

基于网络药理学、分子对接和化学信息学方法探索益肺健脾方治疗肺纤维化的物质基础

靳晓杰^{ab}, 王燕如^b, 王玉^a, 关瑞宁^a, 罗宏^a, 石生青^a, 李潮新^a, 李丹桂^a, 张志明^c, 刘永琦^{bd*} (甘肃中医药大学, a.药学院, b.甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室, c.附属医院, d.敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室, 兰州 730000)

摘要: 目的 运用网络药理学、分子对接以及化学信息学方法探索益肺健脾方治疗肺纤维化的分子机制和物质基础。方法 TCMSP、TCMID 数据库下载益肺健脾方 11 味中药化合物。利用 SwissTargetPrediction 预测化合物潜在靶点, 运用 Cytoscape 构建化合物-靶点网络。TTD、Drugbank 筛选肺纤维化相关靶点, STRING 分析靶点蛋白相互作用并进行 GO 分析和 KEGG 分析。进一步采用分子对接对化合物与肺纤维化关键靶点整合素 $\alpha\beta6$ 的亲合力进行评估, 对筛选得到活性较高的化合物进行化学信息学层次聚类分析。结果 益肺健脾方与肺纤维化共有靶点 27 个, PPI 分析得到关键靶点 6 个, GO 分析和 KEGG 分析得到 GO 条目 336 个、KEGG 通路 35 条。分子对接获得了具有靶向 $\alpha\beta6$ 潜在亲和力的成分, eRo5 规则和打分排名筛选 30 个化合物进行化学信息学聚类分析, 结果显示化合物 Naphthol aS-bl phosphate、Tangshenoside IV_{qt}、(2R)-2-azaniumyl-3-(1H-indol-3-yl)propanoate、(3S)-3-azaniumyl-4-hydroxy-4-oxobutanoate、[(2R)-2-Formyloxy-3-phosphonoxypropyl] formate 所代表的骨架结构具有潜在抑制肺纤维化活性, 主要相互作用为氢键和疏水相互作用。结论 本研究为中医药抗新冠病毒引起肺纤维化的治疗和相关医方的研究提供基于生物信息学、网络药理学、分子对接、化学信息学的系统研究方法。

关键词: 网络药理学; 益肺健脾方; 肺纤维化; 整合素 $\alpha\beta6$; 分子对接; 层次聚类分析; 新型冠状病毒肺炎

中图分类号: R285.6

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2020)08-0897-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.08.001

引用本文: 靳晓杰, 王燕如, 王玉, 等. 基于网络药理学、分子对接和化学信息学方法探索益肺健脾方治疗肺纤维化的物质基础[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 897-906.

Explore the Material Basis of Treating Pulmonary Fibrosis with Yifei Jianpi Prescription Based on Network Pharmacology, Molecular Docking and Chemical Informatics

JIN Xiaojie^{a,b}, WANG Yanru^b, WANG Yu^a, GUAN Ruining^a, LUO Hong^a, SHI Shengqing^a, LI Chaoxin^a, LI Danguai^a, ZHANG Zhiming^c, LIU Yongqi^{b,d*} (Gansu University of Chinese Medicine, a.School of Pharmacy, b.Gansu University Key Laboratory for Molecular Medicine & Chinese Medicine Prevention and Treatment of Major Diseases, c.Affiliated Hospital, d.Key Laboratory of Dunhuang Medicine, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the molecular mechanism and material basis of treating pulmonary fibrosis with Yifei Jianpi prescription based on network pharmacology, molecular docking and chemical informatics. **METHODS** TCMSP and TCMID database were used to download the compounds of 11 traditional Chinese medicines. Prediction of potential targets was made by SwissTargetPrediction, Cytoscape was used to construct a chemical-target network. TTD and Drugbank screened pulmonary fibrosis related targets, constructed target protein interaction(PPI) network and conducted gene function GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis in String database. Further, molecular docking technology was used to evaluate the affinity of key compounds with $\alpha\beta6$ and Hierarchical Clustering analysis was carried out on the compounds with high activity. **RESULTS** There were 27 targets of Yifei Jianpi prescription and pulmonary fibrosis. PPI analysis yielded 6 key targets, 336 GO items and 35 KEGG pathways. Molecular docking was used to obtain 30 pharmacokinetic active compounds with potential

基金项目: 甘肃省新型冠状病毒肺炎(NCP)科技重大专项(2020); 2020 年度甘肃中医药大学新型冠状病毒感染的肺炎应急防治专项项目(2020XGZX-01, 2020XGZX-02); 甘肃省高等学校科研项目(2017A-048); 2020 年度甘肃省重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室新型冠状病毒防治研究专项开放基金(FZYX20-1, FZYX20-2, FZYX20-3)

作者简介: 靳晓杰, 男, 硕士, 副教授 Tel: 13919839318 E-mail: jinlovedream@163.com *通信作者: 刘永琦, 男, 博士, 教授 Tel: 13919019578 E-mail: liuyongqi73@163.com

affinity for $\alpha\text{v}\beta 6$. ERO5 and scoring rankings were used to select 30 combinations for chemical informatics cluster analysis. Naphthol aS-bl phosphate, Tangshenoside IV_qt, (2R)-2-azaniumyl-3-(1H-indol-3-yl)propanoate, (3S)-3-azaniumyl-4-hydroxy-4-oxobutanoate and [(2R)-2-Formyloxy-3-phosphonooxypropyl] formate had potential inhibitory activities against pulmonary fibrosis. **CONCLUSION** This study is expected to provide a systematic research method of bioinformatics, network pharmacology, molecular docking and chemical informatics for the treatment of pulmonary fibrosis caused by SARS-CoV-2 in traditional Chinese medicine and the related medical prescription.

KEYWORDS: network pharmacology; Yifei Jianpi prescription; pulmonary fibrosis; $\alpha\text{v}\beta 6$; molecular docking; hierarchical clustering analysis; COVID-19

目前, 2019 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)在国内的疫情已经得到初步控制, COVID-19 患者依次进入恢复期^[1]。

肺纤维化是一种以弥散性肺泡炎和肺泡结构紊乱导致的以肺间质纤维化为特征性疾病^[2], 可引起胸闷、呼吸困难、肺功能指标的恶化甚至呼吸衰竭而被称为类肿瘤疾病。新冠病毒(SARS-CoV-2)与非典(SARS-CoV)病毒基因序列相似度达 79.5%^[3], 而肺纤维化在 SARS 愈后患者中具有较高发病率^[4-5]。近期临床报道亦显示 COVID-19 患者消散期 CT 表现为斑片状实变或条索影, 随着时间延长可见网格状增厚小叶间隔、支气管壁增厚扭曲成条索状及少许散在斑片状实变^[6], 与肺纤维化的病理改变相符。马林纳等^[7]指出部分 COVID-19 患者在核酸检测转阴、乃至痊愈后会出现肺部纤维化并对自身健康造成终身的困扰。因此对于肺纤维化发生, 及早用药、截断扭转成为了迫切的需求。但目前西医对本病尚缺乏有效的药物并存在患者预后差、不良反应较大等普遍缺点^[8]。中医以辨证论治为指导, 以益气扶正、活血化瘀及清热等治法, 可在一定程度阻抑肺纤维的形成与发展, 显示出独特的治疗优势^[9-14]。

COVID-19 的后期多脾肺气虚, 《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》和甘肃省依此证型均推荐出 COVID-19 恢复期的基本治则治法——益肺健脾法^[15]。脾肺气虚、痰瘀阻络也为肺纤维化发病的关键病机, 甘肃省中医防治专家注重发挥中医的优势, 结合前期防治经验和甘肃地理特点论证形成益肺健脾方。该方由补中益气汤加减而来, 组方为炙黄芪、党参、陈皮、当归、柴胡、桔梗、麸炒白术、炒白芍、砂仁、生麦芽、炙甘草, 共 11 味药, 主要合奏健脾益肺、固本培元之功。主用于经治后症状缓解以及核酸转阴的 COVID-19 患者^[16], 在防止其向肺纤维化发展上发挥了重要作用, 临床疗效显著。在甘肃省 91 例患者中 89 例治疗后期或出院均服用了本方, 至今未

见肺纤维化患者^[17]。

网络药理学提供了一种系统寻找中药复方活性成分和作用靶点的新策略, 契合于中药多成分-多靶点的作用关系, 有助于挖掘中药整体调控的分子机制^[18]。分子对接等计算机辅助药物设计方法(computer-aided drug design, CADD)的研究优势是从已明确的治疗靶点结构出发, 在得到相应靶点和结合位点特征的基础上, 对中药复方化合物与靶点之间的相互作用和亲和力进行计算, 通过虚拟筛选的方式得到中药起效的物质基础和作用机制^[19]。本研究首先采用网络药理学探究益肺健脾方治疗肺纤维化的潜在物质基础、关键靶点和分子机制。并采用分子对接技术对方中中药动力学性质较好的化合物与肺纤维化药物开发靶点整合素 $\alpha\text{v}\beta 6$ 的亲和能力进行评估, 获得益肺健脾方中能够靶向治疗靶点的化合物, 然后通过化学信息学方法对化合物进行层次聚类分析, 确定有效成分的结构分类和特点。期望本研究可为中医药抗 COVID-19 引起肺纤维化的防治和相关医方的现代化开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 益肺健脾方化学成分收集和药动力学筛选

在 TCMSP^[20]和 TCMID^[21]数据库搜集各药味的化学成分, 并通过文献查询补充各药化学成分, 同时在 Pubchem 中对部分化合物进行结构确证, 建立分子对接技术虚拟筛选的小分子数据库。全方共收集到 1 509 个成分结构, 其中柴胡 349 个, 陈皮 63 个, 桔梗 102 个, 砂仁 165 个, 麦芽 64 个, 黄芪 87 个, 党参 134 个, 当归 125 个, 白术 55 个, 白芍 85 个, 甘草 280 个。

1.2 益肺健脾方化合物作用靶点反向预测

中药成分通过与特定靶点相结合调节生物功能, 使药物发挥治疗疾病的作用。SwissTargetPrediction 是一款基于分子相似性原理预测小分子化合物的作用靶点(标)的工具, 可以预测中药成分的作用靶点^[22], 本研究利用

SwissTargetPrediction 预测益肺健脾方各药味成分的作用靶点。

1.3 益肺健脾方抗肺纤维化作用靶标分析

通过药物靶标数据库(TTD, <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)、DrugBank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>), 以“pulmonary fibrosis”“lung fibrosis”为关键词检索获取疾病“肺纤维化”靶点, 将“1.2”项下获得的益肺健脾方成分作用靶点与肺纤维化疾病靶点取交集获取益肺健脾方与肺纤维化药物靶点共有靶点, 即为益肺健脾方抗肺纤维化作用靶点。

1.4 益肺健脾方抗肺纤维化关键成分分析

基于益肺健脾方抗肺纤维化作用靶点, 在 Cytoscape 中构建中药-成分-靶点网络^[23], 依据参数度值(degree)分析网络节点中心性(centrality)。节点度值越大代表这个节点的中心性越高, 本研究以中药成分在网络中的度值分析中药作用的主要有效成分。

1.5 生物功能和通路富集分析

将益肺健脾方抗肺纤维化作用靶点导入生物学信息注释数据库 DAVID 数据库^[24], Select identifier 设置为 official gene symbol, List type 设置为 gene list, 限定物种为 homo sapiens, 阈值 $P < 0.05$, 进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。利用 OmicsShare 在线分析平台进行富集通路可视化处理。

1.6 益肺健脾方抗肺纤维化作用关键靶点分析

利用 String^[25]对靶点的蛋白间相互作用(protein protein interaction, PPI)进行分析, 物种选择“Homo sapiens”, 将蛋白互作综合得分(interaction score) > 0.7 作为筛选条件, 最后将得到的 PPI 信息导入 Cytoscape 软件进行网络分析。

1.7 分子对接

PDB 数据库(www.rcsb.org)下载 $\alpha\text{v}\beta 6$ (PDB ID: 4UM9)^[26]晶体结构。使用 Schrödinger 软件的 PrepWiz 模块对受体进行预处理。使用 Glide 的标准精度方法(standard precision, SP)进行分子对接。将“1.1”项下收集的小分子结构用 LigPrep 进行处理, 运用 MMFFs 力场得到相应的低能构象。Epik28 以 pH 值为 7.0 ± 2.0 为条件分配电离状态并进行对接计算。

1.8 潜在活性化合物的类药性评估

药物化学家 Lipinski 在 2001 年提出的筛选类药分子的 5 条基本法则, 简称 Rule of 5 (Ro5)。Ro5

内容为①分子量 < 500 ; ②氢键给体数目 < 5 ; ③氢键受体数目 < 10 ; ④脂水分配系数 < 5 ; ⑤可旋转键的数量 ≤ 10 。符合 Ro5 的化合物通常会有更好的药动学性质, 在生物体内代谢过程中会有更高的生物利用度。Ro5 的目的是使化合物的筛选与设计过程更加合理, 以免产生非极性, 结构松散且过大的分子, 从而提高口服生物利用度等药物特性。尽管 Ro5 一直是指导开发口服药物的实用性方针, 但是近几年药物研发与医学实践中发现许多违反 Ro5 的化合物都是很好的候选药物, 具有很好的药动学性质, 例如一些天然产物属于超五规则化合物(bRo5), 但也有很好的生物利用度, FDA 批准的激酶抑制剂中大约有 30%是 bRo5, 表明对于特定的靶点和研究对象。因此, Ro5 的使用应该谨慎, 某些靶标会从违反传统 Ro5 标准的化合物中受益^[27]。本研究中选择“延伸 Ro5(eRo5)”作为类药性筛选标准, 同时参考药物化学专家们在长期的实践过程中对五规则简化形成的“四规则”, 去掉 Ro5 关于可旋转键的数量限制。本研究对分子对接结果的结构筛选具体标准为①分子量 < 700 ; ②氢键给体数目 < 5 ; ③氢键受体数目 < 10 ; ④脂水分配系数 < 7.5 。

1.9 层次聚类分析

对分子对接结果筛选到的潜在靶向活性化合物的结构进行聚类分析, 采用化学信息学软件包 canvas 计算化学小分子化合物分子指纹, 然后通过基于相似性矩阵的层次聚类方法对化合物结构属性进行聚类, 类间距离选择簇间平均距离法。

2 结果

2.1 益肺健脾方抗肺纤维化作用靶点

基于 Swisstargetprediction 预测活性成分的作用靶点, 去重后获得靶点 1 041 个。以“pulmonary fibrosis”和“lung fibrosis”为关键词, 在 TTD 和 DrugBank 数据库中, 共检索到肺纤维化疾病药物靶点 105 个。将益肺健脾方活性成分作用靶点基因与肺纤维化疾病基因取交集, 得到共有靶点 27 个, 这 27 个靶点可能是益肺健脾治疗肺纤维化的潜在靶点, 见表 1。

2.2 益肺健脾方干预“肺纤维化”关键成分分析

药味-化合物-靶点网络总共包括 182 个节点, 包括 11 种药材节点、144 个化合物节点及 27 个靶点节点, 见图 1。□代表药材, ○代表活性化合物, △代表活性成分作用靶, 每条边则表示药材中所

表 1 肺纤维化靶点与益肺健脾方交集靶点

Tab. 1 Pulmonary fibrosis target and Yifei Jianpi prescription intersection target

No.	Protein name	No.	Protein name
1	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	15	Serotonin 2a (5-HT2a) receptor
2	Cathepsin (B and K)	16	Serotonin 2b (5-HT2b) receptor
3	Cathepsin K	17	Serotonin 2c (5-HT2c) receptor
4	Cathepsin L	18	Serotonin 3a (5-HT3a) receptor
5	Cathepsin S	19	Serotonin 4 (5-HT4) receptor
6	Interleukin-8 receptor B	20	Serotonin 6 (5-HT6) receptor
7	Fibroblast activation protein alpha (by homology)	21	Serotonin 7 (5-HT7) receptor
8	Fibroblast growth factor receptor 1	22	Voltage-gated potassium channel subunit Kv1.3
9	Vitamin D-binding protein	23	Voltage-gated potassium channel subunit Kv1.5
10	G-protein coupled estrogen receptor 1	24	HERG
11	Serotonin 1a (5-HT1a) receptor	25	Sphingosine 1-phosphate receptor Edg-1
12	Serotonin 1b (5-HT1b) receptor (by homology)	26	Transforming growth factor beta-1
13	Serotonin 1d (5-HT1d) receptor	27	TGF-beta receptor type I
14	Serotonin 1f (5-HT1f) receptor		

含化合物及化合物与靶点相互作用关系。1个节点的度值(degree)表示网络中和节点相连的节点的数量。度值较大的节点在整个网络中起到枢纽的作用,提示可能是关键的化合物或者靶点。由该网络模型可知每个化合物与多个靶点相互作用,而每个靶点又可与不同成分相互作用。从化合物角

度分析,通过分析化合物-靶点的中心度值、亲中心度值及等级值等发现,排名前5位的化合物分别为豆甾醇-Spinasterol、Octalupine、euchrenone、(+)-Anomalin、和(5*S*, 8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*R*, 14*S*, 17*R*)-17-[(1*R*,4*R*)-4-ethyl-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-2,4,5,7,8,9分别与11,10,9,9和8个靶点蛋白发生作用。从靶点的角度分析,排名前5的关键靶点分别是HTR2A、HTR2C、FGFR1、KCNA5和CTSS。

2.3 生物过程(biology process, BP)与通路富集分析

使用 STRING 网站对益肺健脾方抗肺纤维化作用靶点靶点进行 GO 富集分析,得到了 $P<0.05$ 的 GO 条目共计 336 个,其中包含 BP 条目 275 个,细胞组成(cell composition, CC)条目 27 个,分子功能(molecular function, MF)条目 34 个。其中,在生物过程层面,预测靶点主要参与刺激细胞反应(cellular response to stimulus)和细胞分泌调节(regulation of secretion by cell);在细胞组分层面 plasma membrane part 和 integral component of membrane 所占比例较大;在分子功能层面,与 protein binding 和 transmembrane signaling receptor activity 关系较为紧密,各类别前 20 的 GO 分析见图 2。

KEGG 通路富集分析采用 Omicshare 在线分析平台进行富集通路可视化处理,见图 2D,图中气泡大小代表该条通路上富集基因数目,气泡颜色差异代表了基因在该条通路富集程度的高低。

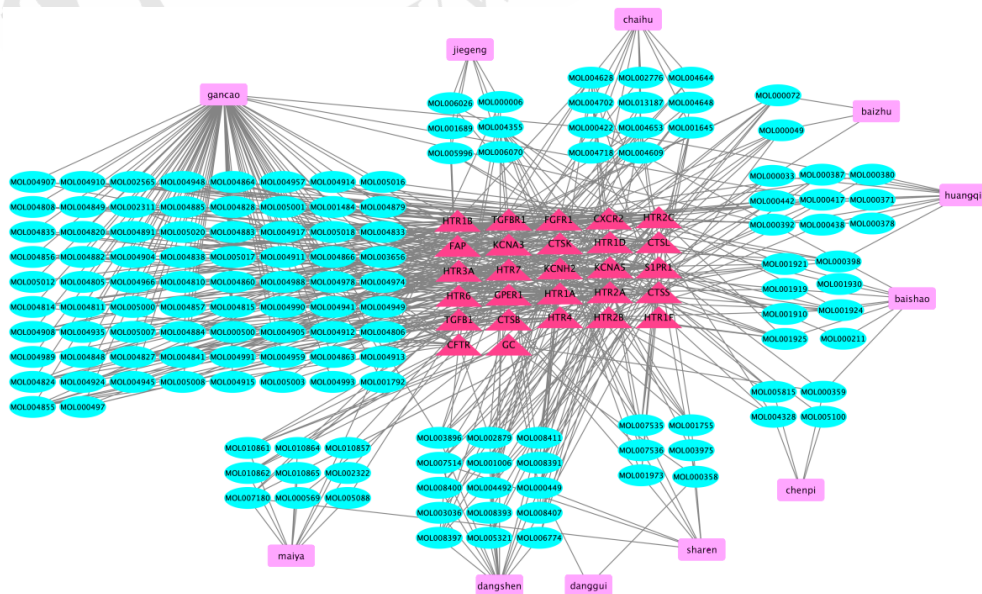


图 1 药味-化合物-靶点图

Fig. 1 Drug-compound-target chart

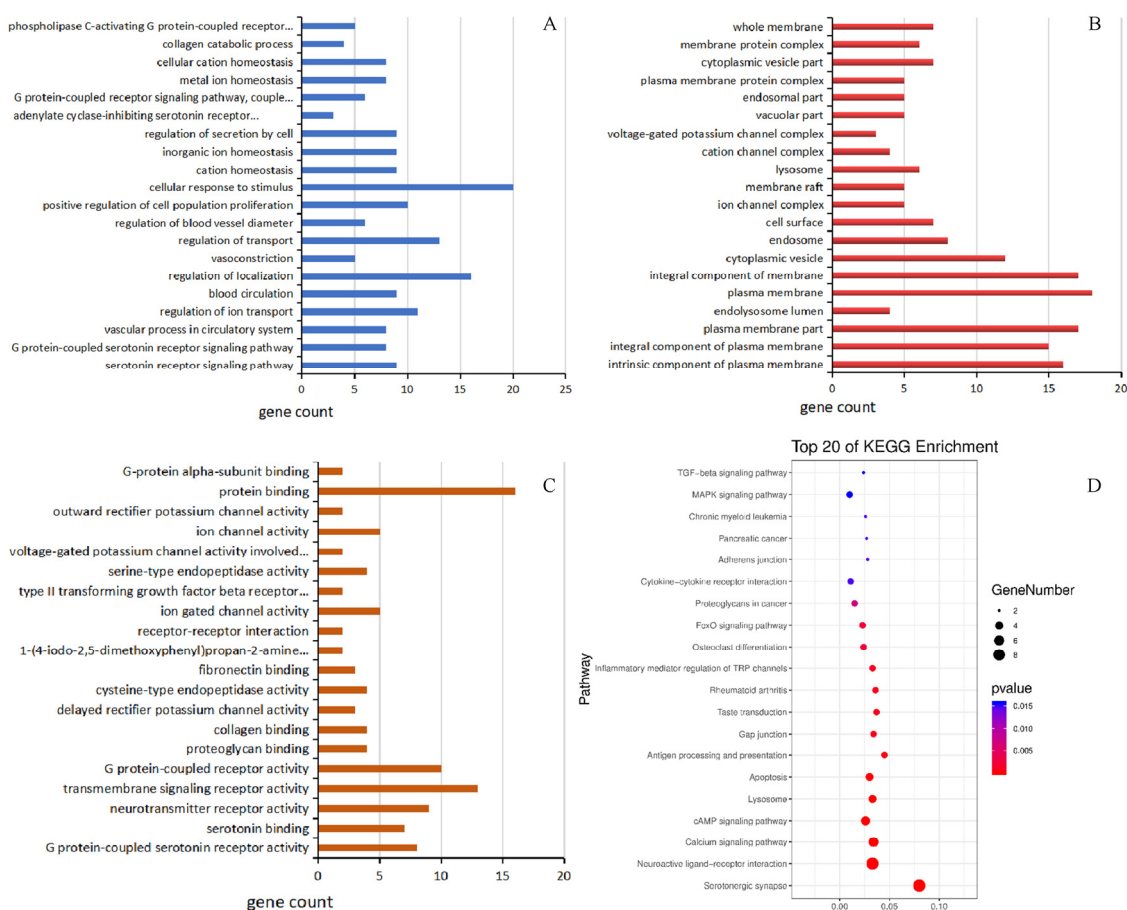


图2 GO、KEGG 靶点富集分析

A-生物过程；B-细胞组成；C-分子功能；D-KEGG 通路富集分析。

Fig. 2 GO and KEGG enrichment analysis of targets

A-biological process; B-cell composition; C-molecular function; D-KEGG pathway enrichment analysis.

结果包括 TGF- β signaling pathway、Serotonergic synapse、Neuroactive、ligand-receptor interaction、Calcium signaling pathway 等 35 条 ($P < 0.05$) 信号通路。其中，分泌转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β) 信号通路与肺纤维化直接相关^[28]，表明益肺健脾方成分可能主要作用于该通路，从而起到抑制肺纤维化作用。其中排名前 20 的通路见图 2D。

2.4 益肺健脾方抗“肺纤维化”作用关键靶点分析

通过 STRING 平台分析获得靶标 PPI 网络图，见图 3。图中有节点 27 个、边 48 条、平均节点度 3.56。对 PPI 网络进行拓扑分析能够得到这个网络中的枢纽蛋白，图中节点颜色越深且节点越大表示该节点对应的作用靶点越重要。由图可知，HTR3A、HTR1A、HTR1B、HTR1D、HTR1F 及 GP1R1 等蛋白度值显著高于其余靶点，可能是其关键作用靶点。

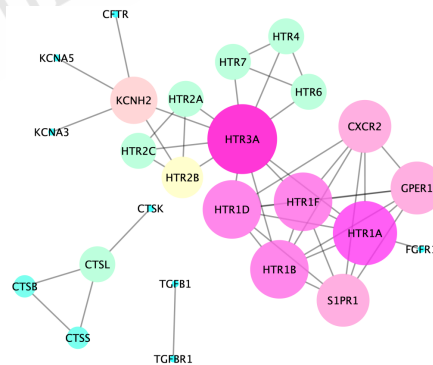


图3 有效化合物作用靶点 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram of effective compound action target

2.5 分子对接

研究表明 TGF- β 是细胞纤维化过程中关键的细胞因子，是肺、肝、肾、皮肤等多个器官纤维化的关键调节器^[29-32]。KEGG 通路富集结果显示，益肺健脾方可通过 TGF- β 信号通路对肺纤维化产生作用。而整合素 $\alpha\beta6$ 是抑制 TGF- β 1 通路，治

疗肺纤维化的关键靶点。本研究基于网络药理学分析结果以及药物靶点的成药性分析,选择药物开发靶点 $\alpha\text{v}\beta 6$ 的三维结构,对益肺健脾方中成药性好的成分进行分子对接研究,来筛选医方对成药性靶点具有潜在靶向能力的成分。

2.5.1 分子对接筛选靶向整合素 $\alpha\text{v}\beta 6$ 成分 在深入分析 $\alpha\text{v}\beta 6$ 配体结合位点的基础上,对益肺健脾方中成分进行了靶向亲和力的评估。分子对接的打分结果见表 2,本研究认为打分值 ≤ -5 的成分具有潜在的抑制活性,打分值 ≤ -7 的成分具有较高的抑制活性。益肺健脾方中各药味对 $\alpha\text{v}\beta 6$ 打分值 ≤ -5 的化合物数量排名前 4 的中药为甘草、麦芽、当归和黄芪,分别有 34, 15, 15, 11 个成分,说明这些药味对纤维化具有潜在的抑制作用。整体而言,分子对接结果初步说明该方具有抑制纤维化的物质基础,对于防治 SARS-CoV-2 引起的肺纤维化具有潜在作用。该结果与中药治疗纤维化的临床应用高度一致,马林纳等^[7]将中医参与肺纤维化治疗的案例共 10 553 篇进行筛选,在符合纳入标准的 323 个中药组方中共得到 184 味中药,在 323 个中药组方中占比前 5 的分别为黄芪(148 次, 45.82%)、甘草(124 次, 38.39%)、丹参(102 次, 31.58%)、川芎(97 次, 30.03%)、当归(96 次,

29.72%)。为了进一步分析潜在活性成分的结构信息和靶向结合模式,将打分值 ≤ -5 的潜在活性化合物按照 eRo5 规则进行筛选,从符合 eRo5 规则的潜在活性成分中选取打分位于前 30 的化合物作为代表性潜在高活性成分,见表 3。

表 2 益肺健脾方符合类药中药成分与 $\alpha\text{v}\beta 6$ 打分范围的成分数量统计

Tab. 2 Statistic of the number of components in Docking scoring ranges of Yifei Jianpi prescription

序号	中药	成分数			
		对接分值 ≤ -8	对接分值 ≤ -7	对接分值 ≤ -6	对接分值 ≤ -5
1	柴胡	0	2	4	10
2	陈皮	0	2	3	4
3	桔梗	0	0	0	2
4	砂仁	0	1	4	6
5	麦芽	0	6	12	15
6	黄芪	0	3	8	11
7	党参	0	4	7	10
8	当归	0	5	11	15
9	白术	1	6	9	10
10	白芍	0	2	4	5
11	甘草	0	3	4	34
总数		1	28	53	102

注:每一味药的成分在本药和在总数中存在交叉现象,因此分别筛去重复保留打分最大值计数(总数 $\neq$ 每一列总和)。

Note: There is crossover between the components and the total amount, so the maximum number of scores is kept by screening them separately (the total quantity is not equal to the sum of each column).

表 3 益肺健脾方中 30 个代表性潜在活性成分分子对接信息汇总

Tab. 3 Summary of docking information of 30 representative potential active components in Yifei Jianpi prescription

序号	化合物	中药归属	对接打分	序号	化合物	中药归属	对接打分
1	(3S)-3-Azaniumyl-4-hydroxy-4-oxobutanoate	白术	-8.08	16	tangshenoside IV_qt	党参	-7.26
2	(2R)-2-Azaniumyl-3-(1H-indol-3-yl)propanoate	柴胡	-7.94	17	异香草酸	陈皮	-7.26
3	(2S)-2-Azaniumyl-3-methylbutanoate	白术	-7.68	18	4-Acetylbenzoic acid	陈皮	-7.23
4	(2S)-2-Azaniumyl-3-(1H-imidazol-5-yl)propanoate	白术	-7.55	19	水杨酸	白芍	-7.20
5	4H-Pyran-4-one,2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	甘草	-7.50	20	香草酸	砂仁、麦芽、黄芪	-7.18
6	(2S)-2-Azaniumyl-3-(4-hydroxyphenyl)propanoate	白术	-7.49	21	D-Serin	白术	-7.18
7	(1R)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido-[3,4-b] indol-2-ium-1-carboxylate	党参	-7.46	22	4-异丙基苯甲酸	柴胡	-7.16
8	[(2R)-2-Formyloxy-3-phosphonooxypropyl]formate	当归	-7.44	23	丁香酸	麦芽	-7.15
9	phosphatidylinositol_qt	当归	-7.43	24	(2S)-2-Azaniumyl-3-phenylpropanoate	白术	-7.06
10	2-Naphthalenecarboxamide, 7-bromo-N-(2-methoxyphenyl)-3-(phosphonooxy)-	麦芽	-7.42	25	4-Methoxybenzoic acid	当归	-7.05
11	d-Camphoric acid	当归	-7.38	26	党参酸	党参	-7.03
12	没食子酸	白芍	-7.34	27	(2S,3S,4S,5R)-2,3,4,5-Tetrahydroxy-6-oxohexanoic acid	黄芪	-7.01
13	丙二酸	麦芽	-7.29	28	烟酸	麦芽、黄芪、党参、当归	-7.01
14	Indole-3-carboxylic acid	甘草	-7.28	29	L-乳酸	砂仁	-6.98
15	3,4-Dihydroxybenzoic acid	麦芽、甘草	-7.27	30	(2S)-2-ammonio-4-[(R)-methylsulfinyl] butyrate	党参	-6.96

注:以分子量 <700 ,氢键给体数目 <5 ,氢键受体数目 <10 ,脂水分系数 <7.5 为筛选条件,选取打分前 30 的信息进行汇总。

Note: Mol MW <700 , DonorHB <5 , Acpt HB <10 , QPlogPo/w <7.5 is the screening condition, and the information of the first 30 points is selected to summarize.

2.5.2 靶向 $\alpha\text{v}\beta 6$ 潜在活性化合物靶点结合模式分析 分子对接的打分值只能初步预测小分子与靶点是否具有相互作用,而化合物与药物靶点是否具有合理的结合模式是其是否会产生药效的关键。本研究对上述 30 个代表性化合物进行了聚类分析和深入的相互作用模式分析。首先将表 3 中的化合物导入到 Canvas,以化学信息学计算获得的结构指纹为分类依据进行层次聚类分析共得到 5 类结构,见图 4。然后从聚类结果中选取每一类中打分值最高的作为代表性化合物,并对其结合模式进行分析,见图 5。结合模式分析显示 5 个化合物结合于 Ile 183、Tyr 178、Ala 217、Ile 219 等疏水性残基形成的空腔内。Naphthol aS-bl phosphate 磷酸根中的氧与残基 Asn 218 形成氢键,残基 Asn 218、Ala 126 与其他 4 个化合物都形成氢键相互作用。Tangshenoside IV_qt 的苯环和苯环上的羟基分别与残基 Tyr 185、Asp 129 形成 $\pi-\pi$ 堆积作用和氢键,(2R)-2-azaniumyl-3-(1H-indol-3-yl)propanoate 吲哚环上的氮与 Pro 179 亦形成氢键。(3S)-3-azaniumyl-4-hydroxy-4-oxobutanoate 中铵根离子与残基 Ile 219 形成氢键相互作用。综上所述,这 5 种代表性化合物与 $\alpha\text{v}\beta 6$ 具有较强的结合能力,推测具有这 5 类骨架结构的化合物也易于与该靶点发生相互作用从而产生抗纤维化作用。

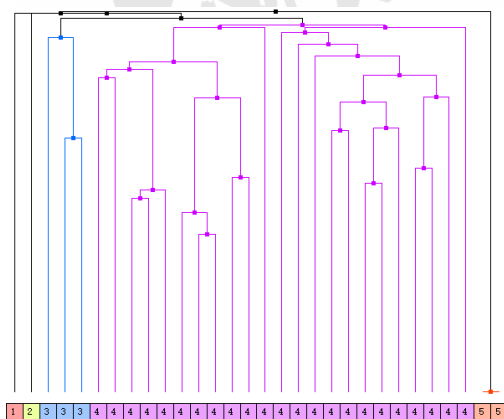


图 4 聚类分析树状图

Fig. 4 Cluster analysis tree chart

3 讨论

急性呼吸系统综合征(SARS)、中东呼吸综合征(MERS)的康复者都发生了不同程度的肺纤维化^[33-34],COVID-19 患者随病情发展也会出现肺部纤维化病理改变^[35-36]。不可逆性、难治愈性使得

COVID-19 患者恢复期及康复后可能存在的肺纤维化不可忽视^[37-38]。

本研究从网络药理学角度出发探讨益肺健脾方抑制肺纤维化的活性成分、潜在靶点和作用的生物过程与通路。GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析结果表明,该方活性成分潜在靶点主要在细胞膜、细胞质部位发生蛋白结合、ATP 结合、酶反应等分子反应。KEGG 分析结果显示,益肺健脾方化合物可通过分泌 TGF- β 信号通路对肺纤维化产生作用。而大量研究已经证实 TGF β 家族中的分泌转化生长因子 $\beta 1$ 是与细胞纤维化有重要关联的细胞因子,是多个器官纤维化的关键调节器^[29-32]。整合素家族的一个子集($\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素)的对激活潜伏状态的 TGF- $\beta 1$ 扮演着重要角色^[39-42]。其中 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素在肺上皮细胞表达,参与调控 TGF $\beta 1$ 的激活,在肺纤维化过程中起到关键角色^[43-44],基因敲除实验证实 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素参与 TGF $\beta 1$ 的激活过程, $\alpha\text{v}\beta 6$ 基因缺失老鼠的继发性肺纤维化被保护^[39,45]。这一结果在辐射诱导保护性肺纤维化的动物模型实验中也证实^[46]。本研究在网络药理学分析结果的基础上,重点进行了靶点成药性分析,最终选择肺纤维化药物开发的热门靶点 $\alpha\text{v}\beta 6$,对益肺健脾方中成药性好的成分进行分子对接研究,筛选医方对肺纤维化关键靶点具有潜在活性的成分。依据筛选结果进行化学信息学结构聚类分析,得到以 Naphthol aS-bl phosphate、Tangshenoside IV_qt、(2R)-2-azaniumyl-3-(1H-indol-3-yl)propanoate、(3S)-3-azaniumyl-4-hydroxy-4-oxo-butanoate、[(2R)-2-Formyloxy-3-phosphonooxypropyl] formate 为代表的 5 类化合物。相互作用模式分析表明潜在活性化合物结合于 $\alpha\text{v}\beta 6$ 的 Ile 183、Tyr 178、Ala 217、Ile 219 等残基形成的疏水性空腔内,主要相互作用为氢键以及疏水相互作用。

肺纤维化的形成是一个极其复杂的过程,是致病因素与人体不断相互作用的结果^[47]。本研究基于中药多成分、多靶点作用的研究思路,采用生物信息学和网络药理学手段,通过对益肺健脾方治疗靶点的反向预测、生物功能以及通路分析,阐述益肺健脾方治疗肺纤维化的潜在物质基础与分子机制。并进一步采用分子对接技术对复方中药药性性质较好的关键化合物与肺纤维化密切相关的药物开发重磅靶点整合素 $\alpha\text{v}\beta 6$ 的亲和能力进行评估,获得益肺健脾方中能够靶向肺纤维化成

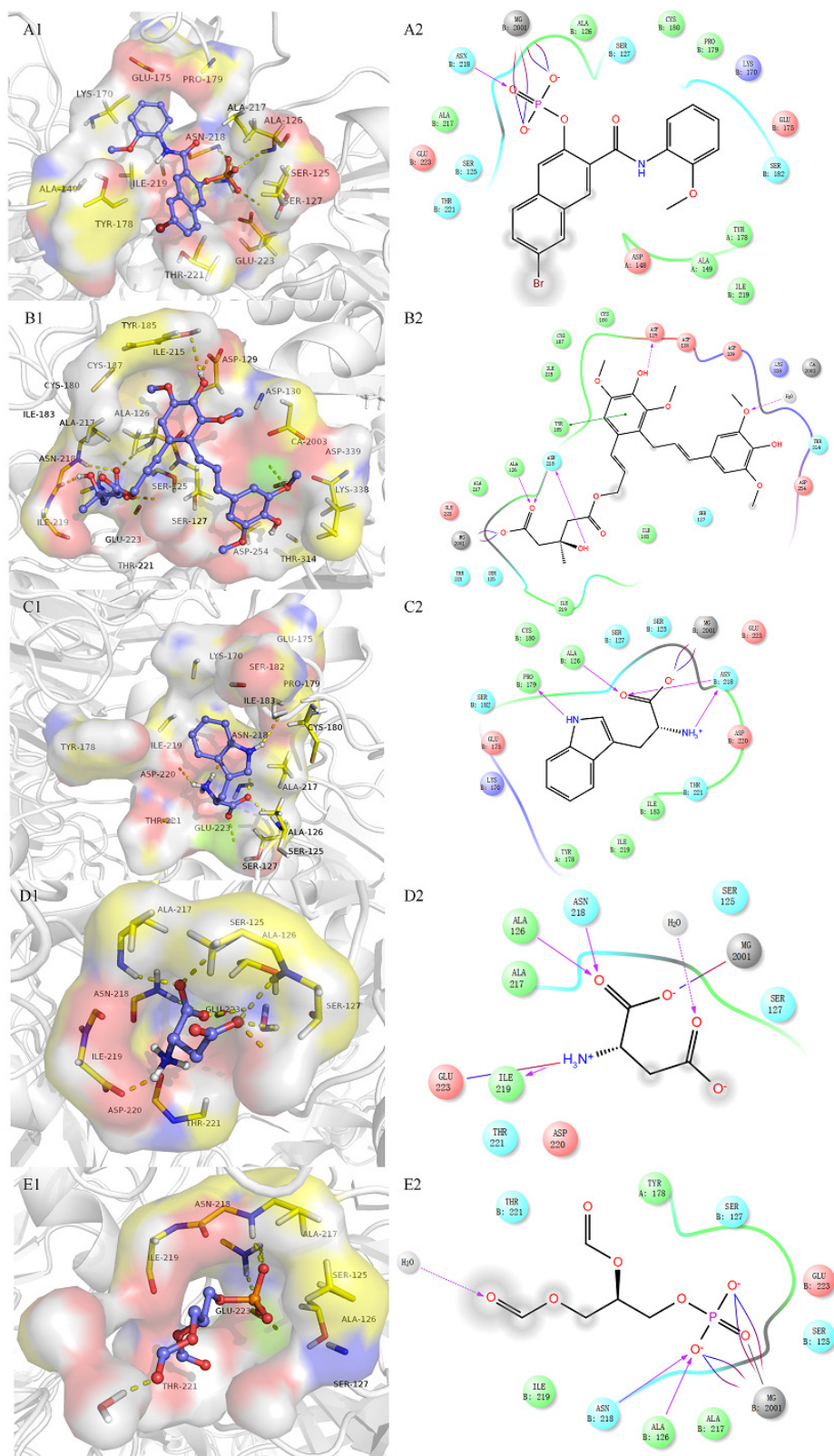


图5 化合物-靶点结合模式图(1-3D图; 2-2D图)

A-Naphthol aS-bl phosphate 与 $\alpha\text{v}\beta 6$ 相互作用; B-tangshenoside IV_qt 与 $\alpha\text{v}\beta 6$ 相互作用; C-(2*R*)-2-azaniumyl-3-(1*H*-indol-3-yl)propanoate 与 $\alpha\text{v}\beta 6$ 相互作用; D-(3*S*)-3-azaniumyl-4-hydroxy-4-oxobutanoate 与 $\alpha\text{v}\beta 6$ 相互作用; E-[(2*R*)-2-Formyloxy-3-phosphonoxypropyl] formate 与 $\alpha\text{v}\beta 6$ 相互作用。

Fig. 5 Compound-target binding pattern(1-3D figure; 2-2D figure)

A-interaction between Naphthol aS-bl phosphate and $\alpha\text{v}\beta 6$; B-interaction between tangshenoside IV_qt and $\alpha\text{v}\beta 6$; C-interaction between (2*R*)-2-azaniumyl-3-(1*H*-indol-3-yl)propanoate and $\alpha\text{v}\beta 6$; D-(3*S*)-3-azaniumyl-4-hydroxy-4-oxobutanoate interacting with $\alpha\text{v}\beta 6$; E-[(2*R*)-2-Formyloxy-3-phosphonoxypropyl] formate interacting with $\alpha\text{v}\beta 6$.

药性靶点的化合物。然后对分子对接所得活性成分结构进行了化学信息学计算和层次聚类分析,获得了潜在活性成分的结构分类,并在此基础上进行了化合物靶向结合模式分析,在分子水平上阐释了潜在活性成分的药效构象和相互结合模式。本研究期望为中医药抗 SARS-CoV-2 引起肺纤维化的治疗和相关医方的现代化开发提供线索。

REFERENCES

- [1] 截至 3 月 23 日 24 时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况 [EB/OL]. [2020-03-23]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqfkd/202003/e6c12d0c2cf04474944187f4088dc021.shtml>.
- [2] HIGASHIYAMA H, YOSHIMOTO D, OKAMOTO Y, et al. Receptor-activated Smad localisation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *J Clin Pathol*, 2007, 60(3): 283-289.
- [3] 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.
- [4] PENG R C, SHAN R, SHI Y, et al. MRI features of ischemic osteonecrosis in patients with steroid-medication history for SARS [J]. *J Clin Radiology(临床放射学杂志)*, 2004, 23(4): 318-320.
- [5] MCKEE M D, WADDELL J P, KUDO P A, et al. Osteonecrosis of the femoral head in men following short-course corticosteroid therapy: A report of 15 cases [J]. *J De L'association Med Can*, 2001, 164(2): 205-206.
- [6] FENG B, CHEN Z X, JIN L W, et al. Concerns about clinical characteristics and pharmacotherapeutics of COVID-19 [J]. *Pharm Today(今日药学)*, 2020, 30(3): 154-156.
- [7] 马林纳, 王瑞, 苗明三. 基于数据挖掘的治疗肺纤维化用药规律分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(6): 1406-1411.
- [8] SONG R Y. Studies on the mechanism of lung fibrosis inhibition of mutant ectodomain of FGF receptor in primary type II alveolar epithelial cells [D]. Guangzhou: Jinan University, 2016.
- [9] LIU J, LIU Y M, WANG Y G. Intervention of Astragaloside on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Beijing J Tradit Chin Med(北京中医药)*, 2015, 34(6): 484-488.
- [10] LI L J, LI L N, LI G M, et al. Different ratios and dosages of Huangqi(*Astragalus*) and Danggui(*Angelica*) for pulmonary fibrosis in mice lung morphology and hydroxyproline content [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报)*, 2015, 17(3): 30-33.
- [11] ZHANG L L, LI L D, LI Y H. Influence of compound TCM on COL-I and caspase-11 and cytokine in lung tissues and of pulmonary fibrosis mice [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2015, 33(9): 2127-2129.
- [12] YAN X N, ZHANG N. Danshen reduced VEGF expression in the lung tissues of model rats with pulmonary fibrosis [J]. *Proceeding Clin Med(临床医药实践)*, 2015, 24(6): 438-441.
- [13] GENG Y Y, YU B, ZHOU Z X, et al. Antifibrotic effect of TY501 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats and related mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报)*, 2015, 31(2): 210-215.
- [14] 顾文菊, 邱波. 黄芩素靶向 p38 MAPK 通路抗肺纤维化的作用机制研究 [J]. *实用中西医结合临床*, 2015, 15(8): 17-18, 31.
- [15] 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知 [EB/OL]. [2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [16] 王金榜, 梁保丽, 孙树椿. 新型冠状病毒(2019-nCoV)感染性肺炎现代中医诊疗建议方案与探讨 [J/OL]. *世界中医药*: 1-12. [2020-04-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5529.R.20200210.0845.002.html>.
- [17] 甘肃省疾病预防控制中心 [EB/OL]. [2020-04-02]. <http://www.gscdc.net/>.
- [18] WU H, WANG J Q, YANG Y W, et al. Preliminary exploration of the mechanism of Qingfei Paidu decoction against novel coronavirus pneumonia based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Acta Pharm Sin(药学报)*, 2020, 55(3): 374-383.
- [19] LI J, MA X R, LIU C, et al. Exploring the mechanism of Danshen against myelofibrosis by network pharmacology and molecular docking [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 8363295.
- [20] 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.
- [21] XUE R C, FANG Z, ZHANG M X, et al. TCMID: Traditional Chinese Medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D1089-D1095.
- [22] GFELLER D, GROSIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Web Server issue): W32-W38.
- [23] LOPES C T, FRANZ M, KAZI F, et al. Cytoscape Web: An interactive web-based network browser [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(18): 2347-2348.
- [24] 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.
- [25] FRANCESCHINI A, SZKLARCZYK D, FRANKILD S, et al. STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D808-D815.
- [26] DONG X C, HUDSON N E, LU C F, et al. Structural determinants of integrin β -subunit specificity for latent TGF- β [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(12): 1091-1096.
- [27] EGBERT M, WHITTY A, KESERÜ G M, et al. Why some targets benefit from beyond rule of five drugs [J]. *J Med Chem*, 2019, 62(22): 10005-10025.
- [28] BAI Q. The research on effects and relationship of TGF- β 1/Smad3 and JNK signaling pathway in apoptosis of pulmonary fibrosis rats [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2014.
- [29] LU B, WANG F, JIANG H, et al. Effects of salvianolic-acid B on proliferation and extracellular matrix synthesis in rat adhesive fibroblasts induced by transforming [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2017, 26(8): 930-935.
- [30] ROBERTS A B, SPORN M B, ASSOIAN R K, et al. Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(12): 4167-4171.
- [31] LEASK A, ABRAHAM D J. TGF- β signaling and the fibrotic response [J]. *FASEB J*, 2004, 18(7): 816-827.
- [32] BREUSS J M, GILLET N, LU L, et al. Restricted distribution of integrin β 6 mRNA in primate epithelial

- tissues [J]. *J Histochem Cytochem*, 1993, 41(10): 1521-1527.
- [33] VENKATARAMAN T, FRIEMAN M B. The role of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in SARS coronavirus-induced pulmonary fibrosis [J]. *Antiviral Res*, 2017(143): 142-150.
- [34] DAS K M, LEE E Y, SINGH R, et al. Follow-up chest radiographic findings in patients with MERS-CoV after recovery [J]. *Indian J Radiol Imaging*, 2017, 27(3): 342-349.
- [35] 国家卫生健康委 1 月 31 日新闻发布会: 介绍新型冠状病毒感染的肺炎疫情防控工作中重点人群和社区组织的健康防护情况[EB/OL]. [2020-02-31]. <http://www.nhc.gov.cn/xwzb/webcontroller.do?titleSeq=11214&gectype=1>.
- [36] 台湾首例新冠肺炎个案出院后有肺纤维化症状[EB/OL]. [2020-02-17]. <http://www.hkcn.hk/content/2020/0221.shtml>.
- [37] CUI B, HU Z W. The advances of the drug therapy for pulmonary fibrosis [J]. *Prog Physiol Sci(生理科学进展)*, 2008, 39(3): 233-238.
- [38] XU S G, LIU C, JI H L. Concise review: Therapeutic potential of the mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for radiation-induced lung injury: Progress and hypotheses [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(4): 344-354.
- [39] MUNGER J S, HUANG X Z, KAWAKATSU H, et al. A mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis: The integrin $\alpha\text{v}\beta 6$ binds and activates latent TGF $\beta 1$ [J]. *Cell*, 1999, 96(3): 319-328.
- [40] MU D Z, CAMBIER S, FJELLBIRKELAND L, et al. The integrin $\alpha\text{v}\beta 8$ mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- $\beta 1$ [J]. *J Cell Biol*, 2002, 157(3): 493-507.
- [41] ASANO Y, IHN H, YAMANE K, et al. Increased expression of integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ contributes to the establishment of autocrine TGF- β signaling in *Scleroderma* fibroblasts [J]. *J Immunol*, 2005, 175(11): 7708-7718.
- [42] ASANO Y, IHN H, YAMANE K, et al. Increased expression of integrin $\alpha\text{v}\beta 5$ induces the myofibroblastic differentiation of dermal fibroblasts [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(2): 499-510.
- [43] KAMINSKI N, ALLARD J D, PITTET J F, et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1778-1783.
- [44] JENKINS R G, SU X, SU G, et al. Ligation of protease-activated receptor 1 enhances $\alpha\text{v}\beta 6$ integrin-dependent TGF- β activation and promotes acute lung injury [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(6): 1606-1614.
- [45] HUANG X Z, WU J F, CASS D, et al. Inactivation of the integrin $\beta 6$ subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin [J]. *J Cell Biol*, 1996, 133(4): 921-928.
- [46] PUTHAWALA K, HADJIANGELIS N, JACOBY S C, et al. Inhibition of integrin $\alpha\text{v}\beta 6$, an activator of latent transforming growth factor- β , prevents radiation-induced lung fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(1): 82-90.
- [47] HE Q, XIONG J. Progress in research on pulmonary fibrosis mechanism [J]. *Chongqing Med(重庆医学)*, 2019, 48(20): 3553-3557.

收稿日期: 2020-03-16

(本文责编: 曹粤锋)