

基于网络药理学与分子对接的金线莲液抗 COVID-19 作用机制研究

朱 瑾^{1#}, 吴岩斌^{2#}, 黄德福³, 白冰珂¹, 何旭辉¹, 贾 丹^{1*}, 郑承剑^{1,4*}

(1. 海军军医大学药理学系, 上海 200433; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 3. 福建医科大学孟超肝胆医院, 福建 福州 350025; 4. 道地药材国家重点实验室, 北京 100700)

摘要: 金线莲液(喷雾用)在 COVID-19 大流行期间表现出良好的临床治疗效果,但其物质基础及作用机制尚不明确。本研究拟通过网络药理学及分子对接的方法预测金线莲液防治新冠的分子机制,结合体外药效学实验对当前具有明确新冠防治效果的靶点与金线莲液重点成分的相互作用进行研究。首先运用 UPLC-MS 结合数据库比对分析金线莲液中活性成分,经 SwissADME 数据库体内药代动力学过程筛选得到类药性较好的潜在活性成分 17 个, SwissTargetPrediction、GeneCards 检索获得化合物疾病共有靶点 93 个。随后运用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“成分-靶点”网络图,以 Metascape 平台进行基因功能注释和富集通路分析,发现金线莲液主要通过异鼠李素、山柰酚、木犀草素、槲皮素、芹菜素等活性成分与共有靶点(NOS3、MPO、MMP3 等)结合,调节对外部刺激的积极反应、炎症反应、细胞因子产生等生物过程,发挥抗 COVID-19 的作用。血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 活性测定实验表明金线莲液(喷雾用)原液及除去多糖后的上清液(主要为黄酮类成分)对 ACE2 酶活性有一定的抑制作用。最后,采用 2019-nCoV-S 蛋白假病毒感染 HEK-293T-ACE2 细胞,发现金线莲液可能主要通过阻断新冠病毒 S 蛋白与 ACE2 的结合发挥抗病毒作用。

关键词: 金线莲液(喷雾用); COVID-19; 网络药理学; 分子靶点对接; 作用机制

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)03-0633-10

Anti-COVID-19 mechanism of *Anoectochilus roxburghii* liquid based on network pharmacology and molecular docking

ZHU Jin^{1#}, WU Yan-bin^{2#}, HUANG De-fu³, BAI Bing-ke¹, HE Xu-hui¹, JIA Dan^{1*}, ZHENG Cheng-jian^{1,4*}

(1. Faculty of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 3. Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China; 4. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China)

Abstract: *Anoectochilus roxburghii* liquid (spray, a hospital preparation of Wu Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University) has shown a good clinical treatment effect during the COVID-19 pandemic, but its material basis and mechanism of action are still unclear. In this study, network pharmacology and molecular docking methods were used to predict the molecular mechanism of *A. roxburghii* liquid against COVID-19, and pharmacodynamic experiments *in vitro* were conducted to study the interaction between the current targets with clear preventive and therapeutic effects and the key components of *A. roxburghii* liquid. UPLC-MS and database were used to compare and analyze the active ingredients in the liquid, and 17 potential active ingredients with good drug-like properties were screened by *in vivo* pharmacokinetics process in SwissADME database. SwissTargetPrediction and GeneCards were searched to find 93 common targets. Cytoscape 3.8.2 software was used to construct the

收稿日期: 2023-07-25; 修回日期: 2023-10-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82174081, 82374118, 82004002); 上海市浦江人才计划(21PJD082); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-21-81871358, E-mail: cjzheng1984@126.com; jiadansmmu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0904

"component-target" network map, and the Metascape platform was used for gene function annotation and pathway enrichment analysis. It was found that the extract could regulate the positive response to external stimuli, inflammatory response, cytokine production and other biological processes by binding the active ingredients such as isorhamnetin, kaempferol, luteolin, quercetin and apigenin to the common targets (NOS3, MPO, MMP3, etc.), and play an anti-COVID-19 role. In the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) activity inhibition assay, it was found that the stock solution of *A. roxburghii* liquid (for spray), and the supernatant after removing polysaccharides (mainly containing flavonoids) could to some extent inhibit the activity of ACE2. Crucially, in the experiment of 2019-nCoV-S pseudovirus infecting HEK-293T-ACE2 cells, we found that *A. roxburghii* liquid may exert anti-COVID-19 effects by blocking the binding of SARS-CoV-S protein to ACE2.

Key words: *Anoectochilus roxburghii* liquid (for spray); COVID-19; network pharmacology; molecular docking; mechanism

自2019年新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)席卷全球引起COVID-19大流行,截至2023年12月20日,根据世界卫生组织发布数据已有确诊病例7.7亿,并造成超698万人死亡(<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>)。中医药治疗疫病有悠久的历史,在新冠肺炎的防治中发挥着其独特的作用。2020年,中华人民共和国国家卫生健康委员会将中医药列为治疗新冠肺炎患者的推荐治疗方案。目前,具有抗新冠治疗前景的主要包括单体活性成分(如黄芩苷、槲皮素、灯盏花素、粉防己碱)、粗提物(如黄芩提取物、大蒜提取物)及复方(如莲花清瘟胶囊、宣肺败毒散、清肺排毒汤)等^[1,2]。

金线莲液(喷雾用,福建医科大学吴孟超肝胆医院院内制剂),是以兰科金线兰属植物金线兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 鲜草汁制成的液体制剂,主要用于治疗乙型肝炎、儿童手足口病、小儿抽动-秽语综合征等^[3-5]。在《福建省中医药防治新型冠状病毒肺炎专家共识(2022年12月普及版)》里,被推荐为中医外用方案,表现出良好的临床治疗效果。与对照组相比,在基础治疗上加入金线莲液喷咽喉部的患者,咽痛消失时间、咳嗽缓解时间、核酸转阴时间均明显缩短,第10~14天的核酸转阴率显著提高^[6]。金线莲中活性成分主要包括黄酮、多糖、有机酸、挥发油、甾体及生物碱等^[7]。槲皮素被报道能够通过抑制丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV) RNA依赖性RNA聚合酶产生抗病毒作用^[8]。金线莲苷(kinsenoside)有良好的药理学活性,能够抑制NF- κ B的核易位及其转录活性,同时增加细胞因子信号传导3抑制因子的水平,导致白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和巨噬细胞迁移抑

制因子的表达减少,以及白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的含量升高,显示出缓解细胞因子风暴的潜力^[9]。同时,金线莲苷抑制多种炎症信号通路与氧化应激,因此还具有保肝、血管保护、降血糖、免疫调节、抑制感染等作用^[10]。在现有的报道中,尚无金线莲液抗COVID-19有效成分和作用机制研究。因此,本课题拟分析金线莲液化学成分,并进一步探究其作用机制。

网络药理学是一种在生物信息学、网络科学、高通量组学、靶向药理学等多学科综合基础上,通过算法和实验相结合,构建“成分-靶标-通路”相互作用关系,探寻药效物质基础、作用机制的方法^[11],包括基于网络的疾病基因预测、药物靶点和药物功能预测、疾病特异性网络构建、中草药网络构建、药物-基因-疾病共模分析等一系列方法^[12-15]。对于成分作用复杂的中草药,天然具有系统性、整体性的网络药理学方法,能够更好地体现中草药多成分、多靶点、复杂机制的特点,同时网络药理学的预测性特点能够高效益地为研究人员提供研究思路,筛选主要活性物质和重点靶标,拓展新药开发和疾病治疗方法^[16]。分子靶点对接通过研究小分子配体与受体生物大分子相互作用,预测其结合模式和亲和力,分子对接方法在不良反应预测、药物再利用、先导化合物发现、新药设计中发挥着重要的作用^[17]。将潜在活性物质与疾病治疗靶点进行虚拟对接,根据对接结果寻找与靶标蛋白有特异性相互作用的候选化合物,提示药物可能的作用机制,最后采用实验的方法进行生物活性检测。因此,本研究希望利用网络药理学和分子靶点虚拟对接的方法,构建金线莲抗COVID-19的“成分-靶点-通路”作用网络,为其临床应用提供科学依据。

材料与方法

细胞与假病毒 血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)过表达的3FLAG-HEK293T

稳定细胞株购自苏州复百澳生物科技有限公司 (FBC2591)、2019-nCoV-S 蛋白假病毒购自上海源叶生物科技有限公司 (11906ES50)。

药品与试剂 金线莲液 (福建医科大学孟超肝胆医院制剂, 20220911); ACE2 抑制剂筛选试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, P0320); 槲皮素 (纯度 $\geq 97\%$, 117-39-5)、异鼠李素 (纯度 $\geq 98\%$, 480-19-3), 上海源叶生物科技有限公司; 山柰酚 (纯度 $\geq 98\%$, 520-18-3)、木犀草素 (纯度 $\geq 98\%$, 491-70-3)、芹菜素 (纯度 $\geq 98.5\%$, 520-36-5), 上海毕得医药科技股份有限公司; 乙腈 (01111812)、DMSO (P2154517), Damas-beta 公司; 甲酸 (江苏强盛功能更化学股份有限公司, 20130701); 乙酸铵 (上海麦克林生化科技有限公司, C14460420); 超纯水 (青岛聚创公司 FST-II-10/20 纯水机制备)。

仪器 超高效液相色谱仪、Orbitrap 高分辨质谱仪、96 孔黑板 (265301), Thermo Fisher Scientific 公司; BEH C18 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm , Waters 公司); SpectraMax M5 多功能酶标仪 (Molecular Devices 美谷子分子仪器有限公司); DM IL LED 倒置荧光显微镜 (徕卡显微系统公司); Mettler AE 分析天平 (梅特勒托利多科技有限公司)。

金线莲液成分分析

样品制备 取金线莲液 4 mL 与 6 mL 乙腈混合, 涡旋混合均匀, 放入 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱经冷冻诱导液液萃取, 待相分离后, 分别取上层乙腈层和下层水层进行分析。

液相色谱条件 BEH C18 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL ; 流速 0.45 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 正离子模式: 流动相 (A) 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 (B) 为 0.1% 甲酸乙腈溶液; 负离子模式: 流动相 (A) 为 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液, 流动相 (B) 为 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵乙腈溶液; 流动相梯度洗脱程序: 0~20 min, 98% A; 20~24 min, 1% A; 25~30 min, 98% A。

质谱条件 离子源: 电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子模式, 喷雾电压为 3 800 V (ESI⁺), 3 000 V (ESI⁻); 毛细管温度 $325\text{ }^{\circ}\text{C}$; 离子源温度 $400\text{ }^{\circ}\text{C}$; 簇裂解电压 60 V; 鞘气体积流量 40 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 辅助气体积流量 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 尾气体积流量 0; 归一化碰撞能量: 低能量 10%, 中能量 35%, 高能量 55%; 采集范围 50~1 000 m/z 。

金线兰属化学成分数据库构建 对已有文献报道的金线兰属化学成分进行搜索整理, 构建包括化合物名、分子式、分子量、CAS 号、植物归属等内容的金线兰属化学成分数据库。数据库涉及金线莲 (金线兰)、台湾银线兰、兴仁金线兰、滇越金线兰、恒春银线兰等金线兰属植物化学成分, 共收录化学成分 210 个, 包括黄酮及其苷类 55 个, 其他苷类 27 个, 挥发油类 49 个,

有机酸类 17 个, 三萜类 15 个, 核苷类 13 个, 生物碱类 4 个, 以及其他酯类、酚类等化合物。

质谱结果化合物鉴定方法 以质谱结果准分子离子峰推断出化合物分子式, 依据分子式及二级质谱图等信息与 mzCloud 数据库化合物信息进行比对, 鉴定出 UPLC-MS 分析结果主要色谱峰对应化合物。将质谱鉴定结果与自建金线兰属化学成分数据库比对, 最终获得金线莲液中潜在活性成分。

网络药理学分析及分子对接

“成分-靶点”网络构建 将通过液-质联用方法分析得到的金线莲液中活性成分输入 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载结构文件, 将化合物结构文件导入 SwissADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>) 查询其体内药代动力学特性, 筛选肠吸收 (GI absorption) 高、类药性 (druglikeness) 良好的化合物。将经药代动力学筛选得到的化合物结构文件导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 设置靶点选择概率 (probability) > 0 , 获取化合物作用靶点。在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库将物种设置为“Homo sapiens”, 以“COVID-19”为关键词检索新型冠状病毒肺炎相关靶点。利用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 物种限定为 human, 将获取的疾病靶点和化合物作用靶点转化为对应基因, 通过 Venny 2.1 作图工具 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 取交集靶点。根据预测的金线莲活性成分及作用靶点, 运用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“成分-靶点”网络图, 计算节点值并调整节点大小。

蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 将化合物疾病交集靶点输入 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 初步构建蛋白质相互作用网络, 运用 Cytoscape 3.8.2 软件计算 PPI 网络 degree 值, 并根据 degree 值进行筛选和调整。

基因功能注释和富集通路分析 将化合物疾病交集靶点录入 Metascape 平台, 设置物种为人 (H. sapiens), $P < 0.01$, 分别从生物过程 (biological processes, BP)、细胞成分 (cellular components, CC)、分子功能 (molecular functions, MF) 3 方面进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析及京都基因与基因组百科全书数据库 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。

分子靶点虚拟对接 将筛选出的关键活性成分 sdf 格式结构文件导入 ChemBio3D Ultra 14.0 软件转化为 mol2 格式文件。利用 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 检索并下载通过 PPI 网络筛选出的核

心靶点蛋白及新冠肺炎治疗热门靶点蛋白 ACE2、新冠病毒 S 蛋白、跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (transmembrane serine protease-2, TMPRSS2)、组织蛋白酶 L (cathepsin L, CTSL)、RdRp、主要蛋白酶 (main protease, Mpro)、木瓜蛋白酶样蛋白酶 (papain-like protease, PLpro) 等 3D 结构, 导入 PyMOL2.4.1 软件进行脱水、配体分离、加氢、电荷计算。使用 AutoDock Vina 进行批量分子对接, 使用 AutoDock Tools 进行精准对接, 并用 PyMOL 软件绘制结合模式图。

ACE2 活性抑制实验 阳性药对照品溶液配制: 阳性药品储配液 MLN-4760 ($0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, IC_{50} 约 $7.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 以 assay buffer:DMSO (1:4, v/v) 作为溶剂稀释为 $0.2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 终浓度为 $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。样品溶液配制: 标准品以 DMSO 配制为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液, 后以 assay buffer:DMSO (1:4, v/v) 作为溶剂稀释至约 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 终浓度为 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。多糖与上清浓缩液: 取金线莲液 10 mL, 浓缩至 2 mL, 边搅拌缓慢加入 95% 乙醇使最终乙醇浓度达到 80%, 放入 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱 24 h, 离心, 得粗多糖沉淀, 用 80% 乙醇清洗 3 次, 干燥, 分别加入 10 或 2 mL 双蒸水配成多糖原液及多糖浓缩液; 上清液 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 旋干, 分别加入 10 或 2 mL 双蒸水配

成上清原液及上清浓缩液。使用多功能酶标仪测量样品孔荧光值, 激发波长 325 nm, 发射波长 393 nm, 计算抑制率。对抑制率进行统计学分析, 计算各样品抑制率平均值及 P 值。

细胞实验 实验前一天, 将待感染 HEK-293T-ACE2 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔接种量约为 1×10^4 个细胞。将病毒、药品、新鲜培养液配制为 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 预混液, 加入 96 孔板, 病毒感染 24 h 后更换新鲜培养基继续培养, 细胞感染假病毒换液后 24~48 h, 荧光显微镜观察 GFP 荧光。

统计学分析 实验数据通过 GraphPad Prism 8.0 和 Excel 2010 软件统计分析。多组间比较采用单因素方差分析, 两组间数据采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 被认为组间差异具有统计学意义。

结果

1 金线莲液成分分析

本研究采用液-质联用方法获得金线莲液化学成分, 将结果数据与自建金线兰属化学成分数据库比对, 得到金线莲液中化学成分。最终鉴定得到化合物 35 个 (表 1、2), 其中乙腈相鉴定得化合物 31 个, 水相

Table 1 Compounds of *Anoectochilus roxburghii* liquid (spray) in the acetonitrile phase. Compounds marked with * are unique to the acetonitrile phase

No.	Formula	Compound	Classification	Theoretical mass (m/z)	Retention time/min	Peak area
1	$\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$	Nicotinamide	Alkaloid	123.055 8	0.75	175 834 136.016
2	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -neohesperosid*	Flavonoids	625.176 8	5.55	96 062 483.793
3	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	Narcissoside	Flavonoids	625.176 8	5.55	96 062 483.793
4	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	Hyperoside	Flavonoids	465.103 3	5.08	47 853 655.447
5	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	Isoquercitrin	Flavonoids	465.103 3	5.08	47 853 655.447
6	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	Quercetin-7- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -glucopyranoside	Flavonoids	465.103 3	5.08	47 853 655.447
7	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	5-Hydroxymethylfurfural	Aldehyde	127.039 5	1.98	40 657 683.314
8	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3$	Apigenin	Flavonoids	271.060 6	7.58	37 623 873.521
9	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	4-Hydroxybenzaldehyde	Aldehyde	123.044 6	3.73	32 495 217.177
10	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	Quercetin	Flavonoids	303.050 5	6.78	31 608 529.603
11	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	Isorhamnetin	Flavonoids	317.066 1	7.99	28 387 619.612
12	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	Isorhamnetin 7- <i>O</i> -glucoside	Flavonoids	479.118 9	5.72	24 938 679.992
13	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -glucoside	Flavonoids	479.118 9	5.72	24 938 679.992
14	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	Luteolin	Flavonoids	287.055 5	6.81	23 014 885.179
15	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$	Acetovanillone/apocynin	Phenol	167.070 8	4.96	12 792 294.561
16	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	<i>p</i> -Hydroxy-cinnamic acid	Organic acids	165.055 1	4.37	12 552 628.526
17	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	Kaempferol	Flavonoids	287.055 5	7.71	9 056 013.128
18	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	Ferulic acid	Organic acids	195.065 7	4.92	7 948 071.827
19	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	Flavonoids	449.108 4	5.14	6 584 913.682
20	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	Rutin	Flavonoids	611.161 2	4.94	6 025 519.264
21	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Quercitrin	Flavonoids	449.108 4	5.73	4 816 696.133
22	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	Chlorogenic acid	Organic acids	355.102 9	3.43	2 107 121.727
23	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	Caffeic acid	Organic acids	181.050 1	3.69	2 074 399.038
24	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	Epicatechin	Flavonoids	291.086 8	3.96	894 546.032
25	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Isoorientin	Flavonoids	449.108 4	4.53	349 859.148
26	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	<i>trans</i> -3-Hydroxycinnamic acid	Organic acids	165.055 1	5.3	212 170.466
27	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	2-Hydroxycinnamic acid	Organic acids	165.055 1	5.67	190 088.487
28	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Orientin	Flavonoids	449.108 4	4.64	182 962.447
29	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	Oleanolic acid*	Organic acids	457.368 1	16.28	171 259.272
30	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	Ursolic acid*	Organic acids	457.368 1	16.28	171 259.272
31	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	<i>cis</i> -Tilirosid	Flavonoids	595.145 1	6.88	133 964.129

Table 2 Compounds of *Anoectochilus roxburghii* liquid (spray) in the water phase. Compounds marked with * are unique to the water phase

No.	Formula	Compound	Classification	Parent ions (<i>m/z</i>)	Retention time/min	Peak area
1	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	Narcissoside	Flavonoids	625.176 8	5.56	360 141 730.433
2	C ₆ H ₆ N ₂ O	Nicotinamide	Alkaloid	123.055 8	0.77	322 069 111.273
3	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -glucoside	Flavonoids	479.118 9	5.56	125 694 608.876
4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Quercetin-3-gentiobioside*	Flavonoids	627.156 1	4.42	96 208 194.200
5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Quercetin-3- <i>O</i> -sophoroside*	Flavonoids	627.156 1	4.42	96 208 194.200
6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Hyperoside	Flavonoids	465.103 3	5.08	57 386 506.410
7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Isoquercitrin	Flavonoids	465.103 3	5.08	57 386 506.410
8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetin-7- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -glucopyranoside	Flavonoids	465.103 3	5.08	57 386 506.410
9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin	Flavonoids	611.161 2	4.96	31 450 367.717
10	C ₆ H ₆ O ₃	5-Hydroxymethylfurfural	Aldehyde	127.039 5	1.99	31 228 323.705
11	C ₉ H ₈ O ₃	<i>trans</i> -4-Hydroxycinnamic acid	Organic acids	165.055 1	4.78	21 625 266.704
12	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Chlorogenic acid	Organic acids	355.102 9	3.44	18 958 348.143
13	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	Flavonoids	449.108 4	5.14	14 536 593.189
14	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Isoorientin	Flavonoids	449.108 4	4.5	8 538 764.556
15	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Orientin	Flavonoids	449.108 4	4.5	8 538 764.556
16	C ₉ H ₈ O ₄	Caffeic acid	Organic acids	181.0501	3.59	6 531 741.290
17	C ₉ H ₈ O ₃	<i>p</i> -Hydroxy-cinnamic acid	Organic acids	165.055 1	4.38	4 756 281.886
18	C ₇ H ₆ O ₂	4-Hydroxybenzaldehyde	Aldehyde	123.044 6	3.74	4 021 347.971
19	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Quercitrin	Flavonoids	449.108 4	5.72	3 308 932.566
20	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Luteolin	Flavonoids	287.055 5	6.96	3 275 269.978
21	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Ferulic acid	Organic acids	195.065 7	4.93	3 118 575.795
22	C ₇ H ₆ O ₅	Gallic acid*	Organic acids	171.029 3	1.12	2 831 396.652
23	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Apigenin	Flavonoids	271.060 6	7.61	2 684 751.734
24	C ₉ H ₁₀ O ₃	Acetovanillone/apocynin	Phenol	167.070 8	4.96	2 413 349.760
25	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Epicatechin	Flavonoids	291.086 8	3.96	1 319 571.235
26	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Isorhamnetin 7- <i>O</i> -glucoside	Flavonoids	479.118 9	5.95	1 272 598.550
27	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	<i>cis</i> -Tiliroside	Flavonoids	595.145 1	6.85	1 195 472.445
28	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Isorhamnetin	Flavonoids	317.066 1	7.99	1 137 304.267
29	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetin	Flavonoids	303.050 5	6.78	944 245.745
30	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	Flavonoids	287.055 5	7.77	860 501.732
31	C ₉ H ₈ O ₃	2-Hydroxycinnamic acid	Organic acids	165.055 1	5.75	766 017.535
32	C ₉ H ₈ O ₃	<i>trans</i> -3-Hydroxycinnamic acid	Organic acids	165.055 1	5.29	482 355.837

32个, 28个化合物两相均有。结果显示, 金线莲液中成分以黄酮类为主, 同时有少量有机酸类化合物及其他成分。

2 网络药理学分析及分子对接

2.1 活性成分和靶点筛选 将液-质联用分析鉴定得到的31个化合物进行体内药代动力学和类药性筛选, 得到GI absorption为high、druglikeness评分(Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge)3个及以上为Yes的化合物17个(表3)。使用GeneCards数据库获取COVID-19疾病靶点6 050个, 根据相关性评分(relevance score)筛选高于中位数的条目, 得到靶点3 046个。对17个潜在活性成分作用靶点与疾病靶点取交集, 得到可作为金线莲液中化学成分治疗COVID-19的靶点93个。

2.2 “成分-靶点”网络构建 将筛选得到的17个活性成分与93个靶点导入Cytoscape 3.8.2软件, 构建金线莲液中活性成分治疗COVID-19的“成分-靶点”网络图(图1), 共包含110个节点、300条边, 蓝色节点为化合物, 黄色节点代表潜在的疾病治疗靶点, 以节点大小表示degree值大小, 其中degree值排名靠前的活性

Table 3 *In vivo* pharmacokinetic process of potential active ingredients with good drug-like properties

No.	Compound	GI absorption	Bioavailability
1	Nicotinamide	High	0.55
2	5-Hydroxymethylfurfural	High	0.55
3	Apigenin	High	0.55
4	4-Hydroxybenzaldehyde	High	0.55
5	Quercetin	High	0.55
6	Isorhamnetin	High	0.55
7	Luteolin	High	0.55
8	<i>trans</i> -4-Hydroxycinnamic acid	High	0.85
9	Acetovanillone/apocynin	High	0.55
10	<i>p</i> -Hydroxy-cinnamic acid	High	0.85
11	Kaempferol	High	0.55
12	<i>trans</i> -Ferulic acid	High	0.85
13	Ferulic acid	High	0.85
14	Gallic acid	High	0.56
15	Caffeic acid	High	0.56
16	Epicatechin	High	0.55
17	<i>trans</i> -3-Hydroxycinnamic acid	High	0.85

成分为儿茶素、香草乙酮、芹菜素、木犀草素、5-羟甲基糠醛、4-羟基苯甲醛、山柰酚、异鼠李素、槲皮素, 这些可能是金线莲液发挥抗新冠作用的关键活性物质。

2.3 PPI网络构建和分析 本研究将金线莲化学成分

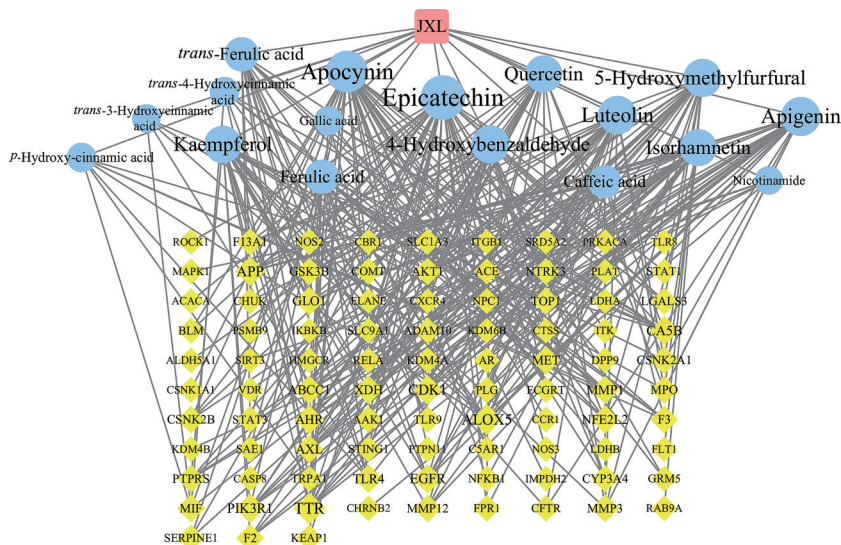


Figure 1 Interaction network of ingredients and target genes of *Anoectochilus roxburghii* liquid

与 COVID-19 疾病交集靶点输入 String 数据库初步构建 PPI 网络, 运用 Cytoscape 3.8.2 软件对 PPI 网络进行调整和分析, degree 值排名靠前的靶点有 AKT1、EGFR、TLR4、NOS3、RELA、STAT3、ACE 等, 提示这些靶点可能是金线莲液中活性成分治疗新冠的潜在核心靶点。

2.4 基因功能注释和富集通路分析 通过 Metascape 平台录入 93 个化合物疾病共同靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析, 获得 GO 富集结果 460 条, 其中 BP 富集结果 271 条、CC 富集结果 91 条、MF 富集结果 98 条, 以及 KEGG 富集结果 177 条。对 GO 富集分析 3 个项目中 $-\lg P$ 值排名前 10 的条目及 KEGG 富集分析排名前 20 的条目进行可视化, 将数据导入微生信在线作图工具, 分别绘制条形图和气泡图 (图 2)。

GO 富集结果显示, 金线莲液中活性成分抗新冠主要通过调节对外部刺激的积极反应、炎症反应、细胞因子产生等生物过程发挥作用, 对细胞的作用部位主要为囊泡腔、分泌颗粒腔等, 分子功能主要涉及蛋白激酶活性、磷酸转移酶活性、丝氨酸型肽酶活性等。KEGG 富集结果则包括 COVID-19 通路、人巨噬细胞病毒感染通路、趋化因子信号通路、Toll 样受体信号通路等, 同时还提示金线莲可能用于治疗癌症、丙型肝炎、麻疹、弓形虫锥虫感染等疾病。

2.5 分子靶点虚拟对接 将经体内药代动力学过程筛选的潜在活性成分及通过 PPI 网络筛选的 19 个潜在核心靶点进行分子对接, 绘制热图呈现结合能高低 (图 3A)。结果显示异鼠李素、山柰酚、木犀草素、槲皮素、芹菜素、儿茶素与 NOS3、MPO、MMP3、EGFR 等靶点有较好的结合能力。在现有文献报道中, 槲皮素等成分被报道与新冠热门靶点 CTSL、ACE2 等具有相互

作用, 因此本研究对这些靶点进行虚拟对接作为实验的补充。异鼠李素、山柰酚、木犀草素、槲皮素、芹菜素、儿茶素 6 个成分在分子对接中与靶点具有良好的结合能力, 将该成分与新冠热门治疗靶点进行分子对接, 以结合能数据绘制热图 (图 3B)。结果显示, 筛选出的 6 个潜在活性成分与 SARS-CoV-2 S 蛋白、ACE2、CTSL 等靶点具有较好的结合能力。选取结合能较低的组合可视化分子-靶点结合模式图 (图 4)。

3 体外药理学实验

3.1 ACE2 活性抑制实验 以 MLN-4760 为阳性抑制剂, 进行 ACE2 抑制剂筛选。实验结果见图 5A, 金线莲液 (喷雾用) 原液、多糖及除去多糖后的上清液 (主要为黄酮类成分) 对 ACE2 酶活性有一定的抑制作用, 抑制率分别为 32.78%、18.08% 及 39.40%, 其作用均弱于阳性抑制剂 MLN-4760 (57.77%)。多糖浓缩液及上清浓缩液 [5 倍金线莲液 (喷雾用) 制剂浓度] 可显著抑制 ACE2 酶活性, 对该制剂在临床的应用剂量具有重要参考意义。分析对接显示 (图 5B), 抑制率较高的黄酮类成分木犀草素和槲皮素与 ACE2 具有适度的结合能力。

3.2 细胞实验 实验结果见图 6, 给予 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 金线莲液作用 48 h 后实验组细胞荧光显著低于对照组, 表明金线莲液在细胞实验中能够通过阻断 S 蛋白 RBD 结合域与 ACE2 的结合, 发挥抗病毒作用。

讨论

由 SARS-CoV-2 引起的 COVID-19 世界性大流行对人类生命安全造成了巨大的损失, 在此期间中草药对疫情防治贡献了独特的力量。金线莲液是福建医科

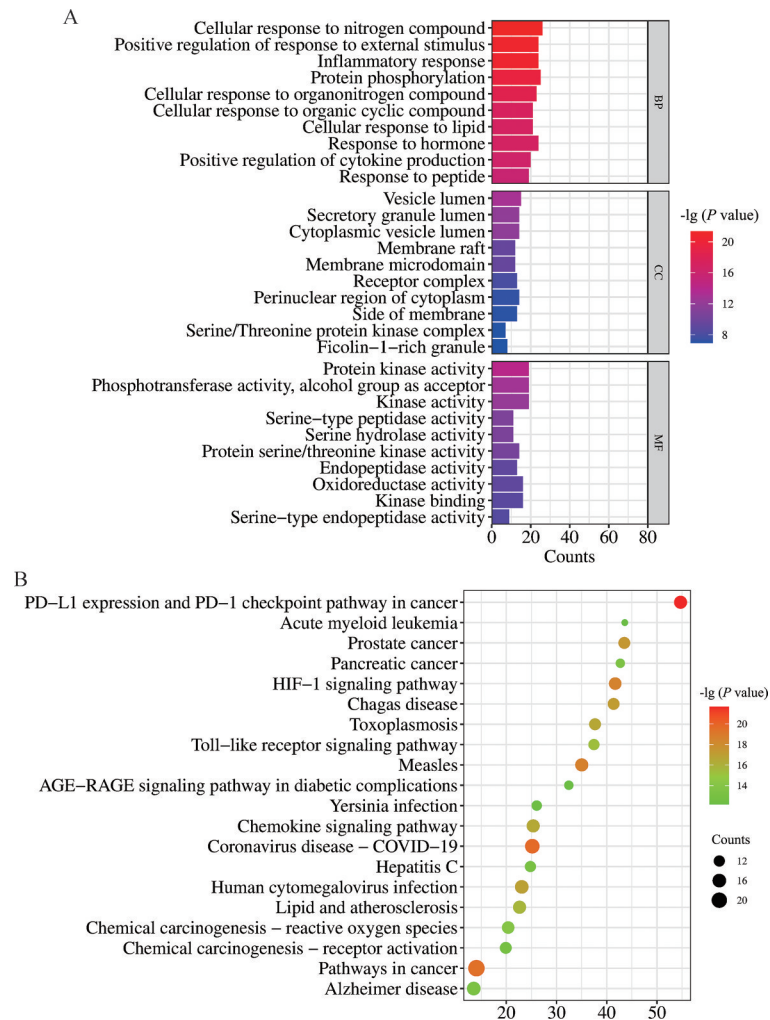


Figure 2 GO enrichment analysis of key targets of *Anoectochilus roxburghii* liquid for COVID-treatment (A) and KEGG signaling pathways enrichment analysis bubble chart of *Anoectochilus roxburghii* liquid for COVID-treatment (B)

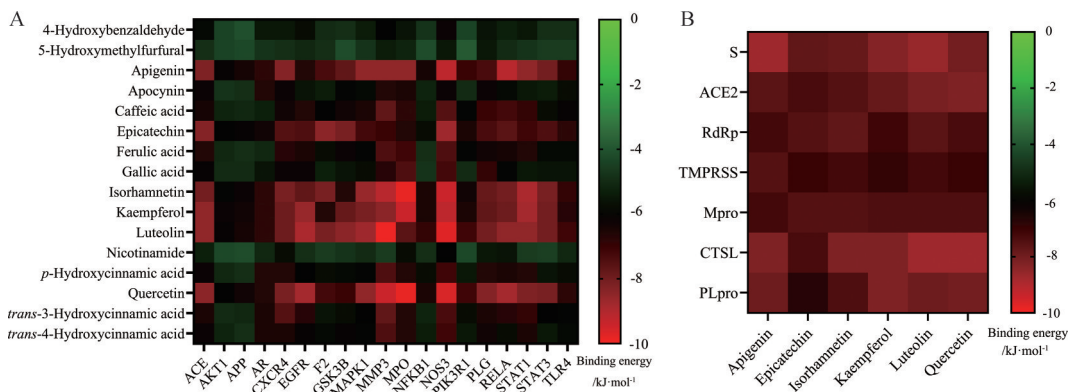


Figure 3 Heat map of the docking binding energy of active ingredients with key targets (A) and the docking binding energy of active ingredients with key targets for COVID-19 (B)

大学吴孟超肝胆医院院内制剂,以兰科金线兰属植物金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 鲜草汁制成,在疫情期间作为口腔喷雾使用,显示出良好的临床使用潜力^[6]。本研究采用超高效液相色谱-质谱联用的方法研究金线莲液中主要活性成分,通过网络药

理学和虚拟分子对接方法预测了金线莲液发挥防治新冠作用的机制。

大量研究表明,黄酮和多糖为金线莲中的主要活性成分^[7]。本研究分别考察了异鼠李素、山柰酚、木犀草素、槲皮素、芹菜素等黄酮类成分,以及金线莲液

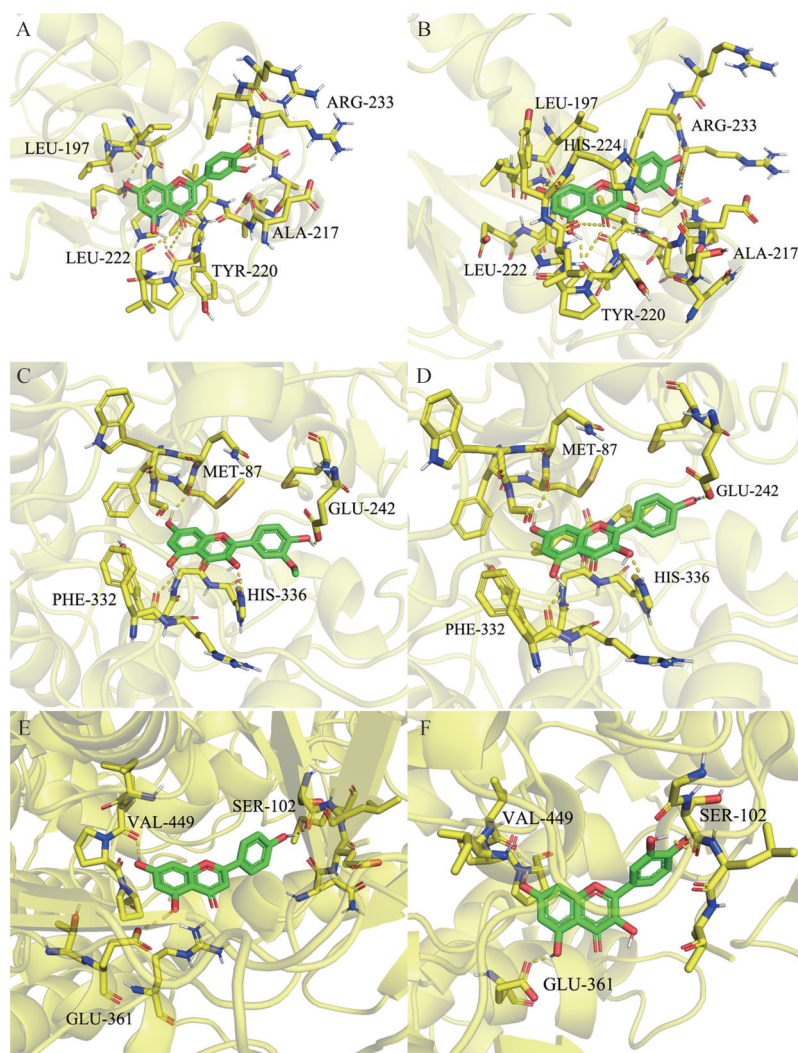


Figure 4 Molecular docking of MMP3-luteolin (A), MMP3-quercetin (B), MPO-isorhamnetin (C), MPO-kaempferol (D), NOS3-apigenin (E), and NOS3-quercetin (F)

(喷雾用)原液、多糖和除去多糖后的上清液(主要为黄酮类成分)分别对ACE2酶活性的影响,结果表明金线莲液(喷雾用)原液、多糖及除去多糖后的上清液(主要为黄酮类成分)对ACE2酶活性有一定的抑制作用,抑制率分别为32.78%、18.08%及39.40%,其作用弱于阳性抑制剂MLN-4760(57.77%)。研究表明,ACE2是SARS冠状病毒的RAS调节剂和核心受体,ACE2与SARS-CoV-2 S蛋白的相互作用介导SARS-CoV-2进入细胞^[18]。同时,ACE2通过在人体中的酶和氨基酸转运功能促进生理稳态:ACE2对降低血压、保护心肌缺血、抑制血栓形成及动脉粥样硬化等心脏疾病具有积极的意义;能抑制肿瘤细胞生长及血管生成、抑制炎症因子、改善高血糖症、降低纤维增生等^[19]。多糖浓缩液及上清浓缩液[相当于金线莲液(喷雾用)制剂浓度的5倍]可显著抑制ACE2酶活性,其可能潜在的心血管系统作用与用药剂量密切相关,因此上述结果对该制

剂在临床中用药剂量具有重要的指导意义。文献报道,黄酮类化合物在新冠期间的抗病毒作用受到关注,如黄芩苷^[20,21]等,普遍认为黄酮类化合物能够抑制病毒蛋白酶、RNA聚合酶、病毒复制和降低传染性,从而直接发挥抗病毒活性,这些化合物还能有效调节干扰素、促炎细胞因子和亚细胞炎症途径间接治疗病毒性疾病^[22]。网络药理学预测结果显示,金线莲液主要作用于NOS3、MPO、MMP3等靶点,在基因功能注释和富集通路分析中发现金线莲液通过调节对外部刺激的积极反应、炎症反应、细胞因子产生等生物过程,最终达到防治COVID-19的目的。

文献^[1]报道黄豆苷能够与SRBD和ACE2结合,而在先前的研究中多采用单纯虚拟分子对接或考察结合的方式对其作用机制进行预测。ACE2的活性与ACE2/SARS-CoV-2 S的相互作用无必然联系。本研究采用2019-nCoV-S蛋白假病毒感染HEK-293T-ACE2

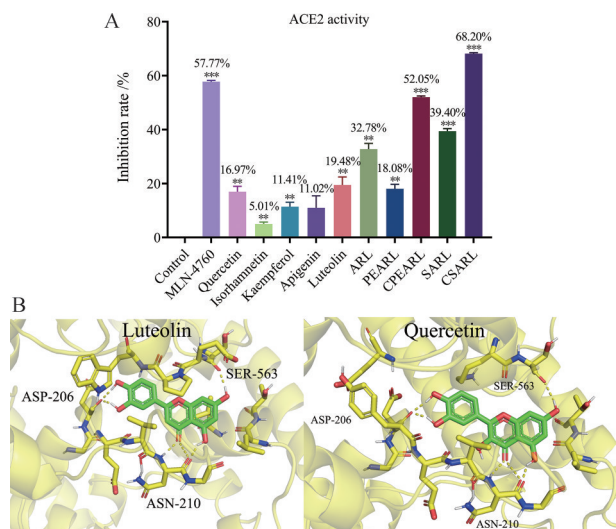


Figure 5 Inhibition of ACE2 activity (A) and molecular docking of luteolin and quercetin to ACE2 (B). ARL: *Anoectochilus roxburghii* liquid; PEARL: Polysaccharide extraction of *Anoectochilus roxburghii* liquid; CPEARL: Concentrated polysaccharide extraction of *Anoectochilus roxburghii* liquid; SARL: Supernatant of *Anoectochilus roxburghii* liquid; CSARL: Concentrated supernatant of *Anoectochilus roxburghii* liquid. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

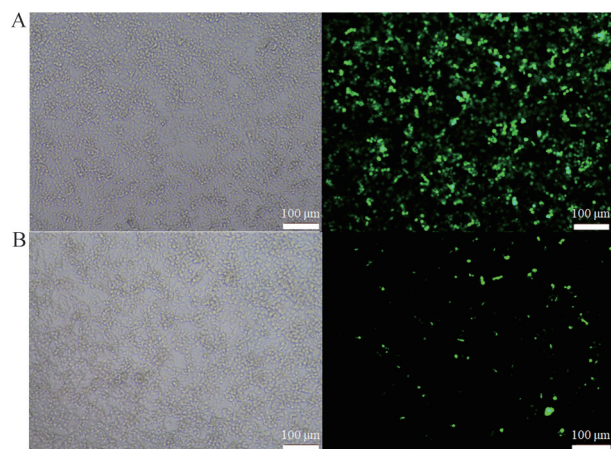


Figure 6 Infection of COVID-19-spike protein pseudovirus with HEK-293T-ACE2 cell. A: Control; B: *Anoectochilus roxburghii* liquid; Scale bar: 100 μm

细胞,发现金线莲液可显著抑制病毒感染,提示其可能主要通过阻断新冠病毒S蛋白与ACE2的结合发挥抗病毒作用。

作者贡献: 朱瑾负责文献调研、网络药理学分析、体外药效学实验、数据分析和文章撰写; 吴岩斌、何旭辉负责化学成分分析、数据收集和文章撰写; 黄德福负责药物制备和数据分析; 白冰珂负责体外药效学实验、数据收集; 贾丹、郑承剑负责实验设计、文章修改和指导审阅。

利益冲突: 本文作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Huang K, Zhang P, Zhang Z, et al. Traditional Chinese medicine (TCM) in the treatment of COVID-19 and other viral infections: efficacies and mechanisms [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107843.
- [2] Wang Z, Yang L. Chinese herbal medicine: fighting SARS-CoV-2 infection on all fronts [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 270: 113869.
- [3] Xiao ZW. Treatment of 49 cases of children Tourette syndrome with *Anoectochilus roxburghii* oral liquid [J]. *Northwest Pharm J (西北药学杂志)*, 2004, 20: 81-82.
- [4] Li Q. Clinical observation of *Anoectochilus roxburghii* oral liquid combined with entecavir in the treatment of hepatitis B [J]. *Fujian J Tradit Chin Med (福建中医药)*, 2008, 39: 125-127.
- [5] Yang HA. The efficacy of *Anoectochilus roxburghii* oral liquid in the treatment of children hand-foot-and-mouth disease and its impact on peripheral blood C-reactive protein and T lymphocyte subsets [J]. *J Med Theor Pract (医学理论与实践)*, 2022, 35: 4226-4228.
- [6] Hong MZ. Treatment of 39 cases of COVID-19 with *Anoectochilus roxburghii* liquid (for spray) and traditional Chinese medicine formula granules [J]. *Fujian J Tradit Chin Med (福建中医药)*, 2023, 54: 1-6.
- [7] Ye S, Shao Q, Zhang A. *Anoectochilus roxburghii*: a review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 209: 184-202.
- [8] Ahmed-Belkacem A, Guichou JF, Brillet R, et al. Inhibition of RNA binding to hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase: a new mechanism for antiviral intervention [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 9399-9409.
- [9] Hsiao HB, Wu JB, Lin H, et al. Kinsenoside isolated from *Anoectochilus formosanus* suppresses LPS-stimulated inflammatory reactions in macrophages and endotoxin shock in mice [J]. *Shock*, 2011, 35: 184-190.
- [10] Lu L, Xiong Y, Lin Z, et al. Advances in the therapeutic application and pharmacological properties of kinsenoside against inflammation and oxidative stress-induced disorders [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1009550.
- [11] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11: 110-120.
- [12] Wu X, Jiang R, Zhang MQ, et al. Network-based global inference of human disease genes [J]. *Mol Syst Biol*, 2008, 4: 189-200.
- [13] Zhao S, Li S. Network-based relating pharmacological and genomic spaces for drug target identification [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e11764.
- [14] Zhao S, Li S. A co-module approach for elucidating drug-disease associations and revealing their molecular basis [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28: 955-961.

- [15] Li S, Zhang B, Jiang D, et al. Herb network construction and co-module analysis for uncovering the combination rule of traditional Chinese herbal formulae [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: S6-S18.
- [16] Li S. Network target: an entry point for the network pharmacology research of TCM prescriptions [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2011, 36: 2017-2020.
- [17] Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 4331-4354.
- [18] Jackson CB, Farzan M, Chen B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23: 3-20.
- [19] Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, et al. Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2 [J]. *Circ Res*, 2020, 126: 1456-1474.
- [20] Zandi K, Musall K, Oo A, et al. Baicalein and baicalin inhibit SARS-CoV-2 RNA-dependent-RNA polymerase [J]. *Microorganisms*, 2021, 9: 893-903.
- [21] Liu H, Ye F, Sun Q, et al. *Scutellaria baicalensis* extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease *in vitro* [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2021, 36: 497-503.
- [22] Khazeei Tabari MA, Iranpanah A, Bahramsoltani R, et al. Flavonoids as promising antiviral agents against SARS-CoV-2 infection: a mechanistic review [J]. *Molecules*, 2021, 26: 3900-3936.