

· 专题 ·

基于分子对接和网络药理学技术预测银翘解毒合剂防治新型冠状病毒肺炎的可行性[△]

许洪波¹, 刘妍如¹, 周瑞¹, 于金高¹, 杨宁娟¹, 王梅², 黄峰³, 宋忠兴¹, 唐志书^{1*}

1. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化省部共建协同创新中心/

秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育)/陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083;

2. 陕西中医药大学 附属医院 国家中医临床研究基地, 陕西 咸阳 712000;

3. 陕西中医药大学 制药厂 陕西省博士后创新基地, 陕西 咸阳 712083

[摘要] **目的:** 利用分子对接和中药网络药理学技术预测银翘解毒合剂防治新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的可行性。**方法:** 借助 TCSP、Pubchem 等数据库检索银翘解毒合剂中金银花、连翘、桔梗、荆芥、薄荷、牛蒡子、淡豆豉、淡竹叶和甘草的化学成分。以银翘解毒合剂中成分为配体, 利用分子对接技术探讨可能作用于人血管紧张素转化酶 II (ACE2) 的活性成分, 进而运用 Cytoscape 软件构建活性成分-靶点(基因)网络, 通过 DAVID 数据库对活性成分靶点进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集分析。**结果:** 获得银翘解毒合剂中化合物 1060 个, 分子对接结果显示有 301 个化合物与 ACE2 具有较好的亲和作用(其中 18 个化合物优于参照药物洛匹那韦和瑞德西韦), 进一步通过吸收、分布、代谢、排泄(ADME)参数从中优选出关键活性成分 55 个。关键成分靶点生物功能富集分析得到 GO 条目 2080 个($P < 0.05$), 其中生物过程(BP)条目 1862 个, 细胞组成(CC)条目 88 个, 分子功能(MF)条目 130 个; KEGG 通路富集分析得到 152 条信号通路($P < 0.05$), 主要涉及与 COVID-19 感染源类似(病毒感染)的疾病, 以及与肺炎和免疫、炎症反应相关的信号通路。**结论:** 银翘解毒合剂中具有潜在作用于 ACE2 蛋白的活性物质, 其有可能通过多靶点、多通路发挥防治 COVID-19 的作用。

[关键词] 新型冠状病毒肺炎; 银翘解毒合剂; 分子对接; 网络药理学**[中图分类号]** R289; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)04-0512-11**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20200311007

Feasibility Analysis of Yinqiao Jiedu Mixture on Prevention and Treatment of COVID-19 Based on Molecular Docking and Network Pharmacology

XU Hong-bo¹, LIU Yan-ru¹, ZHOU Rui¹, YU Jin-gao¹, YANG Ning-juan¹,
WANG Mei², HUANG Feng³, SONG Zhong-xing¹, TANG Zhi-shu^{1*}

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization,

State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation),

Shaanxi Innovative Drug Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China;

2. National TCM Clinical Research Base, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China;

3. Pharmaceutical Factory of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

[Abstract] **Objective:** To predict the feasibility of Yinqiao Jiedu Mixture on prevention and treatment of COVID-19. **Methods:** The chemical constituents in Yinqiaojiedu Mixture were collected by using TCSP and Pubchem database. Molecular docking technology was used to explore the active ingredients that may act on human angiotensin-converting enzyme II (ACE2) protein, and then the active ingredients-targets (gene) network was constructed using Cytoscape software. The DAVID database was used to perform gene ontology (GO) function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment

[△] **[基金项目]** 2020 年度咸阳市重点研发计划“新型冠状病毒肺炎疫情应急防治”科技专项; 陕西省三秦学者创新团队(陕组通字[2018]34号); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-21)

^{*} **[通信作者]** 唐志书, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药制剂技术与质量分析研究; Tel: (029)38185060, E-mail: tzs6565@163.com

analysis. **Results:** There were 1060 compounds in Yinqiao Jiedu mixture. The molecular docking results showed that 301 compounds had good affinity with ACE2 (18 compounds were better than the reference drugs lopinavir and remdesivir), and 55 key active ingredients were further selected through setting thresholds. GO function enrichment analysis revealed 2080 items ($P < 0.05$), including 1862 biological process (BP) items, 88 cell composition (CC) items, and 130 molecular function (MF) items. KEGG pathway enrichment resulted in 152 signal pathways ($P < 0.05$), which mainly involved diseases similar to the source of COVID-19, and signal pathways related to pneumonia, immune and inflammatory responses.

Conclusion: Yinqiao Jiedu Mixture possesses active substances with potential effects on ACE2, and it may play the role in regulating COVID-19 through multiple targets and multiple pathways.

[**Keywords**] COVID-19; Yinqiao Jiedu Mixture; molecular docking; network pharmacology

2019年末至今,一场由新型冠状病毒(2019-nCoV或SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)肆虐全球,目前全世界已有数万人被2019-nCoV感染。该病毒是迄今第7种可感染人类的冠状病毒,其引发的重症病例和病死率较高^[1-3]。目前为止还没有针对2019-nCoV的特效药;因此,根据冠状病毒结构及其致病机理寻找高效、低毒、靶向的药物,是目前中国和国际医药界的当务之急。

中医的整体观念与辨证论治特点在历次新突发传染病的防治中均发挥了独特作用^[4-6]。从中医的角度分析,此次COVID-19可归于温病范畴,因其传染性较强,又属瘟疫^[7]。在数千年中华文明史上,中医药学对于瘟疫诊治已积累了丰富的临床经验,形成了卫气营血辨证、三焦辨证以及六经辨证等多种辨证论治理论体系^[7]。中医治疗的优势是即使不明确病原体,仍然可以在辨证论治理论的指导下,根据许多既定的证候类型,参照传统的理法方药进行治疗。基于中医药在新突发传染病防治中的独特作用,国家卫生健康委将中医治疗纳入《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》,并提出了该病的中医病因、病机和治则。经过近1个月的临床实践证明,中医药对治疗此次COVID-19确实有疗效^[5]。

清代温病大家吴鞠通创立的温病名方银翘散,由金银花、连翘、桔梗、荆芥、薄荷、牛蒡子、淡豆豉、淡竹叶和甘草9味中药组成,用于治疗温病初起卫分证及风热表证。银翘散目前已在临床上广泛应用于COVID-19的防治,很多省市和地区将其纳入COVID-19的治疗方案中,如陕西省卫健委与中医药管理局组织形成的《陕西省新型冠状病毒感染的肺炎中医药治疗方案》中,就明确提到银翘散加减的系列方剂用于无症状和轻症患者的防治。临床应用上,根据病症的轻重缓急,银翘散常有多种剂型载体,银翘解毒合剂就是其一。银翘解毒合剂与银翘

散组方相同,是辛凉解表类的代表性方剂。现代药理研究表明该方具有显著抗病毒、抗炎、抗菌、抗过敏、解热及增加免疫力的作用^[8],临床上主要用该方治疗流行性感、腮腺炎、咽结膜炎、咽峡疱疹、麻疹、单纯疱疹性角膜炎、病毒性心肌炎等病毒感染性疾病^[8]。因此,中医理论和目前的药理结果提示银翘解毒合剂可能适用于COVID-19的防治,但其治疗COVID-19的可行性和现代科学依据尚不明确。

分子对接技术是一种重要的计算机辅助药物分子设计手段,它通过化学计量学方法研究蛋白质受体和药物分子之间空间、能量和化学环境匹配情况,可阐明和预测药物的作用效果和机制^[9]。近年来,分子对接技术已成为中药研究领域的一项常用技术^[10-11],特别是对中药药效物质基础的高效、快速筛选研究有重要意义。网络药理学整合了系统生物学、多向药理学(polypharmacology)、计算生物学和网络分析等学科,从整体角度探索中药与疾病间的关联性,契合于中药多成分-多靶点的作用关系,与中药从整体水平调控机体并发挥治疗作用的观点相吻合,从而提供了一种从系统水平探寻中药及其复方潜在活性成分的新策略^[3]。

本研究运用分子对接和网络药理学技术研究银翘解毒合剂防治病毒性肺炎可能的物质基础和起效路径,为银翘解毒合剂用于COVID-19的防治提供参考。

1 方法

1.1 银翘解毒合剂所含化学成分收集

使用计算系统生物学实验室平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/>)、Collective Molecular Activities of Useful Plants(CMAUP, <http://bidd2.nus.edu.sg/CMAUP/>)及PubChem数据库,分别收集金银花、连翘、桔梗、荆芥、薄荷、牛蒡子、淡豆豉、淡竹叶和甘草中已报道的化学成分。

1.2 分子对接

以银翘解毒合剂中的成分为配体,以血管紧张素转换酶Ⅱ(ACE2)蛋白为受体,进行分子对接虚拟筛选,对接主要通过 Discovery Studio (DS) 软件完成。

1.2.1 对接受体的准备 本研究蛋白靶点 ACE2 的晶体结构获取自 RCSB 蛋白质数据库 (PDB: 2ajf), 并按照以下步骤对蛋白晶体进行预处理: 1) 删除水分子、原配体分子及非相关的蛋白质构象; 2) 经 Prepare Protein 工具处理; 3) 基于文献报道的该受体可能结合域定义结合位点 Sphere; 4) 保存备用。

1.2.2 配体的准备 将所收集的成分结构去重后, 保存成 sd 格式文件, 导入 DS 软件中, 运行 Prepare Ligands 工具, 对配体加氢、生成优势构象, 保存结构备用。

1.2.3 分子对接 分别打开准备的受体和配体文件, 按照 DS 软件对接流程进行分子对接。LibDock 对接参数设置为: Docking Tolerance 0.25, Max Hits to Save 100, Conformation Method FAST, 其他参数为默认设置。从对接结果中选取 Docking 打分函数 LibDockScore 得分最高者, 分析其相互作用。CDOCKER 对接参数设置为: Top Hits 10, Dynamics Steps 1000, Dynamics Target Temperature 1000, Maximum Bad Orientations 800, Orientation vdW Energy Threshold 300, Heating Steps 2000, Heating Target Temperature 700, Cooling Steps 5000, Cooling Target Temperature 300, Forcefield CHARMM。

1.3 关键活性成分及其靶标蛋白的筛选

中药多为口服制剂, 在体内需经过吸收 (absorption)、分布 (distribution)、代谢 (metabolism) 及排泄 (excretion) 过程到达靶点器官、组织发挥作用, 即 ADME 过程。其中口服生物利用度 (OB) 是药物 ADME 过程中重要的药动学参数之一, 它表示口服药物的有效成分或活性基被吸收到达体循环并吸收的速度与程度。此外, 化合物类药性 (DL) 是指化合物与已知药物的相似程度, $DL \geq 0.18$ 则认为该化合物与 Drugbank 数据库里药物具有一定的相似性。因此, 为了从银翘解毒合剂活性化合物群中筛选到关键活性成分, 设定 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 作为阈值进行过滤筛选, 获得关键活性成分, 并通过 TCMSP、Drugbank 等数据库获取相关靶标蛋白。

1.4 关键活性成分-靶点网络构建与分析

将筛选得到的银翘解毒合剂中关键活性成分及

其对应的靶标, 导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建活性成分-靶点网络, 利用 Cytoscape 软件的 Network Analyzer 工具计算网络拓扑参数, 包括度值 (Degree)、介数 (betweenness centrality, BC) 等。

1.5 靶点生物学功能富集分析

通过 R 软件包中的 Cluster profiler 模块对关键成分的潜在作用靶点进行 GO (Gene Ontology) 富集分析和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 信号通路富集分析, 以 $P < 0.05$ 为指标对结果进行筛选分析, 使用 R 语言对结果进行可视化处理。

2 结果

2.1 成分收集

通过网络数据库收集到金银花、连翘、桔梗、荆芥、薄荷、牛蒡子、淡豆豉、淡竹叶和甘草中的成分结构分别为 236、150、102、164、144、15、19、280 个, 共计 1269 个化合物, 去掉重复结构后共有 1060 个化合物。

2.2 分子对接结果

将收集的 1060 个中药成分, 以 ACE2 为靶蛋白, 进行分子对接。计算结果表明: 银翘解毒合剂中化合物的 LibDockScore 得分最大值为 221.368, 得分排名前 10 的化合物分别为: 去芹菜糖基-桔梗皂苷- D_3 (deapio-platycodin- D_3) (221.368)、远志皂苷 D_2 (polygalacin D_2) (211.283)、3'- α -O-远志皂苷 D (3'- α -O-polygalacin D) (208.178)、连翘种苷 B (suspensaside B) (194.921)、桔梗皂苷 G_1 (platycoside G_1) (186.793)、连翘酯苷 B (forsythoside B) (183.393)、3'-O-远志皂苷 D (3'-O-polygalacin D) (182.998)、甘草糖苷 E (licorice glycoside E) (178.568)、连翘脂苷 C (forsythoside C) (178.038)、连翘属苷 (forsythiaside) (176.095)。所有参与分子对接的成分中, 有 18 个化合物的 LibDockScore 值比参照药物洛匹那韦高 (LibDockScore > 165.002), 有 40 个化合物比瑞德西韦高 (LibDockScore > 152.993) (见表 1)。此外, 共有 301 个成分的 LibDockScore 值 > 100 (LibDock 分子对接的打分函数 LibDockScore 是基于配体与受体对接时的亲和力、相对能量和对接模式等进行综合打分, 一般认为 LibDockScore > 100 即表明受体与配体结合较好, 其值越大则表明对接产生的复合物构象越稳定, 配体与受体的亲和作用越好^[12])。

表 1 LibDock 分子对接排名前 40 的化学成分

编号	化合物名称	LibDockScore	- CDOCKER_ INTERACTION_ ENERGY/kcal·mol ⁻¹
1	deapio-platycodin D3	221.368	71.146
2	polygalacin D2	211.283	65.598
3	3'- α -O-polygalacin D	208.178	76.382
4	suspensaside B	194.921	57.311
5	platycoside G1	186.793	89.063
6	forsythoside B	183.393	52.585
7	3'-O-polygalacin D	182.998	98.818
8	licorice glycoside E	178.568	61.780
9	forsythoside C	178.038	61.536
10	forsythiaside	176.095	45.932
11	forsythoside F	175.965	71.398
12	1- [2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-1-carboxy] ethoxycarbonyl-2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-3- [2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-1-methoxycarbonyl] ethoxycarbonyl-7, 8-dihydroxy-1, 2-dihydronaphthalene	175.085	72.970
13	polygalacin D	173.979	67.020
14	madreselvin B	173.611	68.842
15	1, 3-bis- [2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-1-carboxy] ethoxycarbonyl-2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-7, 8-dihydroxy-1, 2-dihydronaphthalene	172.944	66.092
16	acteoside	170.175	57.360
17	deapio-platycodin E	165.183	79.697
18	1, 3-bis [2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-1-methoxycarbonyl] ethoxy carbonyl-2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-7, 8-dihydroxy-1, 2-dihydronaphthalene	165.083	66.249
19	flavoplatycoside	164.552	56.114
20	diosmin	164.542	49.686
21	docosyl caffeate	164.313	45.300
22	suspensaside A	163.512	54.269
23	1- [2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-1-methoxycarbonyl] ethoxycarbonyl-2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-3- [2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-1-carboxy] ethoxycarbonyl-7, 8-dihydroxy-1, 2-dihydronaphthalene	163.367	57.987
24	1-carboxy-2-(3, 4-dihydroxyphenyl) ethyl-(E)-3- [3- [1-carboxy-2-(3, 4-dihydroxyphenyl) ethoxycarbonyl]-7-hydroxy-2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-benzofuran-5-yl] propenoate	163.206	63.496
25	platycoside B	162.724	74.035
26	diosmin impurity C	162.638	56.705
27	licorice glycoside A	162.056	58.690
28	phytofluene	161.060	39.294
29	robinin	159.147	51.840
30	platycodin A	159.087	66.341
31	lappaol C	158.850	45.347
32	lappaol F	157.995	54.723
33	nonacosanol	156.853	52.070
34	onjisaponin G	156.457	73.102
35	sapindoside B	155.315	61.142
36	lobetyolinin	155.016	43.710
37	linarin	154.956	50.793
38	forsythoside G	153.737	67.831
39	lappaol B	153.302	57.334
40	akebiasaponin D	153.124	53.475
R1	lopinavir	165.002	48.210
R2	remdesivir	152.993	43.005
R3	chloroquine	105.656	—
R4	arbidol	96.590	—

注：—表示未进行 CDOCKER 研究。

为进一步评估和验证这40个化合物与ACE2蛋白的作用,我们采用CDOCKER方法对其进行研究。CDOCKER是基于CHARMm力场的分子对接方法,它采用高温动力学搜索配体分子的柔性构象,进而针对各配体构象用模拟退火的方法优化其与受体活性位点的作用,这种方法可以产生高精度的对接结果。CDOCKER实验结果表明,这40个化合物的-CDOCKER_INTERACTION_ENERGY值均为正数,且该值基本都高于参照化合物洛匹那韦($48.210 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)和瑞德西韦($43.005 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$),提示这些化合物与受体蛋白具有较好的亲和作用。

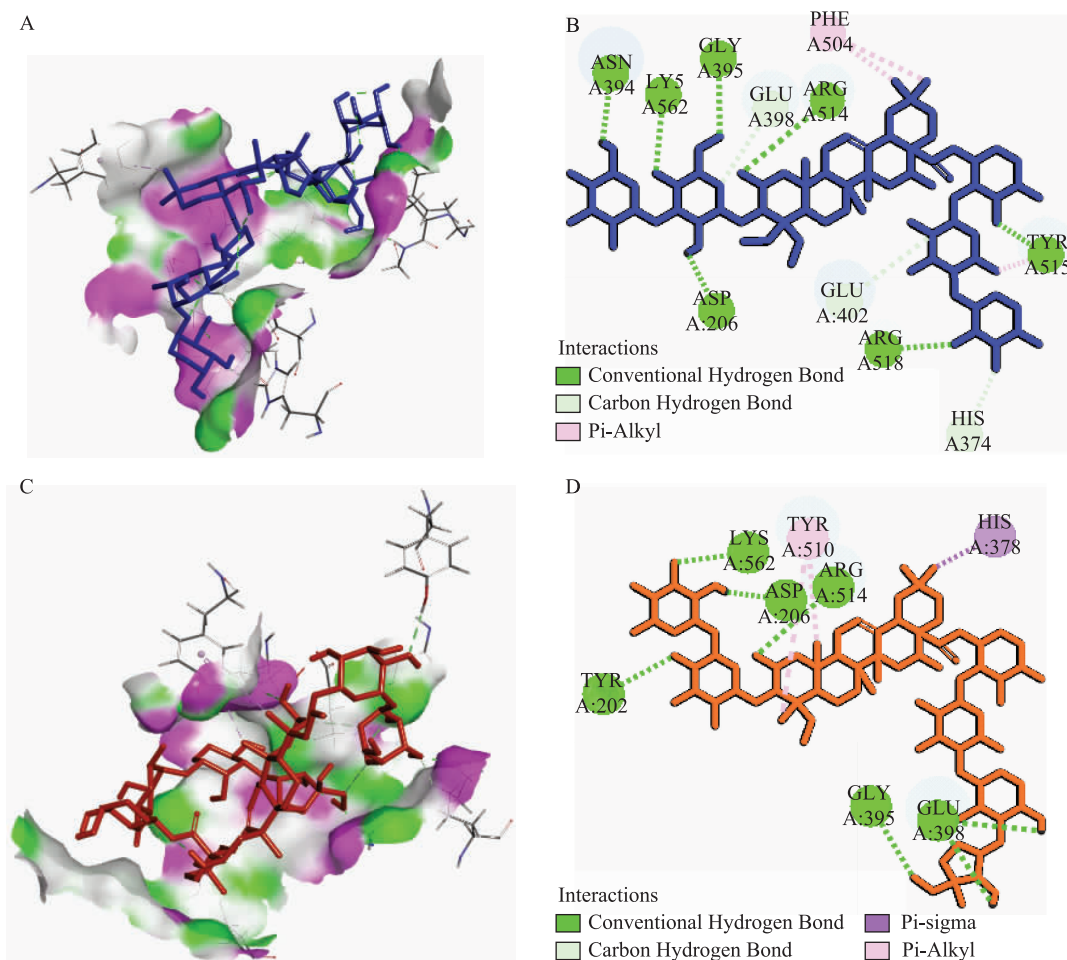
2.3 结合模式分析

根据上述分子对接结果,对表1中LibDockScore得分最高的2个化合物去芹菜糖基-桔梗皂苷- D_3 和远志皂苷 D_2 与ACE2蛋白对接的作用模式进行分析。

ACE2蛋白与这2个化合物相互作用的2D和3D图见图1。由图可知,2个配体均结合于ACE2蛋白的空腔内,且与受体之间主要通过氢键作用稳定结合。所不同的是,去芹菜糖基-桔梗皂苷- D_3 可与受体蛋白中ASN394、LYS562、GLY395、ARG514、ASP206、TYR515、ARG518、HIS374、GLU398残基形成氢键作用,产生稳定结合。远志皂苷 D_2 主要与受体蛋白中TYR202、ASP206、LYS562、GLY395、GLU398、ARG514残基形成氢键作用,其他残基如TYR510、HIS378等,可与配体形成较强的疏水堆积作用,有利于其结合。

2.4 银翘解毒剂抗冠状病毒的关键活性成分筛选

上述通过分子对接筛选得到的潜在活性化合物,尽管有较高的LibDockScore值,但通过检索发现,很多成分的OB和DL较差。



注: A. 去芹菜糖基-桔梗皂苷- D_3 与ACE2蛋白结合3D模式; B. 去芹菜糖基-桔梗皂苷- D_3 与ACE2蛋白相互作用2D图; C. 远志皂苷 D_2 与ACE2蛋白结合3D模式; D. 远志皂苷 D_2 与ACE2蛋白相互作用2D图。

图1 代表性化合物去芹菜糖基-桔梗皂苷- D_3 和远志皂苷 D_2 与ACE2蛋白作用模式

因此我们根据系统药理学通用的活性成分筛选标准($OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$)^[3-5], 借助 TCMS 数据平台, 从 LibDockScore 得分 > 100 的成分中筛选出

符合标准的化合物, 建立关键活性成分集合。最终从 301 个成分(LibDockScore > 100)中筛选到关键活性成分 55 个, 详细信息见表 2。

表 2 银翘解毒合剂中潜在抗冠状病毒的关键活性成分

编号	化合物名称	代码	LibDockScore	口服生物利用度/%	类药性	中药
1	licorice glycoside E	KAI-01	178.57	32.89	0.27	甘草
2	phytofluene	KAI-02	161.06	43.18	0.50	金银花
3	robinin	KAI-03	159.15	39.84	0.71	桔梗
4	linarin	KAI-04	154.96	39.84	0.71	薄荷
5	Supraene	KAI-05	144.45	33.55	0.42	荆芥
6	glycyroside	KAI-06	140.96	37.25	0.79	甘草
7	β -carotene	KAI-07	136.53	37.18	0.58	金银花、牛蒡子
8	fortunellin	KAI-08	136.24	35.65	0.74	薄荷
9	rhodoxanthin	KAI-09	133.73	31.22	0.55	金银花
10	cynarin	KAI-10	129.30	31.76	0.68	牛蒡子
11	6-prenylated eriodictyol	KAI-11	125.03	39.22	0.41	甘草
12	6'-O-malonylglycitin	KAI-12	123.37	30.40	0.81	淡豆豉
13	glepidotin B	KAI-13	119.50	64.46	0.34	甘草
14	gadelaidic acid	KAI-14	119.49	30.70	0.20	甘草
15	5E-eicosenoic acid	KAI-15	119.18	30.70	0.20	甘草
16	(-)-medicocarpin	KAI-16	119.00	40.99	0.95	甘草
17	mandenol	KAI-17	118.64	42.00	0.19	金银花
18	neoarctin A	KAI-18	117.79	39.99	0.27	牛蒡子
19	spinasterol	KAI-19	117.28	42.98	0.76	桔梗
20	ethyl linolenate	KAI-20	116.52	46.10	0.20	金银花
21	glabranin	KAI-21	115.98	52.90	0.31	甘草
22	glyasperin B	KAI-22	115.38	65.22	0.44	甘草
23	glyasperin F	KAI-23	115.07	75.84	0.54	甘草
24	gancaonin H	KAI-24	114.21	50.10	0.78	甘草
25	luteolin	KAI-25	114.00	36.16	0.25	连翘、桔梗、薄荷、荆芥
26	euchrenone	KAI-26	113.11	30.29	0.57	甘草
27	phillyrin	KAI-27	112.70	36.40	0.86	连翘
28	(-)-phillygenin	KAI-28	111.43	95.04	0.57	连翘
29	sigmoidin-B	KAI-29	110.93	34.88	0.41	甘草
30	dinethylsecologanoside	KAI-30	110.88	48.46	0.48	金银花
31	arctiin	KAI-31	110.66	34.45	0.84	连翘、牛蒡子
32	5'-prenylbutein	KAI-32	110.29	46.27	0.31	甘草
33	20(S)-dammar-24-ene-3 β , 20-diol-3-acetate	KAI-33	109.94	40.23	0.82	连翘
34	secologanic dibutylacetal	KAI-34	109.94	53.65	0.29	金银花
35	isolariciresinol	KAI-35	108.71	66.51	0.39	连翘、金银花
36	kryptoxanthin	KAI-36	108.35	47.25	0.57	金银花
37	pinoresinol monomethyl ether	KAI-37	106.46	85.12	0.57	连翘
38	5, 7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one	KAI-38	106.01	47.74	0.27	荆芥
39	stigmasterol	KAI-39	105.86	43.83	0.76	金银花、荆芥
40	dehydroglyasperins C	KAI-40	105.84	53.82	0.37	甘草
41	phaseol	KAI-41	105.62	78.77	0.58	甘草
42	3-epi- β -sitosterol	KAI-42	105.05	36.91	0.75	荆芥
43	kanzonol B	KAI-43	104.14	39.62	0.35	甘草
44	cis-dihydroquercetin	KAI-44	103.79	66.44	0.27	桔梗
45	lcoisoflavanone	KAI-45	103.79	52.47	0.54	甘草

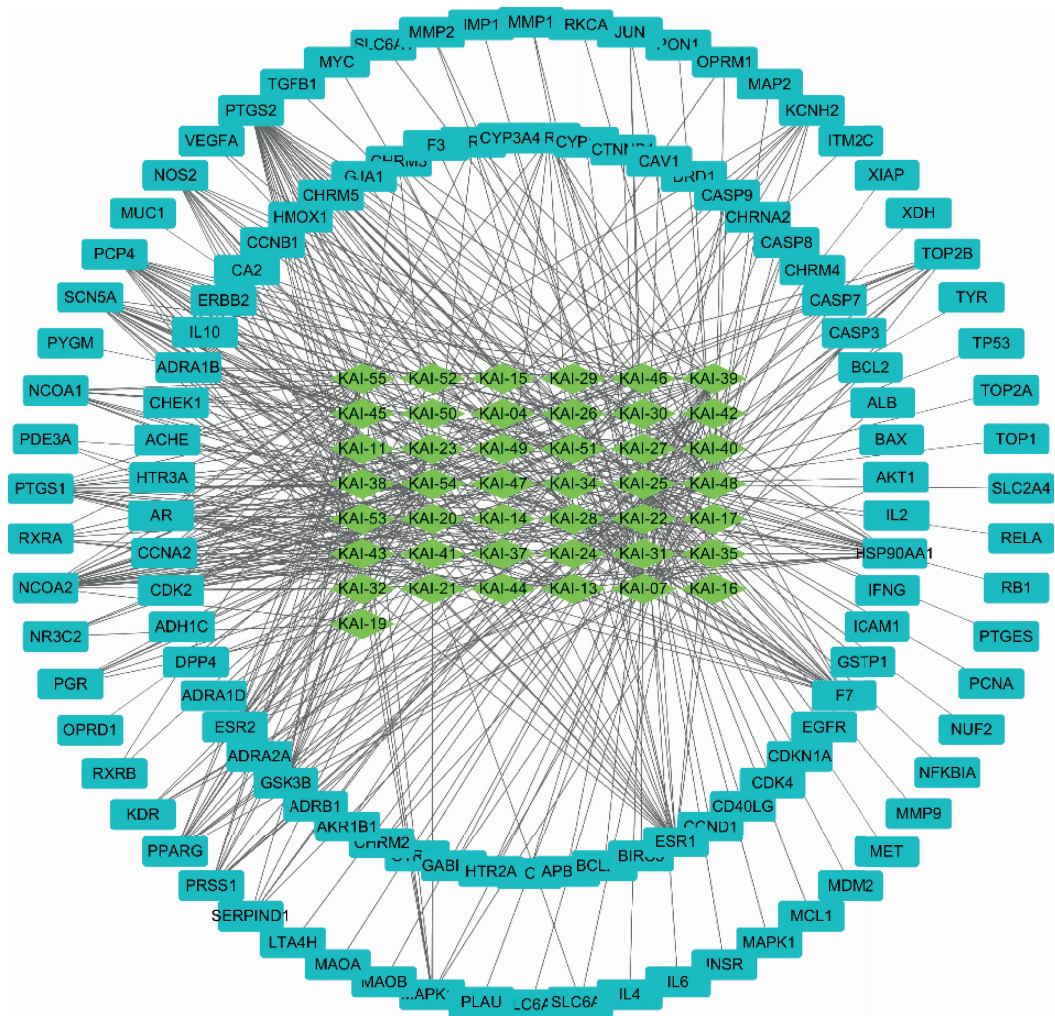
续表 2

编号	化合物名称	代码	LibDockScore	口服生物 利用率/%	类药性	中药
46	isolicoflavanol	KAI-46	103.52	45.17	0.42	甘草
47	campesterol	KAI-47	103.51	37.58	0.71	荆芥
48	β -sitosterol	KAI-48	103.34	36.91	0.75	金银花、荆芥、连翘
49	(3S, 8R, 9R, 10R, 13R, 14S, 17R)-17-[(E, 2R, 5S)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl]-10, 13-dimethyl-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	KAI-49	102.57	43.83	0.76	金银花
50	forsythinol	KAI-50	102.38	81.25	0.57	连翘
51	eriodictiol	KAI-51	102.22	41.35	0.24	金银花
52	xambioona	KAI-52	101.96	54.85	0.87	甘草
53	glyasperin C	KAI-53	101.43	45.56	0.40	甘草
54	shinpterocarpin	KAI-54	100.54	80.30	0.73	甘草
55	4'-methoxyglabridin	KAI-55	100.27	36.21	0.52	甘草

2.5 关键活性成分-靶点网络构建与分析

通过 PubChem、TCMSP 等数据库检索, 收集整理 55 个关键活性成分的相关靶点 123 个。运用

Cytoscape 软件构建银翘解毒合剂关键活性成分-靶点网络, 见图 2。图中共包含 166 个节点和 502 条边线, 其中化合物节点 43 个(12 个化合物未参与网络



注: 绿色菱形节点为关键活性化合物; 蓝色方形节点为靶点。

图 2 银翘解毒合剂中潜在抗冠状病毒的关键活性成分-靶点网络

构建), 蛋白靶点节点 123 个。该网络拓扑学性质分析表明: 平均每个化合物与 11.67 个靶点相互作用, 每个靶点平均与 4.08 个化合物相互作用, 因此在银翘解毒合剂中也存在多个化合物同时作用于同 1 个靶点且单个化合物又作用于多个靶点的现象。从化合物角度来看, 有 7 个化合物 (16.28%) 的作用靶点超过 20 个, 分别为芦丁、 β -谷甾醇、豆甾醇、4'-甲氧基光甘草定、新疆甘草紫檀素 (shinpterocarpin)、粗毛甘草素 C 和 β -胡萝卜素。从靶点的角度来看, 有 6 个靶标 (4.88%) 的 Degree ≥ 20 , 有 18 个靶标与不少于 10 个化合物相互作用, 其中等级值排名前 5 的靶标为: PTGS2 (Prostaglandin G/H synthase 2)、NCOA2 (Nuclear receptor coactivator 2)、HSP90AA1 (Heat shock protein HSP 90)、PCP4 (Calmodulin) 和 F7 (Coagulation factor VII); 其中大部分靶点蛋白能够调控炎症、细胞凋亡以及免疫反应等生物过程。

2.6 关键活性成分作用靶点生物学功能分析

为深入了解上述关键化合物作用靶点的生物学功能, 对这些靶点进行了 GO 富集分析与 KEGG 通路分析。GO 富集分析得到了 $P < 0.05$ 的 GO 条目共计 2080 个, 其中包含生物过程 (biological process, BP) 条目 1862 个, 细胞组成 (cell composition, CC) 条目 88 个, 分子功能 (molecular function, MF) 条目 130 个, 各类别前 20 的条目分别见图 3~5。

KEGG 通路分析得到了 $P < 0.05$ 的通路 152 条 (前 20 条通路结果见图 6), 其中富集的主要通路包括了与 COVID-19 感染源类似 (病毒感染) 的疾病, 如卡波济氏肉瘤疱疹病毒感染、人巨细胞病毒感染、乙肝病毒、丙肝病毒、EB 病毒感染、A 型流感病毒等; 以及 PI3K-Akt 信号传导通路、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、IL-17 信号传导通路、T 细胞受体信号传导通路等已报道与肺炎和免疫反应、炎症反应相关的信号通路^[13]。

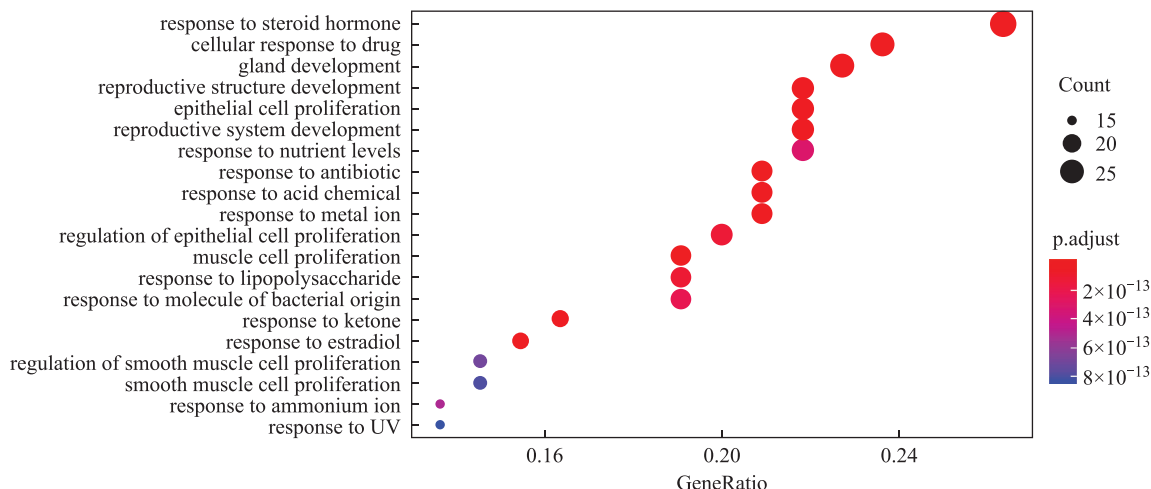


图3 GO-BP 富集分析结果

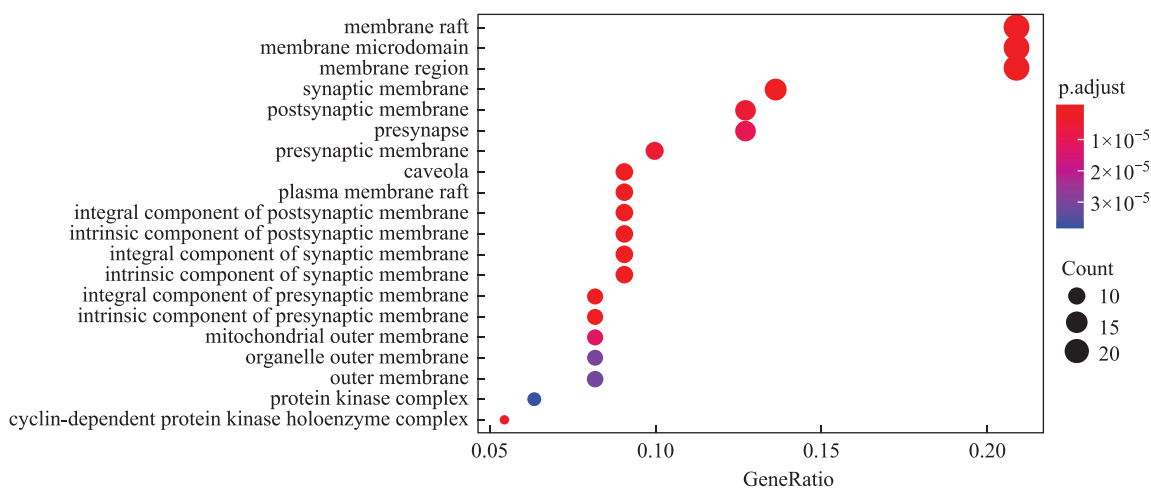


图4 GO-CC 富集分析结果

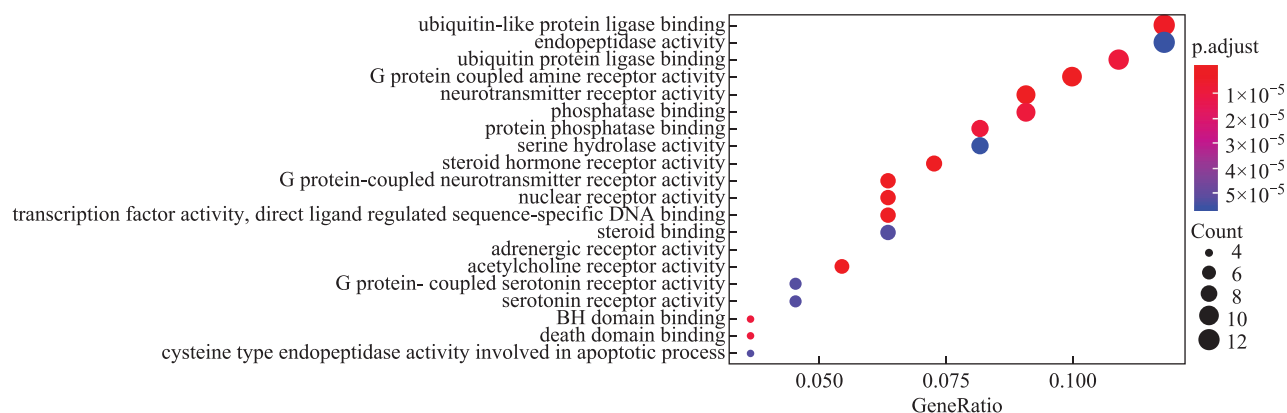


图5 GO-MF 富集分析结果

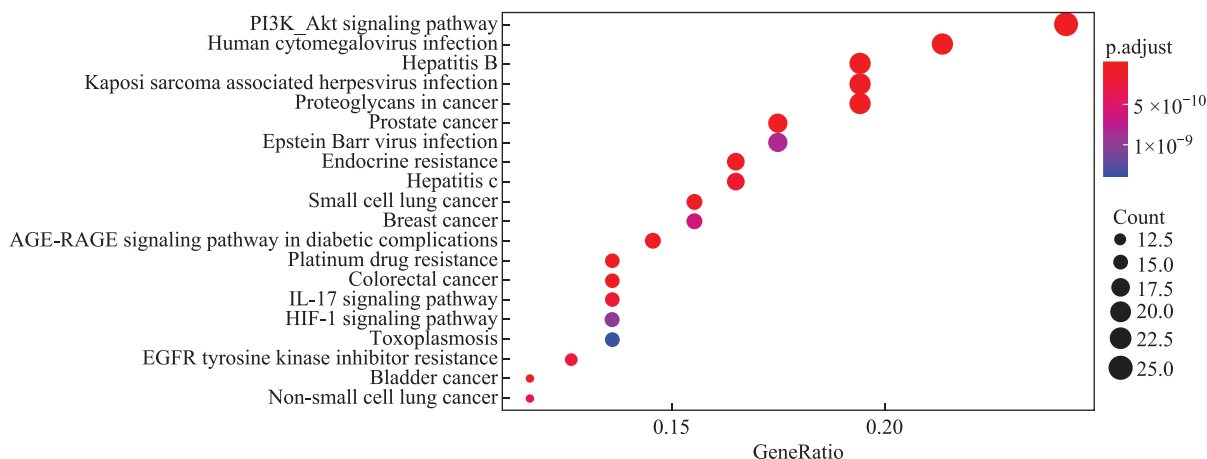


图6 银翘解毒合剂中潜在抗冠状病毒的关键成分作用靶点 KEGG 通路富集分析

综合通路富集分析结果可知,从银翘解毒合剂中筛选出的关键活性成分可能对病毒感染以及肺部损伤有一定的作用。该结果与分子对接实验一致,可互为佐证,同时也揭示了银翘解毒合剂临床防治 COVID-19 可能的起效环节。

3 讨论

银翘解毒合剂处方源于温病名方银翘散;该方出自《温病条辨》,是吴塘(鞠通)论治温病所创,被誉为治疗温病第一方^[14],具有辛凉化湿、疏散风热、清热解毒之功效。该方以金银花、连翘为君药,既有辛凉透邪清热之效,又具芳香辟秽解毒之功;荆芥、豆豉辛温不燥能助君药透散表邪,又能防止寒性药物凉遏太过,而致表邪难解;薄荷、牛蒡助君药疏散风热,共为臣药;淡竹叶、芦根清热生津;桔梗、甘草宣肺利咽止咳,均为佐药,其中甘草调和诸药,兼为使药。银翘解毒合剂配伍具有内清热毒、外散风热、透解表邪之功,构成清疏兼顾之剂。

该方主要针对温病初起卫分证及风热表证;温病初起,邪在卫分,卫气被郁,开合失司,则发热,微恶风寒,无汗或有汗不畅,风热袭肺以致咳嗽咽痛,温邪易伤津液,故口渴,舌尖红,邪在卫表,故舌苔薄白或薄黄。现代研究表明,该方用于治疗风热感冒、流感的疗效显著^[15-16]。

COVID-19 属于中医学温病范畴,病机为疫毒犯肺,起始邪在肺卫,入里化热为重要病机转归。此疾具有伏邪治病特点,疫毒伏藏体内,因人禀赋不同,可即刻起病,也可伏藏体内,殆至机体免疫功能低下而发病,具有湿、热、毒之性,临床治疗应化湿清解。COVID-19 的发病特点、临床症状、中医证候及传变规律等与银翘解毒合剂所治诸症符合,因此,从中医理论方面来看,银翘解毒合剂的确可以作为防治早期新冠肺炎的首选方之一。同时我们认为,新冠肺炎进入危重期后,病情复杂,变证丛生,临床治疗上需要采取更加个体化的方式。

研究显示,2019-nCoV 与感染途径一致,均通过其表达的 S-蛋白与人体内 ACE2 结合,导致病毒侵入机体而致病^[4,17-18]。重要的是,同源性建模表明 2019-nCoV 与 ACE2 受体的结合域与 SARS-CoV 结构相似,尽管它的受体结合域中存在氨基酸突变,多个氨基酸发生了变化,但变化后的氨基酸却在整体性上完美地维持了病毒 S-蛋白与 ACE2 受体相互结合构象的稳定性^[19-21]。因此,能作用于 ACE2 特异性位点的小分子,就有可能阻断 2019-nCoV S-蛋白与宿主 ACE2 的结合,从而达到防治 2019-nCoV 的目的。为此,本研究主要针对 2019-nCoV 感染过程的关键靶蛋白 ACE2,通过分子对接筛选银翘解毒合剂抗 2019-nCoV 的潜在分子。对接结果表明,银翘解毒合剂中有 301 个成分与 ACE2 蛋白具有较好的亲和作用,其中作用较好的化合物主要为桔梗中的皂苷和连翘中的酯苷等类成分。此前已有研究显示桔梗皂苷和连翘酯苷确有较好的抗呼吸道病毒作用^[22-25],提示虚拟筛选的结果与此前的实验结果具有较高的一致性。

基于对活性成分 ADME 性质的考虑,我们对虚拟筛选所得活性成分进行进一步筛选,从中得到关键活性成分 55 个,这些成分生物利用度较高、类药性较好,可能是银翘解毒合剂防治 COVID-19 的物质基础。为了探讨关键活性成分防治 COVID-19 的复杂路径,本研究采用网络药理学技术对关键成分及其靶标进行了深入挖掘和网络分析。从网络药理学分析结果可知,银翘解毒合剂中关键成分通过多成分、多靶点、多途径形式调控疾病;重要的是这些关键成分作用的通路包含了与 COVID-19 致病源类似的病毒感染性疾病,及与肺炎、免疫和炎症反应相关的信号通路;进一步表明这些关键成分可能对 2019-nCoV 有抑制作用、对 COVID-19 有防治作用;同时也佐证了分子对接的结果。

总之,本研究应用分子对接和网络药理学方法对银翘解毒合剂中防治病毒性肺炎的物质基础及可能起效环节进行了探讨。研究结果提示银翘解毒合剂用于 COVID-19 的防治具有一定的合理性。

但也应当注意,目前对病毒本身及感染治病机制认知尚存不足,计算化学生物学方法本身存在局限性等,因此可能会存在计算结果与实际临床疗效不符的现象;针对上述问题,可围绕物质基础-药效

学-通路验证等开展实验研究,同时进行临床药效观察,为银翘解毒合剂防治 COVID-19 提供更坚实的依据。

参考文献

- [1] 刘千勇,王晓良. 新型冠状病毒(2019-nCoV)的靶向药物研究策略[J]. 药学学报,2020,55(2):181-188.
- [2] 陈嘉源,施劲松,丘栋安,等. 2019 新型冠状病毒基因组的生物信息学分析[J/OL]. 生物信息学,2020. [2020-02-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1513.q.20200120.0839.002.html>.
- [3] 宗阳,丁美林,贾可可,等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒(2019-nCoV)肺炎活性化合物的研究[J]. 中草药,2020,51(4):836-844.
- [4] 牛明,王睿林,王仲霞,等. 基于临床经验和分子对接技术的抗新型冠状病毒中医组方快速筛选模式及应用[J]. 中国中药杂志,2020,45(6):1213-1218.
- [5] 李婧,马小兵,沈杰,等. 基于文献挖掘与分子对接技术的抗新型冠状病毒中药活性成分筛选[J]. 中草药,2020,51(4):845-850.
- [6] ZHANG M M, LIU X M, HE L. Effect of integrated traditional Chinese and Western medicine on SARS: A review of clinical evidence [J]. World J Gastroenterol, 2004,10(23):3500-3505.
- [7] 杨进. 关于中医药防治新型冠状病毒肺炎的几点思考[J/OL]. 南京中医药大学学报,2020. [2020-02-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1247.r.20200213.1012.004.html>.
- [8] 黄碧松. 新银翘散及牛蒡子制剂抗甲 1 型流感病毒 FM1 株的实验研究[D]. 广州:广州中医药大学,2005.
- [9] 黄启和,周福军,徐旭,等. 基于分子对接技术虚拟筛选延胡索抗心肌缺血物质基础研究[J]. 中草药,2019,50(10):2355-2361.
- [10] 李克宁,郑惠婷,张雨,等. 基于分子对接技术虚拟筛选葛根治疗缺血性脑卒中的物质基础研究[J]. 中草药,2018,49(8):1847-1853.
- [11] 于雅楠,陈锡欣,刘怡,等. 基于分子对接技术的豆科喹啉里西啶类生物碱抑制血管新生的活性成分虚拟筛选[J]. 中草药,2018,49(7):1640-1646.
- [12] 王槊,张海玲,光翠娥,等. 大豆皂苷 I 抑制唾液酸转移酶的分子机理研究[J]. 食品与生物技术学报,2015,34(4):355-360.
- [13] 吴昊,王佳琪,杨雨薇,等. 基于网络药理学和分子对接技术初步探索“清肺排毒汤”抗新型冠状病毒肺炎作用机制[J]. 药学学报,2020,55(3):374-383.

(下转第 563 页)

腔黏膜炎有一定的改善作用,能够降低金黄地鼠口腔颊囊组织宏观评分,改善5-FU所致的颊囊组织病理损伤,其作用机制可能与降低金黄地鼠血清中炎症标记物TNF- α 和IL-1 β 的含量,降低脂质过氧化产物MDA的含量有关。

参考文献

- [1] SANTOS R C, DIAS R S, GIORDANI A J, et al. Mucositis in head and neck cancer patients undergoing radiochemotherapy[J]. Rev Esc Enferm USP, 2011, 45(6): 1338-1344.
- [2] ALVARIÑO-MARTÍN C, SARRIÓ-PÉREZ M G. Prevention and treatment of oral mucositis in patients receiving chemotherapy[J]. J Clin Exp Dent, 2014, 6(1): e74-80.
- [3] 杨霖,王笑民,念家云,等.恶性肿瘤患者化疗相关性口腔黏膜炎的中西医药物治疗进展[J].世界科学技术—中医药现代化,2016,18(5):883-888.
- [4] 梅康康,汪俭,屈丽君.化疗后口腔黏膜炎治疗的研究进展[J].中国医院药学杂志,2019,39(13):1409-1413.
- [5] 杨霖,王笑民,孙书贤.潜阳封髓丹治疗肾阳不足型恶性肿瘤患者化疗相关性口腔黏膜炎的临床观察[J].北京中医药,2016,35(4):367-369.
- [6] 唐晓丽,杨霖,杨依,等.5-氟尿嘧啶联合机械划伤致金黄地鼠口腔黏膜炎模型的建立[J].中国比较医学杂志,2019,29(1):29-34.
- [7] SKEFF M A, BRITO G A, DE OLIVEIRA M G, et al. S-nitrosoglutathione accelerates recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis[J]. PLoS ONE, 2014, 9(12): e113378.
- [8] 程森,张健峰,刘燕,等.中医药治疗化疗性口腔黏膜炎研究进展[J].新中医,2019,51(8):40-42.
- [9] 朱丽婵,江子芳,余新燕.5-氟尿嘧啶化疗致口腔黏膜炎对生活质量的影響[J].护理与康复,2008,7(2):90-92.
- [10] MOSLEMI D, NOKHANDANI A M, OTAGHSARAEI M T, et al. Management of chemo/radiation-induced oral mucositis in patients with head and neck cancer: A review of the current literature[J]. Radiother Oncol, 2016, 120(1): 13-20.
- [11] BARBOSA S C M, PEREIRA V B M, WONG D V T, et al. Amifostine reduces inflammation and protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis and hyposalivation[J]. Braz J Med Biol Res, 2019, 52(3): e8251.

(收稿日期: 2019-10-16 编辑: 王笑辉)

(上接第521页)

- [14] 周江.《温病条辨》银翘散及类方辨析[J].中国中医急诊,2008,17(1):87,89.
- [15] 张照研,周喆.银翘散抗流行性感冒的临床运用和实验研究[J].中医学报,2015,30(3):438-440.
- [16] 焦志玲.银翘散加减治疗急性上呼吸道感染疗效观察[J].中外医疗,2013,32(3):115-116.
- [17] XU X T, CHEN P, WANG J F, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission[J]. Sci China Life Sci, 2020, 63(3): 457-460.
- [18] LI F, LI W H, FARZAN M, et al. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor[J]. Science, 2005, 309: 1864-1868.
- [19] LU R J, ZHAO X, LI J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. The Lancet, 2020, 395(10224): 565-574.
- [20] 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.
- [21] 李鹤,谭晓川,姜栋,等.冠状病毒及其治疗药物研究进展[J/OL].中国药理学杂志:1-22[2020-02-13].http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2162.r.20200212.2010.004.html.
- [22] 李国强.分析桔梗皂苷活性成分及其生物活性[J].中西医结合心血管病电子杂志,2015,3(27):192-193.
- [23] 刘羽华,董竞成.呼吸道病毒感染中西医药物治疗进展[J].中西医结合学报,2018,2(3):226-227.
- [24] 程森,王明哲,宋金华,等.扶正解毒化痰方总苷提取物对呼吸道合胞病毒感染宿主细胞炎症反应的影响[J].中国中医药信息杂志,2018,25(12):35-39.
- [25] 赵文华,石任兵,刘斌,等.连翘病毒清胶囊抗病毒有效部位化学成分的研究[J].中成药,2005,27(4):449-453.

(收稿日期: 2020-03-11 编辑: 谢睿)