

小儿风热清抗新型冠状病毒肺炎 网络药理学研究^{*}

贾瑞康^{1,4} 刘会云^{1,4} 睢建亮^{1,2,4} 王梦蕾^{1,4} 王珍^{1,2,3,*}

(1. 河北省(邯郸)中药产业技术研究院, 河北 邯郸 056000;

2. 河北工程大学医学院附属医院, 河北 邯郸 056000; 3. 复旦大学生物医学研究院, 上海 200030;

4. 邯郸制药股份有限公司, 河北 邯郸 056000)

摘要:目的 分析小儿风热清抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的有效成分及作用。方法 使用中药系统药理学分析平台(TCMSP)获得了小儿风热清药材中的有效成分和潜在作用靶点,使用 GeneCards 收集肺炎相关的作用靶点,与药物作用靶点相比较,筛出药物成分作用的预测靶点。利用 Cytoscape 软件,构建药材-有效成分-靶点相互作用网络分析有效成分和潜在靶点。用 R 语言进行 KEGG 通路富集分析和 GO 生物过程分析。将筛选得到的成分与 COVID-19 肺炎密切相关的 3CLpro 和 ACE2 进行分子对接,筛选出主要成分。建立小鼠疼痛模型和炎症模型,检测小儿风热清治疗效果。结果 收集得到 20 个关键的有效成分,210 个相应潜在靶点。GO 富集分析显示潜在靶点主要定位在膜上,行使受体功能,参与由化学物、活性氧和药物刺激产生的反应。靶点涉及的通路主要有 AGE-RAGE、IL-17 和 TNF 信号通路等。分子对接获得 9 种有效成分与 3CLpro 具有较高亲和力,2 种有效成分与 ACE2 具有较高亲和力。小儿风热清具有良好的抗炎镇痛效果。结论 小儿风热清可能通过与 ACE2 和 3CLpro 结合作用于 AGE-RAGE、IL-17 和 TNF 信号通路,起到抗炎镇痛作用,从而有可能对 COVID-19 起到治疗作用。

关键词:新型冠状病毒肺炎; 小儿风热清; 网络药理学; 分子对接技术; 功能富集分析

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-0571(2021)06-0022-12

DOI: 10.13424/j.cnki.mtcm.2021.06.005

新型冠状病毒(COVID-19)传染性强,感染早期会出现发热、乏力和肌肉酸痛等症状,严重者可能发展为败血性休克和肾功能衰竭等症状^[1-2]。为了积极应对突来的疫情,科研工作者们积极的开展了各方面研究,但在短时间内仍未发现针对性强且有效的治疗药物^[3-5]。目前,我国临床上采用中西医结合方式治疗新型冠状病毒肺炎,以抗病毒西药为主,辅助使用中药进行治疗,康复后继续使用中药进行恢复治疗^[6]。自古以来,中药对于治疗疫病具有很好的效果,在近代的传染病治疗中也发挥了巨大的作用^[7]。新发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》试行第八版中指出,

各地可根据病情、当地气候和不同体质等情况,进行中药辨证论治^[8]。

小儿风热清是以银翘散为基础方辨证加减研制而成,具有退热、镇痛和止咳的功效。具有抗病毒、抗炎的作用,对于小儿上呼吸道感染,尤其是病毒性感冒,具有较好的治疗效果。有研究显示,小儿风热清对手足口病和甲型流行性感冒具有良好的有效性和安全性^[9-11]。药方含有的抗病毒、抗菌的有效成分可能对 COVID-19 也有抵抗作用。

网络药理学由系统生物学发展而来,从系统的角度分析药物发挥的作用,十分符合中药多成分、多途径、多靶点的作用特点^[12-13]。通过构建

* 基金项目: 河北省自然科学基金青年项目(C2019402141); 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2019215); 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(1727201061); 河北省卫生和计划生育委员会科研基金项目(201909620); 邯郸市科技局资助项目(1823208029ZC)

** 通讯作者: 王珍, 硕士生导师。E-mail: wangzhen@hebeu.edu.cn

疾病-基因-靶点-药物的相互作用网络,模拟中药发挥药效的方式,能够预测出关键的有效成分和潜在靶点,目前已被广泛用于研究中药作用的机制^[14-16]。分子对接技术采用多种分子建模方法,考虑氢键和范德华力等多种分子间相互作用的影响,计算并估计配体和受体之间的结合能,来寻找潜在稳定的药物分子和作用靶点,已经成为药物发现中一种重要的工具^[17-18]。本研究通过使用网络药理学的方法,对小儿风热清的有效成分进行分析,寻找其中可能抗新型冠状病毒肺炎的途径,并通过分子对接技术分析关键有效成分与已知新型冠状病毒肺炎相位点的亲和度,为相关研究提供参考和帮助。

1 方法

1.1 有效成分的筛选 在中药系统药理学分析平台(TCMSP)^[19]和BATMEN-TCM数据库^[20]中检索小儿风热清中的20味中药,获取每味中药的成分,根据口服生物利用度(OB)和成药相似性(DL)筛选小儿风热清的有效成分。口服生物利用度(OB)描述口服药物由肠胃吸收,经过肝脏达到体循环血液中药量的百分比,成药相似性(DL)指化合物与已知药物的相似性。筛选OB≥30%和DL≥0.18的化学成分作为小儿风热清有效成分。

1.2 潜在靶点的筛选 在TCMSP中获得小儿风热清有效成分对应的预测靶点,作为小儿风热清发挥作用的可能靶点。同时使用关键字“pneumonia”在数据库GeneCards^[21]中检索,获得肺炎相关的靶点。取两部分靶点的交集,作为小儿风热清抗新型冠状病毒肺炎的潜在靶点,用于后续分析。

1.3 GO和KEGG富集分析 GO(Gene Ontology)数据库主要由生物过程(Biological Process, BP)、分子功能(Molecular Function, MF)和细胞组分(Cellular Component, CC)三个独立的部分组成^[22]。BP指基因或者基因产物参与的生物过程,一个过程由一个或多个有序分子功能组成,例如细胞生长和分裂、细胞循环和信号转导等。MF就是指基因产物的生化活动,例如酶、受体、配体和转运等。CC指基因的产物在细胞中展现活性的具体位置,例如核糖体、蛋白酶体、细胞核和细胞膜等。

KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)是一个用于基因功能系统分析的数据

库,其中的PATHWAY包含了分子相互作用网络(通路)在基因层面的描述,例如细胞凋亡、信号转导、细胞循环等过程,为目前整理最好且使用最多的数据库^[23]。

对潜在靶点进行GO和KEGG富集分析,可以揭示其涉及的主要功能和通路,了解其可能发挥的作用。本文使用R语言(<https://www.r-project.org/>)中的clusterProfiler包^[24]进行潜在靶点的富集分析,并进行结果的可视化。

1.4 药物-有效成分-潜在靶点网络的构建

使用R语言整理导入Cytoscape软件^[25]中,使用merge功能构建药物-有效成分-潜在靶点网络,对网络进行分析,根据节点的度(degree)筛选前20个有效成分。

1.5 蛋白互作网络的构建 在STRING数据库^[26]中检索潜在靶点,构建蛋白互作网络,并将蛋白间相互作用的数据导出。在Cytoscape软件中,使用蛋白互作数据重新进行蛋白互作网络的构建,使用MCC算法筛选网络中较为核心的20个蛋白,并使用MCODE工具获得较为致密的蛋白互作模块。

1.6 分子对接 3CLpro控制着冠状病毒复制复合物的活性^[27],ACE2是SARS-CoV-2进入宿主细胞的关键受体^[28],在RCSB数据库^[29]中检索上述两种蛋白,获得其3D结构。同时在Pubchem数据库^[30]中检索20种有效成分,获得对应的3D结构。使用PyMol软件^[31]处理受体蛋白分子,去除其中的水分子和配体。使用Autodock软件^[32]处理有效成分和受体蛋白,进行加氢、计算电荷和对接操作。结合能≤-5 kJ/mol时认为有效成分与受体蛋白的结合较为稳定,并使用PyMol软件对结果进行可视化。

1.7 实验验证

1.7.1 药品和试剂 小儿风热清合剂(邯郸制药股份有限公司生产,批号:S03520003,规格:60 mL);拜耳阿司匹林肠溶片(拜耳医药保健有限公司生产,批号:BJ51469,规格:100 mg);二甲苯(天津市风船化学试剂科技有限公司生产,批号:20190103)。

1.7.2 动物 SPF级雄性BALB/c小鼠,体质量(20±2)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

司,生产许可证号 SCXK(京)2019-0008。

1.7.3 小鼠抗炎试验 对18只小鼠编号,随机分为3组:小儿风热清组、阳性对照组、空白模型组,每组6只。小儿风热清组给予小儿风热清合剂 $7.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (由说明书上人的日服剂量换算得来);阳性对照组给予阿司匹林 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;空白模型组给予等量蒸馏水,均采取灌胃给药方式,每天给药1次,连续给药3 d。最后一天给药1 h后,将二甲苯均匀涂于小鼠左耳前、后两面, $30 \mu\text{L}/\text{只}$,制备耳肿胀模型。致炎40 min后,小鼠脱颈处死,用8 mm直径的打孔器分别在左耳和右耳的同一部位取得耳片组织,用分析天平进行称重。肿胀度 = 致炎后左耳片质量 - 未致炎右耳片质量;肿胀率(%) = (致炎后左耳片质量 - 未致炎右耳片质量) / 未致炎右耳片质量 $\times 100\%$;肿胀抑制率(%) = [(空白组平均耳肿胀度 - 实验组平均耳肿胀度) / 空白组平均耳肿胀度] $\times 100\%$ 。

1.7.4 小鼠镇痛实验 调节水浴锅,控制温度在 $55 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$,在水浴锅上放置铝板。用秒表记录每只小鼠的痛阈值(即小鼠自放入热板后第一次出现舔后足的时间),测量2次,挑选痛阈值均值在5~30 s之间且反应稳定、不跳跃的小鼠18只。将18只小鼠进行编号,随机分成3组,每组6只,分别为小儿风热清组、阳性对照组、空白模型组。小儿风热清组给予小儿风热清合剂 $7.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;阳性对照组给予阿司匹林 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;空白模型组给予等量蒸馏水,均采取灌胃给药方式,每天灌胃1次,连续给药3 d。最后一天给药后30、60、90和120 min,以同样的方法测定各小鼠的痛阈值并记录,痛阈值若超过60 s则以60 s计。

1.7.5 统计学方法 用 GraphPad Prism 8.0.2 软件,对数据进行统计分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,小鼠抗炎实验数据采用完全随机设计的单因素方差分析,小鼠镇痛试验数据采用重复测量数据方差分析,然后均采用 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 有效成分筛选 经过 $\text{OB} \geq 30\%$ 和 $\text{DL} \geq 0.18$ 的标准筛选后,共获得282种无重复的有效成分。其中甘草有效成分92种,板蓝根有效成分39种,黄芩有效成分36种,赤芍有效成分29种,连翘有

效成分23种,金银花有效成分23种,苦杏仁有效成分19种,防风有效成分18种,柴胡有效成分17种,栀子有效成分15种,薄荷有效成分10种,牛蒡子有效成分8种,荆芥穗有效成分8种,石膏有效成分7种,桔梗有效成分7种,积壳有效成分5种,芦根有效成分1种,淡竹叶有效成分1种,炒六神曲有效成分1种,僵蚕并没有筛选出有效成分,表1为各种药材的部分有效成分。

2.2 潜在靶点获取 潜在靶点的获取结果如图1所示,将TCMSP中预测得到的靶点去重后,共得到284个无重复的靶点。同时在GeneCards中检索得到5014个肺炎相关靶点蛋白,与TCMSP中的预测靶点取交集后得到210个小儿风热清抗新型冠状病毒肺炎的潜在靶点。

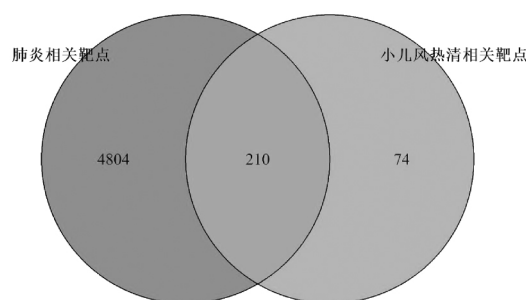


图1 潜在靶点的筛选

2.3 GO和KEGG富集分析 潜在靶点的GO富集分析见图2。结果显示潜在靶点涉及的主要生物过程有对抗生素的反应、对化学应激的反应、对氧化应激的反应、对脂多糖的反应、对活性氧的反应和对药物的反应等;主要位于膜筏、膜微区、囊泡腔、小窝和转录调节复合物中;主要具有核受体活性、配体激活的转录因子活性、磷酸酶结合、DNA结合转录因子结合和细胞因子活性等分子功能。KEGG富集分析见图3,结果显示潜在靶点涉及的主要通路有糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、IL-17信号通路、TNF信号通路和乙型肝炎等。

AGE-RAGE信号转导会激活多个信号通路,使NF- κ B激活,从而促进多种促炎性细胞因子以及多种与动脉粥样硬化相关的基因表达。白细胞介素17(IL-17)家族是由IL-17A-F组成的细胞因子的一个子集,在急性和慢性炎症反应中都起着至关重要的作用。结果显示这些潜在靶点主要存在于膜上,行使类似受体的功能,参与信号转导过程,涉

与炎症反应密切相关的通路 因此从功能的角度 考虑 这些潜在靶点十分具有研究价值。

表 1 小儿风热清中部分活性化合物的基本信息

药物	编号	分子名称	相对分子质量	OB(%)	DL
金银花	MOL001494	Mandenol	308.6	42	0.19
	MOL001495	Ethyl linolenate	306.5	46.1	0.20
连翘	MOL000173	wogonin	284.3	30.68	0.23
	MOL003281	20(S) - dammar - 24 - ene - 3 β 20 - diol - 3 - acetate	486.9	40.23	0.82
板蓝根	MOL001689	acacetin	284.3	34.97	0.24
	MOL002322	isovitexin	432.4	31.29	0.72
薄荷	MOL011616	Fortunellin	592.6	35.65	0.74
	MOL001689	acacetin	284.3	34.97	0.24
柴胡	MOL001645	Linoleyl acetate	308.6	42.1	0.20
	MOL002776	Baicalin	446.4	40.12	0.75
牛蒡子	MOL010868	neoarctin A	742.9	39.99	0.27
	MOL000522	arctiin	534.6	34.45	0.84
荆芥穗	MOL011849	Schizonepetoside B	330.4	31.02	0.28
	MOL001689	acacetin	284.3	34.97	0.24
黄芩	MOL001689	acacetin	284.3	34.97	0.24
	MOL000173	wogonin	284.3	30.68	0.23
栀子	MOL002883	Ethyl oleate (NF)	310.6	32.4	0.19
	MOL001494	Mandenol	308.6	42	0.19
桔梗	MOL001689	acacetin	284.3	34.97	0.24
	MOL004355	Spinasterol	412.8	42.98	0.76
赤芍	MOL001002	ellagic acid	302.2	43.06	0.43
	MOL001918	paeoniflorgenone	318.4	87.59	0.37
芦根	MOL000449	Stigmasterol	412.8	43.83	0.76
苦杏仁	MOL010921	estrone	270.4	53.56	0.32
	MOL010922	Diisooctyl succinate	342.6	31.62	0.23
枳壳	MOL013381	Marmin	332.4	38.23	0.31
	MOL002341	Hesperetin	302.3	70.31	0.27
防风	MOL000011	(2R , 3R) - 3 - (4 - hydroxy - 3 - methoxy - phenyl) - 5 - methoxy - 2 - methylol - 2 , 3 - dihydropyrano [5 , 6 - h] [1 , 4] benzodioxin - 9 - one	386.4	68.83	0.66
	MOL011730	11 - hydroxy - sec - o - beta - d - glucosylhamaudol_qt	292.3	50.24	0.27
甘草	MOL001484	Inermine	284.3	75.18	0.54
	MOL001792	DFV	256.3	32.76	0.18
	MOL000211	Mairin	456.8	55.38	0.78
	MOL002311	Glycyrol	366.4	90.78	0.67
	MOL000239	Jaranol	314.3	50.83	0.29
	MOL002565	Medicarpin	270.3	49.22	0.34
	MOL000354	isorhamnetin	316.3	49.6	0.31
石膏	MOL009149	Cheilanthifoline	325.4	46.51	0.72
	MOL000785	palmatine	352.4	64.6	0.65
炒六神曲	MOL000098	quercetin	302.3	46.43	0.28
淡竹叶	MOL000006	luteolin	286.3	36.16	0.25

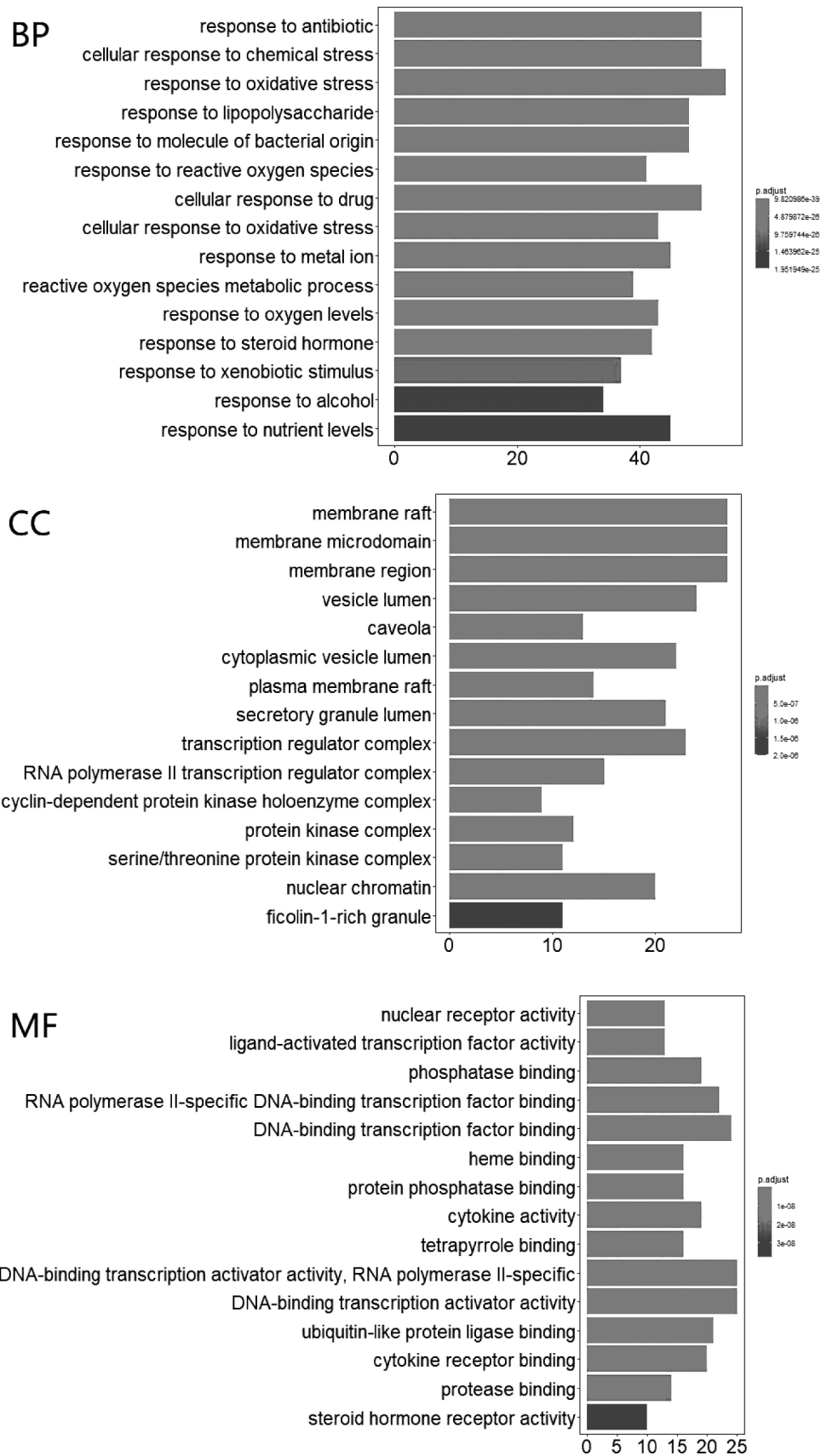


图 2 潜在靶点 GO 富集分析

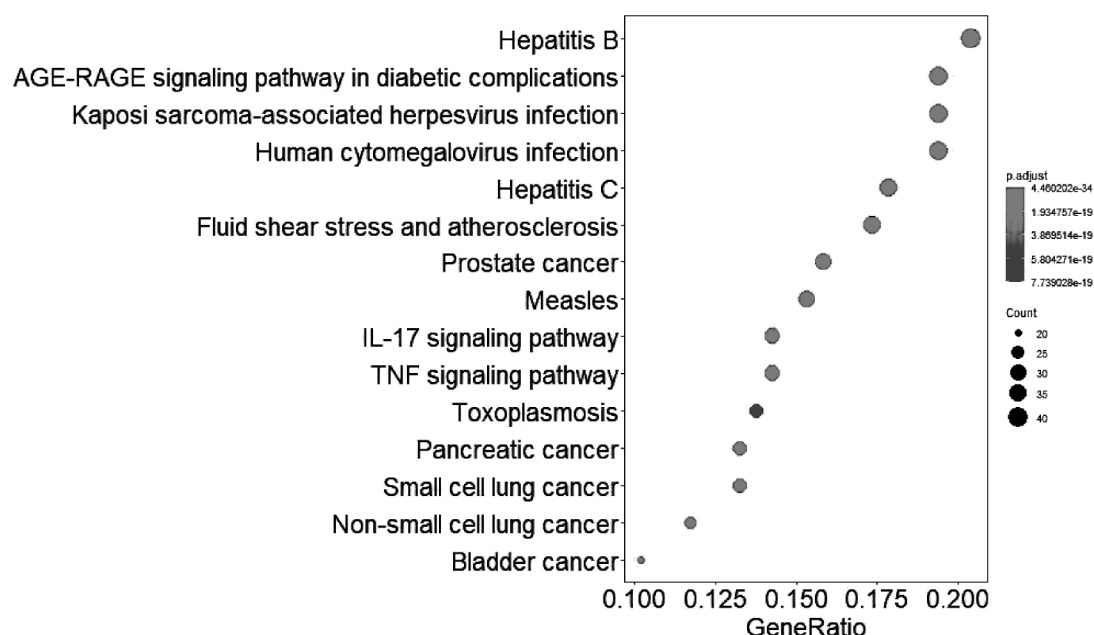


图3 潜在靶点 KEGG 富集分析

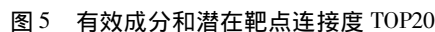
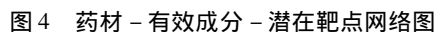
2.4 药物-有效成分-潜在靶点网络 将药物、有效成分和潜在靶点的信息导入 Cytoscape 软件中,构建药物-有效成分-潜在靶点网络。结果如图4所示,其中粉色菱形节点代表小儿风热清的药材(19种),紫色三角形节点代表有效成分(207种),绿色圆形节点代表潜在靶点(210个)。去除药材信息后,对有效成分和潜在靶点之间的连接情况进行总结分析。发现每个有效成分平均与10.17个潜在靶点连接,每个潜在靶点平均与10.02个有效成分连接。表明小儿风热清中的每种有效成分可能作用于多个不同的靶点,同时每个靶点也可能接受多个不同有效成分的作用,这些结果与中药多成分、多位点的治疗特点相符。

图5为连接度(degree)最高的20个有效分子和潜在靶点。连接度越高表明该有效成分或潜在靶点在网络中核心地位越高,其变化对整个网络的影响也就越大。有效成分中 quercetin(槲皮素)、luteolin(木犀草素)、kaempferol(山奈酚)、wogonin(汉黄芩素)、baicalein(黄芩素)等连接度最高,可能小儿风热清中的主要有效成分。潜在靶点中 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1、AR、ESR1 等连

接度最高,有效成分可能主要通过调控这些靶点发挥作用。

2.5 蛋白互作网络 蛋白互作网络的构建结果如图6所示,该网络中共209个节点,4736条边,平均连接度为45.1。每个节点代表一个蛋白(潜在靶点),每条边代表两个蛋白之间的相互作用,因为 APBA 与网络中的其它蛋白暂无相互作用关系,所以该网络由209个节点组成。

将 STRING 中的蛋白质相互作用数据导出,使用 Cytoscape 软件中的 MCC 算法进行计算,得到20个处于蛋白质相互作用网络中心的蛋白,这些蛋白连接度也最高,可能是治疗过程中中药的调控位点,具有较高的研究价值,具体蛋白名称如图7所示,其中排名前五的分别为 VEGFA、MAPK3、JUN、AKT1 和 IL6。随后使用 Cytoscape 软件中的 MCODE 功能对蛋白相互作用网络进行模块划分。结果如图8所示,得到3个k值大于4的模块,模块1、模块2和模块3分别由67、29和7个蛋白质组成。模块内的蛋白质之间关系比较紧密,可能具有相近的生物学功能,有利于分析特定基因或蛋白之间联系。



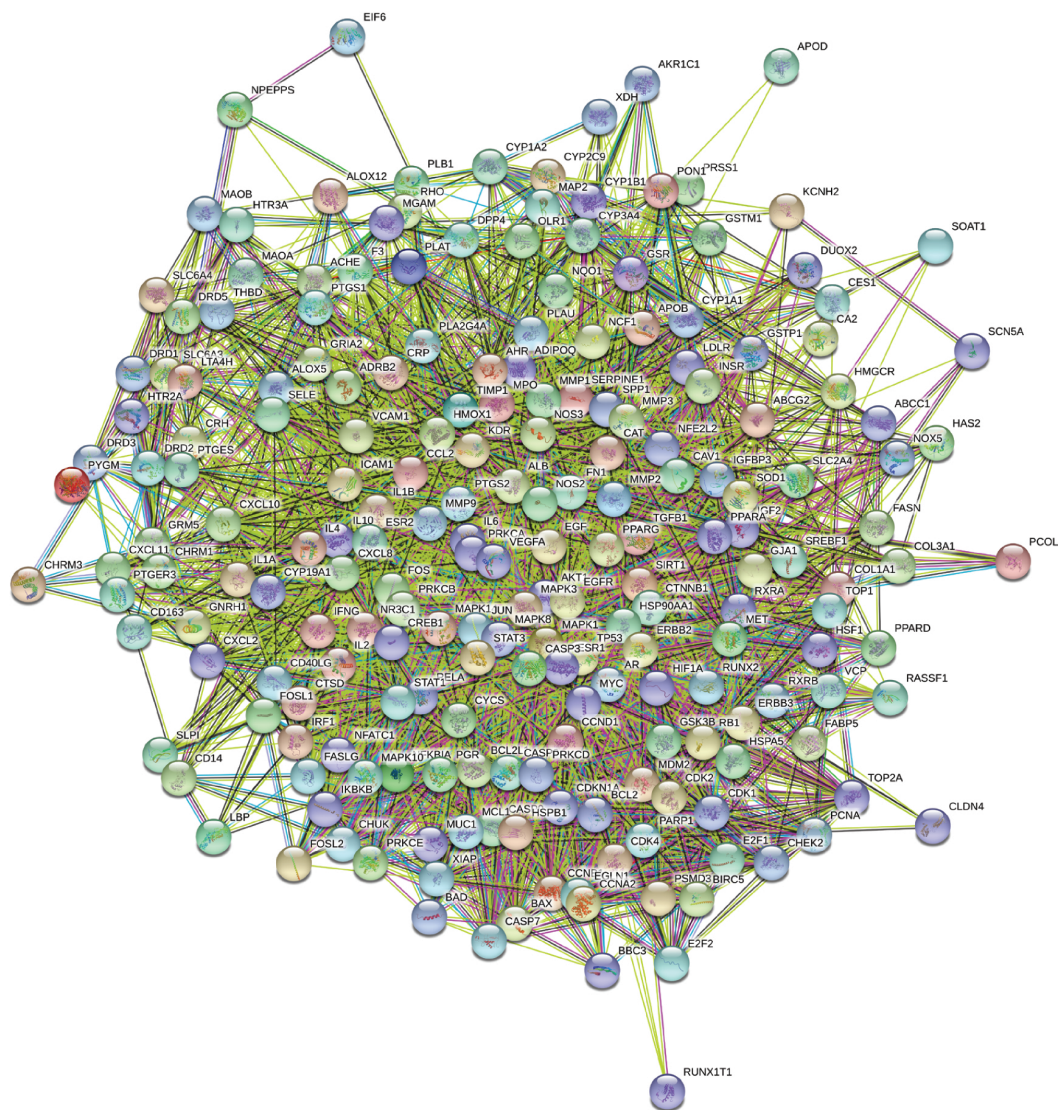


图 6 潜在靶点对应的蛋白互作网络图

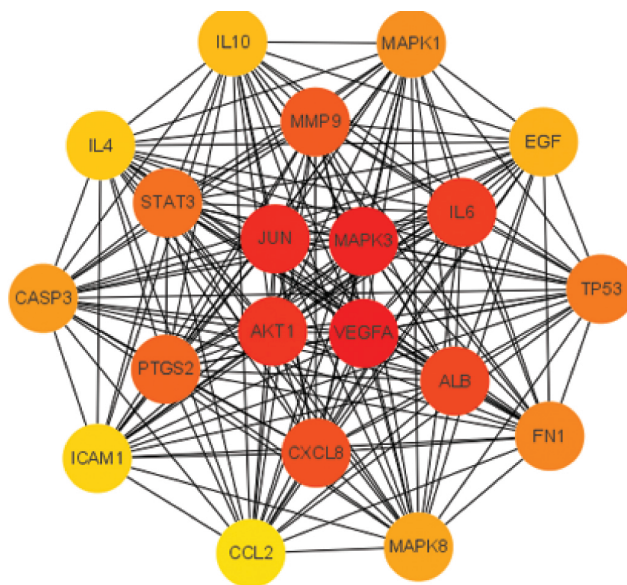


图 7 蛋白互作网络中 Top20 核心蛋白

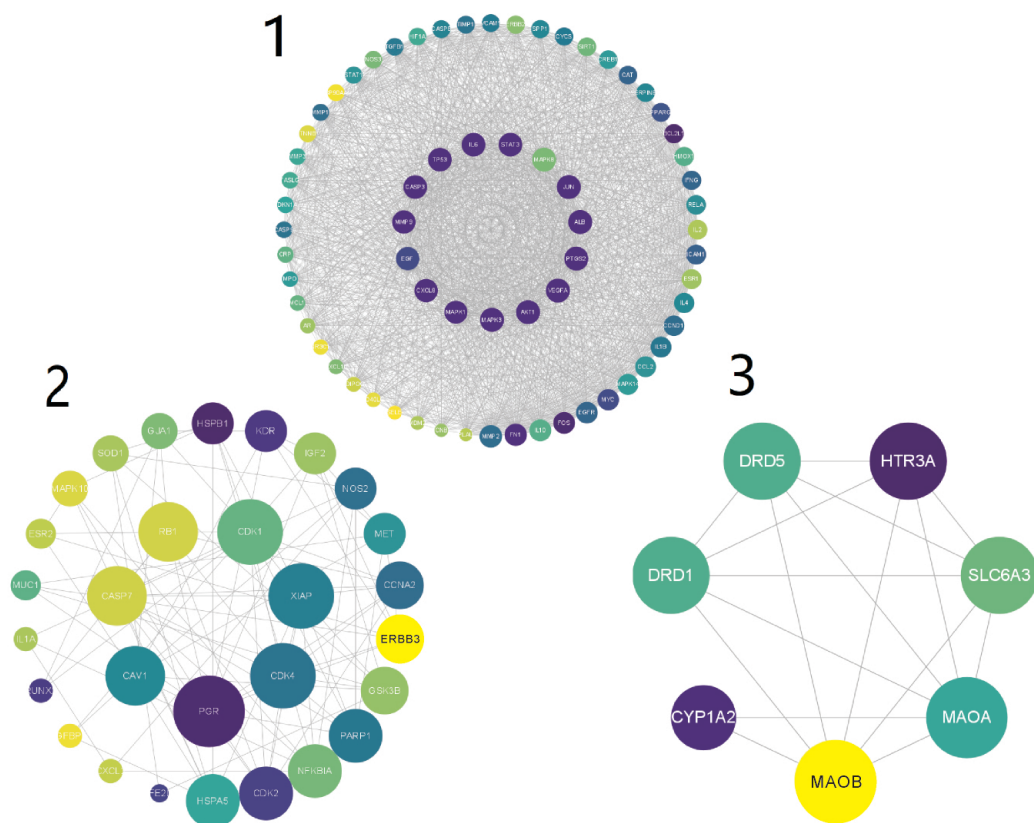


图 8 蛋白相互作用模块

2.6 分子对接 20 种关键有效成分与 3CLpro 和 ACE2 的对接结果如表 2 所示,其中 kaempferol、baicalein、formononetin、beta - sitosterol、vestitol、2 - [(3r) - 8 β - dimethyl - 3 α - dihydro - 2h - pyrano [6,5-f]chromen - 3 - yl] - 5 - methoxyphenol、shinpterocarpin、hmo 和 beta - carotene 与 3CLpro 的结合能小于 -5 kJ/mol,表明这些化合物很可能与

3CLpro 直接作用; shinpterocarpin (紫檀素) 和 acacetin(刺槐黄素)与 ACE2 的结合能小于 -5 kJ/mol,表明这两个化合物很可能与 ACE2 直接作用。其中 shinpterocarpin 与这两种蛋白的结合能皆小于 -5 kJ/mol。图 9 分别展示了 2 个与 4CLpro 或 ACE2 结合能最小的有效成分。

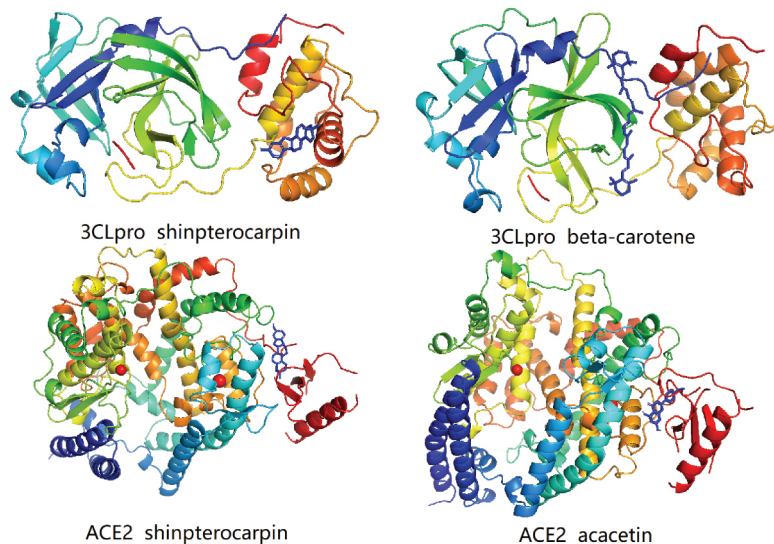


图 9 有效成分与 3CLpro 和 ACE2 分子对接模式

表 2 有效成分与 3CLpro 和 ACE2 的结合能

Compound	PubChem CID	Molecular Formula	Binding Energy (kJ/mol) 3CLpro	Binding Energy (kJ/mol) ACE2
quercetin	5280343	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-4.55	-3.85
luteolin	5280445	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-4.34	-3.29
kaempferol	5280863	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-5.07	-3.51
wogonin	5281703	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-4.34	-4.09
baicalein	5281605	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-5.02	-4.69
naringenin	439246	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	-4.16	-4.44
licochalcone a	5318998	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	-3.52	-4.23
7-methoxy-2-methyl isoflavone	354368	C ₁₇ H ₁₄ O ₃	-4.77	-4.82
nobiletin	72344	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	-3.83	-3
formononetin	46881075	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	-5.04	-4.58
isorhamnetin	5281654	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	-3.87	-2.47
beta-sitosterol	12303645	C ₂₉ H ₅₀ O	-5.18	-4.28
vestitol	177149	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	-5.34	-4.5
2-[(3r)-8β-dimethyl-3-μ-dihydro-2h-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5	9927807	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	-5.46	-4.95
-methoxyphenol				
shinpterocarpin	10336244	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	-5.89	-6.41
medicarpin	336327	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	-4.85	-4.61
hmo	3764	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	-5.09	-4.6
glypallichalcone	5317768	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	-4.16	-3.6
beta-carotene	5280489	C ₄₀ H ₅₆	-5.96	-3.83
acacetin	5280442	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-4.81	-5.5

2.7 小儿风热清对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 平均肿胀率反映了二甲苯致炎后小鼠耳肿胀程度。二甲苯致炎 40 min 后,空白模型组小鼠平均耳肿胀率为(34.31 ± 15.13)%,与空白模型组相比,小儿风热清给药组平均耳肿胀率为(21.48 ± 5.89)%,表明小儿风热清可抑制小鼠耳片的肿胀程度,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。肿胀抑制率则反映了药物作用下小鼠耳肿胀的消退程度,具体结果见表 3 和图 10。

表 3 小儿风热清对二甲苯致小鼠耳肿胀程度的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	平均肿胀率(%)	肿胀抑制率(%)
小儿风热清组	21.48 ± 5.89*	37.39
阳性药组	16.37 ± 8.67	52.28
空白模型组	34.31 ± 15.13	/

2.8 小儿风热清对热刺激致小鼠疼痛的影响

表 4 各组小鼠不同时间点痛阈值的比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	起始痛阈值 (s)	给药后痛阈值(s)			
		30 min	60 min	90 min	120 min
小儿风热清组	19.75 ± 3.69	19.40 ± 9.24	20.05 ± 3.24	21.62 ± 7.09	14.01 ± 6.99
阳性对照组	17.23 ± 5.00	26.72 ± 5.84	21.57 ± 10.04	16.07 ± 3.67	14.23 ± 3.60
空白模型组	20.21 ± 2.70	27.15 ± 2.95	23.41 ± 10.41	16.95 ± 6.39	28.17 ± 14.82

如表 4 所示,在给药 120 min 后,空白模型组痛阈值为(28.17 ± 14.82) s,小儿风热清组痛阈值为(14.01 ± 6.99) s,与空白模型组相比,小儿风热清组显著缓解了热刺激所致小鼠疼痛,舔足潜伏期明显延长,表明小儿风热清具有一定的镇痛作用。

致炎模型结果

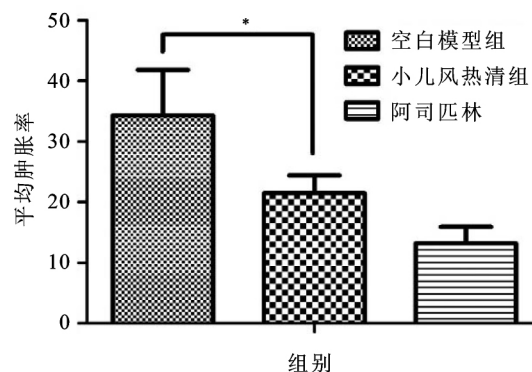


图 10 各组小鼠耳肿胀程度比较($n = 6, *P < 0.05$)。

3 讨论

至今对于 COVID-19 的治疗仍然缺乏有效的特效药,现有的化学药物和抗生素等也仅是针对症状进行治疗,目前最热门有潜力的特效药物有瑞德西韦、利托那韦、阿比朵尔、达芦那韦、磷酸氯喹等。但是,所有这些都还是探索,并没有定论。哪怕是最有希望的瑞德西韦也只是进入了中国的临床 3 期试验,短时间内并不能用于临床治疗。而中医药在多次疫情中都发挥了很好的防治作用,从疫情发生至今,国家卫生健康委联合国家中医药管理局已经颁布了 5 版《关于新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》,从中医治疗推荐的处方分析,明显看出现阶段临床治疗 COVID-19 初期症状的处方是在小儿风热清的基础方上加减用药。

文献报道^[27] 3CLPro 是冠状病毒复制所必须的酶,可作为有效的抗病毒药物靶点,2003 年 SARS 以来已经有大量的研究基础。Lopinavir 与 Ritonavir 等抗 HIV 药物也是作用于类似的蛋白酶靶点,并在临床上得到很好的验证。由于人体内没有与 3CLPro 类似切割位点的蛋白酶,可筛选出高特异性的抑制剂,具有更好的安全性。3CLPro 在 beta 冠状病毒中保守性高,筛选出的 3CLPro 抑制剂具有广谱抗冠状病毒能力,甚至可能用于猪冠状病毒等其他动物的疾病治疗中。同时,SARS-CoV-1 与 SARS-CoV-2 两种病毒感染的途径均通过其表达的 S 蛋白与宿主细胞表面 ACE2 受体结合,进而介导病毒入侵宿主细胞,由此可见,ACE2 是冠状病毒抗体研发的重要靶点。综合网络药理学分析结果得知,20 个关键的有效成分。通过构建蛋白互作网络筛选 20 个关键的潜在靶点和 3 个较为致密的蛋白作用模块。将筛选得到的 20 种关键有效成分与新型冠状病毒肺炎密切相关的 3CLpro 和 ACE2 进行分子对接,发现其种 9 种有效成分与 3CLpro 具有较高亲和力,shinpterocarpin(紫檀素)和 acacetin(刺槐黄素)与 ACE2 的结合能小于 -5 kJ/mol ,说明这两种有效成分与 ACE2 具有较高亲和力,其中 shinpterocarpin(紫檀素)与这两种蛋白的结合能皆小于 -5 kJ/mol ,具有非常高的研究潜力,但仍需进一步研究。

小儿风热清 KEGG 富集分析显示潜在靶点涉及的通路主要有糖尿病并发症中的 AGE-RAGE

信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、IL-17 信号通路和 TNF 信号通路等。其中,IL-17 信号通路和 TNF 信号通路是重要的促炎症细胞因子通路,由辅助性 T 细胞(Th17)、先天性免疫细胞及癌相关成纤维细胞 CAFs 等分泌,在多种炎症反应及自身免疫性疾病病理过程中发挥关键作用。IL-17 受体(IL-17R)通过信号转导复合体 IL-17R-Act1-TRAF6 激活下游 NF- κ B、JNK 等信号通路。TNF 信号通路可以激活 Caspase 蛋白酶、JNK 和转录因子 NF- κ B 三条信号通路,实现其细胞毒性、抗病毒、免疫调节和细胞凋亡等生物学功能。然而,小儿风热清通过该信号通路的调控 COVID-19 引起的相关症状,从而起到抗 COVID-19 的作用需要进一步研究。

综上所述,本研究应用网络药理学和分子对接的方法对小儿风热清中化学成分、作用靶点及其核心活性化合物以及 3CLpro 和 ACE2 结合能进行了探索性研究,从中可以看出小儿风热清治疗疾病是通过多成分、多靶点、多通路的协同作用来发挥疗效的。鉴于网络药理学和分子对接的局限性,后期有条件的科研团队可以围绕物质基础-药效学评价-代谢组学-通路验证等开展实验研究,为小儿风热清治疗 COVID-19 以及后期的药物开发提供理论和实验依据。

参考文献

- [1]赵士博,姜皓,张艺馨,等.新冠肺炎中医药诊治预防及地区治疗特色研究进展[J].中国医院药学杂志,2020,40(17):1896-1901.
- [2]王琛,王旋.新型冠状病毒感染的流行、医院感染及心理预防[J].全科护理,2020,18(3):309-310.
- [3]陈嘉源,施劲松,丘栋安,等.新型冠状病毒基因组的生物信息学分析[J].生物信息学,2020,18(2):96-102.
- [4]孟宪泽,辛志俊,孙擎,等.血清抗体 IgM、IgG 双阳性新型冠状病毒病患者临床特征分析[J].解放军医学院学报,2020,24(9):860-864.
- [5]王淮,杨健康.新型冠状病毒复制依赖基因 MTHFD1 的表达及功能[J].重庆师范大学学报(自然科学版),2020,37(4):140-146,148.
- [6]黄胜男,薛日娜,褚梦真,等.新型冠状病毒肺炎恢复期中药药学服务策略[J].北京中医药,2020,39(9):943-946.
- [7]黄海,谭三春,左新河,等.72 例新型冠状病毒肺炎患者

- 中医证候特点及临床疗效分析[J]. 现代中西医结合杂志 2020 29(22): 2395–2399 2483.
- [8] 中华人民共和国国家卫生委员会, 国家中医药管理局. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)[J]. 传染病信息 2020 33(4): 289–296.
- [9] 王艳荣, 王险峰, 陈军, 等. 小儿风热清口服液辅助治疗儿童手足口病 30 例[J]. 医药导报 2011 30(8): 1037–1038.
- [10] 王艳荣, 王险峰, 陈军, 等. 小儿风热清口服液治疗儿童手足口病的疗效及安全性临床观察[A]. 全国第 3 届中西医结合传染病学术会议暨中国中西医结合学会传染病专业委员会第 2 届委员会会议 2010.
- [11] 冯自威, 杜永刚. 小儿风热清治疗儿童甲型流行性感冒疗效观察[J]. 中医药临床杂志 2020 32(7): 1296–1299.
- [12] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇[J]. 药学学报 2012 47(6): 696–703.
- [13] 刘艾林, 杜冠华. 网络药理学: 药物发现的新思想[J]. 药学学报 2010 45(12): 1472–1477.
- [14] 陈凯明, 薛一涛. 黄精四草汤治疗高血压病作用机制的网络药理学研究[J]. 山东中医杂志 2020 39(9): 1001–1008.
- [15] 罗武龙, 陈洁, 牛婕, 等. 基于网络药理学的二仙汤治疗抑郁症的作用机制研究[J]. 中国药理学通报 2020 36(9): 1317–1324.
- [16] 沙宗阁, 杨欣, 杨长福, 等. 基于网络药理学探讨斑蝥素抗小细胞肺癌的分子机制研究[J]. 中医药信息 2020 37(5): 58–61.
- [17] Meng X Y, Zhang H X, Mezei M, et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure – Based Drug Discovery[J]. Current Computer – Aided Drug Design, 2011 7(2): 146–157.
- [18] Ferreira L G, dos Santos R N, Oliva G, et al. Molecular Docking and Structure – Based Drug Design Strategies. Molecules 2015 20(7): 13384–13421.
- [19] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics 2014 6: 6.
- [20] Liu Z Y, Guo F F, Wang Y, et al. BATMAN – TCM: a Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechanism of Traditional Chinese Medicine [J]. Scientific Reports, 2016 6: 11.
- [21] Rebhan M, Chalifa – Caspi V, Prilusky J, et al. Gene Cards: integrating information about genes, proteins and diseases [J]. Trends in genetics: TIG, 1997 13(4): 163.
- [22] Harris M A, Clark J I, Ireland A, et al. The Gene Ontology (GO) project in 2006 [J]. Nucleic Acids Research, 2006 34: D322–D326.
- [23] Ogata H, Goto S, Sato K, et al. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [J]. Nucleic acids research, 1999 27(1): 29–34.
- [24] Yu G C, Wang L G, Han Y Y, et al. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters [J]. Omics – a Journal of Integrative Biology, 2012 16(5): 284–287.
- [25] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome research, 2003. 13(11): 2498–504.
- [26] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein – protein interaction networks integrated over the tree of life [J]. Nucleic Acids Research, 2015 43(D1): D447–D452.
- [27] Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, et al. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti – SARS drugs [J]. Science (New York, N. Y.) 2003 300(5626): 1763–1767.
- [28] Hoffmann M, Kleine – Weber H, Schroeder S, et al. SARS – CoV – 2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor [J]. Cell 2020 181(2).
- [29] Rose P W, Beran B, Bi C X, et al. The RCSB Protein Data Bank: redesigned web site and web services [J]. Nucleic Acids Research 2011 39: D392–D401.
- [30] Kim S, Thiessen P A, Bolton E E, et al. PubChem Substance and Compound databases [J]. Nucleic Acids Research 2016 44(D1): D1202–D1213.
- [31] DeLano, W L, Lam J W. PyMOL: A communications tool for computational models [J]. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 2005 230: U1371–U1372.
- [32] Trott, O, Olson, A J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading [J]. Journal of Computational Chemistry, 2010 31(2): 455–461.

(收稿日期: 2020 – 11 – 30 编辑: 巩振东)