

热毒宁注射液组对抗 CoxA16 和 EV71 病毒活性研究

曹泽彧^{1,2}, 谢雪^{1,2}, 牛莹³, 倪付勇^{1,2}, 曹亮^{1,2}, 赵祎武^{1,2}, 王振中^{1,2}, 马世平^{3*}, 萧伟^{1,2*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001;

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001;

3. 中国药科大学 中药学院, 南京 210009)

[摘要] 目的:明确热毒宁注射液组对抗柯萨奇病毒 A16 (coxsackievirus A16, CoxA16) 和肠道病毒 71 (enterovirus 71, EV71) 病毒的活性。方法:考察热毒宁注射液 1~19 号组分 (RND1~19) 对非洲绿猴肾细胞 (Vero) 的毒性,明确半数中毒浓度 (TC₅₀);进一步利用病毒感染的 Vero 细胞模型研究各组分的抗病毒活性及量效关系。采用 50 倍半数组织培养感染量 (TCID₅₀) CoxA16 和 EV71 病毒分别感染 Vero 细胞 (1 万个/孔),热毒宁注射液组分 (15.625~500 mg·L⁻¹) 给药 3 d 后,考察抗 CoxA16 和 EV71 病毒活性 (n=3)。活性组分 (最佳浓度) 给药 8 h 后,检测病毒载量。结果:热毒宁注射液各组分的 Vero 细胞毒性,TC₅₀ 从 >1 000 mg·L⁻¹ 到 221 mg·L⁻¹ 不等;抗病毒活性及量效关系研究表明,RDN7 和 RDN18 具有较好的抗 CoxA16 活性,半数有效浓度 (EC₅₀) 分别为 460,92 mg·L⁻¹,治疗指数 (TI) 分别为 1.44,2.40;RDN6 和 RDN17 具有较好的抗 EV71 活性,EC₅₀ 分别为 395,378 mg·L⁻¹,TI 分别为 2.22,1.10;病毒载量研究表明,RDN7 极显著降低 Vero 细胞中 CoxA16 病毒载量 (P<0.01),RDN6,RDN17 极显著地降低 Vero 细胞中 EV71 病毒载量 (P<0.01),而 RDN18 则没有上述活性。结论:明确了热毒宁注射液组分的抗 CoxA16 和 EV71 病毒活性。

[关键词] 热毒宁注射液;组分;柯萨奇病毒 A16;肠道病毒 71;非洲绿猴肾细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0106-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140106

Anti-CoxA16 and EV71 Activity of Components from Reduning Injection CAO Ze-yu^{1,2}, XIE Xue^{1,2}, NIU Ying³, NI Fu-yong^{1,2}, CAO Liang^{1,2}, ZHAO Yi-wu^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, MA Shi-ping^{3*}, XIAO Wei^{1,2*}
(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China; 2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China; 3. Department of Pharmacology of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antiviral effects of components from Reduning injection against coxsackievirus A16 (CoxA16) and enterovirus 71 (EV71) *in vitro*. **Method:** African green monkey cell (Vero cells), infected with 50 times 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) CoxA16 and EV71, were treated with components (15.625-500 mg·L⁻¹) for 3 days (n=3), median toxic concentration (TC₅₀) values were clarified. The antiviral activity of components against CoxA16 and EV71 was assessed. Viral load was detected after active components application with optimum concentration for 8 h. **Result:** Firstly, the toxic effects (TC₅₀) of the components (RDN1-19) on Vero cells were investigated, which was from more than 1 000 to 221 mg·L⁻¹. Furthermore, the antivirus and dose-response relationship studies of components showed that RDN7 and RDN18 revealed antiviral activity against CoxA16 with concentration for 50% of maximum effect (EC₅₀) 460, 92 mg·L⁻¹, therapeutic index (TI) 1.44, 2.40. Meanwhile, RDN6 and RDN17 revealed antiviral activity against EV71 with EC₅₀ 395, 378 mg·L⁻¹, TI 2.22, 1.10. Finally, investigation on viral load indicated that RDN7 reduced CoxA16

[收稿日期] 20141117(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX090402203)

[第一作者] 曹泽彧,博士,助理研究员,从事中药活性成分筛选与药理 Tel:025-86587935-8215, E-mail: youngker918@hotmail.com

[通讯作者] * 萧伟,博士,研究员级高级工程师,从事中药新药的研究与开发, Tel:0518-81152367, E-mail: kanionlunwen@163.com;

* 马世平,博士,教授,从事中药及复方的药理毒理学研究, Tel:025-86185232, E-mail: spma@cpu.edu.cn

copies very significantly in Vero cell ($P < 0.01$). And RDN6, RDN 17 depressed EV71 copies very obviously in Vero cells ($P < 0.01$). However, RDN18 failed to change CoxA16 and EV71 load clearly. **Conclusion:** The exogenous antiviral activity of components from Reduning injection against CoxA16 and EV71 could be clarified.

[Key words] Reduning injection; components; coxsackievirus A16; enterovirus 71; African green monkey kidney cells

手足口病是由病毒引起的法定丙类传染病,多见于 2~3 岁儿童^[1]。其病原体约有 20 余种,以柯萨奇病毒 A16 (coxsackievirus A16, CoxA16) 和肠道病毒 71 (enterovirus 71, EV71) 最常见^[1]。患儿感染后常在口腔和四肢末端出现疱疹等症状,少数病例可并发严重的中枢神经系统^[2]和心肺感染^[3-4],有较高的致残和致死风险。

实验室规范化^[5]及临床研究^[6-10]也表明热毒宁注射液对手足口病具有明确的疗效,但作用机制尚不明确。另一方面,中药组分研究是现代中药研究的思路之一^[11-12]。孙兰等通过研究制剂及组分对神经氨酸酶的抑制作用,阐释了热毒宁注射液抗流感的潜在机制^[13-14]。研究热毒宁注射液组分抗手足口病活性,有助于明确其药效物质基础及机制。因此,本研究考察了热毒宁注射液组分抗 CoxA16 和 EV71 活性。

1 材料

1.1 细胞与病毒株 非洲绿猴肾细胞 (Vero)^[15], 取传代 130~145 次的细胞用于实验;CoxA16 病毒 TS10/08 株 (JX068829);EV71 病毒 BJ09/07 株 (JQ319054.1),由军事医学科学院微生物流行病学研究所王希良研究员惠赠。参照文献^[16]方法测定病毒半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀),临用前 M199 培养基稀释至 500 TCID₅₀。

1.2 试剂 M199 培养基 (美国 Hyclone 公司,批号 NZC1116),胎牛血清 (FBS) 和 0.25% 胰酶溶液 (美国 Gibco 公司,批号分别为 1376154,1535318),MTS 细胞增殖定量检测试剂盒 (美国 Promega 公司,批号 00000657694),总 RNA 提取试剂盒 TRIzol (美国 Invitrogen 公司,批号 14105),反转录试剂盒 Prime Script™ [宝生物工程 (大连) 有限公司,批号 AK2401],CoxA16 及 EV71 病毒载量检测试剂盒 (上海之江生物科技股份有限公司,批号均为 H20140301-3)。

1.3 仪器 CKX41 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司),Forma Steri-Cycle 371 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司),Spectra Max M2^e 型酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司),生物安全柜 (上海洁

佳空气净化技术有限公司)。

2 方法

2.1 热毒宁注射液组分制备 参照文献方法^[17],取 20 g 热毒宁注射液浸膏,40 mL 50% 甲醇超声溶解,离心取上清过柱。Fuji C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 250 mm, 5 μm);波长 210,230,250,280 nm 检测;5%~100% 乙腈-0.5% 甲酸水溶液梯度洗脱;流速 30 mL·min⁻¹,1 min 时开始收集,4 min/管,弃去前 2 管 (外水体积),减压冷冻干燥后得 19 个组分 (RDN 1-19),经检测各组分均为混合物。

2.2 组分细胞毒性 胰酶消化 Vero 细胞,调整细胞密度至 1 × 10⁵/mL,100 μL/孔接种于 96 孔板,CO₂ 培养箱中孵育 2 h 后弃上清,加入 200 μL 含药培养基 (药物从 1 000 mg·L⁻¹ 起 2 倍梯度稀释 7 个梯度,2.5% FBS),设对照组,每组 3 个复孔,培养 72 h 后 MTS 试剂盒测定细胞活力,490 nm 检测吸光度 A 。细胞存活率 = $A_{\text{样品组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$,计算各组分对 Vero 细胞的半数毒性浓度 (TC₅₀)。

2.3 组分抗病毒研究 细胞种板及孵育方法与 2.2 同,加入 100 μL CoxA16 或 EV71 病毒悬液 (50 TCID₅₀),再加入 100 μL 含药培养基 (TC₅₀ > 500 mg·L⁻¹ 的组分终浓度为 500 mg·L⁻¹,TC₅₀ < 500 mg·L⁻¹ 的组分终质量浓度为 250 mg·L⁻¹),培养体系统一为 200 μL (2.5% FBS),设对照组和模型组,每组 3 个复孔。CO₂ 培养箱中培养 72 h 后测定细胞活力。

2.4 活性组分的量效关系考察 组分终质量浓度从 500 mg·L⁻¹ 开始 2 倍梯度稀释 5 个质量浓度,其余方法与 2.3 同。病毒抑制率 = $(A_{\text{样品组}} - A_{\text{模型组}})/(A_{\text{对照组}} - A_{\text{模型组}}) \times 100\%$ ^[18],分别计算各组分对病毒的半最大效应浓度 (EC₅₀) 及治疗指数 (TI),TI = TC₅₀/EC₅₀。

2.5 病毒载量研究 胰酶消化 Vero 细胞,调整细胞密度至 2 × 10⁵/mL,1 mL/孔接种于 6 孔板,CO₂ 培养箱中孵育 2 h 后弃上清,接种病毒和给药方法与 2.3 同,培养体系为 4 mL。8 h 后提取总 RNA,反转录后检测病毒载量,以每 1 μg RNA 中病毒拷贝数表示。

2.6 统计学处理 数据采用 SPSS 19.0 软件处理,

以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 Vero 细胞的毒性作用 各组分对 Vero 细胞的毒性作用基本呈量效关系, 细胞存活率随给药浓度的提高逐步降低。表 1 展示了热毒宁注射液各组分对 Vero 细胞的 TC_{50} , 其中, RDN 1-8 及 RDN 13 $TC_{50} > 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 其余各组分 $TC_{50} < 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其中 RDN 11, 12, 15, 18 与其他组分相比 TC_{50} 较低 ($< 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 对 Vero 细胞的毒性较大。本节明确了各组分细胞毒性, 为抗病毒研究中浓度的选择提供了依据。

3.2 抗 CoxA16 和 EV71 病毒活性 热毒宁注射液组分对 2 种病毒导致的细胞病变具有不同程度的抑制作用。其中, RDN 7, 17, 18 极显著地抑制 CoxA16 病毒导致的细胞病变, 细胞存活率较模型组显著提高 ($P < 0.05, P < 0.01$); RDN 6, 17, 18 号组分极显

表 2 热毒宁注射液组分对病毒感染细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of components from Reduning injection on cell survival rate infected by virus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞存活率/%		组别	细胞存活率/%	
	CoxA16	EV71		CoxA16	EV71
对照	100.00 ± 3.24	100.00 ± 1.46	RDN10	46.72 ± 3.18 ²⁾	35.52 ± 2.41 ²⁾
模型	31.52 ± 3.15 ¹⁾	29.30 ± 3.11 ¹⁾	RDN11	46.51 ± 3.16 ²⁾	42.31 ± 2.88 ²⁾
RDN1	39.26 ± 2.67 ²⁾	48.67 ± 3.31 ²⁾	RDN13	44.32 ± 3.01 ²⁾	41.11 ± 2.80 ²⁾
RDN2	49.12 ± 3.34 ²⁾	44.57 ± 3.03 ²⁾	RDN14	46.31 ± 3.15 ²⁾	47.90 ± 3.26 ²⁾
RDN3	49.05 ± 3.34 ²⁾	46.34 ± 3.15 ²⁾	RDN15	50.15 ± 3.41 ²⁾	40.33 ± 2.74 ²⁾
RDN4	51.38 ± 3.49 ²⁾	44.36 ± 3.02 ²⁾	RDN16	20.89 ± 1.42 ²⁾	45.35 ± 3.09 ²⁾
RDN5	46.38 ± 3.15 ²⁾	42.10 ± 2.86 ²⁾	RDN17	45.28 ± 3.08 ²⁾	43.58 ± 2.97 ²⁾
RDN6	44.53 ± 3.03 ³⁾	68.40 ± 4.65 ³⁾	RDN18	57.82 ± 3.93 ³⁾	63.31 ± 4.30 ³⁾
RDN7	66.51 ± 4.52 ³⁾	46.41 ± 3.16 ³⁾	RDN19	60.21 ± 4.09 ³⁾	51.79 ± 3.52 ³⁾
RDN8	51.11 ± 3.48 ²⁾	42.74 ± 2.91 ²⁾		48.57 ± 3.30 ²⁾	44.29 ± 3.01 ²⁾
RDN9	46.04 ± 3.13 ²⁾	37.15 ± 2.53 ²⁾			

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 活性组分的量效关系 如表 3 所示, 抗病毒活性组分 RDN6, 7, 17, 18 的活性呈现明显的量效关系。在 RDN7 抗 CoxA16 病毒以及 RDN6 抗 EV71 病毒量效关系考察中, 细胞存活率随给药质量浓度逐步提高, $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最佳浓度, EC_{50} 分别为 $460, 395 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, TI 分别为 1.44, 2.22。在 RDN18 抗 CoxA16 病毒研究中, $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最佳质量浓度, EC_{50} 为 $92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, TI 为 2.40。在 RDN17 抗 EV71 病毒研究中, $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最佳质量浓度, EC_{50} 为 $378 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, TI 为 1.10。上述研究中得到的组分最佳效

表 1 热毒宁注射液组分对 Vero 细胞的 TC_{50}

Table 1 TC_{50} of components from Reduning injection on Vero cells

组分	TC_{50} $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	组分	TC_{50} $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
RDN1	> 1 000	RDN11	293
RDN2	> 1 000	RDN12	237
RDN3	956	RDN13	> 1 000
RDN4	973	RDN14	472
RDN5	690	RDN15	276
RDN6	876	RDN16	300
RDN7	662	RDN17	416
RDN8	540	RDN18	221
RDN9	366	RDN19	333
RDN10	403		

著地降低 EV71 病毒导致的细胞病变, 细胞存活率较模型组显著提高 ($P < 0.01$)。见表 2。

应浓度将用于后续的研究。然而, RDN17 对 CoxA16 病毒以及 RDN18 对 EV71 病毒抑制活性与其他活性组分相比较弱, 无法统计得到 EC_{50} 值。

3.4 活性组分对 CoxA16 和 EV71 病毒载量的影响 如表 4 所示, 活性组分能够不同程度地降低感染细胞中的病毒载量。其中, $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RDN7 极显著地降低 CoxA16 病毒载量 ($P < 0.01$), 而 RDN18 对 CoxA16 病毒载量则没有显著影响, 表明 RDN18 抗病毒作用可能与降低病毒载量无关。同时, $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RDN6 和 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RDN17 极显著地降低

表 3 热毒宁注射液活性组分不同浓度对病毒的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Inhibition rate of active components from Reduning injection under different concentrations against virus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度 /mg·L ⁻¹	CoxA16 抑制率/%			EV71 抑制率/%		
	RDN7	RDN17	RDN18	RDN6	RDN17	RDN18
15.6	19.67 ± 1.32	0.65 ± 0.94	2.68 ± 1.18	6.15 ± 1.75	3.86 ± 1.53	2.48 ± 1.17
31.3	21.91 ± 1.47	1.21 ± 0.81	1.52 ± 2.10	14.49 ± 2.97	7.74 ± 1.25	4.28 ± 2.29
62.5	26.62 ± 1.65	9.98 ± 0.67	21.07 ± 2.41	15.87 ± 1.39	12.01 ± 2.80	7.66 ± 2.51
125	32.61 ± 2.18	15.30 ± 1.03	57.54 ± 3.52	25.73 ± 1.72	28.92 ± 1.27	8.82 ± 1.59
250	51.16 ± 3.43	38.42 ± 2.57	41.91 ± 3.48	37.94 ± 2.54	48.07 ± 3.22	31.80 ± 2.13
500	59.91 ± 3.81	31.27 ± 2.10	24.78 ± 3.67	55.30 ± 3.71	22.89 ± 1.40	25.13 ± 1.68

EV71 病毒载量 ($P < 0.01$)。总之,本研究中活性组分对病毒载量的降低作用有所差异。

表 4 热毒宁注射液活性组分对 CoxA16 和 EV71 病毒载量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects of active components from Reduning injection on CoxA16 and EV71 copies ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度 /mg·L ⁻¹	病毒载量/拷贝数/μg	
		CoxA16	EV71
对照	-	-	-
模型	-	53 756 ± 135	18 325 ± 152
RDN6	500	-	6 ± 1 ¹⁾
RDN7	500	20 ± 1 ¹⁾	-
RDN17	250	-	116 ± 18 ¹⁾
RDN18	125	44 143 ± 140	-

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

基于组分的中药研发,是现代中药创新与研发的有效模式之一^[11-12],制备热毒宁注射液组分开展活性研究是药效机制研究的有效手段。孙兰等^[13]考察了热毒宁注射液组分流感病毒神经氨酸酶的抑制作用,但没有关于其抗手足口病毒报道;系统制备其组分的研究也比较少见;同时,本团队的研究表明^[5],热毒宁注射液能够显著抑制 CoxA16 病毒,本研究是在此基础上的深化。

首先,本研究发现热毒宁注射液组分的毒性差异较大,RDN 1-8,13 $TC_{50} > 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而 RDN 11,12,15,18 $TC_{50} < 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。明确各组分 TC_{50} ,为后续药效评价奠定了基础。其次,本研究对组分抗 CoxA16 和 EV71 病毒活性进行了考察。各组分抗病毒活性有所不同。其中,RDN17,18 对 CoxA16 和 EV71 病毒均具有较高的抑制活性;同时,RDN 7 对 CoxA16 病毒以及 RDN6 对 EV71 病毒也具有较高的抑制活性。RDN 7,18 抗 CoxA16 病毒 EC_{50} 分

别为 460,92 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,TI 分别为 1.44,2.40;RDN 6,17 抗 EV71 病毒 EC_{50} 分别为 395,378 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,TI 分别为 2.22,1.10。总之,RDN 6,7,17,18 是抗手足口病毒的活性组分,具有进一步开展抗病毒物质基础研究的价值。最后,本研究探讨了活性组分对病毒载量的降低作用。其中,RDN7 对 CoxA16 病毒载量,以及 RDN6,17 对 EV71 病毒载量具有极显著的降低作用,而 RDN18 对 CoxA16 病毒载量则没有明显的调节作用,表明活性组分的抗病毒机制可能有所不同。例如,乳铁蛋白通过诱导宿主细胞分泌干扰素- α ^[18],提高宿主细胞 EV71 病毒抗性;甘草酸对 CoxA 16 和 EV71 病毒颗粒具有直接的灭活作用^[12],金腰素类化合物^[19]以及绿原酸^[20]则对病毒复制具有明显的抑制作用。因此,各组分具体的抗病毒机制还需要深入探讨。

本研究明确了热毒宁注射液组分抗 CoxA16 和 EV71 病毒活性,初步探讨了活性组分对病毒载量的降低作用。然而,由于本研究的组分为混合物,尚不能明确具体的活性单体,还需要进一步的活性物质分离与辨析,从而明确抗病毒单体及机制。总之,本研究为热毒宁注射液抗病毒物质辨析和机制研究奠定了基础,也为组分中药的开发提供了依据。

[参考文献]

- [1] WHO. Report on the hand, foot and mouth disease outbreak in Fuyang City, Anhui Province and the prevention and control in China[R]. 2008.
- [2] Singh S, Chow V T, Phoon M C, et al. Direct detection of enterovirus 71 (EV71) in clinical specimens from a hand, foot, and mouth disease outbreak in Singapore by reverse transcription-PCR with universal enterovirus and EV71-specific primers[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40 (8):2823-2827.
- [3] Chang L Y, Huang C Y, Lin T Y. Fulminant

- neurogenic pulmonary oedema with hand, foot and mouth disease [J]. Lancet, 1998, 352 (9125): 367-368.
- [4] Chang L Y, Lin T Y, Hsu K H, et al. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus 71-related hand, foot and mouth disease[J]. Lancet, 1999, 354(9191):1682-1686.
- [5] 曹泽彧, 常秀娟, 赵忠鹏, 等. 热毒宁注射液抗 A16 型柯萨奇病毒的研究[J]. 中草药, 2014, 45(10): 1450-1455.
- [6] 王咏梅. 热毒宁联合利巴韦林治疗小儿手足口病疗效观察[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(1): 106-107.
- [7] 贾燕. 热毒宁注射液联合利巴韦林注射液治疗小儿手足口病疗效观察[J]. 临床合理用药, 2011, 4(8A):55-56.
- [8] 邵启民, 严娟娟. 热毒宁注射液治疗 200 例手足口病的疗效观察[J]. 中国现代医生, 2011, 49(4):31-32.
- [9] 文九芳, 张先平, 王宗喜, 等. 热毒宁注射液治疗手足口病的 Meta 分析[J]. 中国药师, 2012, 15(4): 521-525.
- [10] 詹国媛, 董淑红, 刘艳薇, 等. 热毒宁注射液治疗手足口病的疗效及安全观察[J]. 中国医药指南, 2010, 8(26):117-118.
- [11] 路广义, 黄齐霞. 中药创新药物的研发探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19):232-234.
- [12] 张东风. 组分中药是未来中药创新的新模式[J]. 中医药管理杂志, 2008, 16(12):902.
- [13] 孙兰, 刘艾林, 王振中, 等. 热毒宁注射液及其组分对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(1):27-31.
- [14] 孙兰, 段书敏, 周军, 等. 热毒宁注射液体外抑制甲型 H1N1 流感病毒的研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(8):848-851.
- [15] Wang J, Chen X, Wang W, et al. Glycyrrhizic acid as the antiviral component of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. against coxsackievirus A16 and enterovirus 71 of hand foot and mouth disease[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(1):114-121.
- [16] Reed L J M, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. Am J Hyg, 1938, 27(1/2):192-197.
- [17] 肖远胜, 徐青, 金郁, 等. 中药标准组分系统分离制备研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2006, 8(3):79-84.
- [18] Weng T Y, Chen L C, Shyu H W, et al. Lactoferrin inhibits enterovirus 71 infection by binding to VP1 protein and host cells[J]. Antiviral Res, 2005, 67(1):31-37.
- [19] Zhu Q C, Wang Y, Liu Y P, et al. Inhibition of enterovirus 71 replication by chrysofenetin and penduletin[J]. Eur J Pharm Sci, 2011, 44(3): 392-398.
- [20] Li X, Liu Y, Hou X, et al. Chlorogenic acid inhibits the replication and viability of enterovirus 71 *in vitro* [J]. PLoS One, 2013, 8(9):e76007.

[责任编辑 聂淑琴]