

· 新冠肺炎防控与诊治 ·

## 基于网络药理学研究柴胡达胸合剂治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制

肖志军<sup>a</sup>, 刘萃萃<sup>b</sup>, 陆赛花<sup>a</sup>, 蔡建<sup>a</sup>, 徐峰<sup>a</sup> (上海交通大学附属第六人民医院南院: a. 药剂科, b. 检验科, 上海 201499)

**[摘要]** **目的** 基于网络药理学方法探讨柴胡达胸合剂治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在药理作用机制。**方法** 利用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)筛选柴胡达胸合剂活性成分和对应的作用靶点,并通过 Uniprot 数据库标准化靶点名称;在 GeneCards 和 OMIM 数据库检索冠状病毒相关基因,并与柴胡达胸合剂作用靶点取交集,筛选出治疗作用靶点;利用 Cytoscape 3.7.2 软件,构建和分析“药材-活性成分-靶点”网络图;通过 String 平台分析靶点蛋白相互作用,并使用 R 软件的相关包进行 GO 基因注释和 KEGG 信号通路分析。**结果** 筛选出 165 个有效成分和 51 个作用靶点,进一步分析发现主要活性成分为  $\beta$ -谷甾醇和 11 个黄酮类化合物,核心作用靶点为 CASP3、MAPK3、IL-6、MAPK8、IL-10、CXCL8、MAPK1、IL-1B 等。GO 基因注释得到 GO 条目共 1 722 个( $P<0.05$ ),其中生物学过程条目 1 612 个,细胞组成条目 30 个,分子功能条目 80 个。KEGG 信号通路筛选出信号通路 156 条( $P<0.05$ ),富集基因较多的信号通路为糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、甲型流感、IL-17 信号通路、TNF 信号通路和乙型肝炎。**结论** 该研究初步揭示了柴胡达胸合剂多成分、多靶点、多通路对 COVID-19 发挥治疗作用的特点,为进一步阐明柴胡达胸合剂治疗 COVID-19 的药理作用机制提供理论依据。

**[关键词]** 网络药理学;柴胡达胸合剂;新型冠状病毒肺炎;分子机制;信号通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)04-0289-07

**[DOI]** 10.12206/j.issn.1006-0111.202004023

## The mechanism study on Chaihudaxiong mixture in the treatment of coronavirus disease 2019 with network pharmacology approach

XIAO Zhijun<sup>a</sup>, LIU Cuicui<sup>b</sup>, LU Saihua<sup>a</sup>, CAI Jian<sup>a</sup>, XU Feng<sup>a</sup> (a. Department of Pharmacy, b. Department of Clinical Laboratory, South Campus, Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201499, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the pharmacological mechanism of Chaihudaxiong mixture in the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) based on a network pharmacology approach. **Methods** The effective ingredients and targets of Chaihudaxiong mixture were collected from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). The targets' names were standardized by Uniprot database. Genes associated with coronavirus were obtained from the GeneCards and OMIM, which were intersected with effective therapeutic targets. A "herbs-ingredients-targets" network was compiled and analyzed by Cytoscape 3.7.2. The protein-protein interaction of the targets was analyzed by String. The GO gene annotation and KEGG signaling pathway analysis were performed using related packages of the R software. **Results** A total of 165 active ingredients and 51 targets were collected. Further analysis revealed that the main active ingredients were  $\beta$ -sitosterol and 11 flavonoids. The core targets were CASP3, MAPK3, IL-6, MAPK8, IL-10, CXCL8, MAPK1 and IL-1B. A total of 1722 GO entries were obtained from the GO gene annotation ( $P<0.05$ ), including 1612 entries for biological processes, 30 entries for cell composition, and 80 entries for molecular functions. 156 signaling pathways ( $P<0.05$ ) were obtained with KEGG signaling pathway screen. The important signaling pathways were AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complication, Influenza A, IL-17 signaling pathway, TNF signaling pathway and hepatitis B. **Conclusion** This study revealed the synergistic features of multi-component, multi-target, and multi-pathway of Chaihudaxiong mixture in the treatment of COVID-19, which provided an important scientific basis for further understanding the mechanism of Chaihudaxiong mixture in the treatment of COVID-19.

**[Key words]** network pharmacology; Chaihudaxiong mixture; coronavirus disease 2019; molecular mechanism; signaling pathway

**[基金项目]** 上海市卫生健康委员会科研课题(20154Y0123),上海市卫生健康委员会临床药学重点专科建设项目(2018-2020)

**[作者简介]** 肖志军, 硕士, 主管药师, Email: zhijiao@126.com

**[通讯作者]** 徐峰, 博士, 主任药师, 研究方向: 临床合理用药, Email: xuf@smu.edu.cn

新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19), 是指 2019 年始发、由严重急性呼吸道综合征冠状病毒 2 型 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 引起的肺炎。截至 2020 年 4 月 5 日, 全球共确诊 COVID-19 患者 1 093 349 例, 死亡 58 620 例<sup>[1]</sup>。目前尚无针对 COVID-19 的特异性治疗药物, 一些化学药物包括氯喹/羟氯喹、洛匹那韦/利托那韦、瑞德西韦等正在临床开展随机对照研究。临床实践表明, 清肺排毒汤和连花清瘟胶囊等多种中药方剂和制剂对 COVID-19 有良好的治疗效果。据国家卫生健康委员会报道, 在我国确诊的 COVID-19 病例中, 有 74 187 人使用了中医药, 占 91.5%; 中医药能够缓解症状, 减少轻型、普通型疾病向重型发展, 提高治愈率、降低病死率, 总有效率达 90% 以上<sup>[2]</sup>。

柴胡达胸合剂, 曾用名为“强力肺炎 1 号”, 是我国国医大师梅国强教授为痰热壅肺证 COVID-19 患者制定的中药处方<sup>[3]</sup>。柴胡达胸合剂由小柴胡汤、小陷胸汤、达原饮、止嗽散共同组方, 包含柴胡、黄芩、法半夏、全瓜蒌、黄连、枳实、甘草、浙贝母、桔梗、百部、前胡、紫苑、款冬花、槟榔、草果、藿香、佩兰、虎杖共十八味中药。由于临床使用疗效显著, 2020 年 2 月 23 日, 湖北省药品监督管理局下发制剂备案批件, 包括柴胡达胸合剂在内的 2 个由湖北省中医院研制的医院制剂获批用于防治 COVID-19<sup>[4]</sup>。

网络药理学是基于系统生物学和多向药理学技术和方法, 通过构建“药物-基因-疾病”网络, 分析药物在网络中与特定节点相互作用的关系, 从整体角度探索药物与机体相互作用的一门学科<sup>[5]</sup>。2007 年, Hopkins 首次在 *Nature Biotechnology* 杂志上发表述评, 提出网络药理学这一概念, 并认为其为发现新药的新范式<sup>[6]</sup>。中药通过多成分、多靶点、多通路对疾病产生治疗作用, 利用网络药理学方法, 可系统阐明中药治疗疾病的药理作用机制<sup>[7]</sup>。

因此, 本研究运用网络药理学方法, 筛选柴胡达胸合剂治疗 COVID-19 的活性成分和作用靶点, 构建“药材-活性成分-靶点”网络图, 然后对靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI)、GO 基因注释和 KEGG 信号通路分析, 为进一步阐明柴胡达胸合剂治疗 COVID-19 的药理作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 柴胡达胸合剂药材的性味归经、活性成分和

### 靶点的筛选

通过《中华人民共和国药典》(2015 年版) 手工检索柴胡达胸合剂的十八味中药材的性味归经, 利用 Cytoscape 3.7.2 软件制作“药材-性味归经”网络图。在中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 以柴胡达胸合剂中的十八味中药材名为关键词检索得到所有中药的化学成分。生物利用度 (oral bioavailability, OB) 和半衰期 (half life, HL) 是影响药动学的重要参数, 而类药性 (drug-likeness, DL) 可以反映化合物的理化性质与已上市的药物是否类似。根据 TCMSP 数据库推荐的筛选标准, 本研究以  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.18$  及  $HL \geq 4$  h 为条件, 筛选得到每味中药材的活性成分。同时, 通过 TCMSP 数据库查找各活性成分的作用靶点, 归纳整理后利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 标准化靶点名称。

### 1.2 “药材-活性成分-靶点”网络图的构建

以 coronavirus 为关键词, 检索 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM (<https://omim.org/>) 数据库获得 COVID-19 潜在相关基因; 利用 Venn 图在线绘制工具 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), 将柴胡达胸合剂活性成分的作用靶点和 COVID-19 相关基因取交集, 得到柴胡达胸合剂治疗 COVID-19 作用靶点; 最后, 将得到的药材-活性成分-靶点关联性文本导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建并分析“药材-活性成分-靶点”网络。

### 1.3 PPI 网络构建

将柴胡达胸合剂治疗 COVID-19 作用靶点导入 STRING 蛋白相互作用数据库 (<https://string-db.org/>), 物种选定为 *Homo sapiens*, 获得 PPI 信息并导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 利用 NetworkAnalyzer 功能, 分析网络中每个靶点的度值 (degree value), 使用 R 软件 Graphics 包, 绘制条形图展示度值排名前 20 位的靶点。

### 1.4 GO 基因注释和 KEGG 通路分析

利用 R 软件的 org.Hs.eg.db 和 clusterProfiler 包, 对柴胡达胸合剂治疗 COVID-19 的作用靶点进行 GO 基因注释和 KEGG 通路分析, 以  $P < 0.05$  进行筛选, 得到柴胡达胸合剂对 COVID-19 发挥治疗作用参与的生物学过程和信号通路, 并绘制气泡图展示结果。

## 2 结果

### 2.1 柴胡达胸合剂的药材性味归经

柴胡达胸合剂“药材-性味归经”网络如图 1 所



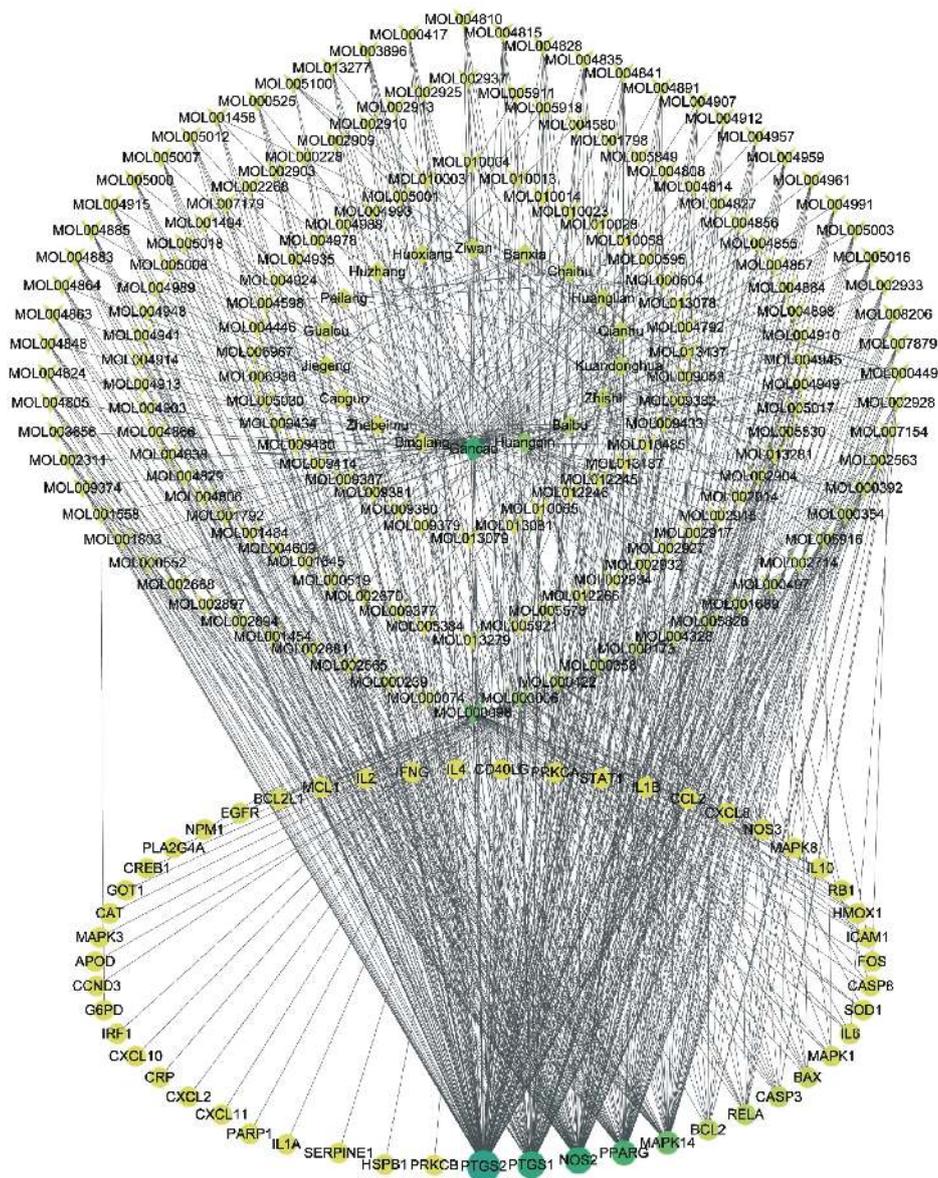


图3 柴胡达胸合剂治疗 COVID-19“药材-活性成分-靶点”网络图

COVID-19的51个作用靶点进行GO基因注释,以 $P < 0.05$ 为条件进行筛选,结果得到GO条目共1722个,其中BP条目1612个,CC条目30个,MF条目80个。选取每个部分的前5个条目作气泡图,富集最多基因且 $P$ 值最小的BP、CC和MF条目分别为脂多糖反应、膜筏和细胞因子受体结合(图5)。

### 2.7 KEGG 信号通路分析

对柴胡达胸合剂治疗 COVID-19的51个作用靶点进行KEGG信号通路富集分析,筛选出 $P < 0.05$ 的信号通路156条,选取富集基因最多的10条通路作气泡图。排名前5的信号通路为糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、甲型流感、IL-17信号通路、TNF信号通路和乙型肝炎(图6)。

### 3 讨论

COVID-19隶属于中医的“温疫”、“疫病”范畴,病因为感受“异气”、“疠气”,疠气夹湿,病位在肺、脾<sup>[3]</sup>。柴胡达胸合剂用于痰热壅肺证患者,其病因为痰热互结,壅闭于肺,致使肺失宣降而表现的肺经实热证候。本研究首先对柴胡达胸合剂的十八味中药材进行性味归经的网络分析,结果发现柴胡达胸合剂组方的性味以“苦寒”最多且主归肺经。“苦寒”药能清热泻火,消除热症,多用于具有实热特征病证<sup>[8]</sup>。因此,柴胡达胸合剂与COVID-19的病机、病位相符。

利用中药、疾病相关数据库,本研究筛选出柴胡达胸合剂治疗 COVID-19的165个活性成分和51个作用靶点,表明柴胡达胸合剂治疗 COVID-

表 2 高于 2 倍数值中位数的化合物信息表

TCMSP数据库ID	化合物名称	对应药材	度值
MOL000098	槲皮素(querletin)	草果、柴胡、甘草、虎杖、黄连、藿香、款冬花、前胡、紫菀	46
MOL000006	木犀草素(luteolin)	虎杖、桔梗、佩兰、枳实、紫菀	23
MOL000422	山奈酚(kaempferol)	柴胡、甘草、款冬花、紫菀	16
MOL000358	$\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol)	百部、半夏、浙贝母、虎杖、黄芩、款冬花、前胡、紫菀	15
MOL000173	汉黄芩素(wogonin)	黄芩	14
MOL004328	柚皮素(naringenin)	甘草、枳实	13
MOL002714	黄芩素(baicalein)	半夏、黄芩	10
MOL000497	甘草查尔酮A(licochalcone A)	甘草	10
MOL001689	刺槐素(acacetin)	黄芩、桔梗	10
MOL005828	川陈皮素(nobiletin)	枳实	10
MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	柴胡、甘草、紫菀	9
MOL005916	葛花苷元(irisolidone)	藿香	9

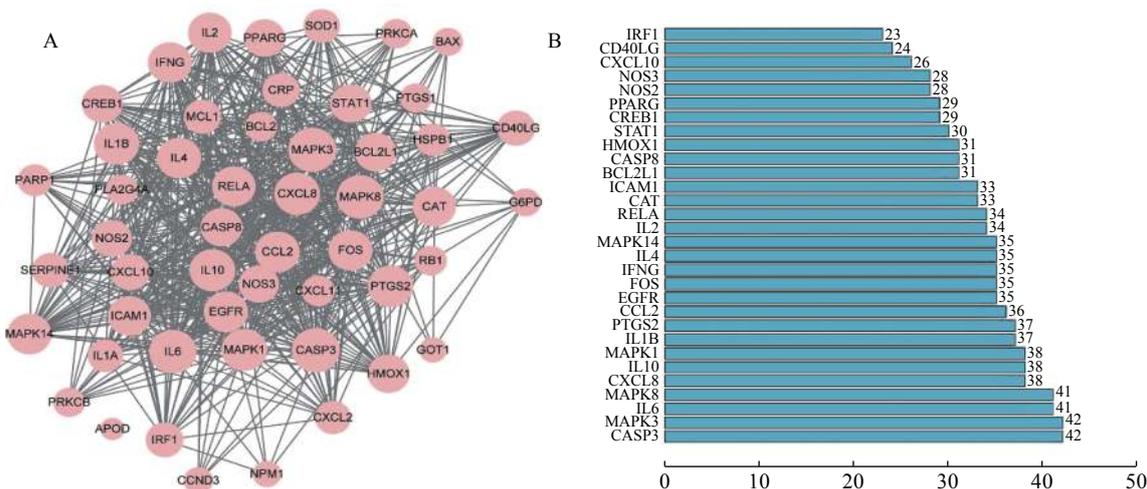


图 4 靶点 PPI 网络图 (A) 和度值条形图 (B)

19 具有多成分、多靶点的特点。通过构建和分析“药材-活性成分-靶点”网络图,发现网络中度值较高的 12 个活性成分:槲皮素、木犀草素、山奈酚、 $\beta$ -谷甾醇、汉黄芩素、柚皮素、黄芩素、甘草查尔酮 A、刺槐素、川陈皮素、异鼠李素和葛花苷元。除  $\beta$ -谷甾醇外,其余 11 个成分均属于黄酮类化合物。

黄酮类化合物广泛存在于自然界的多种植物中,具有包括抗炎、抗动脉粥样硬化和抗肿瘤等多种药理作用<sup>[9]</sup>。黄酮类化合物还有良好的抗病毒作用,对流感病毒、呼吸道合胞病毒、单纯疱疹病毒和柯萨奇病毒等都有抑制作用<sup>[10]</sup>。体外实验研究表明,槲皮素和木犀草素均能够抑制 SARS-CoV 3CL 蛋白酶活性,对 SARS-CoV 产生抑制作用<sup>[11-12]</sup>。 $\beta$ -谷甾醇也能抑制 SARS-CoV 3CL 蛋白酶活性<sup>[13]</sup>。

SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 基因序列有约 80% 同源性,两者 3CL 蛋白酶结构有相似性<sup>[14]</sup>。此外,分子对接结果发现山奈酚、槲皮素、黄芩素、木犀草素、汉黄芩素、 $\beta$ -谷甾醇与 SARS-CoV-2 3CL 蛋白酶均有较高的结合活性<sup>[15]</sup>。因此,通过直接抑制 SARS-CoV-2 3CL 蛋白酶活性,可能是柴胡达胸合剂治疗 COVID-19 的药理作用机制之一。

通过分析 PPI 网络发现,CASP3、MAPK3、IL-6、MAPK8、IL-10、CXCL8、MAPK1、IL-1B、PTGS2、CCL2 等在网络中有较高的度值。CASP3 基因编码的 caspase-3 蛋白是细胞凋亡过程中重要的终末剪切酶,研究发现 caspase-3 蛋白在 SARS-CoV 病毒引起的组织细胞凋亡过程中发挥了重要作用<sup>[16]</sup>。MAPK 基因编码的丝裂原活化蛋白激酶参与细胞的增殖、分化、迁移及凋亡等多个

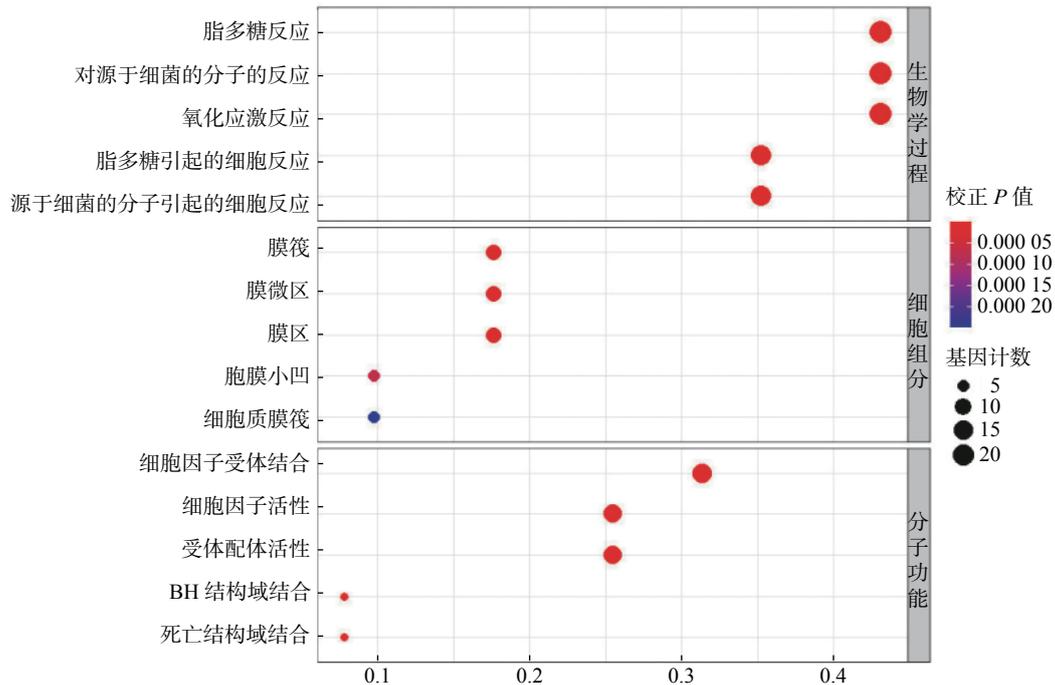


图5 GO基因注释气泡图

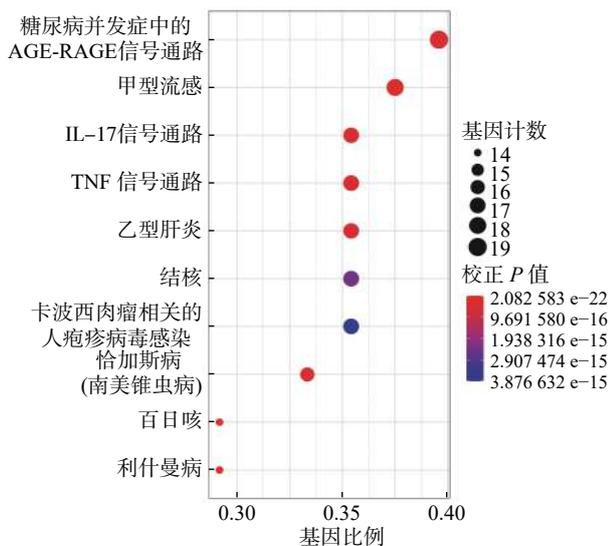


图6 KEGG 信号通路分析气泡图

生物学过程。此外,炎症因子风暴被认为是重症 COVID-19 患者组织损伤的病理机制之一。SARS-CoV-2 病毒在体内激活 T 细胞,产生粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和 IL-6 等细胞因子,随后 GM-CSF 会进一步激活 CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>炎性单核细胞,进一步升高 IL-6 等炎性因子,形成炎症因子风暴,导致严重的肺部和其他器官免疫损伤<sup>[17]</sup>。细胞因子根据其在炎性反应中的作用不同可分为促炎性细胞因子(如 IL-1、IL-6、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等)和抑炎性细胞因子(如 IL-4、IL-10 等)两类。SARS 患者的肺部炎症和肺损伤与患者血浆

中的 IL-1B、IL-6、IL-12 等促炎性细胞因子水平升高引起炎症因子风暴有关<sup>[18]</sup>。同样地,COVID-19 患者血浆 IL-1B、IFN- $\gamma$ 、CXC 趋化因子 -10 (CXCL-10)等促炎性细胞因子水平也升高<sup>[19]</sup>。本研究中,IL-6、IL-10 和 IL-1B 均为核心作用靶点。因此,减少组织细胞凋亡、降低促炎性细胞因子和升高抑炎性细胞因子水平可能也是柴胡达胸合剂治疗 COVID-19 的药理作用机制。

对靶点进行 GO 基因注释的结果表明,柴胡达胸合剂治疗 COVID-19 的主要生物学过程为脂多糖反应、对源于细菌的分子的反应和氧化应激反应等。脂多糖是 G 菌细胞壁的组成成分,可诱导细胞产生炎性反应,其中促炎性细胞因子发挥了重要介导作用。IL-6 可促进 B 细胞分化,并活化 MAPK,激活 STAT 转录因子,从而加重炎性反应<sup>[20]</sup>。KEGG 分析富集到 156 条信号通路,主要涉及糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、甲型流感、IL-17 信号通路、TNF 信号通路和乙型肝炎,表明柴胡达胸合剂治疗 COVID-19 多通路的特点。

综上所述,本研究采用网络药理学方法,初步揭示了柴胡达胸合剂可能一方面通过多种黄酮类化合物和  $\beta$ -谷甾醇直接抑制 SARS-CoV-2 3CL 蛋白酶活性,另一方面通过多成分、多靶点、多通路减少组织细胞凋亡、降低促炎性细胞因子和升高抑炎性细胞因子水平,从而对 COVID-19 产生治疗作用。

## 【参考文献】

- [1] WHO. Coronavirus disease (COVID-19) situation dashboard [EB/OL]. (2020-04-05)[2020-04-05]. <https://experience.arcgis.com/experience/685d0ace521648f8a5beee1b9125cd>.
- [2] 长江网. 九成以上新冠肺炎患者使用中医药治疗, 有效率超九成 [EB/OL]. (2020-03-23)[2020-04-05]. <http://www.cjrbapp.cjn.cn/toutiao/p/169144.html>.
- [3] 巴元明, 李晓东, 闵晓俊, 等. 湖北省中医院新型冠状病毒肺炎中医药防治方案(第三版)[J]. 湖北中医杂志, 2020, 42(2): 7-8.
- [4] 长江网. 用于治疗新冠肺炎, 省中医院“肺炎1号”“强力肺炎1号”医院制剂获批备案 [EB/OL]. (2020-02-24)[2020-04-05]. <http://www.cjrbapp.cjn.cn/p/163360.html>.
- [5] 周文霞, 程肖蕊, 张永祥. 网络药理学: 认识药物及发现药物的新理念[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(1): 4-9.
- [6] HOPKINS A L. Network pharmacology[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [7] 陈海彬, 周红光, 李文婷, 等. 网络药理学: 中药复方作用机制研究新视角[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 2873-2876.
- [8] 李玉洁, 张为佳, MAYUREE T, et al. “苦寒”方药性效解[J]. 中医杂志, 2014, 55(19): 1630-1634.
- [9] 祝寅溟, 王帅, 李瑶, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2018, 39(3): 219-223.
- [10] 龚金炎, 张英, 吴晓琴. 黄酮类化合物抗病毒活性的研究进展[J]. *中草药*, 2008, 39(4): 623-627.
- [11] NGUYEN T T, WOO H J, KANG H K, et al. Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3C-like protease expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(5): 831-838.
- [12] RYU Y B, JEONG H J, KIM J H, et al. Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CLpro inhibition[J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(22): 7940-7947.
- [13] LIN C W, TSAI F J, TSAI C H, et al. Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds[J]. *Antiviral Res*, 2005, 68(1): 36-42.
- [14] GRIFONI A, SIDNEY J, ZHANG Y, et al. A sequence homology and bioinformatic approach can predict candidate targets for immune responses to SARS-CoV-2 [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(4): 671-680.
- [15] 孔艺, 吴红卫, 陈永, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨痰热清注射液治疗新型冠状病毒肺炎机制[J]. *中草药*, 2020, 51(7): 1785-1794.
- [16] TAN Y J, FIELDING B C, GOH P Y, et al. Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway [J]. *J Virol*, 2004, 78(24): 14043-14047.
- [17] ZHOU Y, FU B, ZHENG X, et al. Aberrant pathogenic GM-CSF<sup>+</sup>T cells and inflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in severe pulmonary syndrome patients of a new coronavirus [J/OL]. bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2020.02.12.945576>.
- [18] WONG C K, LAM C W, WU A K, et al. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 136(1): 95-103.
- [19] 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.
- [20] HODGE D R, HURT E M, FARRAR W L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(16): 2502-2512.
- [收稿日期] 2020-04-05 [修回日期] 2020-05-08  
[本文编辑] 李春德