

·数字中医药·

本文引用:谢丽华, 简晓源, 何 飘, 刘 瑛, 胡国恒. 基于网络药理学与分子对接法探寻双黄连口服液治疗新型冠状病毒肺炎的有效成分及机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(9): 1123-1131.

基于网络药理学与分子对接法探寻双黄连口服液治疗新型冠状病毒肺炎的有效成分及机制研究

谢丽华^{1,2}, 简晓源², 何 飘^{1,2}, 刘 瑛^{1,2}, 胡国恒^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

[摘要] **目的** 基于网络药理学和分子对接技术, 预测双黄连口服液治疗新型冠状病毒肺炎(Coronavirus Disease 2019, COVID-19)的有效成分及潜在作用机制。**方法** 利用 TCMSP、Swiss Target Prediction 等数据库检索双黄连口服液中药物的化学成分及作用靶点, 运用 GeneCards、CTD 等数据库筛选 COVID-19 相关潜在靶标, 通过 Cytoscape 3.6.1 软件构建“中药-成分-靶点-疾病”网络、PPI 网络, 利用 BioGPS 数据库进行关键靶点组织定位分析, 通过 GO 及 KEGG 富集分析预测潜在作用机制, 并将主要活性成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶、ACE2 及 2019-nCoV-RBD/ACE2-B0AT1 complex 进行分子对接验证。**结果** 共筛选出双黄连口服液中 78 个化学成分, 629 个成分靶点, 330 个 COVID-19 相关靶点, 得到 72 个成分-疾病靶点, 筛选出 PTGS2、SRC、MMP2 等 28 个关键靶点。GO 富集共得到 169 个条目, 主要涉及 RNA 转录、IL-6 的表达与调控、ATP 结合、血红素结合等。KEGG 富集得到 100 条信号通路, 主要为癌症相关通路、HIF-1、PI3K/Akt、TNF 信号通路等。组织定位分析显示关键基因表达主要分布在在肺组织和免疫细胞中, 分子对接结果显示双黄连口服液主要活性成分与 3CLMpro、ACE2、complex 结合较好, 其中黄芩素、黄烷酮、木犀草素与 3 个蛋白结合能均较低, 推测在治疗中发挥重要作用。**结论** 双黄连口服液可通过多成分-多靶点-多途径协同治疗 COVID-19, 其临床应用具有一定局限性, 其机制可能是通过干预癌症相关通路、HIF-1、PI3K-Akt 及 TNF 信号通路, 发挥抗病毒、抗炎、抑制氧化应激、抑制细胞凋亡的作用, 又可能与 3CLMpro、ACE2、complex 结合抑制病毒感染宿主细胞及干扰病毒复制增殖有关。

[关键词] 新型冠状病毒肺炎; 双黄连口服液; 网络药理学; 分子对接; 黄芩素; 黄烷酮; 木犀草素

[中图分类号]R285 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.09.016

Research on Shuanghuanglian Oral Liquid for Treatment of COVID-19 Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

XIE Lihua^{1,2}, LIN Xiaoyuan², HE Piao^{1,2}, LIU Ying^{1,2}, HU Guoheng^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To predict the effective components and potential mechanisms of Shuanghuanglian oral liquid for the prevention and treatment of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The chemical components and targets were retrieved by TCMSP, Swiss Target Prediction, and other databases. The potential targets of COVID-19 were screened by GeneCards and CTD databases. The network of “drug- components-targets-disease”, and PPI network was constructed by Cytoscape 3.6.1 software. The BioGPS database was used to analyze the tissue location of key targets. The

[收稿日期]2020-04-15

[基金项目]国家自然科学基金项目(81573941); 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科。

[作者简介]谢丽华, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 从事中医药防治内科疾病研究。

[通讯作者]* 胡国恒, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: hugh9198@163.com。

potential mechanisms were predicted by GO and KEGG analysis. The main active ingredients and SARS-CoV-2 3CL hydrolase, ACE2 and 2019-nCoV RBD/ACE2-B0AT1 complex were verified by molecular docking. **Results** A total of 78 active components, 629 drug targets, and 330 disease targets of COVID-19 were screened, and 72 drug-disease common targets were obtained. PTGS2, SRC, MMP2, and other 28 key targets were screened. 169 entries were obtained by GO analysis, which mainly involved RNA transcription, expression and regulation of IL-6 production, ATP binding, heme binding. KEGG pathway enrichment screened 100 signaling pathways, including cancer-related pathways, HIF-1, PI3K-Akt, TNF signaling pathway, and so on. The results of tissue location showed that the key gene expression sites were mainly in lung and immune cells. The molecular docking results showed that the main active components of Shuanghuanglian oral liquid had a good binding ability with 3CLMpro, ACE2, and complex. There was a relatively low binding energy of baicalein, flavanone, luteolin with 3 proteins, which indicated that they play an important role in treatment. **Conclusion** Shuanghuanglian oral liquid acts on COVID-19 through multiple components, multiple targets, multiple pathways, but there are some limitations in clinical application. The mechanism may be through interfering with cancer-related signaling pathways, HIF-1, PI3K-Akt, and TNF signaling pathway to exert the effects of antiviral, anti-inflammatory, antioxidation, and inhibiting apoptosis to treat COVID-19, and may also be related to inhibiting virus infection of the host cell and interfering with virus replication and proliferation by binding with 3CLMpro, ACE2, and complex.

[**Keywords**] COVID-19; Shuanghuanglian oral liquid; network pharmacology; molecular docking; baicalein; luteolin

新型冠状病毒肺炎(Coronavirus Disease 2019, COVID-19)是一种由 2019 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的流行性肺炎,其传染性强,人群普遍易感,临床症状以发热、乏力、干咳为主,严重者并发急性呼吸窘迫综合征。针对 COVID-19,西医主要以抗感染、对症支持治疗为主^[1],中医药作为祖国医学的宝贵遗产,在治疗与预防疫病方面具有丰富的临床经验,在整体观念及辨证论治思想的指导下,可通过驱邪外出、扶助正气实现整体调节,以改善临床症状、延缓疾病发展。

2020 年 1 月 31 日,中国科学院初步发现双黄连口服液可抑制 SARS-CoV-2,双黄连口服液由金银花、黄芩、连翘 3 味中药组成,具疏风解表、清热解毒之效。金银花、连翘疏散风热、清热解毒,配以苦寒之黄芩以清中上焦湿热、泻上焦实火,主要用于以发热、咳嗽、咽痛为主的外感风热之症,对病毒感染所致的上呼吸道感染、肺炎等具有一定疗效^[2]。研究表明,双黄连口服液可通过减少炎性细胞浸润、抑制病毒复制,减轻肺损伤,对流感病毒(H1N1、H5N1)、呼吸道合胞病毒、轮状病毒具有明显的抗病毒效应^[3-6]。刘菊等^[7]通过总结中药抗病毒及抗 COVID-19 临床推荐用药的研究发现,抗病毒中药使用频率前 5 的为金银花、板蓝根、鱼腥草、连翘、黄芩,中医药防治 COVID-19 推荐用药多含金银花、连翘、板蓝根、黄连、黄芪、人参等,而在多次 COVID-19 临床诊疗方案中并未推荐双黄连制剂。故本文采用网络药理学对双黄连口服液主要化学成分及其靶点进行功能

及通路富集分析,预测双黄连口服液防治 COVID-19 的有效成分及潜在作用机制,并采用分子对接的方法,对主要活性成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶(Mpro)、ACE2、2019-nCoV RBD/ACE2-B0AT1 complex 进行筛选,为寻找 COVID-19 的药物治疗或新药研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中药系统药理学数据库和分析平台(TCM-SP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>); DAVID 6.8 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>); RCSBPDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>); Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>); PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>); CTD 数据库(<http://ctdbase.org/>); BioGPS 数据库(<http://biogps.org/#goto=welcome>); Venny 2.1 在线软件作图工具平台(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>); 在线绘图平台 OmicsShare(<https://www.omicsshare.com/>); Chemoffice 软件; AutoDock Vina 1.1.2 软件; PyMOL 软件; Cytoscape 3.6.1 软件; GraphPad Prism 8 软件。

1.2 方法

1.2.1 双黄连口服液化学成分的收集 以“金银花”“黄芩”“连翘”为关键词通过 TCMSP 数据库搜索其成分,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、药物相似性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18

为标准进行筛选,并结合相关文献数据确定化学成分,使用 Pubchem 数据库下载化学成分的分子结构并保存各成分的 Canonical SMILES 格式。

1.2.2 双黄连口服液靶点的预测 将 SMILES 格式导入 Swiss 数据库,以“人类”为研究对象,得到相应化学成分的作用靶点,整合去除重复后得到双黄连口服液的作用靶点。

1.2.3 COVID-19 靶点的获取 使用 GeneCards、CTD 数据库,以“novel coronavirus”为关键字进行搜索,每个数据库选择相关度前 300 的靶点作为 COVID-19 的相关作用靶点^[8],整合去除重复后得到 COVID-19 作用靶点。

1.2.4 潜在作用靶点的获取 将双黄连口服液靶点及 COVID-19 靶点分别导入 Venny 2.1 在线作图工具平台,绘制韦恩图,得到两者的交集,即为双黄连口服液抗 COVID-19 的潜在作用靶点,即成分-疾病靶点。

1.2.5 网络构建 将化学成分及所得到的潜在作用靶点导入 Cytoscape 3.6.1 软件,构建双黄连口服液抗 COVID-19 的“中药-成分-靶点-疾病”关系网络,使用 Network Analyzer 功能对药物中的化学成分及靶点进行分析,节点大小颜色深浅代表度(degree)值的大小,根据节点度值筛选主要活性成分及关键靶点。将关键靶点录入 STRING 数据库获取蛋白相互作用信息,运用 Cytoscape 3.6.1 软件进行可视化分析,并通过 BioGPS 数据库对关键基因进行组织定位分析,得到其作用组织。

1.2.6 通路富集分析 将成分-疾病靶点以 Gene Symbol 的格式导入 DAVID 6.8 数据库,分别选择生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞成分(cellular component, CC)进行基因本体(GO)富集分析,选择 KEGG 进行靶点基因通路注释分析,并且使用 GraphPad Prism 8 软件将 GO 富集分析满足 $P < 0.05$ 的结果做成可视化条形图。使用 Omicshare 平台将 KEGG 分析满足 $P < 0.05$ 的结果制成可视化气泡图。

1.2.7 分子对接验证 将主要活性成分的分子结构导入 Chemoffice 软件对其进行分子结构能量优化,保存;应用 RCSBPDB 数据库下载 SARS-CoV-2 3CLMpro (PDB ID:6LU7)、ACE2 (PDB ID:1R42)、2019-nCoV-RBD/ACE2-B0AT1 complex (PDB ID:6M17)的晶体结构,运用 Mgltools 1.5.6 进行加氢、计算电荷后保存为 *.pdbqt 文件,选择 3CLMpro、ACE2、complex 特有的小分子配体作为活性中心,最

后运用 AutoDockVina 对其进行分子对接,利用 Py-mol 进行分析作图。

2 结果

2.1 潜在化学成分

根据 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$,通过 TCMSp 检索到双黄连口服液中 3 味中药去除重复的化学成分后共 74 个,金银花 23 个,黄芩 36 个,连翘 23 个,其中,汉黄芩素为黄芩、连翘所共有,豆甾醇、黄烷酮为黄芩、金银花所共有,槲皮素、木犀草素、山奈酚为连翘、金银花所共有, β -谷甾醇为三者共有。研究表明,金银花中的齐墩果酸、木犀草苷、异绿原酸 A 和连翘中的连翘酯苷具有潜在的抗 SARS-CoV-2 作用^[9],虽然这些成分不满足 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 的标准,亦纳入研究,故共收集到 78 个化学成分。

2.2 抗 COVID-19 潜在作用靶点

将 Swiss 数据库中得到的化学成分作用靶点去重复后得到 629 个靶点,中药-成分-靶点统计见图 1。通过 Genecards、CTD 数据库查找 COVID-19 相关作用靶点,去重复后得到 330 个。将化学成分潜在作用靶点及疾病相关靶点导入 Venny 2.1 在线作图工具平台,绘制韦恩图,见图 2,共得到两者交集靶点 72 个,表明双黄连口服液可能通过调节多个潜在靶点发挥作用。

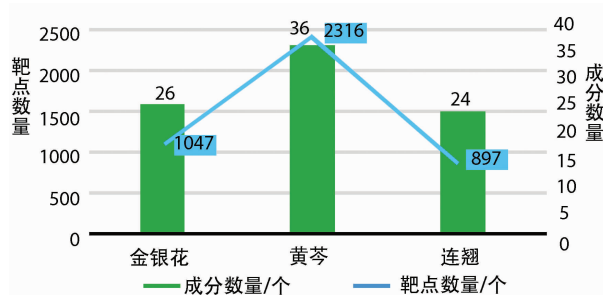


图 1 双黄连口服液中中药-成分-靶点信息统计图

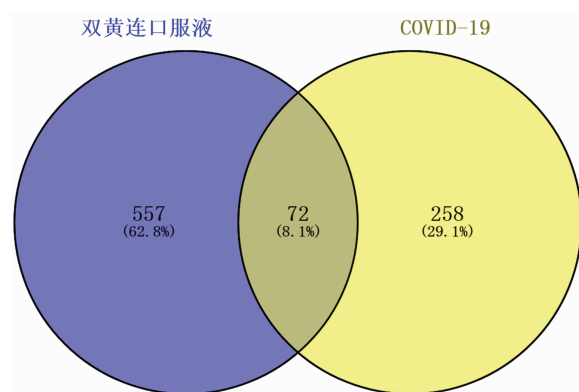


图 2 双黄连口服液与 COVID-19 靶点韦恩图

2.3 中药-成分-靶点-疾病网络构建

将双黄连口服液化学成分与 72 个潜在作用靶点导入 Cytoscape 3.6.1 软件,除去无靶点关联的孤立成分,绘制中药-成分-靶点-疾病关系网络,见图 3。使用 Network Analyzer 功能对关系网络进行分析,度值代表该成分与潜在靶点的关联数,度值越大表明该成分在疾病网络中越重要,根据度值筛选活性成分,其中 7-O-甲基汉黄芩素、1,2-苯二甲酸二(2-乙基己基)酯、刺槐素、汉黄芩素、黄芩素、5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮、鼠尾草素、去甲汉黄芩素、5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮、金圣草素、千层纸素 A、黄芩黄酮、黄烷酮、木犀草素等 14 个成分度值均大于成分度值中位数(成分度值中位数=13),且均能与 18 个及以上靶点相关联,预测这 14 个成分是双黄连口服液抗 COVID-19 的主要活性成分。

2.4 PPI 网络构建及组织定位分析

根据靶点度值 ≥ 2 倍中位数(靶点度值=4)筛选关键靶点^[10],得到 PTGS2、SRC、MMP2、EGFR、APP 等 28 个关键靶点,将关键靶点录入 STRING 数据库得到蛋白之间相互作用关系,并导入 Cytoscape 3.6.1 软件进行可视化分析,构建 PPI 网络,结果见图 4。PTGS2 为前列腺素内过氧化物合成酶的一种亚型,其主要产物前列腺素对 RNA 病毒、DNA 病毒均有抗病毒活性,可在病毒复制的早期抑制细胞中的病毒复制^[11]。SRC 蛋白激酶在多种病毒感染过程中被激活并在病毒复制、侵袭过程中具有重要作用^[12-13]。EGFR 是受体酪氨酸激酶(RTKs)家族成员之一,其可介导病毒入侵,并在病毒延长存活时间及逃避宿主免疫监控等过程发挥重要作用^[14]。

为明确双黄连口服液发挥抗病毒功效与人体组

织之间的关系,将关键靶点导入 BioGPS 数据库进行定位,见图 4,其中,各组织类型分别为呼吸系统的肺及气管,消化系统的胃肠,神经系统的脑,免疫系统的血小板、T 细胞、B 细胞、浆细胞、中性粒细胞等,不同颜色代表对应不同的组织。由图可知,13 个靶点作用于肺组织,为最多,依次为大脑 10 个,T 细胞 9 个,胃肠 8 个,血小板 8 个,中性粒细胞 6 个,B 细胞 5 个,浆细胞 3 个。表明双黄连口服液活性成分抗 COVID-19 的关键基因主要在肺组织和免疫细胞中表达。

2.5 GO 富集分析及 KEGG 通路注释分析

将 72 个潜在靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 富集分析($P < 0.05$),共得到 169 个条目,包含 121 个生物过程,23 个细胞成分,25 个分子功能,见图 5。生物过程主要涉及分解代谢、RNA 转录调控、血管再生、IL-6 的表达与调控等;在细胞成分中,主要涉及细胞溶质、胞外基质、溶酶体、RNA 聚合酶 II 转录因子复合物等;分子功能主要包括 ATP 结合、血红素结合、转录因子活性等。KEGG 分析($P < 0.05$)共富集到 100 条信号通路,见图 6,主要集中在癌症相关通路、缺氧诱导因子-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、雌激素信号通路(Estrogen signaling pathway)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路等(TNF signaling pathway)等,可见上述生物功能及信号通路可能与双黄连口服液治疗 COVID-19 密切相关。

2.6 主要活性成分的分子对接验证

一般结合能小于 0 说明配体可与受体自发结合,目前对于活性分子靶点筛选尚无统一标准,根据

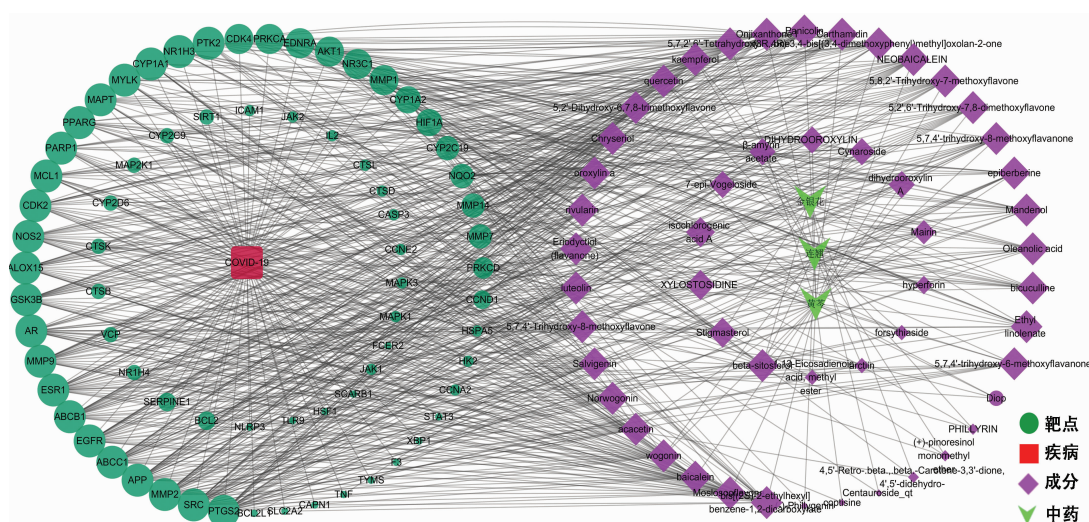


图 3 中药-成分-靶点-疾病关系网络

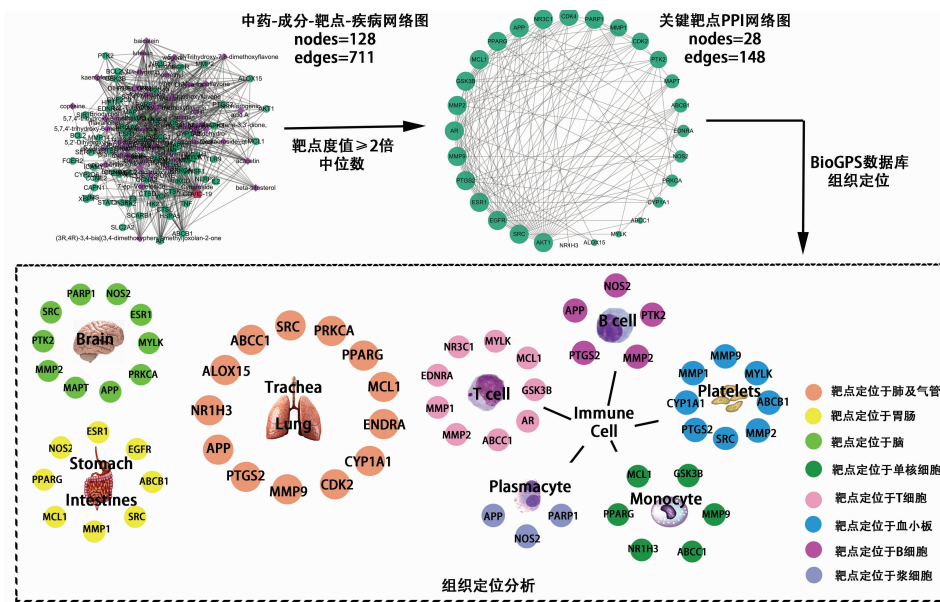


图 4 关键基因 PPI 筛选网络及组织定位分析图

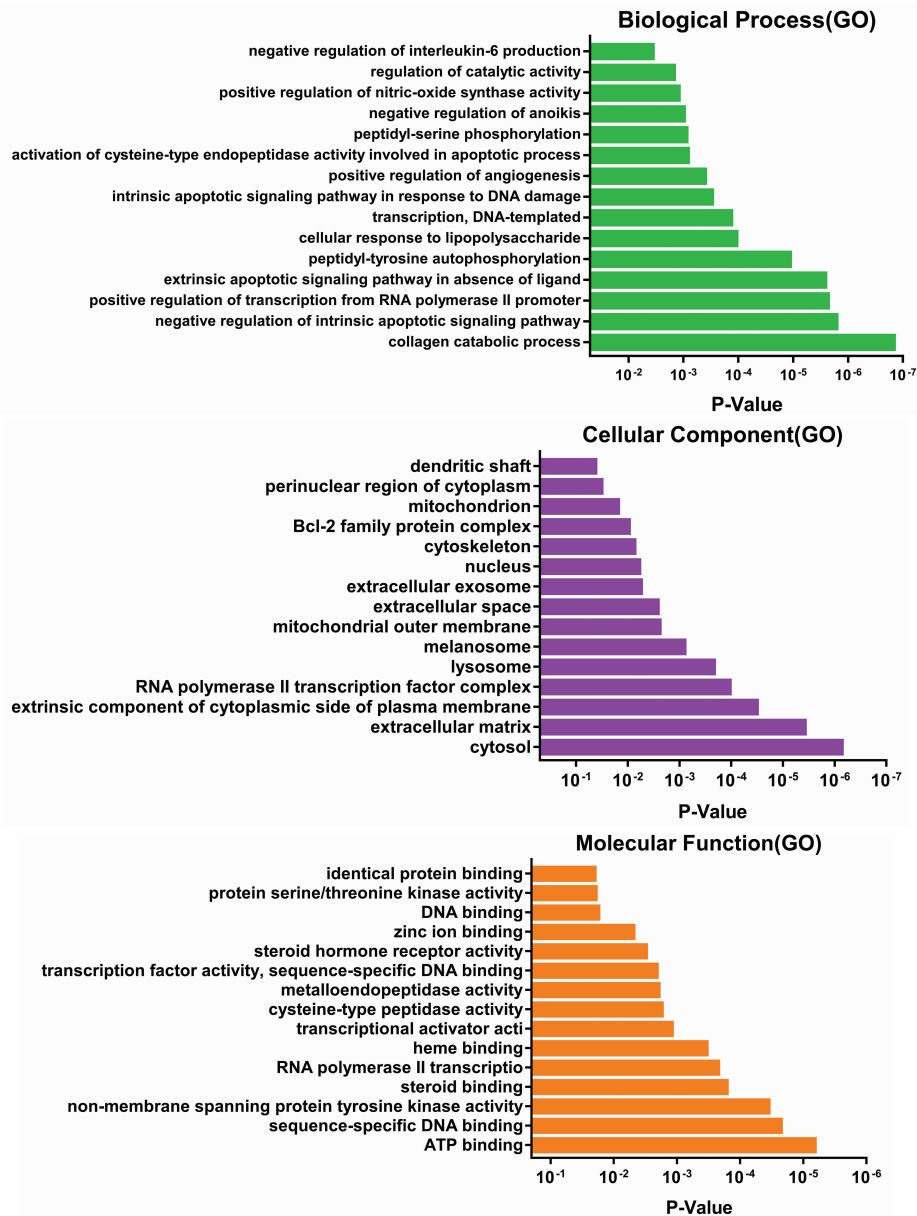


图 5 SHLKFY 治疗 COVID-19 潜在靶点 GO 富集分析

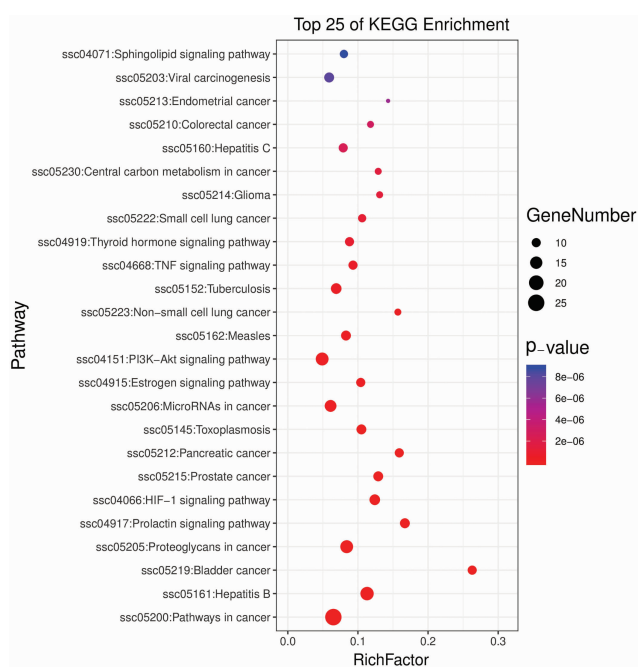


图6 潜在靶点 KEGG 通路注释分析气泡图

文献报道,此处选取结合能 ≤ -5.0 kcal/mol 作为活性分子与 SARS-CoV-2 存在较强结合活性的评价标准^[15]。研究表明,SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 感染途径均通过其表达的 S-蛋白与人体内 ACE2 相结合构成 SARS-CoV-2-RBD-ACE2 复合物,再通过 S 蛋白膜融合作用释放病毒核酸进入细胞内^[16]。SARS-CoV-2 属于 RNA 病毒,3CLMpro 在其复制过

程中发挥重要作用^[17],影响 3CLMpro、ACE2 结合活性或影响病毒与 ACE2 结合复合物结构的稳定性干扰病毒感染宿主细胞及复制过程,可能是抑制 SARS-CoV-2 感染人体的方式^[18]。故将网络药理学分析中度值前 14 的活性成分与 3CLMpro、ACE2 及 2019-nCoV-RBD/ACE2-B0AT1 complex 进行分子对接,结果见表 1 及图 7。结果显示,14 个主要活性成分与 3CLMpro、ACE2 及 complex 结合能均 < -5.0 kcal/mol,可知双黄连口服液主要活性成分与这 3 个蛋白结合构象能量低,结构稳定,具有较好的结合能力。

3 讨论

自推行中西医结合治疗 COVID-19 后,我国疫情逐渐被控制下来,而中医药发挥至关重要的作用,数据表明,中西医结合治疗临床治愈率(91.2%)较单纯西医疗疗(61.1%)有明显提高^[19-20]。根据此次疫情发生的特点,COVID-19 属于中医学“疫病”范畴,“寒湿疫毒”为其重要病因^[21]。《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第三版)》^[22]将 COVID-19 分为寒湿郁肺、邪热壅肺、邪毒闭肺、内闭外脱 4 类,治以化湿解毒、宣肺透邪,或清热解表、宣肺透邪,或宣肺解毒、通腑泄热,或开闭固脱、解毒救逆。双黄连口服液具疏风解表、清热解毒之效,可明显降低邪热壅肺型支气管肺炎患者血象及降钙素原等感染指标,改善患者发热、咳嗽、气急及肺部啰音等症状及

表 1 双黄连口服液主要活性成分的结合能

化学成分中文名	化学成分英文名	分子式	相对分子质量	CAS	结合能(kcal/mol)		
					3CLMpro	ACE2	complex
5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮	5,2'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344.34	86926-52-5	-6.6	-7.8	-7.0
5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮	5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.28	57096-02-3	-7.5	-8.0	-8.5
刺槐素	Acacetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.28	480-44-4	-7.5	-8.1	-7.9
黄芩素	Baicalein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.25	491-67-8	-7.9	-8.5	-8.3
1,2-苯二甲酸二(2-乙基己基)酯	Bis(2S)-2-ethylhexyl benzene-1,2-dicarboxylate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.62	8033-53-2	-6.2	-6.0	-6.4
金圣草(黄素)	Chryseriol	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.28	491-71-4	-7.4	-8.6	-8.2
黄烷酮	Eriodyctiol (flavanone)	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.27	4049-38-1	-7.7	-8.4	-8.0
木犀草素	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.25	491-70-3	-7.7	-8.4	-8.1
7-O-甲基汉黄芩素	Moslosooflavone	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	298.31	3570-62-5	-7.6	-8.0	-8.1
去甲汉黄芩素	Norwogonin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.25	4443-09-8	-7.6	-8.3	-8.4
千层纸素 A	Oroxylin A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.28	480-11-5	-7.3	-8.0	-8.2
黄芩黄酮	Rivularin	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344.34	70028-59-0	-7.4	-8.2	-8.3
鼠尾草素	Salvigenin	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	328.34	19103-54-9	-7.6	-8.1	-7.7
汉黄芩素	Wogonin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.28	632-85-9	-7.4	-8.2	-7.9
瑞德西韦	Remdesivir	C ₂₇ H ₃₅ N ₆ O ₈ P	602.58	1809249-37-3	-8.1	-8.7	-8.5
利巴韦林	Ribavirin	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅	244.21	36791-04-5	-6.5	-6.9	-6.5
利托那韦	Ritonavir	C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂	720.96	155213-67-5	-8.0	-8.6	-8.5
洛匹那韦	Lopinavir	C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅	628.80	192725-17-0	-7.9	-8.7	-8.7

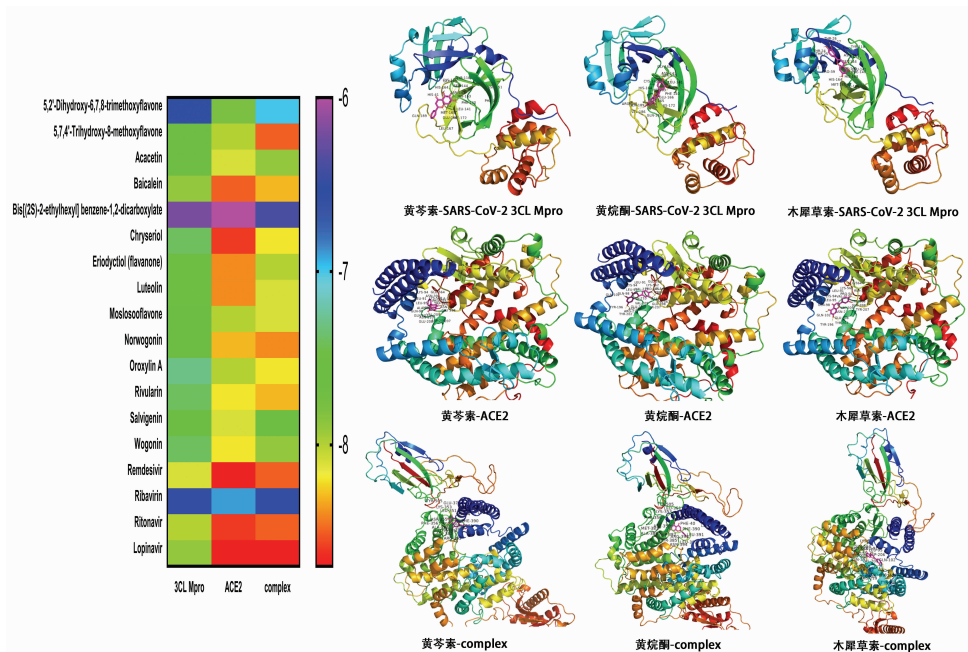


图7 分子对接热图和黄芩素、黄芩酮、木犀草素与3CLMpro、ACE2、complex分子对接模式

体征^[23]。目前,双黄连口服液广泛用于流感、肺炎的临床治疗^[24-25]。虽在多次修订的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》中并没有明确推荐双黄连口服液治疗,但通过对全国各地治疗 COVID-19 的中药数据挖掘发现,金银花、黄芩、连翘使用次数较为频繁^[26],因此其物质基础及作用机制的研究具有一定意义,也为 COVID-19 的中医药治疗提供参考。

本研究通过网络药理学进行研究,共得到双黄连口服液化学成分 78 个,化学成分靶点 629 个, COVID-19 相关靶点 330 个,最终得到化学成分-疾病靶点 72 个。对成分-疾病靶点进行 GO 富集分析发现,双黄连口服液活性成分可参与 RNA 转录及转录因子活性、IL-6 的表达与调控、ATP 结合、血红素结合等生物功能发挥抗 COVID-19 作用。研究表明, SARS-CoV-2 属于 RNA 病毒, RNA 转录可调控其复制增殖过程^[17]。黄芩素、木犀草素可抑制 H5N1 病毒复制,并可干扰 N5N1 诱导巨噬细胞 IL-6、TNF- α 产生^[27]。IL-6 是一种促炎性因子,是形成细胞因子风暴中的关键因素,在加速 COVID-19 发生发展中发挥重要作用^[28]。黄芩苷可明显降低 IL-6、TNF- γ 等细胞因子抑制炎症反应^[29],连翘可通过降低核因子- κ B (NF- κ B)、Toll 样受体 4 (TLR4) 表达水平,减少 IL-10、IL-6 等细胞因子分泌,发挥抗炎及免疫调节作用^[30]。血红素为铁卟啉化合物,是血红蛋白的辅基,其可与氧结合参与机体载氧、贮氧过程,当组织得不到充足的氧,或不能充分利用氧时,则可导致机体缺氧,严重 COVID-19 患者可见呼吸困难和低氧血症,其发生机制可能与 IL-2、IL-10、TNF 等诱发

炎症反应,缺氧诱发活性氧(ROS)的产生,进而引起弥漫性肺泡损伤、肺水肿,导致呼吸困难,甚至引发急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[31]有关。黄芩苷可下调百草枯中毒大鼠肺组织转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、HIF-1 α 表达,改善肺纤维化及缺氧症状^[32]。

KEGG 通路注释分析结果显示,双黄连口服液主要通过调节癌症相关通路、HIF-1、PI3K-Akt、TNF 信号通路等途径来干预 COVID-19。HIF-1 通路主要通过调控 ROS 产生、能量代谢、线粒体呼吸等过程参与机体缺氧反应^[33],去甲汉黄芩素可降低缺氧细胞内 ROS 的产生,下调 HIF-1 α 、Caspase-3 表达,增加 Bcl-2 表达水平,保护细胞膜完整性^[34]。TNF 信号通路主要与炎症反应相关,金银花提取物可抑制 H1N1 病毒核酸 RNA 表达,抑制病毒复制,还可降低 TNF- α 、IL-1 β 水平抑制炎症反应^[35]。PI3K/Akt 通路可调控细胞增殖、分化、凋亡、能量代谢等过程,还参与调节 TNF- α 诱导的炎症反应及 ROS 介导的氧化应激反应^[36-37]。黄芩苷可抑制 PI3K/Akt 通路激活,抑制 NF- κ B 转导,减少 TNF- α 、IL-6 等细胞因子的分泌,发挥抑制炎症反应作用^[38]。连翘苷可通过调控 NF- κ B 通路以抑制 IL-1 β 诱导的细胞凋亡^[39]。因此,双黄连口服液活性成分可能通过干预癌症相关通路、HIF-1、PI3K-Akt 及 TNF 信号通路,发挥抗病毒、抗炎、抑制氧化应激、抑制细胞凋亡作用,从而达到治疗 COVID-19 的目的。

PPI 网络构建发现干预 COVID-19 的关键靶点主要为 PTGS2、SRC、MMP2、EGFR、APP 等 28 个。进一步对关键靶点进行组织定位分析,可知其基因主

要映射在肺组织和免疫细胞中。SARS-CoV-2 感染早期主要通过肺中气道上皮细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞和巨噬细胞表达的 ACE2 结合而侵入机体^[40-41]。SARS-CoV-2 感染和肺组织损伤可触发免疫反应,募集巨噬细胞、单核细胞,释放细胞因子,诱发 T 细胞免疫反应及 B 细胞免疫反应^[41],可见肺组织及免疫细胞较易受累。PTGS2 主要产物是前列腺素(PG),黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等黄酮类化合物可通过抑制脂多糖(LPS)激活的小鼠巨噬细胞对 PGE2 的产生发挥抗炎作用^[42]。木犀草素可抑制 PI3K/Akt 通路激活,减少直肠癌细胞诱导的小鼠肺组织中 MPP9 表达^[43]。连翘可以抑制 H1N1 肺炎小鼠模型中促炎细胞(巨噬细胞、淋巴细胞、白细胞等)释放 TNF、IL-6 等细胞因子发挥抗炎作用^[44]。黄芩素可显著抑制免疫细胞对巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)的释放,抑制 PARP1 激活,保护线粒体功能,减少细胞凋亡^[45]。

通过构建“中药-成分-靶点-疾病”关系网络发现,双黄连口服液活性成分主要有木犀草素、千层纸素 A、黄芩素、汉黄芩素、黄芩黄酮等 14 个,该 14 个成分均能与 SARS-CoV-2 3CLM_{pro}/ACE2 及 2019-nCoV_{VRBD}/ACE2-B0AT1 complex 结合,表明双黄连口服液对 COVID-19 具有一定的潜在治疗作用。其中,黄芩素、黄烷酮、木犀草素与 3CLM_{pro} 结合能力较好,而 3CLM_{pro} 抑制剂可有效阻断病毒复制;金圣草素、黄芩素、黄烷酮、木犀草素和 ACE2 具有较好的结合能力,可竞争性结合 ACE2,抑制 SARS-CoV-2 感染宿主细胞;5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮、去甲汉黄芩素、黄芩素、黄芩黄酮与 complex 有较好的结合能力,可影响 SARS-CoV-2 S 蛋白受体与 ACE2 结合复合物结构的稳定性以抑制病毒核酸进入宿主细胞。结合分子对接结果,黄芩素、黄烷酮、木犀草素与 3 个蛋白结合能均较低,且与瑞德西韦及《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第 7 版)》^[46]中推荐的利托那韦、洛匹那韦具有相似的结合能力。黄芩素、木犀草素等黄酮类化合物可通过抑制病毒复制、降低细胞因子产生发挥抗病毒作用^[27],故推测黄芩素、黄烷酮、木犀草素可能在抗 SARS-CoV-2 中发挥重要作用。

综上所述,通过对双黄连口服液中化学成分、作用靶点及其主要活性成分与 3CLM_{pro}/ACE2、complex 结合能力进行网络药理学及分子对接技术研究,可以发现双黄连口服液可通过多成分、多靶点、多途径协同发挥抗 COVID-19 的作用。然而,“整体观念、辨证论治”是中医诊治疾病的基本特点,临证

处方之时还需考虑患者体质阴阳偏盛之别、发病地域寒温之异、病情发展阶段不同等情况因证施治。双黄连为苦寒清解之品,易损伤脾胃,易耗伤人体阳气,故不可盲目服用。且根据 2015 版《中华人民共和国药典》^[47],黄芩苷、绿原酸、连翘苷为双黄连口服液的质量控制成分,在制备过程由于成分的富集及丢失,致黄芩素、黄烷酮、木犀草素等含量较低,故双黄连口服液抑制 SARS-CoV-2 具有一定限制性。此外,网络药理学及分子对接技术本身具有一定的局限性,其预测的结果还需进一步的实验验证其有效性,为防治 COVID-19 及药物研发提供科学依据。

参考文献

- [1] 李昌海,李 波,雷珊珊,等.新型冠状病毒肺炎感染防治研究进展[J].中国药师,2020,23(6):1168-1174.
- [2] 郭 洁,宋殿荣.双黄连的药理作用和临床应用及不良反应研究进展[J].临床合理用药杂志,2017,10(21):161-163.
- [3] TANG Y L, WANG Z H, HUO C Y, et al. Antiviral effects of Shuanghuanglian injection powder against influenza A virus H5N1 in vitro and in vivo[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 121: 318-324.
- [4] LIU T, WANG H D, DI L Q, et al. HPLC specific chromatogram spectrum-effect relationship for Shuanghuanglian on MDCK cell injury induced by influenza A virus (H1N1)[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(21): 4194-4199.
- [5] 吴成林,杨占秋,候 炜,等.双黄口服液抗呼吸道合胞病毒的实验研究[J].数理医药学杂志,2005,18(6):592-594.
- [6] 易 波.双黄连口服液(儿童型)联合蒙脱石散治疗小儿轮状病毒性肠炎的疗效观察[J].中国药物评价,2018,35(1):48-50.
- [7] 刘 菊,崔 瑛,白明学,等.基于中医药预防治疗新型冠状病毒肺炎的用药探析[J].中草药,2020,51(4):1-5.
- [8] 徐文华,郑景辉,赵 阳,等.基于网络药理学和生物信息学的丹参酮 IIA 治疗冠心病的分子生物学机制分析[J].中草药,2019,50(5): 1131-1140.
- [9] 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):1-11.
- [10] 侯 磊,李晓宇,黄娜娜,等.四逆散干预焦虑症作用机制的网络药理学分析[J].中草药,2019,50(21):5154-5161.
- [11] CALDAS L A, FERREIRA D F, FREITAS T R P. Prostaglandin A1 triggers Mayaro virus inhibition and heat shock protein 70 expression in an epithelial cell model[J]. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, 2018, 51(5): 584-590.
- [12] CHENG C Y, TSENG H H, CHIU H C, et al. Bovine ephemeral fever virus triggers autophagy enhancing virus replication via upregulation of the Src/JNK/AP1 and PI3K/Akt/NF- κ B pathways and suppression of the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Veterinary Research, 2019, 50(1): 1476-1481.
- [13] CURCIO M F, BATISTA W L, CASTRO E D, et al. Nitric oxide stimulates a PKC-Src-Akt signaling axis which increas-

- es human immunodeficiency virus type 1 replication in human T lymphocytes[J]. Nitric Oxide: Biology and Chemistry, 2019, 93: 78-89.
- [14] 王顷森,束思成,江 宁,等. EGFR 在病毒性传染病中的研究进展 [DB/OL]. [2020-03-19] 中国动物传染病学报. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=ZSJB20200317004&v=MDMyNTR2a1c3dkFJMw89UH03Q-mJMRzRITkhNckk1Q1pPc0xZdzlNem1SbjZqNTdUM2ZscVdNME-NMTDdSN3FkWitabUZp>.
- [15] 徐森楠,庄 莉,翟园园,等. 基于网络药理学研究二至丸防治骨质疏松症的物质基础与作用机制[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(22): 1913-1920.
- [16] YAN R H, ZHANG Y Y, LI Y N, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2[J]. Science (New York, N.Y.), 2020, 367(6485): 1444-1448.
- [17] CHEN Y W, YIU C B, WONG K Y. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CL pro) structure: Virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates[J]. F1000Research, 2020, 9: 129.
- [18] 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.
- [19] 杨艳梅,黄 姗,黄玉静,等. 从武汉抗疫看中医药文化认同与新的医学模式[J]. 中医药文化, 2020, 15(2): 1-7.
- [20] 夏文广,安长青,郑婵娟,等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎 34 例临床研究[J]. 中医杂志, 2020, 61(5): 375-382.
- [21] 郑 榕,陈 琴,黄铭涵. 从“寒湿疫毒”辨治新型冠状病毒肺炎[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(8): 18-20.
- [22] 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第 3 版)[J]. 天津中医药, 2020, 37(1): 1-3.
- [23] 吴长刚. 双黄连注射液辅助治疗支气管肺炎的疗效及其对血清降钙素原水平影响[J]. 中国医学创新, 2015, 12(10): 95-97.
- [24] 高亚东. 双黄连口服液(仅适用于儿童)联合重组人干扰素 α -2b 治疗小儿病毒性肺炎 55 例[J]. 医药导报, 2018, 37(S1): 10-12.
- [25] 张瑞君. 利巴韦林联合双黄连口服液治疗甲型 H1N1 流感 13 例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2013, 11(23): 73.
- [26] 吴红英,许光兰,赵 娟,等. 基于数据挖掘的全国各地运用中医药防治新型冠状病毒肺炎的用药规律研究[J]. 中药药理学与临床, 2020, 36(3): 6-11.
- [27] SITHISARN P, MICHAELIS M, SCHUBERT-ZSILAVECZ M, et al. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells[J]. Antiviral Research, 2013, 97(1): 41-48.
- [28] 邹青旭,林风武,王 岩,等. 老年新型冠状病毒肺炎患者血清 IL-2R、IL-6、TNF- α 水平变化及临床意义[J]. 长春中医药大学学报, 2020, 36(4): 692-694.
- [29] 于彦彦,黄绍刚,张海燕,等. 黄芩苷对溃疡性结肠炎患者细胞因子表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(6): 864-872.
- [30] 李文星,张 毅,温勃阳,等. 连翘对内毒素作用下大鼠脾脏淋巴细胞 Toll 样受体 4、核因子- κ B 及白细胞介素-6、白细胞介素-10 的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(2): 288-290.
- [31] TAY M Z, POH C M, RÉNIA L, et al. The trinity of COVID-19: Immunity, inflammation and intervention[J]. Nature Reviews Immunology, 2020, 20(6): 363-374.
- [32] 徐丽倩,李 江,李璐璐,等. 茶多酚和黄芩苷对百草枯中毒大鼠血清及肺组织 TGF- β 1 和 HIF-1 α 表达的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 24(9): 757-760, 764.
- [33] LEE P, CHANDEL N S, SIMON M C. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020, 21(5): 268-283.
- [34] 高荣敏. 去甲汉黄芩素的抗氧化与抗缺氧作用研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2014.
- [35] 奚 清. 金银花提取物活性成分对甲型流感病毒肺炎小鼠免疫细胞因子表达影响的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2008.
- [36] LIU S Y, CAO C X, ZHANG Y J, et al. PI3K/Akt inhibitor partly decreases TNF- α -induced activation of fibroblast-like synoviocytes in osteoarthritis[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2019, 14(1): 425.
- [37] KOUNDOUROUROS N, POULOGIANNIS G. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling and redox metabolism in cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2018, 8: 160.
- [38] 蒋 寅,刘军楼,朱 磊,等. 黄芩苷对 HT-29 细胞炎症模型 PI3K/NF- κ B 信号通路的影响及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(12): 118-122.
- [39] 罗 珊,霍永鑫,刘 英,等. 连翘苷对 IL-1 β 诱导的人关节软骨细胞凋亡及细胞外基质降解的影响[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(8): 645-652, 658.
- [40] WALLS A C, PARK Y J, TORTORICI M A, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein[J]. Cell, 2020, 181(2): 281-292.
- [41] LI Y W, ZHOU W, YANG L, et al. Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor[J]. Pharmacological Research, 2020, 157: 104833.
- [42] KANEKO T, CHIBA H, HORIE N, et al. Inhibition of prostaglandin E2 production by flavone and its related compounds[J]. In Vivo (Athens, Greece), 2010, 24(1): 55-58.
- [43] KIM H Y, JUNG S K, BYUN S, et al. Raf and PI3K are the molecular targets for the anti-metastatic effect of luteolin[J]. Phytotherapy Research: PTR, 2013, 27(10): 1481-1488.
- [44] COON T A, MCKELVEY A C, WEATHINGTON N M, et al. Novel PDE4 inhibitors derived from Chinese medicine Forsythia[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115937.
- [45] LI W H, YANG Y L, CHENG X, et al. Baicalein attenuates caspase-independent cells death via inhibiting PARP-1 activation and AIF nuclear translocation in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. Apoptosis: an International Journal on Programmed Cell Death, 2020, 25(5/6): 354-369.
- [46] 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[J]. 中国医药, 2020, 15(6): 801-805.
- [47] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典·一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 735.