, LI Sha-sha², MA Xian-peng⁴, WAN Li-sheng³, XIAO Xue⁵

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

2. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

3. Shenzhen Children's Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518038, China

4. Guizhou Jingcheng Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550200, China

5. Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Ertong Huichun Granules in treatment of respiratory virus infection diseases by network pharmacology and molecular docking. **Methods** TCMIP, TCMSP and BATMAN-TCM databases were used to search and summarize the meridian and components of medicinal materials from Ertong Huichun Granules. PubChem and Swiss Target Prediction

收稿日期: 2020-03-11

基金项目: 广东省中医儿科重点建设单位项目 (粤中医办函[2018] 202 号)

作者简介: 张辛宁 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药系统生物学。Tel: (021)34205989 E-mail: 15541993662@163.com

*通信作者 李莎莎, 女, 助理研究员, 研究方向为中医药系统生物学。Tel: (020)39318473 E-mail: happylishasha@163.com

马贤鹏, 男, 高级工程师, 研究方向为中药质量分析。Tel: (021)66861001 E-mail: maxianpeng@jzfzhiao.com

#并列第一作者 陈文璐 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中医药系统生物学。Tel: (020)39318473 E-mail: chenwenlu2266@163.com

database were used to query the targets corresponding to the active components, and the respiratory virus infection-related targets were inquired in the GeneCards database. The KEGG pathway and GO biological process enrichment were analyzed by DAVID database, and the relevant network was constructed by Cytoscape software. According to the analysis results of the network diagram, components and targets were selected for molecular docking. **Results** The herbs in Ertong Huichun Granules were most attributed to lung, stomach, liver meridian; combining database and literature retrieval. A total of 126 Chinese native medicine ingredients and 55 targets were ensured for constructing network. KEGG pathways mainly included cancer, hepatitis related pathways, PI3K-Akt signaling pathway, TNF signaling pathway, and HIF-1 signaling pathway, which were mainly involved in inflammatory response, transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway, hypoxia response, and other biological processes. Molecular docking results showed that 7,8-didehydrocimigenol, cimicifugoside, and cimigenol from *Cimicifuga foetida* had good binding capacity with PTGS2, MAPK, ACE2, and 3CL hydrolase (3CLpro), and maybe have potential anti-respiratory virus effects. **Conclusion** Gallic acid, 7,8-didehydrocimigenol, ccimicifugoside, baicalin, and other ingredients from Ertong Huichun Granules can be through PTGS2, EGFR, MAPK, IL2, ACE2, and 3CLpro targets for reducing inflammatory reaction, interference virus invasion of the host and inhibiting the virus replication to play the role of treating the respiratory virus infection diseases.

Key words: Ertong Huichun Granules; respiratory virus infection diseases; network pharmacology; molecular docking; mechanism; 7,8-didehydrocimigenol; cimicifugoside; cimigenol

呼吸道病毒感染疾病是人类最常见的疾病之一, 严重威胁人们的生命健康^[1]。引起感染的呼吸道病毒主要包括流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒和冠状病毒等^[2]。近年来, 全球范围内逐渐出现一些引起呼吸道感染的新型高致病性病毒, 病死率普遍较高, 如严重急性呼吸综合征 (SARS)、中东呼吸综合征 (MERS)、甲型 H5N1 人禽流感病毒和新甲型 H1N1 流感病毒等, 以及 2019 年底开始在世界范围内大流行的新型冠状病毒肺炎 (COVID-19), 都对全球公共卫生构成了巨大威胁^[3]。

在现代医学中, 主要使用金刚烷类 (如金刚烷胺、金刚烷乙胺) 和神经氨酸苷酶抑制剂 (如扎纳米韦和奥司他韦) 作为抗流感病毒药物, 而对于其他呼吸道病毒尚无有效的针对性治疗手段, 多采用广谱抗病毒药物或激素治疗, 但广谱抗病毒药物耐药率高^[2]; 激素治疗虽然能在短时间内减轻炎症反应, 降低治疗失败的发生率, 但可能伴随着侵袭性真菌感染、骨坏死等风险^[4]。中医将呼吸道病毒感染辨证为感冒、咳嗽、风湿肺热等, 中药治疗此类疾病主要优势不在于抗病毒, 而是调整人体免疫状态^[5]。在 2003 年抗击 SARS 过程中已经初步体现了中药治疗呼吸道病毒感染的优势^[6], 如减少继发真菌感染、缩短发热时间、减轻肺部炎症等。此次抗 COVID-19 的过程中, 国家和地方均将中医药纳入诊疗方案, 在对症治疗的同时益气扶正、顾护脾胃, 贵州省中医药管理局在《贵州省新型冠状病毒肺炎中医药防治参考方案 (第二版)》中将儿童回春颗粒作为 COVID-19 轻症中成药的推荐用药^[7-9]。中药治

疗呼吸道病毒感染具有良好的应用前景。

临床试验证实了儿童回春颗粒在治疗小儿上呼吸道感染具有良好效果, 且安全性好^[10-11]; 同时, 也有研究表明儿童回春颗粒对感冒引起的消化道症状、轮状病毒引起的肠炎等有明显改善作用^[12-13]。儿童回春颗粒由水牛角浓缩粉、羚羊角、防风、升麻、荆芥等 20 味中药组成, 主要功效为清热解毒、透表豁痰; 用于急性惊风、伤寒发热、临夜发烧、小便带血、麻疹隐现不出引起的身热咳嗽以及赤痢、水泻、食积、腹痛等消化道疾病^[14-15]。但儿童回春颗粒发挥抗病毒作用的机制尚未明确。因此, 本研究采用网络药理学方法和分子对接技术探索儿童回春颗粒治疗呼吸道病毒感染疾病的作用机制, 为其在呼吸道病毒感染性疾病的临床使用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 成分信息

通过 TCMIP^[16] 数据库 (<http://www.tcmip.cn/TCMIP/>) 并结合文献调研, 查询儿童回春颗粒中的药材的性味归经信息。在 TCMSP^[17] 数据库 (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 中以口服生物利用度 (OB) > 30%、类药性 (DL) > 0.18, BATMAN-TCM^[18] 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 中以默认值 (Score cutoff > 20、 $P < 0.05$) 为筛选条件, 同时结合文献检索, 得到儿童回春颗粒组方药材的潜在有效成分。

1.2 潜在靶点库的建立

在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中查询有效成分的 SMILES 字符串, 并将

其输入 SwissTargetPrediction 网站^[19] (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 进行化合物的靶点预测, 建立儿童回春颗粒成分靶点库。

通过文献检索汇总常见呼吸道病毒, 在 GeneCards^[20] 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中分别以 “influenza virus” “human parainfluenza virus” “respiratory syncytial virus” “measles virus” “rubella virus” “MERS-CoV” “SARS-CoV” “HCoV-229E” “HCoV-OC43” “HCoV-NL63” “HCoV-HKU1” “ECHO virus” “coxsackie virus” “cytomegalovirus” “rhinovirus” “adenovirus” “human metapneumovirus” 为关键词搜索, 选取评价分数大于 10 分的靶点建立呼吸道病毒感染靶点库。

利用将中药成分靶点与呼吸道病毒靶点进行交集得出二者共同靶点, 作为儿童回春颗粒治疗呼吸道病毒感染的潜在靶点。

1.3 富集分析

将潜在靶点列表导入 DAVID^[21] 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 物种选择为 “Homo sapiens”, 进行结合基因本体论 (gene ontology, GO) 分析和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析, 利用在线工具 ImageGP (<http://www.ehbio.com/ImageGP/>) 将其结果可视化。

1.4 网络构建

根据 “1.1” 项中得到的药材归经信息, 利用

Cytoscape 3.7.1 软件^[22] 构建中药-归经网络图; 将药材-成分和成分-潜在靶点关系导入 Cytoscape 3.7.1 软件中利用 Merge 功能构建药材-成分-潜在靶点网络图, 并进一步分析网络度 (degree) 值, 以 degree 值较高的成分作为候选药效成分用于分子对接。

1.5 分子对接

在 TCMSP 数据库中下载儿童回春颗粒候选药效成分的 3D 结构信息; 在 Pubchem 数据库中下载临床抗呼吸道病毒感染药物 3D 结构信息; 在 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中下载呼吸道病毒的候选靶点蛋白的 3D 结构, 并导入 AutodockTool^[23] 软件对靶蛋白进行清除配体、水及加氢、加电等修饰。最后利用 Autodock 4.0, 将候选药效成分、候选抗病毒药物与经前处理后的靶蛋白进行对接运算分析, 对接运算采用拉马克遗传算法, 具体参数设置为以蛋白活性口袋作为盒子的中心坐标, 格点数为 $6\text{ nm} \times 6\text{ nm} \times 6\text{ nm}$, 格点距离间隔为 0.0375 nm , 其余为默认参数。

2 结果

2.1 中药-归经分析

根据 TCMIP 数据库和文献检索搜集并分析儿童回春颗粒复方中的中药归经信息, 并构建中药-归经网络图, 见图 1。连接度较大的经络为肺 (lung)、胃 (stomach)、肝 (liver)、心 (heart)、脾 (spleen) 等经络; 连接度较大的药物为黄芩、黄连、升麻、地黄、川木通等药物。

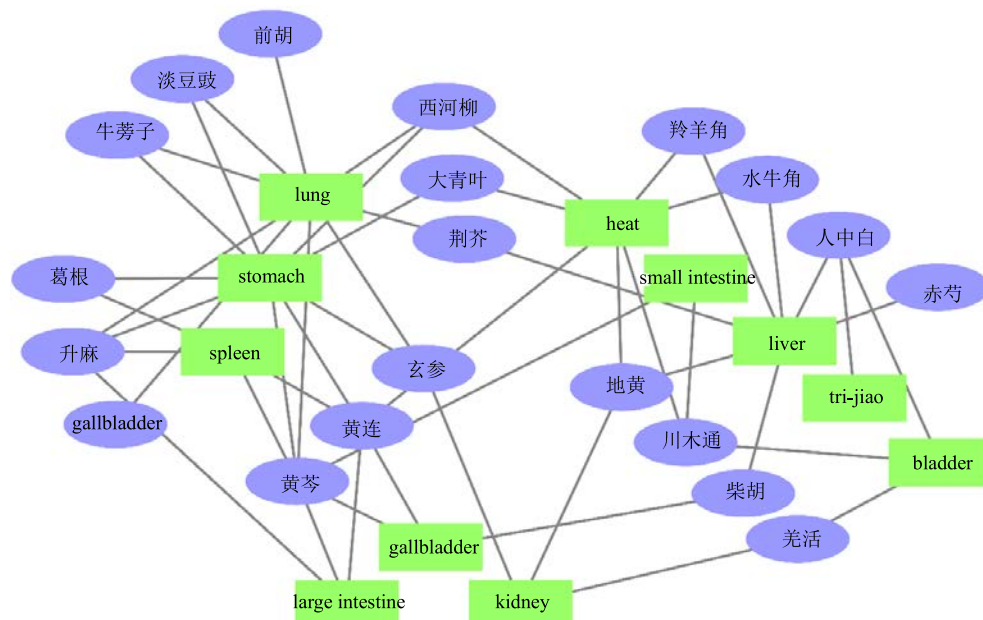


图 1 中药-归经网络

Fig. 1 Herb-meridian network

2.2 儿童回春颗粒成分库建立

根据 TCMSP 数据库和 BATMAN-TCM 数据库

同时结合文献检索, 最后共得到儿童回春颗粒的 126 个有效成分, 见表 1。

表 1 儿童回春颗粒的有效成分
Table 1 Active ingredients of Ertong Huichun Granules

药材	归经	化合物数	主要成分
黄芩	肺、脾、胃、胆、大肠、小肠	31	去甲汉黄芩素苷、山姜苷、二氢木蝴蝶素
前胡	肺	18	紫花前胡素、8-甲氧基异欧前胡内酯、珊瑚菜素
黄连	心、脾、胃、胆、大肠	13	小檗碱、甲基黄连碱、广玉兰内酯
赤芍	肝	12	没食子酸、芍药苷元、苯甲酰芍药苷
柴胡	肝、胆	12	牵牛花色素、亚油酰乙酸酯、羟基羽扇豆烷宁
西河柳	心、肺、胃	12	豆甾-4-烯-3,6-二酮、24-亚甲基环木菠萝烷醇
羌活	膀胱、肾	11	香柑素、香橙内酯、珊瑚菜素
荆芥	肺、肝	10	木犀草素、香叶木素、 β -谷甾醇
升麻	肺、脾、胃、大肠	10	升麻醇、升麻酸、升麻素苷
大青叶	心、胃	9	异牡荆苷、 γ -谷甾醇、梨果仙人掌黄质
牛蒡子	肺、胃	8	朝鲜蓟酸、牛蒡苷、 β -胡萝卜素
水牛角	心、肝	5	精氨酸、天冬氨酸、胆固醇
葛根	脾、胃	4	3'-甲氧基大豆苷元、芒柄花黄素
玄参	肺、胃、肾	4	土可玄参苷、柳杉酚
地黄	心、肝、肾	3	梓醇、氨基丁酸、毛蕊花糖苷
桔梗	肺、肝、胆	3	木犀草素、菠菜甾醇
川木通	心、小肠、膀胱	3	豆甾醇、谷甾醇
淡豆豉	肺、胃	2	6"-O-丙二酸单酰黄豆黄苷、黄豆黄素

2.3 潜在靶点库的建立

在 SwissTargetPrediction 网站上传中药成分结构信息后进行化合物的靶点预测, 根据预测得分选取每个成分前 20 个靶点纳入成分靶点库中, 最后去除重复结果共得到儿童回春颗粒有效成分的作用靶点 603 个。

通过文献检索汇总引起呼吸道感染的病毒, 见表 2, 病毒的种类主要包括正粘病毒科、副粘病毒科、冠状病毒、肠病毒和其他病毒, 通过 GeneCards 数据库检索得到呼吸道病毒感染相应靶点, 根据评价分数大于 10 进行筛选, 最终获得 402 个重要靶点。

将儿童回春颗粒成分靶点与呼吸道病毒靶点进行交集, 得出二者共同靶点 55 个, 如图 2 所示, 作为通路富集和及网络研究的候选靶点。

2.4 富集分析

将共有靶点列表导入“DAVID”数据库后得到富集分析结果, 根据 P 值大小筛选出前 10 条 KEGG 通路 (图 3) 和前 10 条 GO 生物过程条目 (表 3)。KEGG 通路图中, 纵坐标代表富集的通路名称,

表 2 引起呼吸道感染的常见病毒

Table 2 Common virus causing respiratory infections

种类	名称	靶点数
正粘病毒科	流感病毒	271
副粘病毒科	人类副流感病毒	8
	呼吸道合胞病毒	42
	麻疹病毒	168
	风疹病毒	119
冠状病毒	MERS-CoV	1
	SARS-CoV	35
	HCoV-229E	2
	HCoV-OC43	1
	HCoV-NL63	1
	HCoV-HKU1	1
肠病毒	埃可病毒	1
	柯萨奇病毒	8
其他病毒	巨细胞病毒	48
	鼻病毒	6
	腺病毒	21
	人偏肺病毒	62

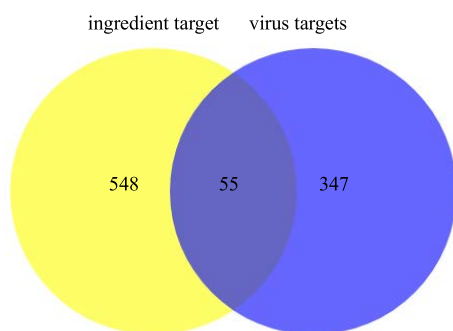


图 2 儿童回春颗粒成分靶点与呼吸道病毒靶点的共有靶点
Fig. 2 Common targets between Ertong Huichun Granules ingredient targets and respiratory virus targets

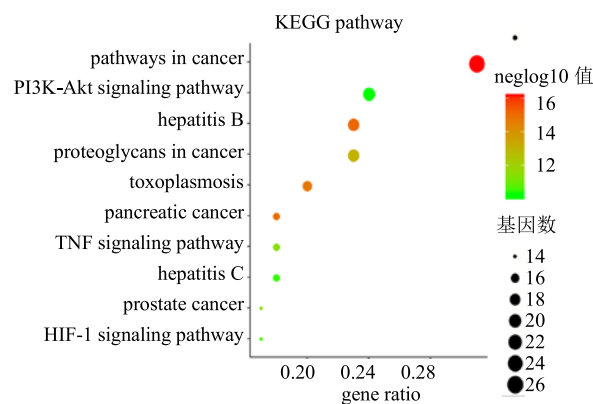


图 3 KEGG 通路分析气泡图
Fig. 3 Bubble diagram of KEGG pathway analysis

表 3 GO 生物过程富集分析

Table 3 GO biological process enrichment analysis

GO 条目	生物过程	富集基因数	富集基因
GO:0006954	inflammatory response	7	SELP、CCR5、PTGS2、CCR1、RELA、JAK2、TLR9
GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	5	TYK2、EGFR、ERBB2、MET、JAK2
GO:0018105	peptidyl-serine phosphorylation	5	MAPK1、MAPK14、BCL2、MTOR、CDK2
GO:0031663	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	4	MAPK1、TNF、MAPK14、MAPK3
GO:0038083	peptidyl-tyrosine autophosphorylation	4	TYK2、MAPK3、JAK2、SRC
GO:0033138	positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	4	TNF、BCL2、VEGFA、PIK3CA
GO:0001666	response to hypoxia	4	VEGFA、MECP2、CASP1、DPP4
GO:0060020	Bergmann glial cell differentiation	3	MAPK1、MAPK3、PTPN11
GO:0030278	regulation of ossification	3	MAPK1、MAPK14、MAPK3
GO:2000811	negative regulation of anoikis	3	BCL2、PIK3CA、SRC

横坐标为每条通路上的基因数占共有靶点的比例。

由图 3 可知, 55 个共同靶点主要富集在癌症相关通路、乙型肝炎及丙型肝炎相关通路、PI3K-Akt 信号、TNF 信号通路以及 HIF-1 信号通路等; 由表 3 可知, 涉及到的主要生物过程包括炎症反应、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、肽基丝氨酸磷酸化、脂多糖介导信号通路、缺氧反应、伯格曼胶质细胞分化、骨化调节、失巢凋亡负性调节等生物过程。

2.5 网络构建及网络分析

利用 Cytoscape 3.7.1 软件构建药材-成分-共有靶点网络图 (图 4)、潜在靶点-通路网络图 (图 5), 其中黄色节点代表药材, 蓝色节点代表药效成分 (S1-S126), 红色节点代表成分与呼吸道病毒感染的共同靶点, 紫色节点代表富集通路。

在药材-成分-潜在靶点网络图中, 来自 18 味药材中的 126 个成分能够作用于 55 个靶点, 这体现了中药复方多药材-多成分-多靶点的作用特点, 通过分析发现 degree 较高的成分主要包括 S31 (没食子酸)、S84 (7,8-二羟基升麻醇)、S87 (升麻素苷)、S88 (升麻醇)、S121 (珊瑚菜素)、S124 (菠菜甾醇)、S110 (黄芩苷)、S27 (8-甲氧基异欧前胡内酯)、S25 (大豆素-4',7-二葡萄糖苷)、S2 (穆坪马兜铃酰胺)、S1 (广玉兰内酯) 等, 这些成分主要来自升麻、赤芍、黄芩、黄连、前胡、羌活、葛根等; 而药材-成分-潜在靶点网络图中 degree 较高的靶点主要包括前列腺素内过氧化物合酶 (PTGS2)、表皮生长因子受体 (EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、白细胞介素 2 (IL2)、 β -分泌酶 1 (BACE1)

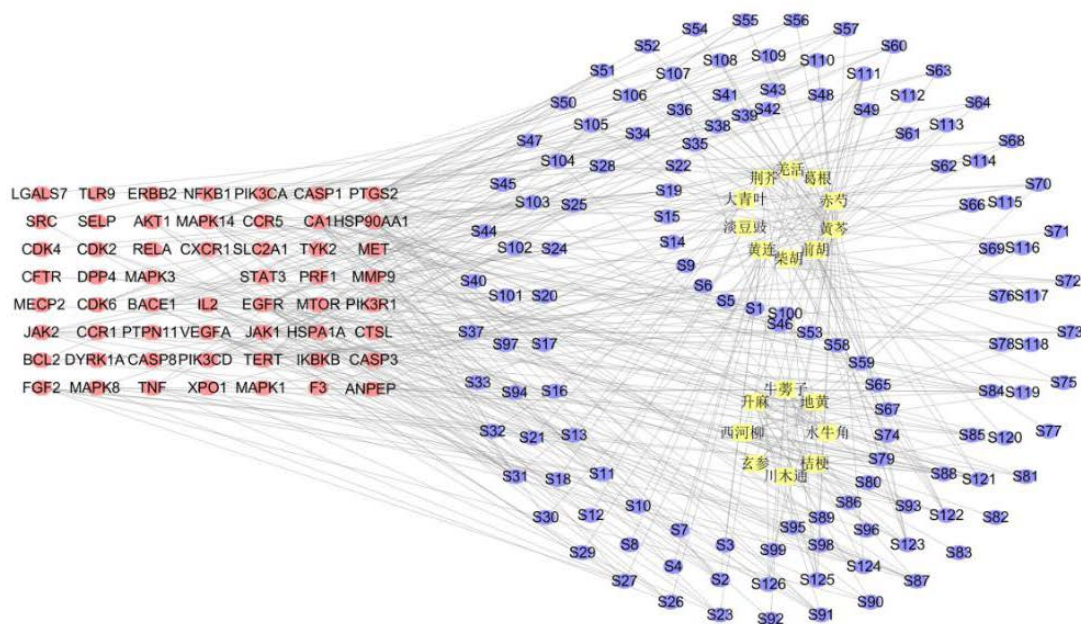


图 4 药材-成分-潜在靶点网络图
Fig. 4 Herbs-ingredients-common targets network

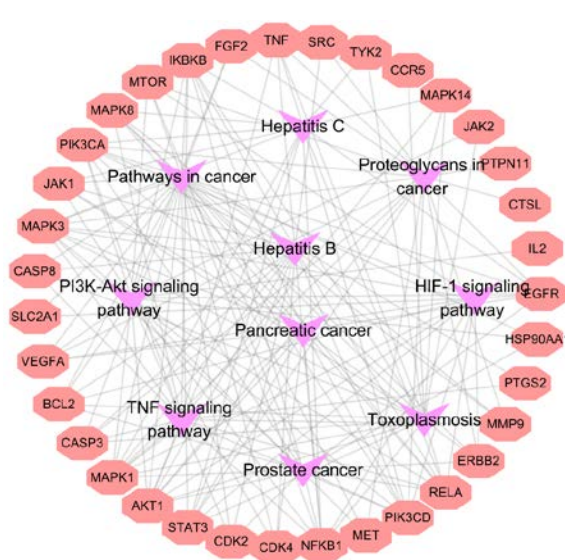


图 5 潜在靶点-通路网络
Fig. 5 Potential targets-pathway network

等。在潜在靶点-通路网络图中，发现 PTGS2、MAPK、IL2、EGFR 均富集在重要通路中包括癌症相关通路、肝炎相关通路、TNF 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路。

2.6 分子对接

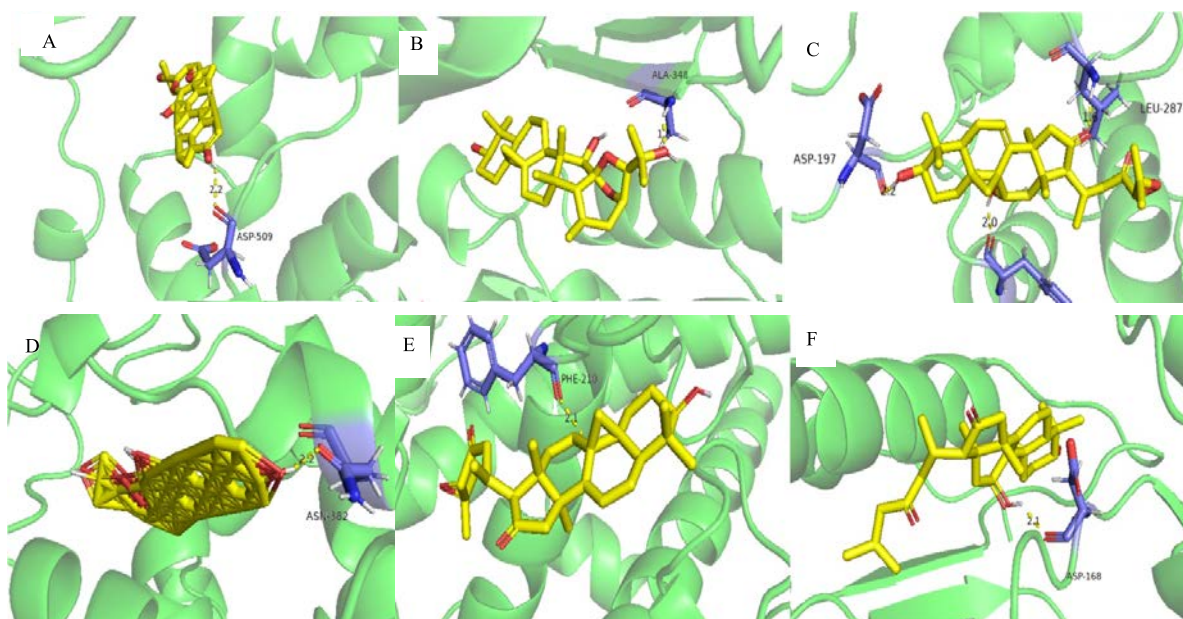
为了进一步验证网络的预测能力，本研究拟采用分子对接技术手段探讨儿童回春颗粒用于治疗呼吸道感染疾病的可能性。在药材-成分-共有靶

点网络图中选取 degree 较高的前 5 个成分包括没食子酸、7,8-二羟基升麻醇、升麻素昔、升麻醇、珊瑚菜素（主要来自于升麻、赤芍、前胡、羌活）作为候选对接药效成分；选取 degree 较高的靶点 PTGS2、MAPK（多种呼吸道病毒的共有靶点）以及 ACE2、3CL 水解酶（3CLpro）^[24]（冠状病毒感染的重要靶点）作为候选对接靶点，进行分子对接。同时，选取广谱抗病毒药物利巴韦林作为参照，对接结果见表 4。成分与靶点的结合能和形成氢键数量是评价结合能力的重要指标，通常认为结合能越低亲和力越强、氢键数量越多则结合越稳定。从对接结果来看（表 4、图 6），来自升麻的 7,8-二羟基升麻醇、升麻素昔及升麻醇与 PTGS2、MAPK、ACE2、3CLpro 的结合能相对较低，即这些成分与 4 个靶点的结合能力较强，除 7,8-二羟基升麻醇未能与 MAPK、3CLpro 形成氢键，稳定性欠佳外，其余均能形成氢键增强稳定性。另外值得注意的是，候选对接成分与 4 个靶点的结合能均低于利巴韦林，表明这些成分与靶点的亲和力要更强，但利巴韦林与靶点蛋白形成的氢键数量相对较多，可能具有良好的稳定性。基于以上结果，儿童回春颗粒中的代表性成分与呼吸道感染疾病的靶点结合能力较强，表明儿童回春颗粒对呼吸道感染具有治疗作用。

表 4 儿童回春颗粒核心成分和利巴韦林与靶点的结合情况

Table 4 Binding results of core ingredients of Ertong Huichun Granules and ribavirin with targets

成分	PTGS2 靶点		MAPK 靶点		ACE2 靶点		3CLpro 靶点	
	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	氢键数	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	氢键数	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	氢键数	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	氢键数
没食子酸	-26.11	2	-26.78	3	-26.23	4	-30.04	4
7,8-二羟基升麻醇	-61.63	1	-51.09	0	-41.80	1	-41.42	0
升麻素苷	-38.66	1	-39.46	1	-34.52	1	-33.97	3
升麻醇	-34.02	4	-36.65	1	-36.74	1	-30.83	2
珊瑚菜素	-28.62	1	-28.45	1	-28.83	1	-24.48	1
利巴韦林	-25.23	5	-23.72	3	-17.07	4	-20.75	2



A-ACE2-7,8-二羟基升麻醇 B-ACE2-升麻醇 C-3CLpro-升麻素苷 D-PTGS2-7,8-二羟基升麻醇 E-PTGS2-升麻素苷
A-ACE2-7,8-didehydrocimigenol B-ACE2-cimigenol C-3CLpro-prim-O-glucosylcimifugin D-PTGS2-7,8-didehydrocimigenol E-PTGS2-prim-O-glucosylcimifugin F-MAPK-prim-O-glucosylcimifugin

图 6 核心成分与靶点对接示意图

Fig. 6 Docking schematic diagram of core ingredients with targets

3 讨论

3.1 儿童回春颗粒与肺系疾病

中医药的性味归经是基于中医药基础理论以及临床经验而产生的,特定性味的药物具有特定作用,而归经则使药物对其特定的脏腑经络产生治疗作用。儿童回春颗粒组分的药性大多寒凉,可清热透表。中医认为,辛能发散表邪,苦能燥湿降泄,甘可补虚缓急,咸可软坚散结。肺系疾病治疗的关键环节为发表散邪,本方味以辛、苦为主,兼有甘、咸,即以辛味为主的儿童回春颗粒能够在呼吸道疾病中发挥作用,同时具有燥湿作用的中药也可尝试治疗以“湿”为主、病变在肺脾的 COVID-19。尤

其甘味补虚,从现代医学角度讲则是提高免疫力,也是儿童回春颗粒可能在预防、治疗呼吸道感染疾病过程中的关键。而中药-归经网络显示 20 味中药主要与肺、胃、心、肝、脾关联,佐证了儿童回春颗粒对以呼吸道症状为主要表现的肺系疾病具有治疗作用;同时,对肝、脾、胃的治疗作用也能使肝气疏泄正常,促进脾胃功能恢复、气机正常升降,解除胸闷、脘痞或呕恶、便溏等伴随的消化道症状。

3.2 儿童回春颗粒治疗呼吸道感染疾病潜在有效成分

通过网络药理学研究发现没食子酸、7,8-二羟基升麻醇、升麻素苷、升麻醇、珊瑚菜素、菠菜甾

醇、黄芩苷、8-甲氧基异欧前胡内酯、大豆素-4',7-二葡萄糖苷、穆坪马兜铃酰胺、广玉兰内酯等成分可能是儿童回春颗粒发挥抗病毒作用的重要成分。研究表明没食子酸能通过对细胞膜的保护作用发挥抵抗大鼠急性肝炎的作用,并且对于乙型肝炎病毒也具有较好的抑制作用^[25],其衍生物表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对于流感病毒引起的肺炎能够明显减轻小鼠肺组织病变程度,降低病死率^[26];黄芩苷在体外实验已被证明对流感甲型病毒和柯萨奇 B3 型病毒感染有抑制细胞病变的作用^[27],在动物实验中发现其能够明显减轻甲型流感病毒性肺炎小鼠的肺纤维化现象,降低肺组织 MAPK、核因子 κ B (NF- κ B)、转化生长因子- β (TGF- β) 蛋白的表达^[28];7,8-二羟基升麻醇、升麻素苷、升麻醇均来自升麻,具有抑制核苷运转、抗病毒、抗肿瘤、消炎等多种生理活性,已被证明对多种呼吸道病毒有显著抑制作用^[29],升麻素苷同时也是防风中的重要抗炎成分,其与荆芥(同时也是儿童回春颗粒的一味药材)常配伍使用治疗外感表症。研究发现荆防散的正丁醇部分预防给药对于脂多糖(LPS)所致小鼠急性肺损伤模型和 LPS 刺激诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型均具有较好的保护作用^[30]。

目前,抗呼吸道病毒药物主要通过抑制病毒包膜上神经氨酸酶的活性阻止病毒扩散、抑制离子通道活磷酸次黄苷脱氢酶活性阻断病毒复制、利用干扰素诱生抗病毒蛋白等生物过程涉及到的相关靶点进行设计,PTGS2、MAPK 是流感病毒、呼吸道合胞病毒、柯萨奇病毒、鼻病毒等多个呼吸道病毒的靶点,ACE2 则是流感病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒等的重要靶点,同时 ACE2 与 3CLpro 也是研究 SARS-CoV-2 的重要靶点^[31]。本研究通过分子对接技术,进一步验证了升麻中的升麻醇和升麻素苷与 PTGS2、MAPK、ACE2 和 3CLpro 之间具有良好、稳定的结合关系,提示儿童回春颗粒中的有效成分可能通过靶向 PTGS2、MAPK、ACE2 和 3CLpro 而发挥抗呼吸道病毒作用,并且对于 COVID-19 可能具有潜在治疗作用。

3.3 儿童回春颗粒治疗呼吸道病毒感染疾病可能作用机制

冠状病毒感染轻则引起类似感冒的发烧、干咳等症状,重则会使患者出现呼吸窘迫综合征、休克、脓毒症甚至死亡,其在宿主细胞中通过激活 PI3K-Akt 通路或提高蛋白激酶磷酸化水平进而激

活 ERK-MAPK 信号通路而完成病毒的复制和组装,通过激活细胞因子和化学趋化因子导致免疫过度应答而引发机体炎症和细胞因子风暴可能是主要致病机制^[32]。SARS-COV-2 同属于冠状病毒,其死亡尸体系统解剖观察报告中发现死者肺部损伤明显,出现灰白色病灶(炎性病变),肺切面可见大量黏稠的分泌物从肺泡内溢出,提示 SARS-COV-2 主要引起深部气道和肺泡损伤为特征的炎症反应^[33]。

本研究通过 KEGG 通路分析和 GO 分析发现,儿童回春颗粒治疗呼吸道病毒感染的靶点主要富集在癌症、肝炎相关通路、PI3K-Akt 信号、TNF 信号通路和 HIF-1 信号通路等,主要涉及炎症反应、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、缺氧反应等生物过程。PI3K-Akt 信号通路与宿主细胞的增殖、凋亡及免疫密切相关,病毒的入侵和复制可能是激活并利用 PI3K-Akt 信号通路完成,而在感染后可能通过降低其活性以躲避宿主的免疫防御^[34];TNF 是一种具有多种生物学效应的炎性介质,可以抑制病毒介导的细胞病变并降低病毒数量^[35];而 HIF-1 是一种低氧诱导因子,在低氧状态下其能激活多种靶基因的转录,是维持氧平衡的主要调节因子,其表达产物对于适应缺氧环境具有重要作用,研究表明病毒感染细胞的 HIF-1 的表达稳定性明显高于未感染细胞,当 HIF-1 的表达抑制后,病毒感染和糖蛋白表达均出现下降,病毒复制速度也明显减慢^[36]。除此之外,网络中度值较高的靶点 PTGS2、EGFR、MAPK、IL2 等均与炎症反应或宿主细胞增殖具有密切联系。

由此可见,儿童回春颗粒可能主要通过降低炎症反应、调控 PI3K-Akt 通路干扰病毒入侵宿主及进行复制的过程,同时降低 HIF-1 的表达以进一步抑制病毒复制,而发挥治疗呼吸道病毒感染的作用。

本研究通过结合网络药理学及分子对接技术,发现儿童回春颗粒中的药材主要通过肺、胃、心、肝等经络及相关脏腑发挥作用,其中的没食子酸、7,8-二羟基升麻醇、升麻素苷、升麻醇、黄芩苷等成分能够通过靶向 PTGS2、EGFR、MAPK、IL2 等靶点调节 PI3K-Akt 信号、TNF 信号通路和 HIF-1 信号通路,进而进一步影响炎症反应、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、缺氧反应等生物过程,而发挥治疗呼吸道病毒感染的作用。

参考文献

- [1] 王辉强,马琳琳,蒋建东,等.重组人干扰素 α 2b 体外

- 广谱抗呼吸道病毒药效学研究 [J]. 药学报, 2014, 49(11): 1547-1553.
- [2] 林秀慧, 张根生, 崔巍. 病毒性肺炎的诊治进展 [J]. 中国现代医生, 2017, 55(5): 163-168.
- [3] 刘恩梅, 彭才静. 新近发现的呼吸道感染流行病学与临床研究进展 [J]. 中国小儿急救医学, 2010, 17(5): 390-391.
- [4] 杨加伟, 徐金富. 糖皮质激素治疗病毒性肺炎利与弊 [J]. 中国实用内科杂志, 2016, 36(2): 133-136.
- [5] 余如瑾, 唐光华, 姜良铎. 浅谈中医防治呼吸道感染性疾病的辨治及研究思路 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(7): 79-80.
- [6] 冯雪, 段笑娇, 张冰, 等. 新型冠状病毒肺炎中医诊疗/防治方案对中医临床指南制定的思考 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 2020-03-04. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20200841>.
- [7] 余苗萃, 吕俊, 徐玉琪. 普通型新型冠状病毒肺炎的中医证治探讨 [J/OL]. 湖北中医杂志, 2020-03-04. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1189.R.20200302.1841.005.html>.
- [8] 新型冠状病毒感染的肺炎治疗方案(试行第四版) [S]. 2020.
- [9] 贵州省中医药管理局. 贵州省新型冠状病毒肺炎中医药防治参考方案(第二版) [EB/OL]. 2020-02-19. http://atcm.guizhou.gov.cn/zwgk/xxgkml/jcxxgk/zcwj_5130534/bmwj/202002/t20200220_50331794.html.
- [10] 刘霞. 儿童回春颗粒治疗儿童上呼吸道感染 77 例 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2012, 10(10): 147-148.
- [11] 黄芳兰. 儿童回春颗粒佐治小儿急性上呼吸道感染伴发热的疗效观察 [J]. 右江医学, 2013, 41(4): 543-544.
- [12] 王乃飞, 卢红飞. 儿童回春颗粒预防上呼吸道感染腹泻病疗效观察 [J]. 中国社区医师, 2012, 14(15): 221.
- [13] 杨俊潮. 儿童回春颗粒佐治小儿上呼吸道感染 70 例疗效分析 [J]. 首都食品与医药, 2015, 22(8): 45.
- [14] 金宝灿, 包忠实, 姜敏. 儿童回春颗粒治疗小儿感冒发热临床试验 [J]. 中华全科医学, 2013, 11(1): 85-86.
- [15] 邓燕君, 刘博文, 贺桢翔, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索藿香正气口服液预防新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物研究 [J/OL]. 中草药, 2020-03-04. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20200224.2202.002.html>.
- [16] 许海玉, 刘振明, 付岩, 等. 中药整合药理学计算平台的开发与应用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3633-3638.
- [17] Ru J L, Li P, Wang J N, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [18] Liu Z Y, Guo F F, Wang Y, *et al.* BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21146.
- [19] Zoete V, Daina A, Bovigny C, *et al.* SwissSimilarity: A web tool for low to ultra high throughput ligand-based virtual screening [J]. *J Chem Inf Model*, 2016, 56(8): 1399-1404.
- [20] Safran M, Solomon I, Shmueli O, *et al.* GeneCards 2002: Towards a complete, object-oriented, human gene compendium [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(11): 1542-1543.
- [21] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [22] Lopes C T, Franz M, Kazi F, *et al.* Cytoscape Web: An interactive web-based network browser [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(18): 2347-2348.
- [23] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16): 2785-2791.
- [24] 宗阳, 丁美琳, 贾可可, 等. 基于网络药理学和分子对接法探寻呋喃衍生物治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 836-844.
- [25] 李肖玲, 崔岚, 祝德秋. 没食子酸生物学作用的研究进展 [J]. 中国药师, 2004, 7(10): 767-769.
- [26] 肖潇, 杨占秋, 石丽桥, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯抗流感病毒作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2678-2682.
- [27] 高雷, 陈鸿珊. 黄芩苷体外对流感病毒、单纯疱疹病毒和柯萨奇病毒的抑制作用 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(6): 474-478.
- [28] 万巧凤, 顾立刚, 李根茂, 等. 黄芩苷在流感病毒致肺纤维化早期进展中的作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(9): 1303-1307.
- [29] 张丽蓉, 鄢连和. 升麻属植物有效成分抗病毒作用研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(4): 384-385.
- [30] 桑文涛. 荆防散正丁醇部位抗炎作用的 NF- κ B 信号通路机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [31] 广东省药学会. 抗呼吸道病毒药物临床药学指引 [J/OL]. 今日药学, 2020-04-23. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1650.R.20200330.1351.002.html>.
- [32] 李振, 俞科贤. 苦参多路径抗冠状病毒的机制探究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 888-894.
- [33] 刘茜, 刘良, 王荣帅, 等. 新型冠状病毒肺炎死亡尸体系统解剖大体观察报告 [J]. 法医学杂志, 2020, 36(1): 21-23.
- [34] 刘荣雕, 阮灵伟. PI3K-Akt 信号通路与病毒感染 [J]. 生物技术通报, 2013(6): 53-62.
- [35] 叶一秀, 王巍, 李洪敏, 等. 严重急性呼吸综合征患者血清 TNF 含量动态观察及评价 [J]. 标记免疫分析与临床, 2004, 11(4): 241-242.
- [36] 李琼毅, 冯若飞, 乔自林, 等. 缺氧诱导因子-1 在病毒感染中的作用 [J]. 微生物学杂志, 2014, 34(1): 88-91.