

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.01.018

# 基于人工智能技术的治疗非重症新型冠状病毒感染中药方剂研发及其作用机制研究

黄文婷<sup>1,2</sup>, 乔连生<sup>1,2</sup>, 闫迪<sup>3</sup>, 刘腾文<sup>3</sup>, 曹宏梅<sup>2</sup>, 郭弘妍<sup>2,4</sup>,  
张智<sup>2</sup>, 程京<sup>1,2,3</sup>, 谢兰<sup>1,2</sup>✉, 刘清泉<sup>5</sup>✉



1. 清华大学医学院医学系统生物学研究中心, 北京市海淀区双清路30号, 100084; 2. 生物芯片北京国家工程研究中心;  
3. 成都中医药大学基础医学院; 4. 北京博奥晶方生物科技有限公司; 5. 首都医科大学附属北京中医医院

**[摘要]** **目的** 研发治疗非重症新型冠状病毒感染 (COVID-19) 的中药方剂并验证其抗炎作用机制。**方法** 基于 COVID-19 患者支气管肺泡灌洗液中巨噬细胞的表达谱和新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 体外感染的肺上皮细胞表达谱分别确定了 COVID-19 在这两类细胞中失调的信号通路。通过文献收集临床治疗非重症 COVID-19 的中药方剂 102 首, 基于特征信号通路评价 102 首方剂在肺上皮细胞和巨噬细胞中的通路逆转率, 并根据中医理论确定“基础方”。通过临床常用方剂总结得到治疗非重症 COVID-19 的常用药, 结合《中华人民共和国药典》中药筛选结果得到 COVID-19 中药方剂研发的“药物池”。通过靶向转录组获得每味药物对信号通路的调控作用, 以逆转 COVID-19 失调的信号通路为目标展开计算, 基于中药智能组方方法采用穷举法和平行运算进行组方得到若干个候选复方, 参考中医专业经验最终得出治疗非重症 COVID-19 的守正创新方。采用 RT-qPCR 法检测该组方醇提物对脂多糖 (LPS) 处理的 RAW264.7 细胞中白细胞介素 1b (IL1b)、C-X-C 基序趋化因子配体 2 (Cxcl2)、C-X-C 基序趋化因子配体 10 (Cxcl10)、C-C 基序趋化因子配体 2 (Ccl2)、一氧化氮合成酶 2 (Nos2) 和前列腺素内过氧化物合成酶 2 (Ptgs2) mRNA 的表达, 对抗炎效果进行验证。**结果** 在巨噬细胞和肺上皮细胞中, 确定了 COVID-19 相关的各 34 条失调信号通路。基于失调信号通路和中药靶向转录组, 对临床治疗非重症 COVID-19 的 102 首中药复方的功效进行评估, 结果显示银翘散合平胃散在巨噬细胞及肺上皮细胞上的通路逆转率分别为 91.18% 和 100%, 效果最佳; 且该复方具有疏风清热、解毒化湿的功效, 符合 COVID-19 风热夹湿的病机, 故选用银翘散合平胃散作为守正创新方研发的基础方。利用中药智能组方方法结合中医专业经验对银翘散合平胃散进行加减化裁, 得到守正创新方翘茅术皮饮。该方逆转了巨噬细胞和肺上皮细胞上 COVID-19 相关全部失调信号通路, 逆转率均为 100%。翘茅术皮饮中的君药连翘、稀莩草和牛蒡子可下调多条与病毒感染、免疫及损伤增值相关的信号通路。RT-qPCR 结果表明, 与模型组比较, 翘茅术皮饮组下调了 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中的 IL1b、Tnf、Cxcl2、Cxcl10、Ccl2、Nos2 和 Ptgs2 mRNA 表达 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。**结论** 基于靶向转录组、中医专业经验和人工智能研发得到治疗非重症 COVID-19 的翘茅术皮饮, 该方剂的乙醇提取物在细胞炎症模型上能够抑制多种促炎基因的表达。

**[关键词]** 新型冠状病毒感染; 中药研发; 靶向转录组; 信号通路; 炎症反应; 人工智能; 翘茅术皮饮

新型冠状病毒感染 (COVID-19) 是由新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 导致的呼吸道感染性疾病, 根据其临床症状严重程度可分为轻型、中型、重型、危重型四种类型<sup>[1]</sup>。随着 COVID-19 的流行,

病毒毒力不断减弱, 但传染性不断增强。在以奥密克戎亚型为主的致病株引起的 COVID-19 中, 轻型和无症状感染者占绝大多数<sup>[2]</sup>。中医药在改善 COVID-19 临床症状、降低病死率及缩短疾病进程方面疗效突出<sup>[3]</sup>, 但传统中药新药研发模式对中医专业经验依赖性强, 且中药作用机制、靶点不明确一直是制约我国原创新药的瓶颈问题<sup>[4]</sup>。本研究利用靶向转录组、中医专业经验和人工智能的中药研

**基金项目:** 国家中医药多学科交叉创新团队项目 (ZYYCXTD-D-202201)

✉ 通讯作者: 刘清泉, liuqingquan2003@126.com; 谢兰, xielan@tsinghua.edu.cn

发思路,研发出治疗非重症 COVID-19 方剂翘蒡术皮饮,并对该方的作用机制进行探讨,为其临床应用提供依据,现报告如下。

## 1 基于靶向转录组及中医专业经验确定治疗非重症 COVID-19 的“基础方”

### 1.1 COVID-19 巨噬细胞中失调的信号通路的筛选结果

人体暴露于 SARS-CoV-2 后,先天免疫应答迅速启动,巨噬细胞作为先天免疫细胞的重要组成部分,可以向炎症部位迁移、吞噬病原体、释放细胞因子招募其他免疫细胞,其过度激活会造成炎症细胞浸润并损伤正常组织,导致 COVID-19 的过度炎症甚至触发细胞因子风暴<sup>[5-6]</sup>。本研究从基因表达综合数据库(GEO)下载一套轻型 COVID-19 患者支气管肺泡灌洗液样本的表达谱(编号 GSE145926)<sup>[7]</sup>,并以 CD68 作为细胞分子标记,分别从 COVID-19 轻型患者(3 例)及健康对照者(3 例)的支气管肺泡灌洗液转录组中提取出巨噬细胞的表达谱,进一步采用基因集富集分析(GSEA,版本 3.0)<sup>[8]</sup>计算 COVID-19 轻型患者巨噬细胞失调的信号通路。所述信号通路来自京都基因与基因组百科全书(KEGG)<sup>[9]</sup>。结合 COVID-19 的发病机制,纳入 9 条免疫相关信号通路、8 条病毒感染相关信号通路、4 条增殖相关信号通路、4 条心脏相关信号通路;结合中医整体观的思想,还纳入 3 条神经相关信号通路及 6 条代谢相关信号通路,作为 COVID-19 巨噬细胞中失调的信号通路,共计 34 条(详见附表 1,请扫描本文二维码获取)。

### 1.2 COVID-19 肺上皮细胞中失调的信号通路的筛选结果

肺上皮细胞是 COVID-19 的主要靶细胞, SARS-CoV-2 通过其表面的刺突蛋白与肺上皮细胞表面的血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 结合进而侵入细胞,引起机体先天免疫应答激活,持续的免疫应答又会造成上皮细胞损伤<sup>[10]</sup>,进而导致肺纤维化<sup>[11]</sup>、急性呼吸窘迫综合征<sup>[12]</sup>等。本研究从 GEO 下载 SARS-CoV-2 体外感染的 A549 细胞表达谱数据(编号 GSE147507)<sup>[13]</sup>,选择 SARS-CoV-2 感染[感染复数(MOI)为 2]的 A549 细胞及未感染的 A549 细胞(对照组)样品各 3 个,计算基因变化倍数,进一步采用 GSEA(版本 3.0)计算肺上皮细胞中失调的信号通路。结合 COVID-19 肺上皮细胞的病理变化,纳入 12 条病毒感染及免疫相关信号通路、7 条损伤增殖相关信号通路;结合中医整体观的思

想,还纳入 4 条神经相关信号通路及 11 条代谢相关信号通路,作为 COVID-19 肺上皮细胞中失调的信号通路,共计 34 条(详见附表 2,请扫描本文二维码获取)。

### 1.3 治疗非重症 COVID-19 中药基础方的确定

本研究从多个来源收集用于轻型、中型 COVID-19 或无症状感染者中药方剂(简称为治疗非重症 COVID-19 的方剂),包括:各版本国家级《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》20 首,安徽、四川、浙江、广西、北京 5 个省、自治区、直辖市的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》19 首,《新型冠状病毒肺炎中医诊疗手册》<sup>[14]</sup> 7 首,从 7 位中医名家处收集 24 首,从 5 家中医院收集 9 首,调研文献收集了 23 首,最后共收集整理了 102 首非重症 COVID-19 的治疗方剂。

基于肺上皮细胞和巨噬细胞中失调的信号通路进行方剂研发。本团队对 2020 年版《中华人民共和国药典》(以下简称《药典》)<sup>[15]</sup>收录的 616 味中药进行提取,由于其中 39 味药物无法采购或者无法用乙醇提取,最终成功获得 577 味中药的乙醇提取物。实验室前期构建的分子本草数据库获得了 577 味中药作用于佛波酯(PMA)诱导的 THP1 细胞(巨噬细胞)<sup>[16-17]</sup>和 A549 细胞(未发表数据)的靶向转录组数据,通过 GSEA(版本 3.0)计算了中药作用的通路表达谱。每一味中药作用细胞后对信号通路的影响用标准化富集得分(NES)表示。NES 为正表明中药作用后通路中的多数基因被上调,NES 为负表明中药作用后通路中的多数基因被下调。若中药与患者的 NES 方向相反则认为该中药可以逆转患者失调的信号通路,中药组合在某信号通路上的 NES 用组合中逆转该失调信号通路的中药 NES 之和表示<sup>[18]</sup>。我们将中药组合逆转的信号通路数除以疾病中失调的信号通路数定义为组合的通路逆转率。研究基于上述方法分别计算了上述 102 首方剂在肺上皮细胞和巨噬细胞中的通路逆转率,结果显示银翘散合平胃散在肺上皮细胞和巨噬细胞中对 COVID-19 失调信号通路的逆转率分别为 100%、91.18%,平均通路逆转率(95.59%)排名第一。药物组成:厚朴、苍术、陈皮、甘草、桔梗、连翘、金银花、薄荷、淡竹叶、荆芥穗、淡豆豉、牛蒡子。

COVID-19 属于中医学“疫病”范畴。《素问·刺法论篇》云:“五疫之至,皆相染易,无问大小,病状相似”;《温病条辨》曰:“热病者,气之发,多兼浊,家家如是,若疫使然”。本团队前期研究

结果显示, 原始 SARS-CoV-2 亚型引起的 COVID-19 为湿毒之邪, 德尔塔亚型引起的 COVID-19 变为湿毒热邪, 而奥密克戎变异株引起的 COVID-19 则风热之性突出、湿邪之性弱化, 核心病机为风热夹湿, 治疗应疏风清热、解毒化湿<sup>[19]</sup>。银翘散辛凉解表、清热解毒, 平胃散化湿运脾、行气和胃, 二者合用可疏风清热、解毒化湿, 适合非重症 COVID-19 的治疗。结合方剂通路调控的效果和 COVID-19 风热夹湿的核心病机<sup>[19]</sup>, 最终选用银翘散合平胃散作为本研究中药研发的基础方。

2 基于中药信号通路调控结果对基础方进行减药以确定“底方”

本研究采用 GSEA (版本 3.0) 进行中药信号通路富集分析, 计算出中药对通路作用的 NES。基于前期建立的靶向转录组数据, 本研究获得了银翘散合平胃散组成中药对 COVID-19 相关信号通路的调控结果<sup>[16]</sup>。银翘散合平胃散共含有 12 味中药, 在 PMA 诱导的 THP1 细胞 (巨噬细胞) 中荆芥穗 (逆转率 61.76%)、厚朴 (逆转率 55.88%)、苍术 (逆转率 26.47%) 逆转通路的效果较好; 在 A549 细胞中, 苍术 (逆转率 94.18%)、甘草 (逆转率 94.18%)、连翘 (逆转率 88.24%)、牛蒡子 (逆

转率 76.47%)、荆芥穗 (逆转率 73.53%)、陈皮 (逆转率 64.71%) 和厚朴 (逆转率 55.88%) 逆转通路的效果较好。综合考虑各药物在两个细胞中逆转通路的效果, 最终决定去掉银翘散合平胃散中通路调控效果较弱的金银花 (THP1 细胞逆转率 2.94%, A549 细胞逆转率 20.59%)、薄荷 (THP1 细胞逆转率 2.94%, A549 细胞逆转率 17.65%)、桔梗 (THP1 细胞逆转率 0, A549 细胞逆转率 5.88%)、淡竹叶 (THP1 细胞逆转率 2.94%, A549 细胞逆转率 2.94%) 和淡豆豉 (THP1 细胞逆转率 5.88%, A549 细胞逆转率 2.94%) 5 味药, 保留苍术、甘草、连翘、牛蒡子、荆芥穗、陈皮、厚朴 7 味药作为“底方”。底方在肺上皮细胞中的通路逆转率依旧是 100%, 在巨噬细胞中的通路逆转率由基础方的 91.18% 降至 88.24%。

3 基于临床治疗非重症 COVID-19 的方剂确定组方的“药物池”

3.1 治疗非重症 COVID-19 的 102 首组方中药物筛选  
102 首组方涉及 154 味中药。表 1 示, 102 首组方中排名前 20 位的中药中具清热功效的药物居多, 包括连翘、金银花、黄芩、芦根等; 具有化湿和化痰止咳平喘功效的药物次之, 具有化湿功效的药物

表 1 治疗非重症 COVID-19 的 102 首组方中排名前 20 位的中药

Table 1 The top 20 ranked Chinese herbal medicines in the 102 compound formulas for the treatment of nonsevere COVID-19

| 排序 | 中药  | 频次 (%)     | 功效                                       | 归经          |
|----|-----|------------|------------------------------------------|-------------|
| 1  | 甘草  | 53 (51.96) | 补脾益气, 清热解毒, 祛痰止咳, 缓急止痛, 调和诸药             | 肺、脾、胃、心     |
| 2  | 连翘  | 37 (36.27) | 清热解毒, 消肿散结, 疏散风热                         | 肺、心、小肠      |
| 3  | 苍术  | 36 (35.29) | 燥湿健脾, 祛风散寒, 明目                           | 脾、胃、肝       |
| 4  | 金银花 | 36 (35.29) | 清热解毒, 疏散风热                               | 肺、胃、心       |
| 5  | 黄芩  | 34 (33.33) | 清热燥湿, 泻火解毒, 止血, 安胎                       | 肺、脾、胆、大肠、小肠 |
| 6  | 广藿香 | 33 (32.35) | 芳香化浊, 和中止呕, 发表解暑                         | 肺、脾、胃       |
| 7  | 苦杏仁 | 28 (27.45) | 降气止咳平喘, 润肠通便                             | 肺、大肠        |
| 8  | 陈皮  | 26 (25.49) | 理气健脾, 燥湿化痰                               | 肺、脾         |
| 9  | 麻黄  | 26 (25.49) | 发汗散寒, 宣肺平喘, 利水消肿                         | 肺、膀胱        |
| 10 | 芦根  | 25 (24.51) | 清热泻火, 生津止渴, 除烦, 止呕, 利尿                   | 肺、胃         |
| 11 | 石膏  | 22 (21.57) | 清热泻火, 除烦止渴                               | 肺、胃         |
| 12 | 黄芪  | 20 (19.61) | 补气升阳, 固表止汗, 利水消肿, 生津养血, 行滞通痹, 托毒排脓, 敛疮生肌 | 肺、脾         |
| 13 | 柴胡  | 19 (18.63) | 疏散退热, 疏肝解郁, 升举阳气                         | 肺、肝、胆       |
| 14 | 桔梗  | 18 (17.65) | 宣肺, 利咽, 祛痰, 排脓                           | 肺           |
| 15 | 厚朴  | 17 (16.67) | 燥湿消痰, 下气除满                               | 肺、脾、胃、大肠    |
| 16 | 草果  | 17 (16.67) | 燥湿温中, 截疟除痰                               | 脾、胃         |
| 17 | 薄荷  | 16 (15.69) | 疏散风热, 清利头目, 利咽, 透疹, 疏肝行气                 | 肺、肝         |
| 18 | 防风  | 15 (14.71) | 祛风解表, 胜湿止痛, 止痉                           | 脾、膀胱、肝      |
| 19 | 大黄  | 14 (13.73) | 泻下攻积, 清热泻火, 凉血解毒, 逐瘀通经, 利湿退黄             | 脾、胃、大肠、肝、心包 |
| 20 | 葛根  | 13 (12.75) | 解肌退热, 生津止渴, 透疹, 升阳止泻, 通经活络, 解酒毒          | 肺、脾、胃       |

注: COVID-19, 新型冠状病毒感染。功效、归经出自《中华人民共和国药典》<sup>[15]</sup>。

包括苍术、广藿香等,具有化痰止咳平喘功效的药物包括苦杏仁、麻黄、陈皮等。从归经方面看,高频药物多数归肺经,其次是脾经和胃经。

### 3.2 《药典》中药物筛选

本团队前期研究中的中药靶向转录组信号通路富集结果<sup>[16]</sup>提示,豨莶草在《药典》577味中药中逆转通路效果第二,其逆转了肺上皮细胞中88.24%失调的信号通路、巨噬细胞中50.00%失调的信号通路;且豨莶草具有清热解毒、散风除湿的功效,符合COVID-19的治法治则。因此,将豨莶草纳入组方的药物池,与102首方涉及的154味中药一起,共155味中药作为COVID-19中药方剂研发的药物池。

## 4 基于中药智能组方方法计算得到翘茅术皮饮

参考本团队前期研究方法<sup>[16,18]</sup>,本研究采用穷举法和平行运算进行组方。鉴于临床常用方剂所含中药数一般为13~15味<sup>[20]</sup>,中药智能组方方法在底方7味药的基础上从药物池抽取6~8味药进行排列组合(约 $7.27 \times 10^{12}$ 组),随后对产生的每组中药组合逆转COVID-19失调信号通路的作用进行评价,输出在肺上皮细胞和巨噬细胞中通路逆转率均为100%的组合。此外,该组方方法还能够为每一首组合计算“药效分”,药效分用中药组合逆转信号通路上的NES绝对值之和表示。中药智能组方的结果显示,13味药的组合中已出现平均通路逆转率100%的候选复方,药效分排名前5位的候选复方见表2。

表2 治疗非重症COVID-19的中药候选复方中通路逆转率为100%的组方(药效分排名前5位)

Table 2 The composition of candidate compound formulas with a 100% reversal rate of signaling pathways for the treatment of nonsevere COVID-19 (top 5 ranked by therapeutic effect)

| 排序 | 药效分    | 中药组成                     |
|----|--------|--------------------------|
| 1  | 436.13 | 底方+生姜+木蝴蝶+豨莶草+荆芥+大黄+细辛   |
| 2  | 435.96 | 底方+生姜+木蝴蝶+豨莶草+荆芥+大腹皮+细辛  |
| 3  | 435.32 | 底方+生姜+木蝴蝶+豨莶草+荆芥+大黄+石菖蒲  |
| 4  | 435.15 | 底方+生姜+木蝴蝶+豨莶草+荆芥+大腹皮+石菖蒲 |
| 5  | 434.88 | 底方+生姜+木蝴蝶+豨莶草+荆芥+大黄+草果   |

COVID-19病机为风热夹湿,治疗应疏风清热、解毒化湿。大黄清热泻火、凉血解毒,石菖蒲可化湿,结合中药智能组方结果和中药功效,推荐药效分排名第三位的候选复方(苍术、甘草、连翘、牛蒡子、荆芥穗、陈皮、厚朴、生姜、木蝴蝶、豨莶草、荆芥、大黄、石菖蒲)。处方中荆芥穗和荆芥

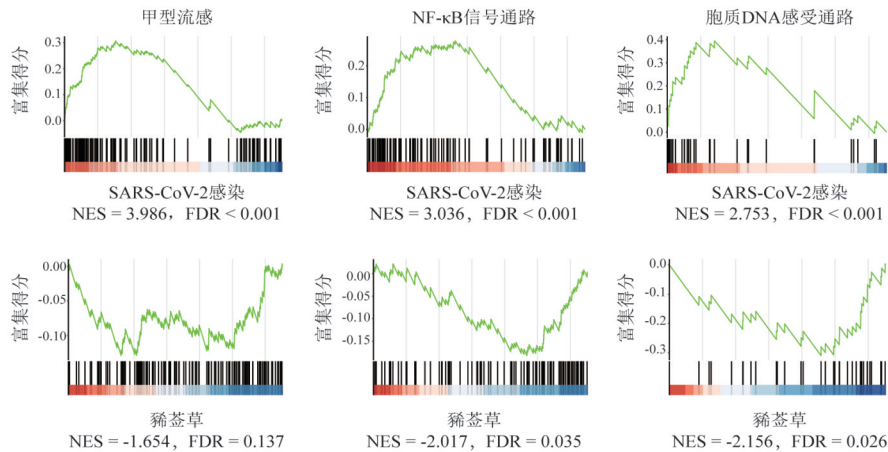
两味药物的功效主治基本一致,但在通路调控方面,荆芥穗(THP1细胞逆转率61.76%,A549细胞逆转率73.53%)强于荆芥(THP1细胞逆转率5.88%,A549细胞逆转率41.18%),因而最终保留了荆芥穗。参考中医专业经验,结合COVID-19病位在肺,用下气止咳的百部替代荆芥,且百部和陈皮、荆芥穗、生姜等构成止嗽散的基本药物组成,可增加止咳之效。替换后,该组方平均通路逆转率仍为100%。参考《药典》<sup>[15]</sup>及本文作者之一的刘清泉教授的临床经验,最终得到13味中药组成:连翘15g、豨莶草9g、牛蒡子15g、大黄6g、荆芥穗6g、木蝴蝶3g、苍术9g、厚朴9g、石菖蒲9g、百部6g、陈皮6g、生姜6g、甘草3g。

方中连翘清热解毒、疏散风热,豨莶草散风解毒,牛蒡子疏散风热、解毒利咽,三者为君药。大黄清热泻火、凉血解毒,助连翘、豨莶草清热解毒之功;荆芥穗解表散风,增强疏风之效;木蝴蝶清肺利咽,与牛蒡子增强利咽之效,三药合用为臣药。苍术化湿健脾,厚朴化湿下气,石菖蒲化湿开窍,与连翘、豨莶草、牛蒡子、大黄联用,解湿毒疫疠之气;百部下气止咳,陈皮健脾化痰,共奏化痰止咳之效,共为佐药。生姜解表,可引药达表;甘草清热解毒,调和诸药,共为使药。其中连翘、豨莶草、牛蒡子、大黄和木蝴蝶为寒凉药物,荆芥穗、苍术、厚朴、石菖蒲、百部、陈皮和生姜为辛温药物,诸药合用,共奏疏风清热、解毒化湿之功效。根据方剂中的君药连翘和牛蒡子、佐药苍术和陈皮的名字取关键字组合拟定方名为翘茅术皮饮。

## 5 翘茅术皮饮君药对THP1细胞和A549细胞信号通路的影响

### 5.1 翘茅术皮饮君药在巨噬细胞中关键通路的GSEA结果

如前所述,本研究在COVID-19轻型患者的巨噬细胞中筛选了34条失调的信号通路,代表性的有与病毒感染相关的甲型流感信号通路及与免疫相关的核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路、胞质DNA感受通路等,COVID-19患者的巨噬细胞中这些信号通路被激活(采用R 3.6.2程序包绘制GSEA山峰图)。本研究发现翘茅术皮饮的君药豨莶草能够抑制甲型流感、NF- $\kappa$ B信号通路、胞质DNA感受通路等,表明其具有抑制COVID-19巨噬细胞中过度炎症反应的效果,见图1。而其他2味君药连翘和牛蒡子在这3条信号通路上调控不显著。



注：NES为标准化富集得分；FDR为错误发现率；FC为基因变化倍数；横轴为按照log<sub>2</sub>FC排序的3267个基因，横轴的颜色表示log<sub>2</sub>FC的大小，越红表示log<sub>2</sub>FC越大，越蓝则表示log<sub>2</sub>FC越小；黑色的线表示通路中的基因，黑线在红色区域聚集表示通路中的基因多数被上调、在蓝色区域聚集则表示通路中的基因多数被下调；中药GSEA计算FDR<0.25被认为显著。

图1 翘莪术皮饮君药稀莪草在巨噬细胞上关键通路的基因集富集分析（GSEA）结果  
Figure 1 Gene set enrichment analysis (GSEA) results of key pathways in macrophages for the chief medicine Xixiancao (稀莪草) in Qiaobang Zhupi Yin (翘莪术皮饮)

## 5.2 翘莪术皮饮君药在肺上皮细胞上关键通路的GSEA结果

本研究在SARS-CoV-2感染的肺上皮细胞中筛选了34条失调的信号通路，其中代表性的信号通路如与损伤增殖相关的自噬信号通路和与病毒感染及免疫相关的肿瘤坏死因子（TNF）信号通路、核苷酸寡聚化结构域（NOD）样受体信号通路等。这些信号通路在SARS-CoV-2体外感染的A549细胞中被激活，因而抑制这些通路有助于缓解病情。翘莪术皮饮君药连翘、稀莪草和牛蒡子能够抑制这些失调的信号通路以缓解肺部炎症造成的肺上皮细胞损伤。详见图2。

## 6 翘莪术皮饮乙醇提取物抗炎效果的验证

### 6.1 材料与细胞

按照翘莪术皮饮中各中药的剂量配比称量药材粉末，总计10 g，采用90%乙醇标准索氏提取3 h，随后进行浓缩、冻干以制备药物冻干粉。称量冻干粉溶于二甲基亚砜（DMSO）中以配制50 mg/ml药物提取物母液，-80 ℃保存备用，实验时药物提取物母液稀释于培养基中使用。小鼠单核巨噬细胞白血病细胞RAW264.7（货号：3101MOUTCM13），购自国家实验细胞资源共享平台。

### 6.2 试剂及仪器

DMSO（货号：D8371，北京索莱宝科技有限公司）；脂多糖（LPS，货号：L4391）、异硫氰酸胍（货号：G9277），美国Sigma公司；细胞培养相

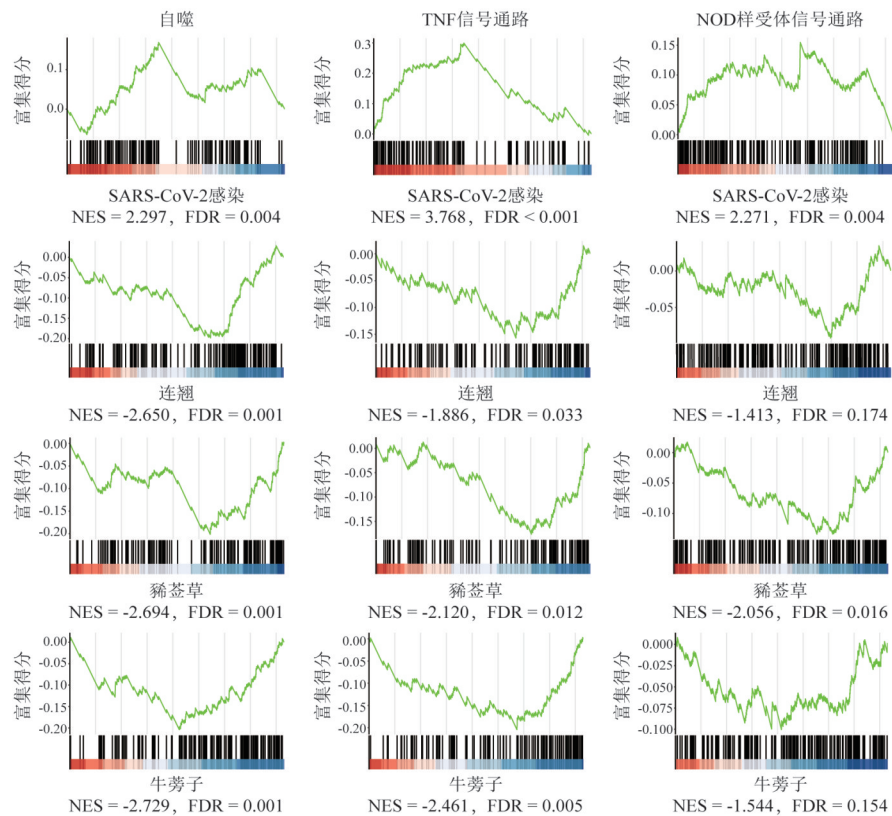
关的RPMI1640培养基(货号:SH30809.01)、DMEM培养基（货号：SH30022.01）、青霉素和链霉素（货号：SV30010）、胰酶（货号：SH30042.01）、磷酸缓冲盐溶液（PBS，货号：SH30256.01）均购自美国Hyclone公司；胎牛血清（FBS，货号B118-500，德国Nobimpex公司）；台盼蓝（货号：T10282，美国Invitrogen公司）；细胞计数试剂盒-8 [CCK8，货号：40203ES76，翌圣生物科技（上海）股份有限公司]；RNA提取柱（货号：RK175）、RNA逆转录试剂盒（货号：KR116），天根生化科技（北京）有限公司；定量聚合酶链反应（qPCR）染料（货号：KK4601，美国Kapa公司）。MCO-15AC细胞培养箱（日本SANYO公司）；VARIOSKAN FLASH多功能读数仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）；Countess 3细胞计数仪(美国Invitrogen公司)；CFX96 Touch荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

### 6.3 统计学方法

应用Graphpad Prism软件（版本9.0）进行数据处理。数据均符合正态分布且方差齐，以均值±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，采用t检验对结果进行检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 6.4 细胞毒性检测

翘莪术皮饮乙醇提取物设12.5、25、50、100、200 μg/ml 5个浓度梯度（药物干预组），另设等体积DMSO处理的RAW264.7细胞为溶剂对照组，每组技术复孔2个，生物重复3次。不同浓度的



注：NES为标准化富集得分；FDR为错误发现率；TNF，肿瘤坏死因子；NOD，核苷酸寡聚化结构域；FC为基因变化倍数；横轴为按照log<sub>2</sub>FC排序的基因，横轴的颜色表示log<sub>2</sub>FC的大小，越红表示log<sub>2</sub>FC越大，越蓝则表示log<sub>2</sub>FC越小；黑色的线表示通路中的基因；黑线在红色区域聚集表示通路中的基因多数被上调、在蓝色区域聚集则表示通路中的基因多数被下调；中药GSEA计算FDR<0.25被认为显著。

图2 翘蒺术皮饮君药在肺上皮细胞中关键通路的GSEA结果

Figure 2 GSEA results of key pathways in lung epithelial cells for the chief medicine Xixiancao (稀莪草) in Qiaobang Zhupi Yin (翘蒺术皮饮)

翘蒺术皮饮提取物干预RAW264.7细胞6 h后，CCK8法检测细胞活力。RAW 264.7细胞3000/孔接种到384孔板，过夜培养后，吸弃旧培养基，每孔加入含不同浓度的翘蒺术皮饮或DMSO的完全培养基50 μl。干预6 h后每孔加入22.5 μl的完全培养基及2.5 μl的CCK8，37℃、饱和湿度、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱内继续孵育3 h。使用多功能读数仪在450 nm波长处测各孔吸光度(OD)，细胞活力计算公式：细胞活力=(OD<sub>药物干预</sub>-OD<sub>空白</sub>)/(OD<sub>溶剂对照</sub>-OD<sub>空白</sub>)×100%<sup>[21]</sup>。

表3示，浓度为200 μg/ml的翘蒺术皮饮提取物可显著降低RAW264.7细胞活力(P<0.05)，其余浓度的翘蒺术皮饮提取物对RAW264.7细胞活力无影响(P>0.05)。本研究在避免细胞毒性影响的前提下选择一个药效最强的药物浓度，因此最终采用100 μg/ml的翘蒺术皮饮提取物开展后续实验。

#### 6.5 翘蒺术皮饮乙醇提取物对RAW264.7细胞炎症模型相关基因mRNA表达的影响

将小鼠巨噬细胞RAW264.7接种到12孔板

表3 各组RAW264.7细胞活力比较

Table 3 Comparison of cell viability in different groups of RAW264.7 cells (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 浓度/μg·ml <sup>-1</sup> | 样本数 | 细胞活力                     |
|-------|------------------------|-----|--------------------------|
| 溶剂对照组 | —                      | 3   | 100                      |
| 药物干预组 | 12.5                   | 3   | 96.58±7.52               |
|       | 25                     | 3   | 102.18±4.51              |
|       | 50                     | 3   | 99.54±9.10               |
|       | 100                    | 3   | 97.36±4.92               |
|       | 200                    | 3   | 84.54±4.11 <sup>a)</sup> |

注：a) 与溶剂对照组比较，P<0.05。

(20万/孔)，过夜培养后，吸弃旧培养基，每孔加入含1 μg/ml的LPS和100 μg/ml的翘蒺术皮饮(药物处理组)、含1 μg/ml的LPS和与药物等体积的DMSO(模型组)、含与LPS等体积的PBS和与药物等体积的DMSO(溶剂对照组)的完全培养基1 ml。干预6 h后，采用逆转录定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测细胞白细胞介素1b(IL1b)、肿瘤坏死

因子 (Tnf)、C-X-C 基序趋化因子配体 2 (Cxcl2)、C-X-C 基序趋化因子配体 10 (Cxcl10)、C-C 基序趋化因子配体 2 (Ccl2)、一氧化氮合成酶 2 (Nos2) 和前列腺素内过氧化物合成酶 2 (Ptgs2) mRNA 表达。使用核酸提取柱提取 mRNA, 按照说明书加入 DNA 酶进行消化 (42 °C、3 min)、逆转录 (42 °C、15 min, 95 °C、3 min) 和 qPCR 反应 (95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环), 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Gapdh) 作为内参, 计算样本中目的基因相对表达量。以溶剂对照组 mRNA 表达量为 1, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算组间对应基因的表达差异。实验重复 4 次, 引物序列见表 4, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 5 示, 与溶剂对照组比较, 模型组和药物处理组 IL1b、Tnf、Cxcl2、Cxcl10、Ccl2、Nos2 和 Ptgs2 mRNA 表达均升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与模型组比较, 药物处理组上述各炎症相关基因 mRNA 表达均降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

7 讨论

本团队前期提出以逆转疾病失调信号通路为核心的中药智能组方策略<sup>[18]</sup>, 以期科学化中药配伍提供新的思路。COVID-19 是由 SARS-CoV-2 感染引起的急性呼吸道传染性疾病, 病毒通过与 II 型肺上皮细胞表面表达的 ACE2 受体结合进而侵入人体<sup>[22]</sup>。入侵后首先引起人体免疫反应, 持续过度的炎症反应会破坏肺上皮细胞屏障, 引起肺部损伤, 进而引发肺纤维化等严重病变。巨噬细胞、自然杀伤细胞是人体先天免疫细胞的重要组成部分<sup>[23]</sup>, 在机体抗病毒免疫应答中至关重要。因此, 本研究纳入与病毒侵染、肺部病理密切相关的肺上皮细胞和作为免疫应答重要组成的巨噬细胞两种细

| 表 4 RT-qPCR 引物序列                     |            |                         |     |
|--------------------------------------|------------|-------------------------|-----|
| Table 4 Primer sequences for RT-qPCR |            |                         |     |
| 基因                                   | 序列 (5'-3') | 产物长度/bp                 |     |
| IL1b                                 | 正向         | GAAATGCCACCTTTTGACACTG  | 116 |
|                                      | 反向         | TGGATGCTCTCATCAGGACAG   | 116 |
| Tnf                                  | 正向         | CCTGTAGCCACGTCGTAG      | 148 |
|                                      | 反向         | GGGAGTAGACAAGGTACAACCC  | 148 |
| Cxcl2                                | 正向         | CCAACCACCAAGGCTACAGG    | 108 |
|                                      | 反向         | GCGTCACACTCAAGCTCTG     | 108 |
| Cxcl10                               | 正向         | CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC   | 133 |
|                                      | 反向         | TCCCTATGGCCCTCATTCTCA   | 133 |
| Ccl2                                 | 正向         | TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA | 120 |
|                                      | 反向         | GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT | 120 |
| Nos2                                 | 正向         | GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA | 127 |
|                                      | 反向         | GTGGACGGGTCGATGTACAC    | 127 |
| Ptgs2                                | 正向         | TGCACTATGTTACAAAAGCTGG  | 124 |
|                                      | 反向         | TCAGGAAGCTCCTTATTTCCCTT | 124 |
| Gapdh                                | 正向         | AGGTCGGTGTAACGGATTTG    | 123 |
|                                      | 反向         | TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA | 123 |

注: IL1b, 白细胞介素 1b 基因; Tnf, 肿瘤坏死因子基因; Cxcl2, C-X-C 基序趋化因子配体 2 基因; Cxcl10, C-X-C 基序趋化因子配体 10 基因; Ccl2, C-C 基序趋化因子配体 2 基因; Nos2, 一氧化氮合成酶 2 基因; Ptgs2, 前列腺素内过氧化物合成酶 2 基因; Gapdh, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

胞的数据进行方剂研发。

本研究基于 SARS-CoV-2 感染的肺上皮细胞和 COVID-19 患者来源的巨噬细胞表达谱确定 COVID-19 中失调的信号通路, 进而以失调信号通路代表疾病特征, 为临床复方的药效评估及创新中药研发提供基础。在巨噬细胞中, 确定了免疫 (9 条)、病毒感染 (8 条)、增殖 (4 条)、心脏 (4 条)、代谢 (6 条)、神经 (3 条) 相关的 34 条失调信号通路; 在肺上皮细胞中, 确定了病毒感染及免疫 (12 条)、损伤增殖 (7 条)、代谢 (11 条)、神经 (4 条) 相关的 34

| 表 5 各组 RAW264. 7 细胞炎症相关基因 mRNA 表达比较                                                                                                                    |     |                                |                              |                               |                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Table 5 Comparison of mRNA expression of inflammation-related genes in different groups of RAW264. 7 cells ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , $\bar{x}\pm s$ ) |     |                                |                              |                               |                             |
| 组别                                                                                                                                                     | 样本数 | IL1b                           | Tnf                          | Cxcl2                         | Cxcl10                      |
| 溶剂对照组                                                                                                                                                  | 4   | 1.01±0.01                      | 1.00±0.00                    | 1.00±0.00                     | 1.00±0.00                   |
| 模型组                                                                                                                                                    | 4   | 2338.09±237.26 <sup>a)</sup>   | 13.37±3.16 <sup>a)</sup>     | 657.39±108.98 <sup>a)</sup>   | 25.03±1.77 <sup>a)</sup>    |
| 药物处理组                                                                                                                                                  | 4   | 912.16±180.25 <sup>a) c)</sup> | 8.55±2.40 <sup>a) d)</sup>   | 390.27±25.13 <sup>a) c)</sup> | 12.44±1.69 <sup>a) c)</sup> |
| 组别                                                                                                                                                     | 样本数 | Ccl2                           | Nos2                         | Ptgs2                         |                             |
| 溶剂对照组                                                                                                                                                  | 4   | 1.00±0.00                      | 1.01±0.00                    | 1.00±0.01                     |                             |
| 模型组                                                                                                                                                    | 4   | 34.96±9.17 <sup>a)</sup>       | 247.50±92.83 <sup>b)</sup>   | 118.94±28.34 <sup>a)</sup>    |                             |
| 药物处理组                                                                                                                                                  | 4   | 9.24±2.42 <sup>a) c)</sup>     | 43.70±12.91 <sup>a) d)</sup> | 77.04±26.28 <sup>b) d)</sup>  |                             |

注: IL1b, 白细胞介素 1b 基因; Tnf, 肿瘤坏死因子基因; Cxcl2, C-X-C 基序趋化因子配体 2 基因; Cxcl10, C-X-C 基序趋化因子配体 10 基因; Ccl2, C-C 基序趋化因子配体 2 基因; Nos2, 一氧化氮合成酶 2 基因; Ptgs2, 前列腺素内过氧化物合成酶 2 基因。

a) 与溶剂对照组比较,  $P<0.01$ ; b) 与溶剂对照组比较,  $P<0.05$ ; c) 与模型组比较,  $P<0.01$ ; d) 与模型组比较,  $P<0.05$ 。

条失调信号通路。基于上述失调信号通路和中药靶向转录组,本研究对临床治疗非重症 COVID-19 的 102 首中药复方的功效进行评估,结果显示银翘散合平胃散在巨噬细胞及肺上皮细胞中的通路逆转率分别为 91.18%、100%,效果最佳;且该复方具有疏风清热、解毒化湿的功效,符合风热夹湿病机。结合巨噬细胞和肺上皮细胞系统生物学结果和中医理论,本研究选用银翘散合平胃散作为守正创新方研发的基础方。上述方剂评价和智能组方的方法具有广泛适用性。

为了研发疗效可靠的且可快速推荐应用于临床的中药方剂,我们坚持“守正”与“创新”的理念。在基础方的选择上,“守正”体现在以中西医结合防治突发传染病的临床经验,提出风热夹湿之病机;银翘散合平胃散在基于特征信号通路的方剂评价中排名第一,以其作为基础方是系统生物学分析的结果。在确定药物池过程中,“守正”体现在组方药物来源于临床治疗非重症 COVID-19 的中药方剂;结合中药在 COVID-19 相关信号通路上的调控结果,研究将豨薟草纳入药物池,通过对其功能主治的深入剖析,最终确认了这味中药作为翘蒺术皮饮的组成药物用于 COVID-19 的治疗,体现了现代科学指导的“创新”思想。在组方中,“守正”体现在参考中医专业经验将方剂中功效冗余的荆芥替换为百部;本研究参考中药通路调控结果去除了基础方中的“弱效”药,同时基于靶向转录组和人工智能在底方中添加其他中药,体现了“创新”的思想。本研究基于 PMA 诱导的 THP1 细胞和 A549 细胞的中药靶向转录组数据进行方剂研发,最终得到能够抑制过度炎症反应、缓解上皮损伤的翘蒺术皮饮。

本研究基于本团队前期构建的中药作用于细胞的基因表达谱,并通过 GSEA 发现翘蒺术皮饮中的君药连翘、豨薟草和牛蒡子能够抑制多条与免疫、病毒感染及细胞损伤相关的信号通路,揭示了翘蒺术皮饮潜在的抗炎机制。有文献对连翘及其活性成分的抗炎机制进行研究,发现连翘提取物能够抑制 LPS 引起的小鼠急性肺损伤<sup>[24]</sup>,连翘中的连翘脂素通过抑制 Toll 样受体 4 (TLR4) /髓样分化因子 88 (MyD88) /NF- $\kappa$ B 信号通路进而抑制了 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎症<sup>[25]</sup>。本研究发现连翘下调了肺上皮细胞中 TNF 信号通路、NOD 样受体信号通路等免疫相关信号通路和自噬等损伤增殖相关信号通路。豨薟草临床常用于治疗风湿痹病<sup>[26]</sup>,而本研究通过中药智能组方推荐其可用于治疗 COVID-19。

现代药理研究表明,豨薟草的乙醇提取物通过调控转录因子激活蛋白-1 (AP-1)、NF- $\kappa$ B 和干扰素调节因子 3 (IRF3) 从而抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎症,下调 Nos2、Ptgs2、Il1b、Il6、Tnf 等炎症介质的产生<sup>[27]</sup>。本研究发现豨薟草引起的扰动基因富集到多条免疫相关的信号通路,如肺上皮细胞的 TNF 信号通路、NOD 样受体信号通路及巨噬细胞的 NF- $\kappa$ B 信号通路、胞质 DNA 感受通路等。文献报道牛蒡子苷通过调控炎症因子如 IL1 $\beta$ 、IL6、TNF 和紧密连接蛋白 1、 $\beta$ -防御素 3 等减轻 LPS 诱导的人鼻咽上皮细胞炎症损伤<sup>[28]</sup>。本研究中,GSEA 结果显示在肺上皮细胞中,牛蒡子既可以抑制 TNF 信号通路、NOD 样受体信号通路等免疫相关信号通路,又可以抑制自噬等细胞损伤相关信号通路,提示牛蒡子通过缓解肺上皮细胞损伤与炎症而帮助机体抵抗病毒。

为了进一步验证翘蒺术皮饮是否具有抗炎效果,本研究采用小鼠巨噬细胞炎症模型进行研究。在此之前,我们首先检测了翘蒺术皮饮乙醇提取物对细胞活力的影响。不同浓度的翘蒺术皮饮提取物作用在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞上 6 h 后,CCK8 检测细胞活力,结果显示从 12.5~100  $\mu$ g/ml,翘蒺术皮饮提取物对 RAW264.7 细胞活力无显著影响,故选择 100  $\mu$ g/ml 的翘蒺术皮饮提取物用于后续实验。病毒 RNA 通过与胞质的模式识别受体结合进而激活下游信号级联,并进一步激活先天免疫。先天免疫响应后分泌了众多细胞因子、趋化因子并上调多个诱导炎症的合成酶,如 Tnf、Il1b、Cxcl2、Cxcl10、Ccl2、Nos2、Ptgs2 等<sup>[5,29]</sup>,这些促炎细胞因子的释放可能进一步引起细胞因子风暴的发生<sup>[6]</sup>。因此,研发抑制促炎因子表达的药物对缓解 COVID-19 过度炎症反应至关重要。本研究选用 RT-qPCR 实验检测炎症相关基因 mRNA 的表达,发现翘蒺术皮饮提取物能够抑制细胞炎症模型中被 LPS 上调的 IL1b、Tnf、Cxcl2、Cxcl10、Ccl2、Nos2 和 Ptgs2 mRNA 表达,说明翘蒺术皮饮在体外具有抗炎效果,展现出缓解 COVID-19 过度炎症反应的潜力。

综上,本研究结合靶向转录组、中医专业经验和人工智能研发得到治疗 COVID-19 的翘蒺术皮饮,该方既符合中医对 COVID-19 的治法治则,又能够抑制 COVID-19 失调的信号通路。目前本研究的药效验证主要集中在体外验证,后面工作中需要采用 ACE2 转基因小鼠或其他病毒感染的小鼠进一步验证不同剂量下翘蒺术皮饮治疗 COVID-19 的功

效。鉴于中药多成分、多靶点的特征,为了进一步解析方剂的活性成分,也将采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术分析翘蓼术皮饮的化学成分。在系统了解抗炎、抗病毒的中药活性单体及其作用机制后,有望实现直接采用单体进行组方配伍。

## 参考文献

- [1] GANDHI RT, LYNCH JB, DELRIO C. Mild or moderate COVID-19[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(18):1757-1766.
- [2] YU W, GUO Y, ZHANG S, et al. Proportion of asymptomatic infection and nonsevere disease caused by SARS-CoV-2 Omicron variant: a systematic review and analysis [J]. *J Med Virol*, 2022, 94(12):5790-5801.
- [3] HUANG K, ZHANG P, ZHANG Z, et al. Traditional Chinese medicine (TCM) in the treatment of viral infections: efficacies and mechanisms [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107843. doi: 10.1016/j.pharmthera. 2021. 107843.
- [4] 栾鑫, 黄敏, 柯博文, 等. 源于临床有效中药活性成分的创新药物研发策略与挑战[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(7):1705-1710.
- [5] SCHULTZE JL, ASCHENBRENNER AC. COVID-19 and the human innate immune system[J]. *Cell*, 2021, 184(7): 1671-1692.
- [6] FAJGENBAUM DC, JUNE CH. Cytokine storm [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(23):2255-2273.
- [7] LIAO M, LIU Y, YUAN J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19 [J]. *Nat Med*, 2020, 26(6):842-844.
- [8] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43):15545-15550.
- [9] KANEHISA M, FURUMICHI M, SATO Y, et al. KEGG: integrating viruses and cellular organisms [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 49(D1):D545-D551.
- [10] BURGOYNE RA, FISHER AJ, BORTHWICK LA. The role of epithelial damage in the pulmonary immune response[J]. *Cells*, 2021, 10(10):2763.
- [11] JONE AE, JOSEPH C, JENKINS G, et al. COVID-19 and pulmonary fibrosis: a potential role for lung epithelial cells and fibroblasts [J]. *Immunol Rev*, 2021, 302(1): 228-240.
- [12] BRIDGES JP, VLADAR EK, HUANG H, et al. Respiratory epithelial cell responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 [J]. *Thorax*, 2022, 77(2):203-209.
- [13] BLANCO-MELO D, NILSSON-PAYANT BE, LIU W, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19 [J]. *Cell*, 2020, 181(5): 1036-1045.
- [14] 王琦, 谷晓红, 刘清泉. 新型冠状病毒肺炎中医诊疗手册[M]. 北京:中国中医药出版社, 2020:7-12, 27-28.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [16] QIAO L, HUANG W, ZHANG X, et al. Evaluation of the immunomodulatory effects of anti-COVID-19 TCM formulae by multiple virus-related pathways [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):577-579.
- [17] DAI Y, QIANG W, GUI Y, et al. A large-scale transcriptional study reveals inhibition of COVID-19 related cytokine storm by traditional Chinese medicines [J]. *Sci Bull*, 2021, 66(9):884-888.
- [18] 乔连生, 李军, 谢兰, 等. 基于靶向转录组、专家经验和人工智能研发守正创新中药的路径探索:以治疗慢性心力衰竭的中药新药研发为例[J]. *中医杂志*, 2023, 64(3):217-224.
- [19] 刘玉超, 王玉光, 郭建, 等. 刘清泉辨治新型冠状病毒感染疫病思路与常用方药探析[J]. *现代中医临床*, 2023, 30(4):6-11.
- [20] 陈丽名, 刘绍永, 张林, 等. 关于经方与当代处方的全方总药量比较[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(3): 735-738.
- [21] FENG J, YANG J, CHANG Y, et al. Caffeine-free hawk tea lowers cholesterol by reducing free cholesterol uptake and the production of very-low-density lipoprotein [J]. *Commun Biol*, 2019, 2:173.
- [22] BOURGONJE AR, ABDULLE AE, TIMENS W, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19) [J]. *J Pathol*, 2020, 251(3):228-248.
- [23] MERAD M, MARTIN JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(6):355-362.
- [24] WANG J, LUO L, ZHAO X, et al. Forsythiae fructus extracts alleviates LPS-induced acute lung injury in mice by regulating PPAR- $\gamma$ /RXR- $\alpha$  in lungs and colons [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293:115322. doi: 10.1016/j.jep. 2022. 115322.
- [25] ZHOU M, TANG Y, LIAO L, et al. Phillygenin inhibited LPS-induced RAW 264.7 cell inflammation by NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 899: 174043. doi: 10.1016/j.ejphar. 2021. 174043.
- [26] 徐丽伟, 徐帅, 王菁, 等. 豨莶草药理作用研究进展 [J]. *长春中医药大学学报*, 2021, 37(3):704-708.
- [27] GUO H, ZHANG Y, CHENG BC, et al. An ethanolic extract of the aerial part of *Siegesbeckia orientalis* L. inhibits the production of inflammatory mediators regulated by AP-1, NF- $\kappa$ B and IRF3 in LPS-stimulated RAW 264.7

cells[J]. Biosci Trends, 2018, 12(3):330-337.

[28] 聂发龙, 赵显芳, 朱紫陌, 等. 牛蒡子苷减轻脂多糖诱导人鼻咽上皮细胞炎症损伤的作用[J]. 中国药房, 2022, 33(12):1436-1441.

[29] HUANG Y, BAI C, HE F, et al. Review on the potential action mechanisms of Chinese medicines in treating coronavirus disease 2019 (COVID-19)[J]. Pharmacol Res, 2020, 158:104939. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104939.

## The Development of Chinese Herbal Formulae for Non-severe COVID-19 Based on Artificial Intelligence Technology and Investigation of Its Action Mechanisms

HUANG Wenting<sup>1,2</sup>, QIAO Liansheng<sup>1,2</sup>, YAN Di<sup>3</sup>, LIU Tengwen<sup>3</sup>, CAO Hongmei<sup>2</sup>, GUO Hongyan<sup>2,4</sup>, ZHANG Zhi<sup>2</sup>, CHENG Jing<sup>1,2,3</sup>, XIE Lan<sup>1,2</sup>, LIU Qingquan<sup>5</sup>

1. Medical Systems Biology Research Center, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing, 100084; 2. National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology; 3. School of Basic Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; 4. Beijing CapitalBio Pharma Co., Ltd.; 5. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University

**ABSTRACT** **Objective** To develop traditional Chinese medicine (TCM) formulae for the treatment of nonsevere coronavirus disease 2019 (COVID-19) and to explore its anti-inflammatory mechanism. **Methods** The dysregulated signaling pathways were determined in macrophages from bronchoalveolar lavage fluid of COVID-19 patients and in lung epithelial cells infected with SARS-CoV-2 *in vitro* based on transcriptome analysis. A total of 102 TCM formulae for the clinical treatment of nonsevere COVID-19 were collected through literature. The pathway-reversing rates of these formulae in macrophages and lung epithelial cells were evaluated based on signature signaling pathways, and the basic formula was determined in conjunction with TCM theory. The commonly used Chinese materia medica for nonsevere COVID-19 were summarized from the 102 TCM formulae as abovementioned. And together with the screening results from the *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, a “Chinese materia medica pool” was established for the development of TCM formulae for COVID-19. The regulatory effects of each herb on signaling pathways were obtained based on targeted transcriptome analysis. Oriented at reversing dysregulated signaling pathways of COVID-19, the calculation was carried out, and the artificial intelligent methods for compositing formulae, that are exhaustive method and parallel computing, were used to obtain candidate compound formulas. Finally, with reference to professional experience, an innovative formula for the treatment of nonsevere COVID-19 was developed. The ethanol extract of the formula was evaluated for its anti-inflammatory effects by detecting the mRNA expression of interleukin 1b (*Il1b*), C-X-C motif chemokine ligand 2 (*Cxcl2*), C-X-C motif chemokine ligand 10 (*Cxcl10*), C-C motif chemokine ligand 2 (*Ccl2*), nitric oxide synthase 2 (*Nos2*), and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*Ptgs2*) using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in RAW264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS). **Results** In macrophages and lung epithelial cells, 34 dysregulated signaling pathways associated with COVID-19 were identified respectively. The effects of the 102 formulae for clinical treatment of nonsevere COVID-19 were evaluated based on the dysregulated signaling pathways and targeted transcriptome, and the result showed that *Yinqiao Powder and Pingwei Powder* (银翘散合平胃散, YQPWP) ranked first, reversing 91.18% of the dysregulated signaling pathways in macrophages and 100% of the dysregulated signaling pathways in lung epithelial cells. Additionally, YQPWP had the function of scattering wind and clearing heat, resolving toxins and removing dampness in accordance with the pathogenesis of wind-heat with dampness in COVID-19. It was selected as the basic formula, and was further modified and optimized to develop an innovative formula *Qiaobang Zhupi Yin* (翘莠术皮饮, QBZPY) based on expert experience and artificial intelligence in compositing formulae. QBZPY can reverse all the dysregulated signaling pathways associated with COVID-19 in macrophages and lung epithelial cells, with the reversing rates of 100%. The chief medicinal of QBZPY, including Lianqiao (*Fructus Forsythiae*), Xixiancao (*Herba Siegesbeckiae*) and Niubangzi (*Fructus Arctii*), can down-regulate multiple signaling pathways related with virus infection, immune response, and epithelial damage. RT-qPCR results indicated that compared with the model group, the QBZPY group down-regulated the mRNA expression of *Il1b*, tumor necrosis factor (Tnf), *Cxcl2*, *Cxcl10*, *Ccl2*, *Nos2* and *Ptgs2* induced by LPS in RAW264.7 cells ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Based on targeted transcriptome analysis, expert experience in TCM and artificial intelligence, QBZPY has been developed for the treatment of nonsevere COVID-19. The ethanol extract of QBZPY has been found to inhibit mRNA expression of several pro-inflammatory genes in a cellular inflammation model.

**Keywords** COVID-19; research and development of Chinese materia medica; targeted transcriptome; signaling pathway; inflammation; artificial intelligence; *Qiaobang Zhupi Yin* (翘莠术皮饮)

(收稿日期: 2023-08-28; 修回日期: 2023-11-01)

[编辑: 邓媛]