

## 基于网络药理学研究复方银花解毒颗粒抗新型冠状病毒的潜在机制

张冬玲<sup>1</sup>, 何枢衡<sup>1</sup>, 吴建雄<sup>1</sup>, 刘存<sup>1</sup>, 张雨茜<sup>2</sup>, 刘光大<sup>1</sup>, 张评汗<sup>2\*</sup> (1. 亿帆医药股份有限公司, 杭州 310000; 2. 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 转化医学研究院, 扬州大学医学院, 扬州 225009)

**摘要:**目的 以网络药理学方法探讨复方银花解毒颗粒抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在作用及其机制,进而通过体外模型验证其抗冠状病毒作用。方法 利用网络药理学方法构建中药活性成分与抗 COVID-19 靶点的“成分-靶点”网络图,并预测其潜在的作用机制;采用人冠状病毒感染细胞模型验证复方银花解毒颗粒抗冠状病毒复制的效果。结果 经筛选发现,复方银花解毒颗粒与 COVID-19 共有 63 个共有靶点、139 个“成分-靶点”网络节点,其中节点度值高于 15 的化合物主要来源有鸭跖草、金银花、青蒿、连翘、野菊花和薄荷等经典清热解暑类中药;京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)富集筛选得到 20 条信号通路( $P < 0.01$ ),主要包括卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、甲型流感、肿瘤坏死因子、白细胞介素 17(IL-17)、人 T 细胞白血病病毒 I 型感染、C 型凝集素受体、人乳头瘤病毒感染、人巨细胞病毒感染、丙型肝炎等信号通路,其中血管紧张素转换酶(ACE)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、一氧化氮合酶 3(NOS3)、髓过氧化物酶(MPO)和肿瘤坏死因子(TNF)等是治疗 COVID-19 的关键靶点。结论 网络药理学分析预测表明,复方银花解毒颗粒中含有的不同活性化合物可通过作用于 ACE、VEGFA、NOS3、MPO、TNF 等关键作用靶点调控多条信号通路而发挥抗 COVID-19 的潜在作用,并在体外感染细胞模型中初步验证了复方银花解毒颗粒具有抗冠状病毒的作用,这为该药临床防治 COVID-19 提供了参考。

**关键词:** 复方银花解毒颗粒;新型冠状病毒肺炎(COVID-19);网络药理学;青蒿

DOI:10.3969/j.issn.1004-2407.2021.04.011

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1004-2407(2021)04-0568-08

## Study on the potential mechanism of Fufang Yinhua Jiedu Granules based on network pharmacology in the treatment of novel coronavirus

ZHANG Dongling<sup>1</sup>, HE Shuheng<sup>1</sup>, WU Jianxiong<sup>1</sup>, LIU Cun<sup>1</sup>, ZHANG Yuqian<sup>2</sup>, LIU Guangda<sup>1</sup>, ZHANG Pinghu<sup>2\*</sup> (1. Yifan Biomedical Limited Company, Hangzhou 310000, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Institute of Translational Medicine, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract: Objective** To explore the potential effect and mechanism of Fufang Yinhua Jiedu Granules against the coronavirus disease 19 (COVID-19) by means of network pharmacology, and then to verify its anti-coronavirus effect through *in vitro* models. **Methods** The network pharmacology method was used to construct a "component-target" network diagram of active ingredients of traditional Chinese medicines and anti-COVID-19 targets, and to predict their potential mechanism of action; the coronavirus infection cell model was used to verify the anti-coronavirus replication of Fufang Yinhua Jiedu Granules effect. **Results** After screening, the Fufang Yinhua Jiedu Granules and COVID-19 had a total of 63 targets and 139 "component-target" network nodes. Among them, the main sources of compounds with a node degree value higher than 15 were classical heat-clearing and detoxifying traditional Chinese medicines such as *Commelina communis*, *Honeysuckle*, *Artemisia annua*, *L. echinacea*, wild chrysanthemum and mint. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment screening resulted in 20 signal pathways ( $P < 0.01$ ), mainly including Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection, influenza A, tumor necrosis factor, IL-17, human T-cell leukemia virus type I infection, C-type lectin receptor, human papillomavirus infection, human cytomegalovirus infection, hepatitis C and other signaling pathways, the angiotensin I converting enzyme (ACE), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), nitric oxide synthase 3 (NOS3), myeloperoxidase (MPO), tumor necrosis factor (TNF) and other key targets for the treatment of COVID-19. **Conclusion** Network pharmacological prediction indicates that the different active compounds contained in Fufang Yinhua Jiedu Granules can play a potential role in against COVID-19 by regulating multiple signaling pathways acting on key target targets such as ACE, VEGFA, NOS3, MPO and TNF. And preliminary verification in the *in vitro* coronavirus infection cell model Fufang Yinhua Jiedu Granules have anti-coronavirus effect, which provides a theoretical basis for the drug in clinical prevention and treatment of COVID-19.

**Key words:** Fufang Yinhua Jiedu Granules; coronavirus disease 19 (COVID-19); network pharmacology; *Artemisia annua*

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)是由新型冠状病毒感染引发的急性呼吸道传染病,临床主要表现为发热、乏力、干咳,严重者可出现呼吸困难、呼吸窘迫综合征或脓毒症休克等。针对此疾病目前尚无特效药物,但根据我国前期的临床诊疗实践研究表明,基

于古代中医辨证论治“时行瘟疫”的思想采用中药或中成药对 COVID-19 不同证型进行对症治疗具有一定疗效。其中基于汉代张仲景的“麻杏石甘汤”与清代吴鞠通的“银翘散”组方而成的金花清感颗粒、清肺排毒汤等在临床治疗轻症以及防止轻症向重症转化方面具有一定作用。因此,基于病毒的复制特点及感染引发细胞因子风暴诱发急性肺损伤与急性呼吸窘迫症(ARDS)的致病机制,采用网络药理学方法探讨

基金项目:安徽省科技重大专项(编号:18030801127)

作者简介:张冬玲,女,主管中药师,硕士

\*通信作者:张评汗,男,教授,博士生导师

<http://XBYZ.cbpt.cnki.net>

此类方剂在临床治疗 COVID-19 中的潜在机制,对指导此类方剂的研发及其临床应用将具有非常重要的意义。

复方银花解毒颗粒是以“银翘散”为基础化裁而来,是临床常用于治疗普通感冒和流感的中成药处方,曾在 2003 年作为安徽省治疗非典型性肺炎(SARS)的预防和治疗用药,2020 年为安徽省用于治疗 COVID-19 的推荐用药<sup>[1-2]</sup>。复方银花颗粒由青蒿、金银花、荆芥、薄荷、野菊花、大青叶、连翘、鸭跖草、前胡、淡豆豉 10 味药材制成,临床研究表明,此药对流感病毒感染引起的病毒性肺炎具有良好的疗效<sup>[3-6]</sup>。本文以复方银花解毒颗粒主要成分为基础,采用网络药理学方法通过“成分-靶点”的关联性分析其治疗 COVID-19 的潜在作用及机制,进而采用体外细胞模型验证其抗冠状病毒的药效作用,以期为该药的临床推广应用提供参考。

## 1 资料与方法

**1.1 网站数据库和分析软件** 数据库包括中药系统药理学数据库与分析平台 TCMSP (<http://Lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>); Pubchem 有机小分子生物活性数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>); Swiss Target prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库; Chemspider (<http://www.chemspider.com>) 化合物结构式查询数据库; Genecards (<https://www.genecards.org>) 数据库; PANTHER (<http://pantherdb.org>) 数据库; STRING (<https://string-db.org>) 数据库; KOBAS 3.0 数据库。使用的软件有 Cytoscape 3.7.2 软件等。

**1.2 成分筛选以及参数设定** 本研究所采用的成分均是从 TCMSP 数据库中查询获得。输入“青蒿”、“金银花”、“荆芥”、“薄荷”、“野菊花”、“大青叶”、“连翘”、“鸭跖草”、“前胡”、“淡豆豉”搜索药材成分。本项研究中以口服生物利用度 ( $OB \geq 30\%$ ) 和类药性 ( $DL \geq 0.18$ ) 为指标筛选活性成分,并最终以有明确简化分子线性输入规范号(smiles 号)及预测靶点的化学成分作为活性成分参与网络药理学分析<sup>[7]</sup>。

**1.3 疾病靶点的获取** 本研究针对 COVID-19 预测靶点以 Genecards 数据库作为主要来源,并通过搜索 COVID-19 相关的治疗靶点及其相关文献的对比分析,建立治疗 COVID-19 有潜在作用的已知靶点信息表。

**1.4 化合物的靶点预测** 本文采用 Swiss Target prediction 数据库预测主要活性成分的主要作用靶点,即首先利用 Pubchem 和 Chemspider 数据库导出化合物 SDF 或 MOL 格式结构式,再导入至 Swiss Target prediction 数据库中预测主要活性成分的作

用靶点,然后利用 Venny 2.1 平台获得与治疗 COVID-19 存在交集的潜在靶点,最终获得活性成分与疾病共有靶点。

**1.5 网络的构建与分析** 本文采用软件 Cytoscape 3.7.2 版本构建复方银花解毒颗粒治疗 COVID-19 的“成分-靶点”网络,并采用部分插件分析网络拓扑参数。

**1.6 基因的富集分析** 本文采用 PANTHER 数据库对复方银花解毒颗粒活性成分中预测出与治疗 COVID-19 存在交集的靶点进行基因本体(GO)注释,并对其靶点蛋白的分子功能、生物进程和细胞成分进行注释;然后利用 String 数据库发掘蛋白间的相互作用,形成蛋白与蛋白相互作用网络图。在此基础上利用 KOBAS 3.0 数据库获得相关靶标蛋白的富集信息,并绘制出  $P < 0.01$  的前 20 条通路高级气泡图。

## 2 体外药效验证与实验方法

本文以人冠状病毒 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 分别感染人肝癌 Huh7 细胞和人肺癌 H460 细胞为模型,以细胞病变保护效力实验为参考指标对复方银花解毒颗粒是否具有抗新型冠状病毒的作用进行了探讨。方法: Huh7 和 H460 细胞按照  $1.5 \times 10^4$  个·孔<sup>-1</sup> 接种于 96 孔板中,过夜培养后分别将含有 100 TCID<sub>50</sub> HCoV-229E 和 HCoV-OC43 的病毒液滴入 96 孔板内感染细胞,加入含待测药物的维持液,待测药物以 3 倍稀释 6~8 个剂量的样品进行实验,待病毒对照组出现明显细胞病变时观察记录结果,并用 Reed-Muench 法计算药物对病毒的半数抑制质量浓度 ( $IC_{50}$ ) 及选择指数 (SI),  $SI = IC_{50} \div TC_{50}$  ( $TC_{50}$  为药物半数毒性质量浓度),其中 SI 值高于 1 即为有效,SI 值越大,药物越安全<sup>[8]</sup>。公式:

$$IC_{50} = \lg\left(A + \frac{B-50}{50-C} \times D\right)$$

其中: A 表示累积抑制率  $< 50\%$  的药物质量浓度; B 表示累积抑制率  $> 50\%$  的抑制率; C 表示累积抑制率  $< 50\%$  的抑制率; D 表示 lg 稀释倍数。

## 3 结果与分析

**3.1 复方银花解毒颗粒活性成分筛选** 通过 TCMSP 数据库获得复方银花解毒颗粒处方的化学成分,筛选条件为  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.18$ ,进一步剔除无明确 smiles 号和作用靶点的化合物,筛选到 109 个活性化合物(青蒿、金银花、荆芥、薄荷、野菊花、大青叶、连翘、鸭跖草、淡豆豉和前胡中分别含有 18、15、9、9、7、8、18、4、2、19 个)。山柰酚、木犀草素、槲皮素、豆甾醇、谷甾醇和  $\beta$ -谷甾醇为该药方中多味中药的共有成分,删除重复最终获得 80 个活性化合物参与后续网络药理学分析,见表 1。

表1 复方银花解毒颗粒的活性成分

Tab. 1 Active compounds in Fufang Yinhua Jiedu Granules

编号	名称	药材名	OB/%	DL	编号	名称	药材名	OB/%	DL
MOL000422	山柰酚	金银花、青蒿、连翘	41.88	0.24	MOL003347	金丝桃素	连翘	44.03	0.60
MOL000006	木犀草素	金银花、青蒿、荆芥、野菊花、连翘、鸭跖草、薄荷	36.16	0.25	MOL003330	连翘脂素	连翘	95.04	0.57
MOL000098	槲皮素	金银花、青蒿、荆芥、野菊花、连翘、前胡	46.43	0.28	MOL003322	连翘醇	连翘	81.25	0.57
MOL000449	豆甾醇	金银花、青蒿、荆芥	43.83	0.76	MOL003306	松脂素单甲醚	连翘	85.12	0.57
MOL000358	$\beta$ -谷甾醇	金银花、荆芥、野菊花、大青叶、连翘、鸭跖草、前胡	36.91	0.75	MOL003305	连翘苷	连翘	36.40	0.86
MOL000359	谷甾醇	青蒿、荆芥、野菊花、前胡、薄荷	36.91	0.75	MOL003295	(+)-松脂素单甲醚	连翘	53.08	0.57
MOL005100	橙皮素	荆芥、前胡	47.74	0.27	MOL003290	$\beta$ -二氢紫罗兰酮	连翘	52.30	0.48
MOL002881	香叶木素	荆芥、薄荷	31.14	0.27	MOL003283	异落叶松脂素	连翘	66.51	0.39
MOL001790	蒙花苷	野菊花、薄荷	39.84	0.71	MOL000791	(+)-荷包牡丹碱	连翘	69.67	0.88
MOL001689	金合欢素	野菊花、薄荷	34.97	0.24	MOL000522	牛蒡苷	连翘	34.45	0.84
MOL003124	木糖苷	金银花	43.17	0.64	MOL000211	白桦脂酸	连翘	55.38	0.78
MOL003095	5-羟基-7-甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)色酮	金银花	51.96	0.41	MOL000173	汉黄芩素	连翘	30.68	0.23
MOL003062	玫红黄质	金银花	31.22	0.55	MOL005043	菜油甾醇	荆芥	37.58	0.71
MOL003059	隐黄质	金银花	47.25	0.57	MOL001506	反式角鲨烯	荆芥	33.55	0.42
MOL003044	金圣草(黄)素	金银花	35.85	0.27	MOL008919	野菊花内酯	野菊花	59.52	0.55
MOL003036	ZINC03978781	金银花	43.83	0.76	MOL013098	丝立尼亭	前胡	87.48	0.37
MOL002914	圣草酚(黄烷酮)	金银花	41.35	0.24	MOL013093	云前胡甙	前胡	58.36	0.71
MOL002773	$\beta$ -胡萝卜素	金银花	37.18	0.58	MOL013087	白花前胡香豆精II	前胡	63.48	0.53
MOL001495	亚麻酸乙酯	金银花	46.10	0.20	MOL013083	茵芋苷	前胡	38.35	0.32
MOL001494	亚油酸乙酯	金银花	42.00	0.19	MOL013081	对生马钱碱	前胡	39.83	0.65
MOL007426	脱氧青蒿素	青蒿	54.47	0.26	MOL013079	白花前胡甲素	前胡	46.46	0.53
MOL007424	青蒿素	青蒿	49.88	0.31	MOL013078	白花前胡素 E	前胡	51.22	0.66
MOL007415	金色酰胺醇酯	青蒿	58.02	0.52	MOL013077	紫花前胡素	前胡	39.27	0.38
MOL007412	甲氧基万寿菊素	青蒿	42.60	0.37	MOL007154	丹参酮II A	前胡	49.89	0.40
MOL007401	条叶菊素	青蒿	43.46	0.34	MOL013103	伞形花醚	前胡	46.57	0.44
MOL007389	青蒿烯	青蒿	54.36	0.31	MOL004792	紫花前胡苷	前胡	57.12	0.69
MOL007274	菊黄素	青蒿	30.35	0.30	MOL004653	白花前胡素 D	前胡	46.06	0.66
MOL005229	蒿亭	青蒿	49.55	0.48	MOL002644	珊瑚菜素	前胡	40.19	0.28
MOL004609	茵陈黄酮	青蒿	48.96	0.41	MOL001942	异欧前胡素	前胡	45.46	0.23
MOL004112	万寿菊素	青蒿	53.11	0.34	MOL001941	欧前胡素	前胡	34.55	0.22
MOL004083	桉柳黄素	青蒿	32.86	0.31	MOL002322	异牧荆素	大青叶	31.29	0.72
MOL002235	泽兰黄醇	青蒿	50.80	0.41	MOL002320	$\gamma$ -谷甾醇	大青叶	36.91	0.75
MOL000354	异鼠李素	青蒿	49.60	0.31	MOL002311	甘草酚	大青叶	90.78	0.67
MOL003370	远志咕吨酮I	连翘	79.16	0.30	MOL002309	靛玉红	大青叶	48.59	0.26
MOL003365	乳甾醇	连翘	40.99	0.85	MOL001810	青黛酮	大青叶	45.28	0.89
					MOL001781	靛蓝	大青叶	38.20	0.26
					MOL001771	穿贝海绵甾醇	大青叶	36.91	0.75
					MOL006836	鸭跖黄酮苷	鸭跖草	32.58	0.65
					MOL006834	N-阿魏酰酪胺	鸭跖草	89.48	0.26
					MOL011616	金柑苷	薄荷	35.65	0.74
					MOL005573	芫花素	薄荷	37.13	0.24
					MOL005190	圣草酚	薄荷	71.79	0.24
					MOL004328	(S)-柚皮素	薄荷	59.29	0.21
					MOL011691	6'-O-丙二酰甘氨酸	淡豆豉	30.40	0.81
					MOL008400	黄豆黄素	淡豆豉	50.48	0.24

<http://XBYZ.cbpt.cnki.net>

**3.2 化合物靶点和疾病靶点的获取** 采用 GeneCards 数据库对治疗 COVID-19 的相关靶点进行检索,共得到相关靶点 2 202 个,其中“score $\geq$ 15”的靶点有 220 个。将活性化合物 SDF 或 MOL 结构式导入 Swiss Target prediction 数据库中获得无重复的化合物靶点 822 个。

**3.3 化合物中与 COVID-19 疾病相关靶点预测** 将化合物的预测靶点与疾病相关靶点进行比对查重,得到药物与疾病相互作用的共有靶点 63 个,按照相关性得分值由高到低依次排列,得分越高,说明与疾病关系越大,见表 2。由表 2 可知,ACE、VEGFA、TNF、NOS3 等得分较高的为治疗 COVID-19 的主要靶点。在靶点化合物的比对中发现,ACE 为青蒿活性成分金色酰胺醇酯(MOL007415)的主要靶点,

表 2 活性化合物与 COVID-19 的共有靶点

Tab. 2 Common targets of active compounds and COVID-19

基因名	描述	相关性得分	基因名	描述	相关性得分
ACE	血管紧张素转换酶	70.48	HLA-DRB1	Ⅱ类主要组织相容性复合体 DR $\beta$ 1	22.54
VEGFA	血管内皮生长因子 A	56.63	IL-2	白细胞介素 2	21.98
TNF	肿瘤坏死因子	49.88	APP	淀粉样 $\beta$ 前体蛋白	21.87
NOS3	一氧化氮合酶 3	49.49	MMP2	基质金属蛋白酶 2	21.77
MPO	髓过氧化物酶	43.61	HTR2A	5-羟色胺受体 2A	21.54
ELANE	中性粒细胞表达弹性蛋白酶	41.63	PTGS2	前列腺素过氧化物合酶 2	21.36
PON1	对氧磷酶 1	40.47	ATM	ATM 丝氨酸/苏氨酸激酶	21.16
PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$	36.94	CASP3	半胱氨酸蛋白酶 3	20.79
MMP9	基质金属蛋白酶 9	36.73	SCN5A	钠电压门控通道 5 $\alpha$ 亚基	20.6
CCL2	C-C 基序趋化因子配体 2	36.06	HMOX1	血红素加氧酶 1	20.12
SERPINE1	Serpin E 族成员 1	35.02	TGFBR1	转化生长因子 $\beta$ 受体 1	18.84
MMP3	基质金属蛋白酶 3	34.87	CYP2C19	细胞色素 P450 家族 2 亚家族 C 成员 19	18.81
AKT1	AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶 1	32.19	MMP1	基质金属蛋白酶 1	18.75
PLG	纤溶酶原	32.01	BTK	布鲁顿酪氨酸激酶	18.46
ICAM1	细胞间黏附分子 1	31.68	ERBB2	Erb-B2 受体酪氨酸激酶 2	18.32
F3	凝血因子 III	30.83	STAT1	信号传感器和转录激活剂 1	17.89
EGFR	表皮生长因子受体	29.51	MAPK8	丝裂原活化蛋白激酶 8	17.88
ESR1	雌激素受体 1	29.02	PPARA	过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$	17.62
TTR	甲状腺素	28.43	KDR	激酶插入域受体	17.38
F2	凝血因子 II	28.4	CASP8	半胱氨酸蛋白酶 8	16.58
VCAM1	血管细胞黏附分子 1	27.19	PTPN11	蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 11 型	16.57
SELE	选择素 E	26.78	PLA2G7	磷脂蛋白酶 A2	16.52
CFTR	囊性纤维化跨膜电导调节因子	26.47	ABCB1	ATP 结合盒 B 亚家族成员 1	16.47
TNFRSF1A	肿瘤坏死因子受体超家族成员 1A	26.45	RAF1	Raf-1 原癌基因,丝氨酸/苏氨酸激酶	16.43
PTPRC	蛋白酪氨酸磷酸酶受体 C 型	26.09	ALOX5	花生四烯酸 5-脂氧合酶	16.15
TERT	端粒酶逆转录酶	25.69	AR	雄激素受体	15.97
PIK3C2A	磷脂酰肌醇-4-磷酸 3-激酶催化亚基 2 型 $\alpha$	25.64	GAPDH	三磷酸甘油醛脱氢酶	15.85
AGTR1	血管紧张素 II 受体 1 型	25.43	HRAS	HRAS 原癌基因,GTP 酶	15.68
NOS2	一氧化氮合酶 2	24.06	MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶 1	15.59
FGF2	成纤维细胞生长因子 2	23.33	ADA	腺苷脱氨酶	15.55
HMGCR	3-羟基-3-甲基戊二酸-CoA 还原酶	22.82	FABP3	脂肪酸结合蛋白 3	15.28
			HIF1A	缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 亚单位	15.14

<http://XBYZ.cbpt.cnki.net>

VEGFA 为薄荷活性成分柚皮素(MOL004328)的主要靶点, TNF 主要为鸭跖草中鸭跖黄酮苷(MOL006836)、前胡中茵芋苷(MOL013083)以及连翘中乳甾醇(MOL003365)的主要靶点, NOS3 为前胡中丝立尼亭(MOL013098)、白花前胡甲素(MOL013079)、白花前胡香豆精 II(MOL013087)以及白花前胡素 E(MOL013078)的主要靶点, MPO 为槲皮素、山柰酚、脱氧青蒿素(MOL007426)、异鼠李素(MOL000354)、(+)-荷包牡丹碱(MOL000791)、木犀草素、芫花素(MOL005573)、条叶蓟素(MOL007401)、汉黄芩素(MOL000173)、香叶木素(MOL002881)、金合欢素(MOL001689)等活性成分的共有靶点, 来源于多种药材, 提示青蒿、薄荷、鸭跖草、连翘、前胡在治疗 COVID-19 中具有重要意义。

**3.4 “成分-靶点”网络构建** 在不同数据库中搜索活性化合物所对应的靶点,筛选出重复后得到化合物靶点,构建“成分-靶点”可视化图,见图1。由图1可知,其中黄色表示化合物靶基因,红色节点表示活性化合物,边则表示化合物与靶点的相互作用关系,节点度(Degree)是指和该节点相关联的边的条数,节点

度越高,说明该化合物或靶点在该网络中越重要,在此网络图中共有活性化合物76个,边657条,平均节点度值为8.6。在化合物中值最高的是化合物N-阿魏酰酪胺(MOL006834),来源于鸭跖草,节点度值高于15的化合物主要来源有鸭跖草、金银花、青蒿、连翘、野菊花、薄荷等。见表3。

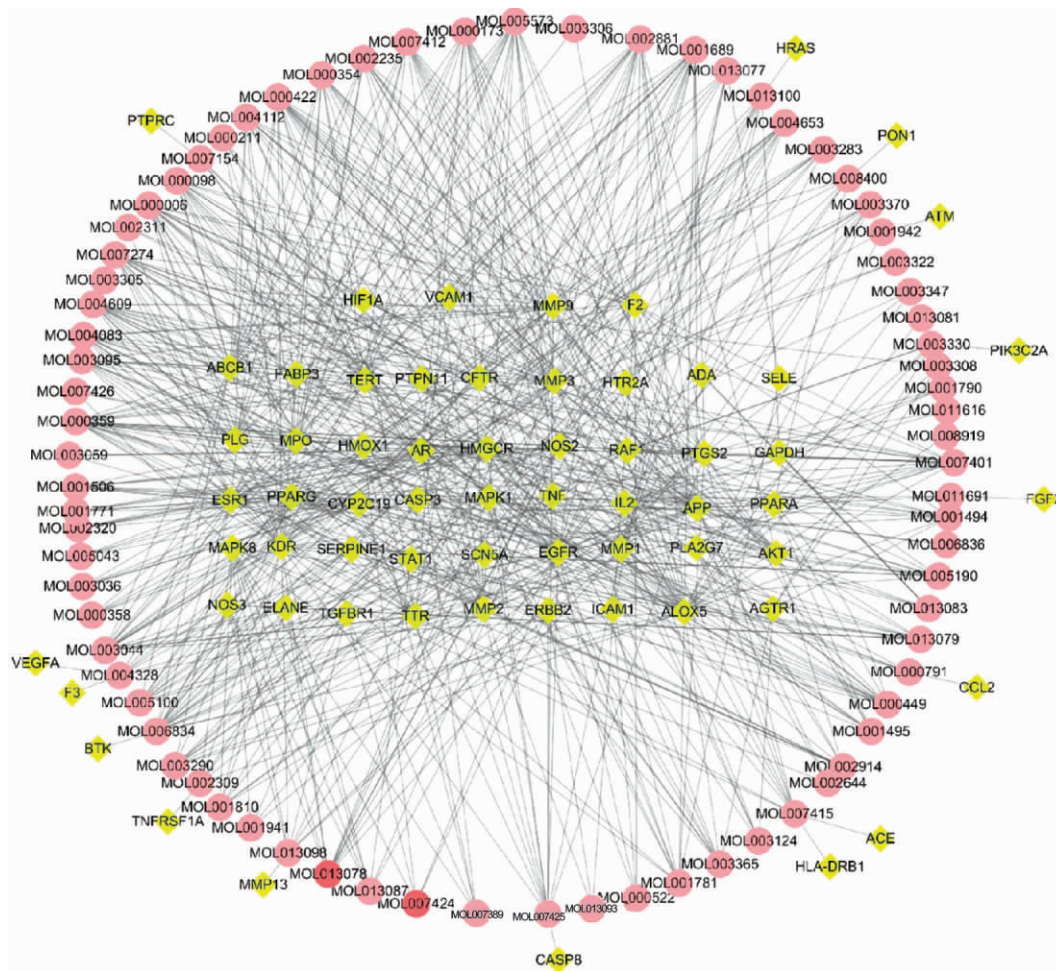


图1 “成分-靶点”网络图

Fig.1 Topological diagram of "compound-target" network

表3 节点度>15的活性化合物及对应药材分析

Tab.3 Analysis of active compounds with node degree >15 and their corresponding medicinal materials

编号	化合物名称	节点度值	来源药材	编号	化合物名称	节点度值	来源药材
MOL006834	N-阿魏酰酪胺	20	鸭跖草	MOL002881	香叶木素	17	荆芥、薄荷
MOL000422	山柰酚	18	金银花、青蒿、连翘	MOL000359	谷甾醇	17	青蒿、荆芥、野菊花、前胡、薄荷
MOL000006	木犀草素	18	金银花、青蒿、荆芥、野菊花、连翘、鸭跖草、薄荷	MOL007401	条叶蒽素	17	青蒿
MOL003044	金圣草(黄)素	18	金银花	MOL004609	茵陈黄酮	16	青蒿
MOL001689	金合欢素	17	野菊花、薄荷	MOL007274	蒽黄素	16	青蒿
				MOL005573	芫花素	15	薄荷

**3.5 共有靶点的GO分析** 为了进一步观察复方银花解毒颗粒治疗COVID-19的分子机制,对共有靶点进行GO分析,采用PANTHER软件对63个共有蛋

白进行GO注释以评估其参与的生物进程、分子功能和细胞组分,见表4。生物进程图表明与这些蛋白参与代谢、免疫调节、生物黏附、应激反应以及细胞增殖

有关。分子功能图显示蛋白主要的功能是转录调节活性、催化、分子传导以及传导调控等功能；细胞组分显示蛋白主要是由细胞膜、蛋白质复合物以及膜部件和细胞器等成分组成。利用 String 数据库构建蛋白与蛋白相互作用网络,见图 2。由图 2 可知,网络图中的连

线为已被证实的蛋白间相互作用,STAT 1、MAPK1、EGFR、RAF1、PTPN11、VEGFR、CASP8、AKT1、NOS3、AR、MMP3 等蛋白参与的信号网络较多,在通路调控中发挥重要作用;而 ACE、ADA、CCL2、SCN5A、HMGCR 等蛋白较为孤立,需要进一步研究。

表 4 复方银花解毒颗粒与 COVID-19 的共有靶点 GO 分析

Tab. 4 GO analysis of common target of Fufang Yinhua Jiedu Granules and COVID-19

GO 本体	GO 条目	描述	基因数量	GO 本体	GO 条目	描述	基因数量
细胞组分	0016020	细胞膜	1	生物进程	0071840	细胞成分组织或生物发生	7
	0044422	细胞器部分	6		0009987	细胞过程	37
	0044421	细胞外区域部分	5		0051704	多生物过程	5
	0031974	膜封闭腔	3		0051179	定位	11
	0032991	含蛋白质复合物	5		0065007	生物调控	29
	0099080	超分子复合物	1		0050896	免疫应激	26
	0005576	细胞外区域	5		0023052	信号调控	21
	0005623	细胞	11		0032502	发展进程	9
	0044464	细胞部分	11		0032501	多细胞有机体过程	12
	0043226	细胞器	10		0040011	运动	4
	分子功能	0140110	转录调节活性		2	0022610	生物黏附
0060089		分子传感器活性	2	0008152	代谢过程	29	
0005488		结合功能	11	0008283	细胞增殖	4	
0098772		分子功能调控	3	0002376	免疫系统过程	5	
0003824		催化活性	7				

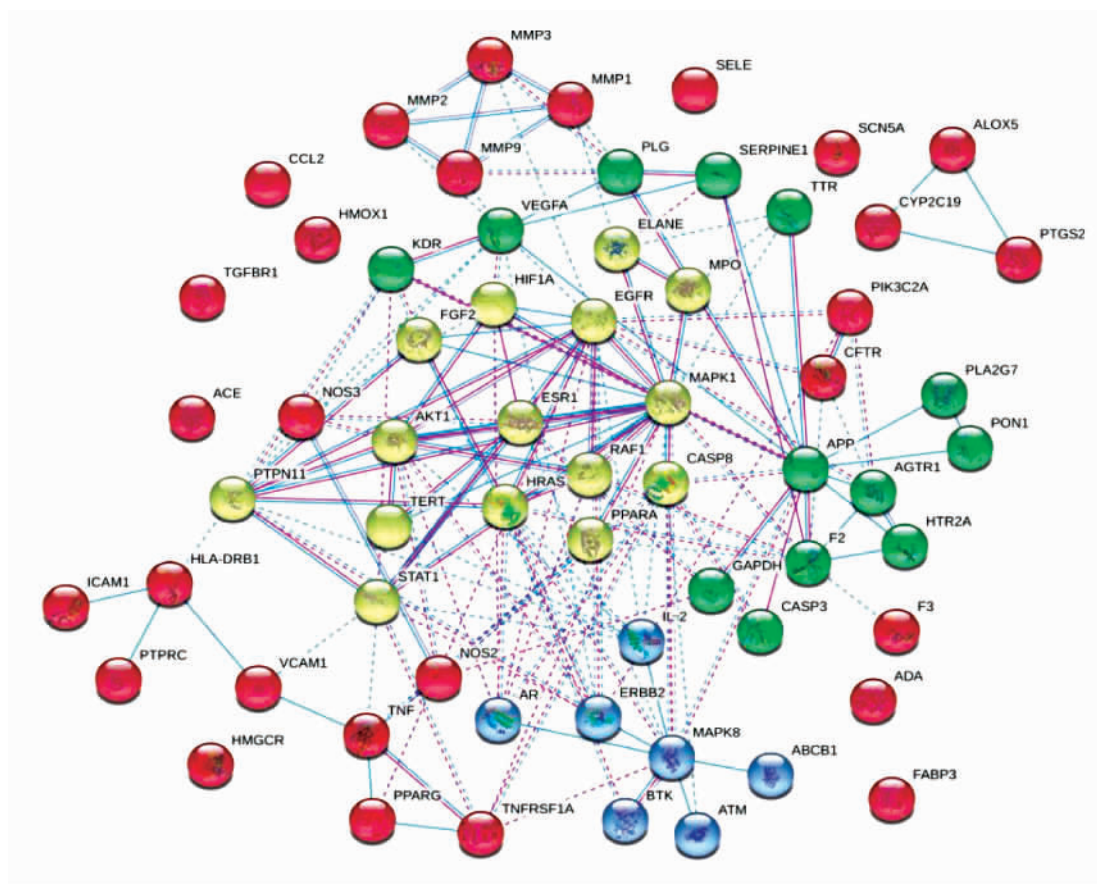


图 2 复方银花解毒颗粒与 COVID-19 共有靶点蛋白相互作用图

Fig. 2 Diagram of common target proteins COVID-19 and Fufang Yinhua Jiedu Granules

http://XBYZ.cbpt.cnki.net

**3.6 信号通路富集分析确认关键靶标和通路** 利用 KOBAS 3.0 数据库对复方银花解毒颗粒治疗 COVID-19 的 63 个共有蛋白进行通路富集分析,选取了  $P < 0.01$  的前 20 条通路,分别与肿瘤信号通路、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、甲型流感信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、IL-17 信号通路、人 T 细胞白血病病毒 1 型感染、C 型凝集素受体信号通路、人乳头瘤病毒感染、人巨细胞病毒感染、丙型肝炎等信号有关,分析发现,复方银花解毒颗粒的富集通路与清肺排毒汤富集通路基本相似<sup>[9]</sup>,提示复方银花解毒颗粒具有潜在治疗 COVID-19 的作用。

**3.7 复方银花解毒颗粒体外抗冠状病毒的药效作用验证** 本研究结果表明,复方银花解毒颗粒在无明显毒性剂量条件下对 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 感染所致的细胞病变具有良好的保护作用,见表 4。由表 4 可知,复方银花解毒颗粒对 HCoV-229E 感染 Huh7 细胞和对 HCoV-OC43 感染 H460 细胞所致细胞病变具有较好的保护作用,其  $IC_{50}$  分别为  $438.16 \pm 166.04$ 、 $165.13 \pm 28.37 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,治疗指数 SI

表 4 受试药物对 HCoV-229E 感染 Huh7 细胞所致病变的保护作用

Tab. 4 The protective effect of test drug on the pathological changes of Huh7 cells infected by HCoV-229E

病毒种类	受试药物	$TC_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$IC_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	SI
HCoV-229E	复方银花解毒颗粒	$2\ 035.21 \pm 521.19$	$438.16 \pm 166.04$	4.64
	利巴韦林	$>100$	$2.98 \pm 2.47$	$>33.56$
HCoV-OC43	复方银花解毒颗粒	$2\ 935.28 \pm 751.70$	$165.13 \pm 28.37$	17.78
	利巴韦林	$>100$	$6.82 \pm 1.25$	$>14.67$

#### 4 讨论

复方银花解毒颗粒由治疗“时行感冒”的临床经典方“银翘散”优化组方而来,其组方选药以辛凉清解治法为依据,具有疏表透邪、轻宣肺气的作用,且有清热解毒之功。鉴于 COVID-19 具有与古代“时行感冒”临床症状及病程转归类似的特点,本文采用网络药理学方法对复方银花解毒颗粒是否具有治疗 COVID-19 的作用及其潜在的机制进行了预测分析,结果预测到从复方银花解毒颗粒中筛选出的 80 个活性化合物存在 822 个作用靶点,而预测到的 COVID-19 相关靶点 2 202 个,其中药物与 COVID-19 存在交叉的共有靶点 341 个,得分  $>15$  分的靶点为 63 个,靶点指认化合物共 76 个,提示复方银花解毒颗粒中绝大多数活性化合物都参与到 COVID-19 的抑制过程中。

网络药理学分析表明,青蒿在抑制 COVID-19 靶点上发挥了重要作用,条叶蓟素、茵陈黄酮和蓟黄素靶点与 COVID-19 一致的分别有 17、16、16 个,青蒿中其他成分青蒿素、青蒿素 I、青蒿素 II、脱氧青蒿

分别为 4.64、17.78。以上结果提示,复方银花解毒颗粒在无毒性剂量条件下对冠状病毒 HCoV-OC43 和 HCoV-229E 感染所致的细胞病变均具有较好的保护作用。

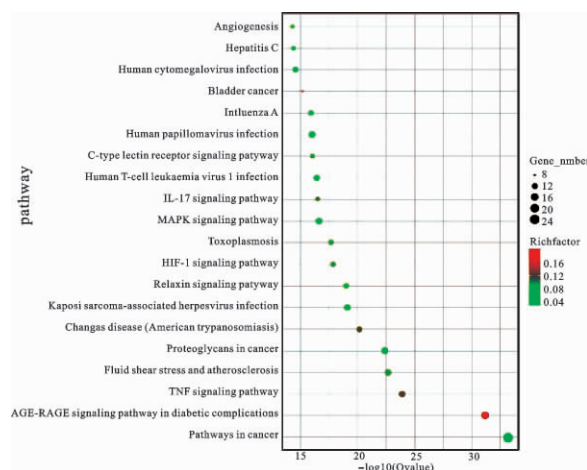


图 3 复方银花解毒颗粒与 COVID-19 共有靶点通路富集的气泡图

Fig. 3 Bubble diagram of common target pathway enrichment of Fufang Yinhuo Jiedu Granules and COVID-19

素、青蒿素 IV、青蒿素 V、青蒿醇、蒿黄素、中国蓟醇、鼠李素、山柰酚、槲皮素、木犀草素和万寿菊素指认 COVID-19 靶点也较多。有文献报道,青蒿素对新型冠状病毒具有抑制作用<sup>[10]</sup>,青蒿鞣制具有抗病毒活性<sup>[11]</sup>,青蒿制剂具有抗猪流感病毒的作用<sup>[12]</sup>。本研究也发现,青蒿活性化合物诸多靶点与 COVID-19 靶点一致,其活性成分鼠李素经分子对接证明与新型冠状病毒亲和力较高<sup>[13]</sup>,其他与多种药材(金银花、青蒿、荆芥、野菊花、连翘)共有的活性成分如槲皮素、山柰酚、木犀草素等也经分子对接等证实与新型冠状病毒受体有较高吻合度<sup>[13-15]</sup>;提示青蒿在复方银花解毒颗粒治疗 COVID-19 中可能发挥重要作用。本次分析发现,鸭跖草、薄荷等药材活性成分指认 COVID-19 靶点也较多,有文献证明,鸭跖草水提物能够抗流感病毒<sup>[16]</sup>。袁琦等<sup>[17]</sup>研究发现,鸭跖草不同提取物能够抗呼吸道合胞病毒(RSV)和单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1),鸭跖草抗病毒作用可能与其能够抑制  $\alpha$ -葡糖苷酶活性有关。徐佳馨等<sup>[18]</sup>报道薄荷能够抗单纯疱疹病毒、抗呼吸道合胞病毒,薄荷水提物对牛

痘病毒、孤儿病毒、Semliki 森林病毒和流行性腮腺病毒均有抑制作用,薄荷中的荜花素能够抑制非洲猪瘟病毒<sup>[19]</sup>,与其他药材共有的活性成分槲皮素能够抗疱疹病毒和流感病毒<sup>[20]</sup>。以上分析表明,金银花、青蒿、荆芥、野菊花、连翘、鸭跖草、薄荷等在复方银花解毒颗粒治疗 COVID-19 中具有重要作用,体现了中药多组分、多靶点的临床优势。

GO 分析发现 STAT1、MAPK1、EGFR、RAF1、PTPN11、VEGFR、CASP8、AKT1、NOS3、AR、MMP3 等蛋白参与的信号网络较多,参与各项药理活动较为活跃,KEGG 富集分析发现靶点参与了卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、甲型流感信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、IL-17 信号通路、人 T 细胞白血病病毒 1 型感染、C 型凝集素受体信号通路、人乳头瘤病毒感染、人巨细胞病毒感染、丙型肝炎等信号通路,显示了复方银花具有抑制病毒、抗炎、免疫的作用。

本研究以人冠状病毒 HCoV-OC43 和 HCoV-229E 体外感染细胞为模型,首次对复方银花解毒颗粒抗冠状病毒的药效作用进行了探讨。结果表明,复方银花解毒颗粒在无毒性剂量条件下对人冠状病毒 HCoV-OC43 和 HCoV-229E 感染所致的细胞病变均具有较好的抑制作用。

综上所述,复方银花解毒颗粒治疗 COVID-19 能通过其有效活性成分青蒿素、异鼠李素、荜花素、槲皮素、木犀草素、山柰酚等作用于 STAT1、MAPK1、EGFR、RAF1、PTPN11、VEGFR、CASP8、AKT1、NOS3、ACE、CCL2 等靶点,调控甲型流感信号通路、IL-17 信号通路、人 T 细胞白血病病毒 1 型感染、人乳头瘤病毒感染、人巨细胞病毒感染、丙型肝炎等信号通路,抑制 COVID-19,改善肺炎患者的临床症状。本研究从网络药理学角度首次阐述了复方银花解毒颗粒的多成分、多靶标调控机体信号通路发挥抗多种病毒的潜在作用机制,为探讨该药临床用于治疗病毒性肺炎的潜在机制与作用靶标提供了新思路。

#### 参考文献:

[1] 国家卫生健康委员会办公厅. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL]. [2020-3-3]. <http://bgs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-03-04/13594.html>.

[2] 安徽省医疗保障局. 安徽省医疗保障局关于印发《新型冠状病毒肺炎治疗的药品供应保障工作方案》的通知[EB/OL]. [2020-2-4]. <http://ybj.ah.gov.cn/public/7071/117236421.html>.

[3] 卢建平,蒋静涵,章辉. 银花解毒颗粒治疗流行性感冒风热证的临床研究[J]. 中成药,2003,25(2):123-128.

[4] 奚肇庆,刁人政. 银花解毒颗粒治疗流行性感冒风热证临床观察[J]. 中国中医急症,2003,12(1):20-21.

[5] 刁人政,奚肇庆. 银花解毒颗粒治疗上呼吸道感染风热证Ⅱ期临床试验小结[J]. 山东中医药大学学报,2003,27(2):127-129.

[6] 蒋萌,熊宁宁,奚肇庆,等. 银花解毒颗粒治疗上呼吸道感染及流行性感冒风热证的临床试验[J]. 中药新药与临床药理,2003,14(4):270-272.

[7] 吕霄晗,宁炫,王博,等. 基于网络药理学研究红核妇洁洗液中酸性成分治疗阴道炎的机制[J]. 西北药学杂志,2020,35(3):356-361.

[8] 黄深惠,汤有志,周雪梦,等. 茶多酚体内外抗流感病毒作用研究[J]. 茶叶科学,2010,30(4):302-308.

[9] 赵静,田赛赛,杨健,等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨[J/OL]. 中草药. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20200216.2044.002.html>.

[10] 刘桂梅,蔡楠,谢静,等. 青蒿素及其衍生物用于治疗新型冠状病毒肺炎的探讨[J]. 药物评价研究,2020,43(4):606-612.

[11] 张军峰,谭健,蒲蕾,等. 青蒿鞣质抗病毒活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(4):307-311.

[12] 王伟. 10味中药制剂抗猪流感病毒作用研究[D]. 郑州:河南农业大学,2014.

[13] 邓燕君,刘博文,贺桢翔,等. 基于网络药理学和分子对接法探索藿香正气口服液预防新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物研究[J]. 中草药,2020,51(5):1113-1122.

[14] 宗阳,丁美林,贾可可,等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究[J]. 中草药,2020,51(4):836-844.

[15] 刘钱,贺桢翔,杨慧,等. 基于网络药理学和分子对接法探索肺毒清治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在活性成分[J/OL]. 中草药. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20200320.1642.004.html>.

[16] 谭志荣,蒋友福,李沛波. 鸭跖草水提取物抗流感病毒的实验研究[J]. 中国热带医学,2009,9(5):829-831.

[17] 袁琦,侯林,刘相文,等. 鸭跖草不同提取方法提取物的体外抗病毒实验研究[J]. 中华中医药学刊,2017,35(7):1755-1758.

[18] 徐佳馨,王继锋,颜妮妮,等. 薄荷的药理作用及临床应用[J]. 食品与药品,2019,21(1):81-84.

[19] 张爱琼,梁海英,曾智勇. 芹菜素衍生物荜花素对非洲猪瘟病毒感染的抑制作用[J]. 猪业科学,2019,36(7):18-19.

[20] 马纳,李亚静,范吉平. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(8):221-224.

(收稿日期:2020-10-25)