

基于分子对接法和网络药理学揭示小柴胡汤防治新型冠状病毒肺炎的活性成分及作用机制

湛攀, 饶鸿宇, 吴灏, 王永刚, 苏薇薇, 李沛波^{*}(中山大学生命科学学院, 广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心/广东省热带亚热带植物资源重点实验室, 广州 510275)

摘要: 目的 探索小柴胡汤防治新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的活性成分及作用机制, 为小柴胡汤在 COVID-19 防治中的应用提供参考。方法 通过 TCMSP 数据库检索小柴胡汤的化学成分, 将各化学成分与 ACE2、MPro 和 PLP 进行分子对接, 预测其在抑制新型冠状病毒感染和复制方面的活性; 采用 TCMSP 和 CTD 数据库检索小柴胡汤化学成分靶点, 使用 String 数据库进行蛋白-蛋白相互作用分析得到核心靶点, 通过 Cytoscape 软件构建“药材-活性成分-核心靶点”网络, 并进行拓扑分析和对核心靶点进行 KEGG 通路富集分析, 预测小柴胡汤防治 COVID-19 的作用机制。结果 分子对接结果表明, 小柴胡汤的化学成分中与 ACE2、MPro 和 PLP 对接结果 Libdockscore>120 的活性成分个数分别为 86, 114 和 105, 如甘草苷 E 与 ACE2、MPro 和 PLP 均具有较好的结合活性, 柴胡皂苷 C 的苷元和人参皂苷 Rh2 与 ACE2 有较高的结合活性, 曲克芦丁和原卟啉与 MPro 具有高的结合活性, 菠萝甾醇和鲨烯与 PLP 具有高的结合活性。网络拓扑分析筛选得到 118 个核心靶点, 关键靶点涉及 PTGS2、AR、MAPK14、PPARG 和 GSK3B 等, 与核心靶点相关联的活性成分共 124 个, 如槲皮素、汉黄芩素、山柰酚、异鼠李素和儿茶酸等。通路富集得到 Influenza A、Small cell lung cancer、TNF、Toll-like receptor、PI3K-Akt 和 HIF-1 等关键信号通路。结论 小柴胡汤中的活性成分群发挥防治 COVID-19 的作用机制主要包括以下 3 个方面: ①活性成分可能通过作用于 ACE2、MPro 和 PLP 靶点抑制病毒感染宿主细胞及自我复制的进程; ②通过作用于 PTGS2、TNF- α 和 IL-6 等靶点抑制细胞因子风暴; ③通过调控 HIF-1 信号通路改善低氧血症。

关键词: 小柴胡汤; 新型冠状病毒肺炎; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)21-2665-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.21.007

引用本文: 湛攀, 饶鸿宇, 吴灏, 等. 基于分子对接法和网络药理学揭示小柴胡汤防治新型冠状病毒肺炎的活性成分及作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(21): 2665-2674.

Discovery of the Major Bioactive Compounds and Action Mechanisms Responsible for the Protective Effects of Xiaochaihu Decoction on COVID-19 Based on Molecular Docking and Network Pharmacology Methods

CHEN Pan, RAO Hongyu, WU Hao, WANG Yonggang, SU Weiwei, LI Peibo^{*}(Guangdong Engineering and Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-evaluation of Post-marketed TCM, Guangdong Key Laboratory of Plant Resources, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the active constituents and mechanism of action in Xiaochaihu decoction(XCHD) for treatment of COVID-19, and provide a reference for its clinical application. **METHODS** The chemical constituents in XCHD were collected by using Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database(TCMSP). Further molecular docking study was performed to evaluate the interactions between these constituents and the ACE2, MPro, and PLP target proteins. The targets of constituents were collected by using TCMSP and Comparative Toxicogenomics Database(CTD). Protein-protein interaction(PPI) data was constructed by using String website to screen key targets. The “herb-active constituent-key target” network was constructed by using Cytoscape software, followed by topology analysis. Moreover, KEGG pathway analysis was performed on screened key targets with the DAVID database to predict the protective mechanism of XCHD on COVID-19. **RESULTS** Molecular docking results showed that the number of active ingredients in XCHD binding with ACE2, MPro, and PLP with Libdockscore>120 were 86, 114, and 105, respectively. For example, licorice glycoside E was nicely bound to ACE2, MPro and PLP. Saikosaponin C and ginsenoside Rh2 were nicely bound to ACE2. Troxerutin and protoporphyrin were nicely bound to Mpro. α -Spinasterol and supraene were nicely bound to PLP. Network topology analysis screened 118 core targets, the key targets involved PTGS2, AR, MAPK14, PPARG and GSK3B, etc. A total of 118 key targets were screened, such as PTGS2, AR, MAPK14, PPARG, and GSK3B. There were 124 key target-related active components, such as quercetin, wogonin,

作者简介: 湛攀, 男, 博士生 Tel: (020)84112398 E-mail: chenpan989@126.com *通信作者: 李沛波, 男, 博士, 副教授, 博导 Tel: (020)84112398 E-mail: lipb73@126.com

kaempferol, isorhamnetin, and (-)-catechin. Further KEGG pathway analysis revealed several key pathways which were probably involved in the treatment of COVID-19, including Influenza A pathway, Small cell lung cancer pathway, TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, and HIF-1 signaling pathway. **CONCLUSION** The mechanisms of XCHD in the treatment of COVID-19 are summarized as following: ① the active constituents can act on ACE2, MPro and PLP to inhibit the infection and reproduction of SARS-CoV-2. ② act on the targets such as PTGS2, TNF- α , and IL-6 to inhibit the cytokine release syndrome. ③ regulate the HIF-1 signaling pathway to alleviate hypoxemia. **KEYWORDS:** Xiaochaihu decoction; COVID-19; network pharmacology; molecular docking

2019 年底, 全球各地陆续出现了由新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引发的肺炎, 以发热、干咳、乏力为主要表现, 该病毒具有传染性强、各类人群普遍易感的特点^[1-2]。2020 年 1 月 31 日, 世界卫生组织(WHO)正式宣布 SARS-CoV-2 感染的疫情构成“国际关注的突发公共卫生事件”, 并于 2 月 11 日将 SARS-CoV-2 感染引起的疾病正式命名为 COVID-19。COVID-19 疫情从特征上可称为大流行, 全球超过两百个国家和地区出现感染病例。目前, 尚无治疗 COVID-19 的特效药, 针对 SARS-CoV-2 的疫苗还处于研发过程中。研究表明, COVID-19 患者康复后, 抗体存在时间很短, 只能持续 2~3 个月^[3]。中国在临床上主要是以中西医结合的方式对症治疗, 以减轻患者的发热、干咳、乏力等肺炎症状, 并通过免疫调节以抑制细胞因子风暴, 降低病死率, 取得了很好的效果, 目前国内疫情已经得到有效控制。中医认为 COVID-19 属于温病范畴的湿毒疫^[4]。国家卫生健康委员会、国家中医药管理局印发的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)》指出, 本病属于中医“疫病”范畴, 病因是感受“疫疠”之气。为充分发挥中医药在应对 COVID-19 中的作用, 目前已有多个中药制剂获各省药品监督管理局批准用于防控 COVID-19 疫情。这些制剂多以经方为基础。

经方小柴胡汤由柴胡、黄芩、半夏、人参、甘草、生姜和大枣等 7 味中药组成, 首载于《伤寒论》, 为和解少阳的代表方, 具有和解表里之功效, 是传统中医用于防治伤寒疫症等外感病的主方。在 COVID-19 防治中, 小柴胡汤以及以小柴胡汤为基础方的中药方剂被应用于临床, 并取得了较好的疗效。如广州市第八人民医院以小柴胡汤为基础方组合的透解祛瘟颗粒(曾用名“肺炎 1 号方”)因具有较好的临床价值^[5], 获得广东省药品监督管理局的批准, 可以在广东省 SARS-CoV-2 感染的肺炎定点救治医院直接调剂使用^[6]。国家中医药管理局在山西、河北、黑龙江和陕西省试点

的以小柴胡汤为基础方的“清肺排毒汤”, 其总体有效率>90%^[7]。2020 年 2 月 6 日, 国家卫生健康委员会办公厅、国家中医药管理局办公室联合印发《关于推荐在中西医结合救治新型冠状病毒感染的肺炎中使用清肺排毒汤的通知》, 将清肺排毒汤推荐各地使用。可见, 小柴胡汤是中药防治 COVID-19 的重要基础方。但是, 小柴胡汤防治 COVID-19 的活性成分和作用机制尚不清楚。

分子对接在药物虚拟筛选中应用广泛, 其实质就是利用计算机技术, 通过分子的几何结构模拟分子间相互作用力, 研究药物分子与靶点间的相互作用, 应用于药物发现阶段的早期虚拟筛选、药物潜在作用机制研究以及药物作用靶点的预测^[8]。中药网络药理学可以从整体角度系统探索药物与疾病间的关联性, 构建“药物-靶点-疾病”网络, 为中药复方的多成分、多途径和多靶点的整体作用机制提供新的视角^[9]。本研究首次采用分子对接技术及网络药理学方法研究经方小柴胡汤防治 COVID-19 的活性成分和作用机制, 为小柴胡汤在 COVID-19 防治中的临床应用提供参考。

1 方法

1.1 小柴胡汤化学成分的获得

借助中药系统药理学平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/>), 分别以“柴胡”“大枣”“生姜”“黄芩”“甘草”“半夏”和“人参”为关键词检索小柴胡汤中的化学成分。口服生物利用度(oral bioavailability, OB)表示口服药物的有效成分经吸收达到体循环的速度与程度, 是筛选药物活性成分的一个重要指标。类药性(drug-likeness, DL)是通过分析现有分子药物的物理化学性质和结构特征而确定的, 已被广泛用于排除一些在吸收、分布、代谢、排泄和安全性方面较差的化合物^[10]。因此, 本研究筛选出小柴胡汤中 OB $\geq$ 30%且 DL $\geq$ 0.18 的化学成分^[10]。

1.2 化学成分-靶点分子对接

据文献报道, SARS-CoV-2 是通过其 S-蛋白与

人体内血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE2)结合而进入宿主细胞,进而诱发疾病^[11-12]。最新的研究表明,SARS-CoV-2的S-蛋白与人体ACE2结合的亲和力要远高于SARS-CoV的S-蛋白,这是其传染性强的主要原因^[13-14]。SARS-CoV-2作为RNA病毒,在复制过程中首先需要编码一个多聚前体蛋白,然后再水解产生功能蛋白,该水解过程主要由3CL水解酶(3CL protease, Mpro)参与完成^[15],因此,Mpro是治疗COVID-19的潜在靶点。冠状病毒木瓜样蛋白酶(papain-like protease, PLP)是冠状病毒在复制过程中的重要蛋白酶之一^[16]。鉴于此,本研究对小柴胡汤中的化学成分与靶点ACE2、Mpro和PLP进行虚拟对接,揭示各化学成分在小柴胡汤发挥防治COVID-19的作用。从PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中下载化合物结构(SDF格式)。在Discovery studio 2016软件工具栏中的Minimize Ligands模块上选择Full Minimization,批量施加CHARMM力场优化小分子结构。从RCSB蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载ACE2(PDB ID: 1R4L)、Mpro(PDB ID: 6LU7)和PLP(PDB ID: 4OVZ)的晶体结构,在Discovery studio 2016软件中删去晶体结构的水分子,并通过Prepare Protein功能补全不完整残基、加氢以及分配相关电荷。ACE2、Mpro和PLP蛋白晶体复合结构中的原配体分别为XX5^[12]、N3^[17]和P85^[18],是相应靶蛋白的抑制剂,并与靶蛋白有很好的结合活性。先将蛋白晶体结构中的原配体删去,选择原配体的结合位置作为对接活性口袋,采用LibDock模块将小分子化合物和原配体对接到对应的蛋白结构的活性口袋中,保留打分较高的对接构象,并与原配体的对接结果作为参照。

1.3 核心靶点的确定及“药材-活性成分-核心靶点”网络的构建

采用中药系统药理学平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/>)和毒性与基因比较数据库(CTD, <https://ctdbase.org/>)分析并检索化合物的靶蛋白或靶标基因,借助Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)、Drugbank(<https://www.drugbank.ca/>)数据库查阅靶蛋白对应的基因名。使用String (<https://string-db.org/>)数据库对上述所有靶点进行蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析,并将分析结果导入Cytoscape3.7.2软件进行

网络拓扑分析,将节点的度(Degree)>2倍中位值、紧密中心度(Closeness centrality)和间距中心度(Betweenness centrality)均大于其中位值的节点基因作为核心靶基因^[19-20]。筛选到核心靶点后,运用Cytoscape3.7.2构建可视化的“药材-活性成分-核心靶点”网络,并分析网络的拓扑特征。

1.4 核心靶点通路富集分析

为进一步分析筛选出的靶基因的功能以及在信号通路中的作用,将筛选得到的核心靶点导入DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),并限定物种为人(Homo sapiens),进行KEGG信号通路富集分析。

2 结果

2.1 化学成分的获得及核心靶点的筛选

通过TCMSP检索并收集到柴胡、大枣、生姜、黄芩、甘草、半夏和人参中满足OB $\geq$ 30%且DL $\geq$ 0.18的化学成分共177个,其中17个来自柴胡,26个来自大枣,5个来自生姜,33个来自黄芩,85个来自甘草,10个来自半夏,21个来自人参,结果见表1。从TCMSP和CTD数据库搜集到成分靶点共526个,通过PPI分析后,得到核心靶点118个,与核心靶点相关联的成分共124个(表1中标注*的成分),这124个成分为防治COVID-19活性成分,其中13个来自柴胡,16个来自大枣,4个来自生姜,24个来自黄芩,67个来自甘草,6个来自半夏,13个来自人参,用于后续网络构建。

2.2 分子对接结果分析

上述小柴胡汤中的177个化学成分与ACE2、MPro和PLP对接结果Libdockscore>120的化学成分分数分别为86,114和105个。此外,本研究发现某些成分的结合活性与原配体接近,结果见表2。柴胡中的柴胡皂苷C、大枣中的滇刺枣碱D、黄芩中的表小檗碱、甘草中的甘草苷E和人参中的人参皂苷Rh2与ACE2有较强的结合活性。柴胡中的曲克芦丁、半夏中的松柏苷和大枣中的酸枣仁皂苷A与MPro具有强的结合活性。人参中的人参皂苷Rh4、生姜中的6-甲基姜辣二醇双乙酸酯和甘草中的甘草苷与PLP具有强的结合活性。部分代表性活性成分与靶蛋白的相互作用见图1。由上述结果可见,小柴胡汤中含有与ACE2、MPro和PLP有较好结合活性的成分群,提示这些活性成分可能具有抑制SARS-CoV-2病毒感染宿主细胞和自我复制的作用。

表 1 小柴胡汤化学成分

Tab. 1 Chemical constituents in Xiaochaihu decoction

序号	来源	成分	PubChem CID	OB/%	DL
1*	柴胡	Linoleyl acetate	21159087	42.10	0.20
2*	柴胡/半夏	Baicalin	64982	40.12	0.75
3*	柴胡/黄芩/半夏/人参/生姜/大枣	Stigmasterol	5280794	43.83	0.76
4*	柴胡/甘草	Isorhamnetin	5281654	49.60	0.31
5*	柴胡/人参/甘草	Kaempferol	5280863	41.88	0.24
6	柴胡	3',4',5',3,5,6,7-Heptamethoxyflavone	389001	31.97	0.59
7*	柴胡	Areapillin	158311	48.96	0.41
8*	柴胡	Cubebin	117443	57.13	0.64
9*	柴胡	Longikaurin A	433636	47.72	0.53
10	柴胡	Octalupine	73404	47.82	0.28
11	柴胡	Sainfuran	185034	79.91	0.23
12*	柴胡	Troloxerutin	5486699	31.60	0.28
13*	柴胡	(+)-Anomalin	6450453	46.06	0.66
14	柴胡	Saikosaponin c _{qt}	254770436	30.50	0.63
15*	柴胡	α -Spinasterol	12960498	42.98	0.76
16*	柴胡	Petunidin	441774	30.05	0.31
17*	柴胡/甘草/大枣	Quercetin	5280343	46.43	0.28
18*	黄芩	Acacetin	5280442	34.97	0.24
19*	黄芩	Wogonin	5281703	30.68	0.23
20*	黄芩	(2R)-7-Hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	821279	55.23	0.20
21*	黄芩	Baicalein	5281605	33.52	0.21
22	黄芩	5,8,2'-Trihydroxy-7-methoxyflavone	156992	37.01	0.27
23	黄芩	5,7,2,5-Tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	44258628	33.82	0.45
24*	黄芩	Carthamidin	188308	41.15	0.24
25	黄芩	Dihydrobaicalin _{qt}	14135325	40.04	0.21
26*	黄芩	Eriodictiol (flavanone)	373261	41.35	0.24
27*	黄芩	Salvigenin	161271	49.07	0.33
28	黄芩	5,2',6'-Trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	44258546	45.05	0.33
29*	黄芩	5,7,2',6'-Tetrahydroxyflavone	5321865	37.01	0.24
30	黄芩	Dihydrooroxylin A	5316733	38.72	0.23
31*	黄芩	Oroxylin A	5320315	41.37	0.23
32*	黄芩	Panicolin	5320399	76.26	0.29
33*	黄芩	5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone	5322078	36.56	0.27
34*	黄芩	Neobaicalein	124211	104.34	0.44
35*	黄芩	Dihydrooroxylin	177032	66.06	0.23
36	黄芩	5,2'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	159029	31.71	0.35
37*	黄芩	Ent-Epicatchin	182232	48.96	0.24
38*	黄芩	Coptisine	72322	30.67	0.86
39	黄芩	Bis[(2S)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate	7057920	43.59	0.35
40	黄芩	Supraene	638072	33.55	0.42
41	黄芩	Diisooctyl phthalate	33934	43.59	0.39
42*	黄芩	Epiberberine	160876	43.09	0.78
43*	黄芩	Moslossoflavone	188316	44.09	0.25
44	黄芩	11,13-Eicosadienoic acid, methyl ester	5365674	39.28	0.23
45*	黄芩	5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavanone	46893290	36.63	0.27
46*	黄芩	5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavanone	42608119	74.24	0.26
47*	黄芩	Rivularin	13889022	37.94	0.37
48*	黄芩/半夏/人参/生姜/大枣	Beta-Sitosterol	222284	36.91	0.75

续表 1

序号	来源	成分	PubChem CID	OB/%	DL
49	半夏	24-Ethylcholest-4-en-3-one	15596633	36.08	0.76
50*	半夏	Cavidine	193148	35.64	0.81
51*	半夏	Coniferin	5280372	31.11	0.32
52	半夏	10,13-eicosadienoic	5365687	39.99	0.20
53	半夏	(3S,6S)-3-(Benzyl)-6-(4-hydroxybenzyl)piperazine-2,5-quinone	11438306	46.89	0.27
54*	半夏	Cycloartenol	92110	38.69	0.78
55	半夏	Beta-D-Ribofuranoside, xanthine-9	64959	44.72	0.21
56*	人参	Ginsenoside Rh4_qt	21599928	31.11	0.78
57	人参	Gomisin B	6438572	31.99	0.83
58*	人参	Panaxadiol	73498	33.09	0.79
59*	人参	Ginsenoside Rh2	119307	36.32	0.56
60*	人参	Alexandrin_qt	5742590	36.91	0.75
61	人参	Chrysanthemaxanthin	21160900	38.72	0.58
62*	人参	Deoxyharringtonine	285342	39.27	0.81
63*	人参	Ginsenoside Rg5_qt	11550001	39.56	0.79
64*	人参	Dianthramine	441562	40.45	0.20
65*	人参	Arachidonate	444899	45.57	0.20
66*	人参	Suchilactone	132350840	57.52	0.56
67*	人参	Girinimbin	96943	61.22	0.31
68*	人参	Frutinone A	441965	65.90	0.34
69	人参	Aposiopalamine	52143306	66.65	0.22
70	人参	Celabenzine	442847	101.88	0.49
71*	人参/甘草	Inermine	91510	75.18	0.54
72	人参/大枣	Malkangunin	90473155	57.71	0.63
73*	人参/大枣	Fumarine	4970	59.26	0.83
74*	甘草	Liquiritigenin	114829	32.76	0.18
75*	甘草	Glycyrol	5320083	90.78	0.67
76*	甘草	Jaranol	5318869	50.83	0.29
77*	甘草	Medicarpin	336327	49.22	0.34
78*	甘草	Lupiwighteone	5317480	51.64	0.37
79*	甘草	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	911486	42.56	0.20
80*	甘草	Formononetin	5280378	69.67	0.21
81*	甘草	Calycosin	5280448	47.75	0.24
82*	甘草	Naringenin	439246	59.29	0.21
83	甘草	Shinflavanone	197678	31.79	0.72
84*	甘草	Glyasperin B	480784	65.22	0.44
85*	甘草	Glyasperin F	392442	75.84	0.54
86*	甘草	Glyasperin C	480859	45.56	0.40
87*	甘草	Isotrifoliol	5318679	31.94	0.42
88	甘草	Kanzonol B	10881804	39.62	0.35
89*	甘草	Kanzonols W	15380912	50.48	0.52
90	甘草	(2S)-6-(2,4-Dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-One	637112	60.25	0.63
91*	甘草	Semilicoisoflavone B	5481948	48.78	0.55
92*	甘草	Glepidotin A	5281619	44.72	0.35
93*	甘草	Glepidotin B	442411	64.46	0.34
94*	甘草	Phaseolinisoflavan	4484952	32.01	0.45
95*	甘草	Glypallichalcone	5317768	61.60	0.19
96	甘草	Glabrocoumarone A	10542808	58.44	0.38
97*	甘草	Licochalcone B	5318999	76.76	0.19

续表 1

序号	来源	成分	PubChem CID	OB/%	DL
98*	甘草	Licochalcone G	49856081	49.25	0.32
99	甘草	Licoarylcoumarin	10090416	59.62	0.43
100*	甘草	Licoricone	5319013	63.58	0.47
101*	甘草	Gancaonin A	5317478	51.08	0.40
102*	甘草	Gancaonin B	5317479	48.79	0.45
103	甘草	Licorice glycoside E	42607811	32.89	0.27
104	甘草	Gancaonin L	14604077	66.37	0.41
105*	甘草	Gancaonin M	14604078	30.49	0.41
106	甘草	Gancaonin O	14604081	44.15	0.41
107*	甘草	Glycyrrin	480787	52.61	0.47
108*	甘草	Licocoumarone	503731	33.21	0.36
109*	甘草	Licoisoflavone A	5281789	41.61	0.42
110*	甘草	Licoisoflavone B	5481234	38.93	0.55
111*	甘草	Licoisoflavanone	392443	52.47	0.54
112*	甘草	Shinpterocarpin	10336244	80.30	0.73
113	甘草	5-Prenylbutein	11267805	46.27	0.31
114*	甘草	Liquiritin	503737	65.69	0.74
115*	甘草	Licopyranocoumarin	122851	80.36	0.65
116	甘草	Glyuranolide	195396	34.32	0.55
117*	甘草	Glyzaglabrin	5317777	61.07	0.35
118*	甘草	Glabridin	124052	53.25	0.47
119*	甘草	Glabranin	124049	52.90	0.31
120*	甘草	Glabrene	480774	46.27	0.44
121*	甘草	Glabrone	5317652	52.51	0.50
122	甘草	Hedysarimcoumestan B	11558452	48.14	0.43
123	甘草	1,3-Dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	11602329	62.90	0.53
124*	甘草	Eurycarpin A	5317300	43.28	0.37
125	甘草	Glycyroside	101939210	37.25	0.79
126*	甘草	(-)-Medicocarpin	23724664	40.99	0.95
127*	甘草	Sigmoidin B	73205	34.88	0.41
128*	甘草	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	928837	71.12	0.18
129	甘草	Isobavachin	193679	36.57	0.32
130*	甘草	Isoglycyrol	124050	44.70	0.84
131*	甘草	Isolicoflavonol	5318585	45.17	0.42
132*	甘草	Isoformononetin	3764	38.37	0.21
133*	甘草	1-Methoxyphaseollidin	480873	69.98	0.64
134*	甘草	3'-Hydroxy-4'-O-Methylglabridin	15228662	43.71	0.57
135*	甘草	Licochalcone A	5318998	40.79	0.29
136*	甘草	3'-Methoxyglabridin	5319439	46.16	0.57
137	甘草	4'-Methoxyglabridin	9927807	36.21	0.52
138*	甘草	Inflacoumarin A	50218733	39.71	0.33
139	甘草	Icos-5-enoic acid	3349565	30.70	0.20
140*	甘草	Kanzonol F	101666840	32.47	0.89
141*	甘草	7,2',4'-Trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin	25015742	83.71	0.27
142*	甘草	7-Acetoxy-2-methylisoflavone	268208	38.92	0.26
143	甘草	Gadelaidic acid	5460988	30.70	0.20
144*	甘草	Vestitol	92503	74.66	0.21
145*	甘草	Gancaonin G	480780	60.44	0.39
146*	甘草	Gancaonin H	5481949	50.10	0.78

续表 1

序号	来源	成分	PubChem CID	OB/%	DL
147*	甘草	Licoagrocarpin	15840593	58.81	0.58
148*	甘草	Glycyrrhiza flavonol A	5317765	41.28	0.60
149*	甘草	Licoagroisoflavone	636883	57.28	0.49
150	甘草	18 α -hydroxyglycyrrhetic acid	14189465	41.16	0.71
151*	甘草	Odoratin	13965473	49.95	0.30
152*	甘草	Phaseol	44257530	78.77	0.58
153*	甘草	Xambioona	14769500	54.85	0.87
154*	甘草/大枣	Mairin	64971	55.38	0.78
155*	生姜	Poriferast-5-en-3 β -ol	457801	36.91	0.75
156	生姜	6-Methylgingediacetate	53145002	48.73	0.32
157*	生姜	Dihydrocapsaicin	107982	47.07	0.19
158*	大枣	Stepharine	98455	31.55	0.33
159	大枣	Spiradine A	441756	113.52	0.61
160	大枣	Jujuboside A_qt	51346169	36.67	0.62
161*	大枣	Coumestrol	5281707	32.49	0.34
162*	大枣	Jujubasaponin V_qt	101635353	36.99	0.63
163*	大枣	Jujuboside C_qt	71448946	40.26	0.62
164*	大枣	Mauritine D	6443026	89.13	0.45
165*	大枣	Berberine	2353	36.86	0.78
166*	大枣	(S)-Cocloraurine	160487	42.35	0.24
167*	大枣	Ziziphin_qt	441957	66.95	0.62
168*	大枣	Ruvoside_qt	101650325	36.12	0.76
169*	大枣	(+)-Catechin	9064	54.83	0.24
170*	大枣	Stepholidine	6917970	33.11	0.54
171*	大枣	Nuciferin	10146	34.43	0.40
172	大枣	Protoporphyrin	4971	30.86	0.56
173	大枣	Ceanothic acid	161352	73.52	0.77
174*	大枣	Moupinamide	5280537	86.71	0.26
175*	大枣	Beta-Carotene	5280489	37.18	0.58
176*	大枣	(-)-Catechin	73160	49.68	0.24
177	大枣	Stigmast-4-ene-3,6-diol	10550610	34.37	0.78

注：“qt”表示该成分的苷元，如 Ginsenoside-Rh4_qt 表示 Ginsenoside 的苷元；*表示与核心靶点相关的活性成分，共 124 个。

Note: “qt” represented the aglycone of constituent, such as Ginsenoside-Rh4_qt represents the aglycone of Ginsenoside; *represented the 124 active constituents associated with key targets.

表 2 ACE2、MPro 和 PLP 靶点筛选获得的代表性化学成分

Tab. 2 Representative chemical constituents obtained by screening for ACE2, MPro, and PLP binding

来源	ACE2		MPro		PLP	
	代表性成分	Libdockscore	代表性成分	Libdockscore	代表性成分	Libdockscore
/	原配体(XX5)	140.1	原配体(N3)	207.0	原配体(P85)	175.1
柴胡	Saikosaponin C_qt	170.0	Troxeutin	195.3	α -Spinasterol	165.9
黄芩	Supraene	146.5	2'-Elucuronide	166.8	Supraene	157.0
半夏	Baicalin	153.6	Coniferin	136.5	Cyclo(L-Tyr-L-Phe)	141.0
人参	Ginsenoside Rh2	161.6	Ginsenoside Rh2	148.0	Deoxyharringtonine	150.8
甘草	Licorice glycoside E	173.0	Licorice glycoside E	208.2	Licorice glycoside E	188.1
生姜	6-Methylgingediacetat	139.5	6-Methylgingediacetate	143.9	6-Methylgingediacetate	150.9
大枣	Mauritine D	148.0	Protoporphyrin	180.4	Stigmast-4-ene-3,6-diol	143.0

2.3 “药材-活性成分-核心靶点”网络分析

利用 Cytoscape 建立的“药材-活性成分-核心

靶点”网络见图 2。由图 2 可见，该网络共有 249 个节点(7 味药材，124 个活性成分，118 个核心靶

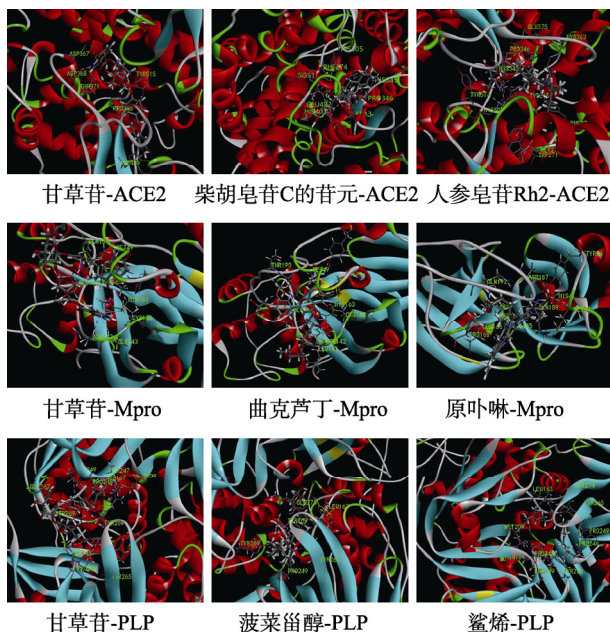


图1 代表性成分与ACE2、MPro和PLP分子对接模式
Fig. 1 Molecular docking patterns of representative components with ACE2, MPro and PLP molecules

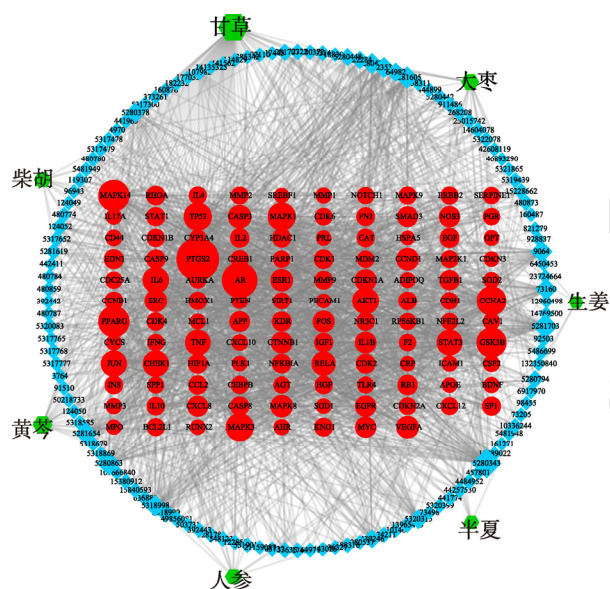


图2 药材-活性成分-核心靶点网络图
六边形代表药材, 圆形代表成分作用的核心靶点, 正方形代表活性成分, 图形的大小代表了节点的 Degree 值。
Fig. 2 Network diagram of medicinal materials-active components-core targets
Hexagons, squares, and circles represent the herbs, the active constituents, and the key targets, respectively. The size represents nodes Degree value.

点), 2 030 条边。在 118 个核心靶点中, Degree 值前 15 的靶点为 PTGS2、AR、MAPK14、PPARG、GSK3B、CCNA2、MAPK1、MAPK3、TP53、IL-6、CHEK1、JUN、STAT3、TNF 和 RELA。Degree 值前 5 的成分是槲皮素、汉黄芩素、山柰酚、异

鼠李素和儿茶酸, 说明这些成分可以作用于多个靶点。

2.4 核心靶点通路富集分析

通过对小柴胡汤作用的 118 个核心靶点进行 KEGG 通路富集, 得到 119 条通路(筛选了 $P < 0.05$ 的通路, P 值越小, 富集程度越高)。图 3 列举了前 30 条相关通路, 主要包括与病毒性疾病相关的 Hepatitis B、Influenza A、Epstein-Barr virus infection、Viral carcinogenesis 通路; 与呼吸系统疾病相关的 Pertussis、Small cell lung cancer、Tuberculosis 通路; 与炎症免疫调控相关的 TNF、Toll-like receptor 信号通路; 此外, 还包括在炎症因子调控及低氧浓度或缺氧应答中发挥重要作用的 HIF-1 信号通路, 以及在某些病毒复制过程中必须激活的 PI3K-AKT 信号通路。

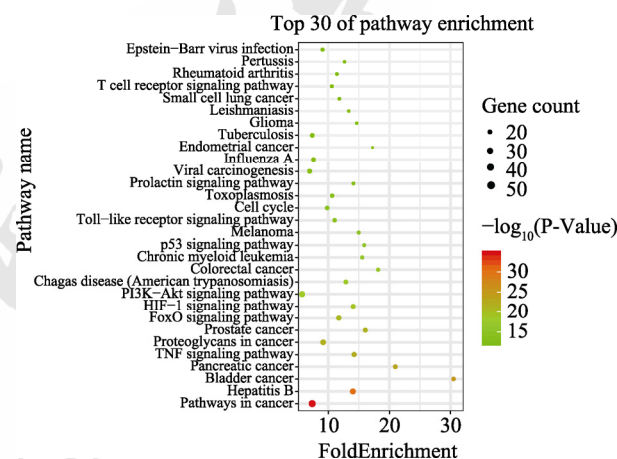


图3 小柴胡汤核心靶点 KEGG 通路富集分析结果
Fig. 3 KEGG pathway enrichment analysis results of the core target of Xiaochaihu decoction

3 讨论

小柴胡汤在防治 COVID-19 中取得了良好的效果, 但是其活性成分和作用机制尚不清楚。本研究的目的就是探索小柴胡汤防治 COVID-19 的活性成分及作用机制, 为小柴胡汤在 COVID-19 的预防和治疗中的应用提供参考。本研究采用分子对接法对小柴胡汤中作用于 ACE2、MPro 和 PLP 靶点的活性成分进行预测和筛选, 然后利用 TCMSP 和 CTD 等数据库进行靶点检索, 通过 PPI 分析筛选得到核心靶点, 构建“药材-活性成分-核心靶点”网络, 对核心靶点进行 KEGG 通路富集分析, 探讨小柴胡汤防治 COVID-19 的可能作用通路。

ACE2、MPro 和 PLP 是 SARS-CoV-2 病毒感

染宿主细胞或自我复制的关键蛋白,被认为是抗 SARS-CoV-2 病毒药物筛选的重要靶点。本研究结果表明,小柴胡汤中含有与 ACE2、MPro 和 PLP 有较好结合活性的成分群;其中,甘草苷 E 与 ACE2、MPro 和 PLP 均具有较好的结合活性,柴胡皂苷 C 的苷元和人参中的人参皂苷 Rh2 与 ACE2 有较高的结合活性,曲克芦丁和原卟啉与 MPro 具有高的结合活性,菠菜甾醇和鲨烯与 PLP 具有高的结合活性。这些活性成分在抑制 SARS-CoV-2 病毒感染宿主细胞或自我复制方面具有潜在的作用。一些代表性活性成分已经有相关抗病毒活性的文献报道,如柴胡皂苷 C^[21]有抑制丙型肝炎病毒复制的活性,人参皂苷 Rh2^[22-23]和黄芩苷^[24-26]则对多种病毒有抑制作用。

细胞因子风暴(cytokine release syndrome, CRS)是一种全身性炎症反应,可由感染等因素引发,表现为多种炎症因子水平急剧升高。CRS 多见于免疫系统相关疾病或病毒感染^[27]。已有研究表明,COVID-19 重症患者存在不同程度的细胞因子风暴,相较于非重症监护患者,重症监护患者的血浆中存在更高的 IL-6 和 TNF- α 等炎症因子浓度^[28-29]。其中, TNF- α 和 IL-6 是引发 COVID-19 患者 CRS 的关键炎症因子, IL-6 的进行性上升已作为 COVID-19 重型、危重型病例病情恶化的临床警示指标。WHO 研究证实 IL-6 抑制剂可降低 COVID-19 住院患者死亡风险^[30]。环氧化酶 2(Cyclooxygenase-2, Cox-2/PTGS2)在机体炎症反应过程中起着十分重要的作用,主要功能之一就是催化花生四烯酸产生前列腺素 E2,广泛参与机体多个组织和器官的炎症反应。Cox-2/PTGS2 的抑制剂双氯芬酸被推荐用于治疗 COVID-19^[31]。本研究结果表明,小柴胡汤能作用于 PTGS2、TNF- α 和 IL-6 等与炎症调控密切相关的多个靶点以及作用于 TNF、Toll-like receptor 等多个信号通路,提示其可能具有抑制 COVID-19 引起的 CRS 的作用。此外, COVID-19 低氧血症重症患者多在发病 1 周后出现呼吸困难和/或低氧血症,本研究通路富集结果显示, HIF-1 信号通路也是小柴胡汤作用的关键通路之一,提示小柴胡汤对 COVID-19 患者的低氧血症可能也有改善作用。

本研究中分子对接是通过将小柴胡汤中的成分与抑制病毒感染宿主细胞及自我复制的靶点进行对接,以筛选出其中具有抑制病毒活性成分。

通过网络药理学研究搜集了小柴胡汤成分的相关作用靶点,对成分靶点进行蛋白间相互作用分析、网络构建及拓扑分析、通路富集分析,挖掘关键靶点和通路,并确定与之相关的活性成分。分子对接和网络药理学研究所侧重的内容和研究方法不同,两部分研究内容互相补充,共同揭示了小柴胡汤防治 COVID-19 的活性成分及作用机制。网络药理学是基于整体和系统的角度去研究中药复方的作用机制,这与中医的整体观念相一致,但该方法也存在一些不足,如目前还无法将活性成分进入血液循环的量考虑进去,也没有考虑到从数据库收集的各靶点的权重差异。分子对接作为一种虚拟研究手段,能快速预测药物靶点,但有可能出现假阳性结果。因此,本研究预测的结果还需要后续的实验验证。

综上所述,小柴胡汤中的活性成分群发挥防治 COVID-19 的作用机制主要包括以下 3 个方面:①活性成分可能通过作用于 ACE2、MPro 和 PLP 抑制病毒感染宿主细胞及自我复制的进程;②通过作用于 PTGS2、TNF- α 和 IL-6 等靶点抑制细胞因子风暴;③通过调控 HIF-1 信号通路改善低氧血症。小柴胡汤防治 COVID-19 的活性成分及作用机制的阐明为小柴胡汤的临床应用提供了参考依据。

REFERENCES

- [1] KANNE J P. Chest CT findings in 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections from Wuhan, China: Key points for the radiologist[J]. Radiology, 2020, 295(1): 16-17.
- [2] GUAN W J, NI Z Y, HU Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China[J]. N Engl J Med, 2020, 382(18): 1708-1720.
- [3] LONG Q X, TANG X J, SHI Q L, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections[J]. Nat Med, 2020, 26(8): 1200-1204.
- [4] MIAO Q, CONG X D, WANG B, et al. Understanding and thinking of novel coronavirus pneumonia in Traditional Chinese Medicine[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2020, 61(4): 286-288.
- [5] 广东省药品监督管理局. “肺炎 1 号方” 获批用于广东 30 家定点救治医院[EB/OL]. http://mpa.gd.gov.cn/xwdt/xwfbpt/mtzx/content/post_2895790.html. 2020-02-14.
- [6] 广东省药品监督管理局. 广东省药品监督管理局 广东省卫生健康委员会 广东省中医药局关于透解祛瘟颗粒(曾用名“肺炎 1 号方”)临床使用有关规定的通知[EB/OL]. http://mpa.gd.gov.cn/zwgk/gzwj/content/post_2888223.html. 2020-02-08.
- [7] ZHAO J, TIAN S S, YANG J, et al. Investigating mechanism of Qing-Fei-Pai-Du-Tang for treatment of COVID-19 by network pharmacology[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),

- 2020, 51(4): 829-835.
- [8] JIN X J, WANG Y R, WANG Y, et al. Explore the material basis of treating pulmonary fibrosis with yifei jianpi prescription based on network pharmacology, molecular docking and chemical informatics[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(8): 897-906.
 - [9] OU H Y, YE X P, LI S, et al. Study on medication rules of herbs in the regulation of ferroptosis based on network pharmacology and data mining[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(18): 2317-2324.
 - [10] DU B, LIU L H, LV Y J, et al. Systems pharmacology uncovers multiple mechanisms of erxian decoction for treatment of premature ovarian failure[J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(2): 106-113.
 - [11] 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.
 - [12] TOWLER P, STAKER B, PRASAD S G, et al. ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis[J]. J Biol Chem, 2004, 279(17): 17996-18007.
 - [13] WRAPP D, WANG N S, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation[J]. Science, 2020, 367(6483): 1260-1263.
 - [14] CHEN Y, GUO Y, PAN Y, et al. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 525(1): 135-140.
 - [15] LIU X, WANG X J. Potential inhibitors against 2019-nCoV coronavirus M protease from clinically approved medicines[J]. J Genet Genom(遗传学报: 英文版), 2020, 47(2): 119-121.
 - [16] YANG Y D, SUN L, CHEN Z B. Structure and functions of papain-like protease of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus[J]. Chin J Biochem Mol Biol(中国生物化学与分子生物学报), 2010, 26(1): 15-21.
 - [17] JIN Z, DU X, XU Y, et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors[J]. Nature, 2020, 582(7811): 289-293.
 - [18] BÁEZ-SANTOS Y M, BARRAZA S J, WILSON M W, et al. X-ray structural and biological evaluation of a series of potent and highly selective inhibitors of human coronavirus papain-like proteases[J]. J Med Chem, 2014, 57(6): 2393-2412.
 - [19] WANG Y Y, WEI S Z, GAO T, et al. Anti-inflammatory effect of a TCM formula Li-Ru-Kang in rats with hyperplasia of mammary gland and the underlying biological mechanisms[J]. Front Pharmacol, 2018(9): 1318. Doi: 10.3389/fphar.2018.01318.
 - [20] WANG J B, CUI H R, WANG R L, et al. A systems pharmacology-oriented discovery of a new therapeutic use of the TCM formula Liuweiwuling for liver failure[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1-14.
 - [21] LI T, PENG T. Traditional Chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity[J]. Antivir Res, 2013, 97(1): 1-9.
 - [22] DONG W, FAROOQUI A, LEON A J, et al. Inhibition of influenza A virus infection by ginsenosides[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171936. Doi: 10.1371/journal.pone.0171936.
 - [23] KANG S, IM K, KIM G, et al. Antiviral activity of 20(R)-ginsenoside Rh2 against murine gammaherpesvirus[J]. J Ginseng Res, 2017, 41(4): 496-502.
 - [24] XU G, DOU J, ZHANG L, et al. Inhibitory effects of baicalin on the influenza virus *in vivo* is determined by baicalin in the serum[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(2): 238-243.
 - [25] MOGHADDAM E, TEOH B T, SAM S S, et al. Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus[J]. Sci Rep, 2014, 4(1): 1-8.
 - [26] ZHU H Y, HAN L, SHI X L, et al. Baicalin inhibits autophagy induced by influenza A virus H3N2[J]. Antivir Res, 2015(113): 62-70.
 - [27] REN Y, YAO M C, HUO X Q, et al. Study on treatment of "cytokine storm" by anti-2019-nCoV prescriptions based on arachidonic acid metabolic pathway[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(6): 1225-1231.
 - [28] HUANG C L, WANG Y M, LI X W, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. Lancet, 2020, 395(10223): 497-506.
 - [29] SUN X, WANG T, CAI D, et al. Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2020(53): 38-42.
 - [30] THARAUX P L. Association between administration of IL-6 antagonists and mortality among patients hospitalized for COVID-19: A meta-analysis[EB/OL]. JAMA, 2021. 326(6): 499-518.
 - [31] VERRALL G M. Scientific rationale for a bottom-up approach to target the host response in order to try and reduce the numbers presenting with adult respiratory distress syndrome associated with COVID-19. is there a role for statins and COX-2 inhibitors in the prevention and early treatment of the disease?[J]. Front Immunol, 2020(11): 2167. Doi: 10.3389/fimmu.2020.02167.

收稿日期: 2020-07-23

(本文责编: 李艳芳)