

- [9] 郭爱叶, 李 泮, 高 岚. 细胞周期检测点激酶与肿瘤的关系研究进展[J]. 肿瘤基础与临床, 2019, 32(2): 181-184.
- [10] 许 敏, 申金金. 五味子乙素对人鼻咽癌 HNE2 细胞周期阻滞和线粒体损伤的诱导作用[J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(1): 7-12.
- [11] 雷 丽, 陈 宇, 杨思敏, 等. 一个新型氮杂萘醌类化合物通过诱导细胞凋亡来抑制肿瘤生长[J]. 中国药学 (英文版), 2018, 27(9): 600-607.
- [12] 贾 丽, 孙翠荣, 成艳梅, 等. 大蒜素诱导人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡的作用机制研究[J]. 世界中医药, 2021, 16(20): 3023-3026.
- [13] Chai E Z, Shanmugam M K, Arfuso F, et al. Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 162: 86-97.
- [14] Xu X F, Zhu Y P. Curcumin inhibits human non-small cell lung cancer xenografts by targeting STAT3 pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(8): 3633-3641.
- [15] 阿旺旦增, 吕广超, 赵 慧, 等. STAT3, mTOR, ERK1/2 磷酸化在非小细胞肺癌中的表达[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(2): 354-356.

菊苣酸体外抗呼吸道合胞病毒的作用

王 红¹, 冯 帅¹, 史 磊¹, 李 鹏^{2*}, 李 峰^{1*}

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东省医学科学院基础医学研究所, 山东第一医科大学, 山东 济南 250062)

摘要: **目的** 研究菊苣酸体外抑制呼吸道合胞病毒 (RSV) 活性的作用。**方法** 采用细胞病变法检测菊苣酸抗 RSV 的活性。通过观察菊苣酸不同给药方式的抗病毒作用以及菊苣酸对病毒吸附和穿入细胞的阻断作用, 检测菊苣酸抗 RSV 的活性, 通过药物半数中毒浓度 (TC₅₀)、半数有效浓度 (EC₅₀) 以及治疗指数 (TI) 进行评价。RT-qPCR 法检测菊苣酸对 RSV 基因组复制的影响。**结果** 菊苣酸对 RSV 诱导的细胞病变具有抑制作用, 其 TI 值为 2.071, 对 RSV 吸附和穿入细胞的过程无抑制作用, 对 RSV 基因组的复制增殖具有抑制作用。**结论** 菊苣酸具有较强的体外抗 RSV 作用, 主要是发生在病毒穿入细胞后的某一阶段。

关键词: 菊苣酸; 呼吸道合胞病毒 (RSV); 抗病毒作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)10-3342-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.053

呼吸道合胞病毒 (RSV) 是副黏病毒科肺炎病毒属的一种在全球范围内引起婴幼儿急性下呼吸道感染的人类呼吸道病毒^[1-2], 其易感人群主要为 6 个月以下的婴儿及高龄人群, RSV 感染后可引起毛细支气管炎、肺炎、上呼吸道感染等多种临床疾病, 严重者可引起病毒性哮喘^[3]。全球每年约有 3 300 万名婴幼儿死于呼吸道疾病, 因 RSV 感染死亡的婴幼儿和老人数量也呈现出上升的趋势, 严重危害人类健康, 逐渐引发社会关注^[4]。

菊苣酸是一种主要存在于紫锥菊、菊苣中的苯丙酸类化合物, 具有抑菌、抗病毒、抗炎及调节免疫的作用^[5-8]。菊苣酸对多种病毒具有抑制作用。Zhang 等^[9]通过 D-半乳糖胺诱导的人正常肝细胞 HL-7702 损伤模型研究菊苣叶中菊苣酸抗乙型肝炎的特性, 结果表明, 10~100 μg/mL 菊

苣酸能够减轻其损伤; 1~100 μg/mL 菊苣酸在受感染的鸭胎肝细胞中显著抑制鸭乙型肝炎病毒 (DHBV) 的 DNA 复制。Langland 等^[10]发现, 菊苣酸等具有咖啡酰基部分有机化合物与各种金属和其他无机离子配对时, 其咖啡酸抗单纯疱疹病毒 (HSV) 的特性增强。Robinson 等^[11]通过体外实验验证, 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 整合酶抑制剂 L-菊苣酸与蛋白酶抑制剂、齐多夫定组合具有抗 HIV 活性的作用。

目前, 菊苣酸抗病毒作用已有不少报道, 但其抗 RSV 的研究却很少, 本实验从细胞水平研究菊苣酸抗 RSV 的作用, 以期为进一步开展菊苣酸抗病毒机制研究和新药研制提供理论基础。

收稿日期: 2021-01-04

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项项目 (2017ZX09301058)

作者简介: 王 红 (1994—), 女, 硕士生, 研究方向为中药抗病毒。Tel: 15169176797, E-mail: 807307533@qq.com

* 通信作者: 李 鹏 (1980—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药抗病毒。Tel: 15063330657, E-mail: lip0127@163.com
李 峰 (1957—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药质量控制与资源研究。Tel: 13969141796, E-mail: 13969141796@163.com

1 材料

1.1 试剂与药物 菊苣酸对照品(纯度 $\geq 98\%$,批号P08M10F82474),购自上海源叶生物科技有限公司;利巴韦林注射液(批号01905083),购自石药银湖制药有限公司;Quacell 特级胎牛血清(南美血源,批号1234567890),购自中山康天晟合生物技术有限公司;不完全RPMI-1640细胞培养液(不含双抗)、青链霉素混合液(批号20190622、20190724),购自江苏凯基生物技术股份有限公司;0.25% Trysin-EDTA(批号2048080),购自美国Gibco公司;TRNzol Universal 总RNA提取试剂(批号U8807),购自天根生化科技(北京)有限公司;HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(批号7E402G0),购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;TB Green[®] Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(批号AJF25979A),购自宝日生物技术有限公司(北京)有限公司;50 \times TAE缓冲液(批号20191204),购自北京索莱宝科技有限公司;Regular AGAROSE G-10(批号182215),购自上海徕创生物科技股份有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4),购自国药集团化学试剂有限公司。中性红、氯仿(批号20120710、20130730),购自天津市科密欧化学试剂有限公司;氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)、异丙醇、无水乙醇(批号20180602、20150315、20160929、20180410、20190227、20190517),购自国药集团化学试剂有限公司;DEPC水(批号011720200417),购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞与病毒 人喉癌上皮细胞(Hep-2)和RSV均由山东省医学科学院基础医学研究所提供。所有涉及RSV的实验均在山东省医学科学院基础医学研究所BSL-2实验室中进行。

1.3 仪器 ABI 7500型荧光定量PCR仪(美国ABI公司);Nanodrop One超微量紫外光度计、-80 $^{\circ}$ C 725型超低温冰柜(美国Thermo公司);超净工作台(上海力申科学仪器有限公司);CO₂恒温培养箱(山东莱索科技有限公司);TD5M型高速台式离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);酶标仪(芬兰Labsystems公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一生物技术有限公司);微波炉(广东格兰仕微波生活电器制造有限公司)。

1.4 引物 根据Genebank已收录的呼吸道合胞病毒融合蛋白(RSV-F),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)应用引物设计与合成委托铂尚生物技术(上海)有限公司,见表1。

表1 引物序列

基因	序列(5'→3')	长度/bp
RSV-F	正向 ATTGCTGTGGACTGCTCCT	75
	反向 ACCACTCAGTTGATCCTTGCT	
GAPDH	正向 GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	138
	反向 TGGTGAAGACGCCAGTGG	

2 方法

2.1 溶液配制

2.1.1 菊苣酸 称取菊苣酸对照品4 mg,加入2 mL PBS,用移液器吹打均匀使其完全溶解,0.22 μ m微孔滤膜过滤,配制质量浓度为2 mg/mL的溶液,避光冷藏保存。

2.1.2 利巴韦林 将100 mg/mL利巴韦林注射液用PBS稀释成4 mg/mL,0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌,置4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

2.1.3 PBS 称取NaCl 80 g、KCl 2 g、KH₂PO₄ 2.4 g、Na₂HPO₄ 36.28 g,加蒸馏水至1 L,调整pH值为7.4,过滤除菌,分装,置4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

2.1.4 中性红染液 称取NaCl 50 g、中性红 2.5 g,在450 mL蒸馏水中加入50 g NaCl使其完全溶解,配制0.9% NaCl溶液,与中性红粉末混匀,即得。

2.1.5 脱色液 50%乙醇与0.1 mol/L Na₂HPO₄溶液混匀,即得。

2.2 细胞复苏传代 将冻存于液氮罐中的Hep-2细胞冻存管取出,迅速放入37 $^{\circ}$ C水中搅动使其快速溶解,1 200 r/min离心5 min,弃去冻存管内的冻存液,于离心管中加入1 mL含10%特级胎牛血清(FBS)的RPMI 1640,将细胞吹打均匀并转移至细胞培养瓶中,加入9 mL含10% FBS的RPMI 1640,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养24 h,待其长成单层后,用0.25%胰蛋白酶消化,进行1:2传代,细胞长成单层时用于病毒扩增或体外抗病毒实验。

2.3 病毒扩增 将长有单层Hep-2细胞的培养瓶中的培养液弃去,PBS冲洗3次,将RSV接种到已长成单层的细胞上,37 $^{\circ}$ C吸附30 min,加入10 mL 1640维持液(含2% FBS的RPMI 1640),置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养。同时设置细胞对照组,只添加等体积含2% FBS的RPMI 1640,显微镜下观察细胞病变效应,待病变达到85%以上时终止实验,反复冻融3次,1 200 r/min离心5 min,上清液定量分装,于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

2.4 病毒毒力检测 采用Reed-Muench法^[12]检测病毒半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)。将Hep-2细胞以每孔1 $\times 10^5$ 个的密度接种到96孔板中,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养过夜,用2% RPMI 1640将病毒液以10倍比依次稀释(1 $\times 10^{-1}$ ~1 $\times 10^{-12}$),横向依次接种在96孔板内单层细胞上,纵向重复3孔,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养,每天观察细胞病变效应,96 h后每孔加入100 μ L中性红染液,置37 $^{\circ}$ C染色1 h,弃去染液,用水将多余染料充分洗涤,每孔加入100 μ L脱色液,室温放置15 min,在540 nm处检测吸光度(A),计算TCID₅₀。

2.5 药物对Hep-2细胞毒性实验 在96孔板中接种Hep-2细胞,培养24 h使细胞形成单层,用2% RPMI 1640将菊苣酸、利巴韦林进行2倍比系列稀释,按稀释度顺序横向接种于96孔板中的Hep-2细胞上,每孔100 μ L,每个稀释度设置3个复孔,并设置细胞对照组,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养72 h,采用Reed-muench法计算药物半数中毒

浓度 (TC_{50})，在 540 nm 处检测吸光度 (A)，计算细胞存活率。

2.6 体外抗病毒实验 将生长状态良好的 Hep-2 细胞接种于 96 孔板中，在 37 °C、5% CO_2 条件下培养 24 h，弃去上清液，依次加入 2 倍比系列稀释的菊苣酸与等体积 100 $TCID_{50}$ 病毒液的混合液 100 μL ，每个稀释度设置 3 个复孔，并设置细胞对照组、病毒对照组、菊苣酸组、利巴韦林组，细胞对照组加入 100 μL 细胞维持液，病毒对照组加入 50 μL 病毒和 50 μL 维持液，菊苣酸组与利巴韦林组加入 50 μL 125 $\mu g/mL$ 菊苣酸、利巴韦林和 50 μL 病毒，96 孔板置于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中培养，每天观察细胞病变效应，待病毒对照组细胞病变效应均达 85% 以上时，用 Reed-muench 法计算菊苣酸的半数有效浓度 (EC_{50})，得到菊苣酸的治疗指数 (TI)，公式为治疗指数 (TI) = 半数中毒浓度 (TC_{50}) / 半数有效浓度 (EC_{50})^[13]

2.7 菊苣酸不同给药方式对 RSV 增殖的影响 将 Hep-2 细胞接种于 96 孔板中，培养 24 h 后使细胞长成单层，按照以下 3 种方式进行抗 RSV 活性检测，分别为先加 RSV，2 h 后添加菊苣酸；先加菊苣酸，2 h 后添加 RSV；同时添加 RSV 和菊苣酸，按“2.5”项下方法检测不同给药方式对菊苣酸抗 RSV 活性的影响。

2.8 菊苣酸抑制 RSV 复制时段的影响

2.8.1 吸附实验 参考文献 [14] 报道，将长成单层的 Hep-2 细胞在 4 °C 下预冷 1 h，弃去培养液，接种 100 $TCID_{50}$ 的 RSV 和 62.5、31.25、15.63、7.813、3.91、1.953、0.98、0.49 $\mu g/mL$ 菊苣酸 (50 $\mu L/$ 孔)，在 4 °C 下孵育 3 h，弃去培养液，PBS 洗 3 次，添加细胞维持液，放入 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养，同时设置正常细胞对照和病毒对照，按“2.5”项下方法检测菊苣酸对 RSV 吸附细胞的影响。

2.8.2 穿入实验 参考文献 [14] 报道，将长成单层的 Hep-2 细胞在 4 °C 下预冷 1 h，弃去培养液，接种 RSV (50 $\mu L/$ 孔)，4 °C 孵育 3 h，加入 62.5、31.25、15.63、7.813、3.91、1.953、0.98、0.49 $\mu g/mL$ 菊苣酸药液 (50 $\mu L/$ 孔)，37 °C、5% CO_2 孵育 1 h，弃去培养液，用碱性 PBS (pH 11) 处理 1 min，灭活未穿入病毒，立即用酸性 PBS (pH 3) 中和，弃去中性 PBS，添加细胞维持液，放入 37 °C、5% CO_2 培养箱中继续培养，同时设正常细胞对照和病毒对照，按“2.5”项下方法检测菊苣酸对 RSV 穿入细胞的影响。

2.9 RT-qPCR 法检测 RSV 基因组复制 将长成单层的 Hep-2 细胞在 37 °C、5% CO_2 条件下孵育 12 h，弃上清，接种 RSV，2 h 后弃病毒液，PBS 冲洗 2 次，加入 125 $\mu g/mL$ 菊苣酸及 250 $\mu g/mL$ 利巴韦林药液，同时设置细胞对照组和病毒对照组，当病毒对照组细胞病变达到 85% 以上时，采用 TRIzol 法提取总 RNA，1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察 RNA 28S、18S、5S 条带清晰度，检测 RNA 降解和 DNA 污染。在 260、280 nm 波长处检测吸光度 (A)，计算 RNA 的

纯度和含量。按照逆转录试剂盒说明书配制相应试剂，37 °C 15 min，85 °C 15 s 进行逆转录，-20 °C 保存备用。按照 PCR 扩增反应试剂盒说明书配置相应试剂，进行扩增反应，反应条件为 95 °C 30 s；95 °C 5 s，60 °C 34 s，共 40 个循环；95 °C 15 s，60 °C 1 min，95 °C 15 s。以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行 RSV-F 相对定量分析。

2.10 统计学分析 采用 Graphpad prism 6 进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 病毒 $TCID_{50}$ 检测 RSV 的 $TCID_{50}$ 为 $1 \times 10^{-6.667} / 0.1 mL$ 。

3.2 菊苣酸对 Hep-2 细胞的毒性 随着菊苣酸质量浓度的减小，细胞折光性、皱缩、变圆、破碎甚至脱落等细胞病变效应特征减弱。当菊苣酸质量浓度 $\geq 250 \mu g/mL$ 时，细胞存活率低于 50%；当菊苣酸质量浓度 $\leq 125 \mu g/mL$ 时，细胞病变极少，存活率达 90% 以上，见图 1。菊苣酸 TC_{50} 值为 171.9 $\mu g/mL$ ，其阳性对照利巴韦林 TC_{50} 值为 578.7 $\mu g/mL$ 。

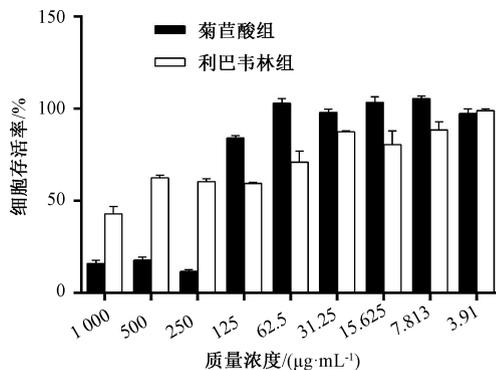


图 1 菊苣酸和利巴韦林对 Hep-2 细胞的毒性作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 菊苣酸对 RSV 的抑制作用 由图 2 可知，细胞对照组细胞呈现鳞形，数量多，排列紧密；病毒对照组细胞变圆，皱缩，间隙增大，脱落；菊苣酸组细胞排列紧密，未变圆；利巴韦林组中细胞出现大量病变，细胞变圆，发生皱缩，间隙增大，甚至脱落，提示药物在无药物毒性范围内能有效地抑制 RSV 引起的细胞病变。对菊苣酸和利巴韦林 (两者质量浓度均为 62.5 ~ 0.122 $\mu g/mL$) 抗 RSV 效果进行比较，发现菊苣酸优于利巴韦林 (P < 0.05)，见图 3。菊苣酸抑制 RSV 的 EC_{50} 值为 0.083 $\mu g/mL$ ，TI 为 2 071；利巴韦林 EC_{50} 值为 138.825 $\mu g/mL$ ，TI 为 4.2。

3.4 菊苣酸不同给药方式对 RSV 增殖的影响 感染 RSV 2 h 后添加菊苣酸，添加菊苣酸 2 h 后再接种 RSV 以及同时添加菊苣酸和 RSV 的 3 组实验中，菊苣酸对 RSV 均具有抑制作用，并且各实验组之间无明显差异 (P > 0.05)，见图 4。

3.5 菊苣酸抑制 RSV 复制时段的影响 分别在 RSV 吸附和穿入细胞时，添加不同浓度的菊苣酸进行干预，结果表明吸附和穿入组的细胞存活率皆与病毒组相当，并未因菊

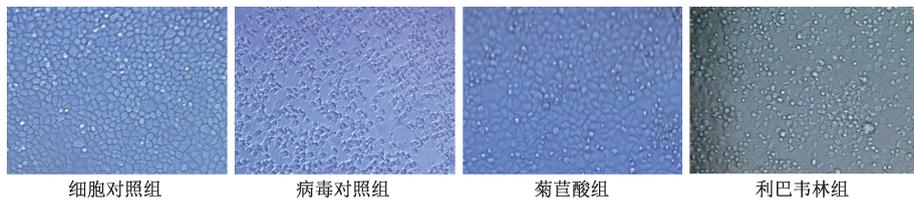
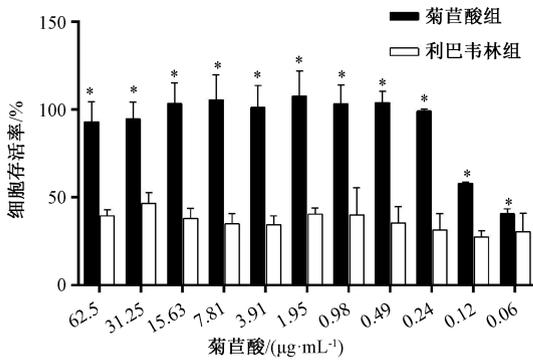


图2 菊苣酸和利巴韦林抑制 RSV Hep-2 细胞病变 (×200)



注：与利巴韦林组比较，* $P < 0.05$ 。

图3 菊苣酸对 RSV 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

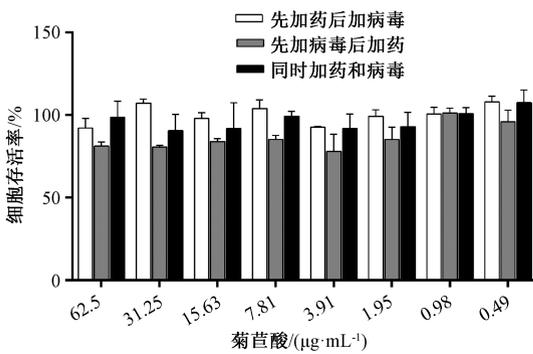
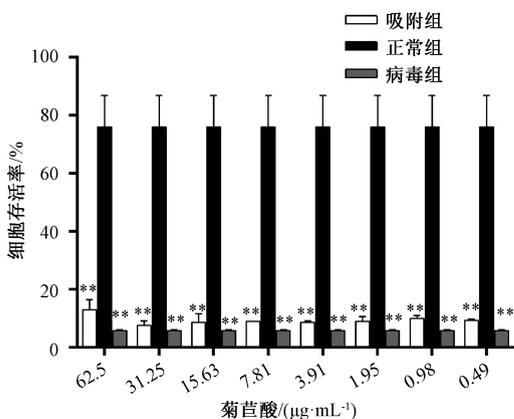


图4 菊苣酸不同给药方式抗 RSV 的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

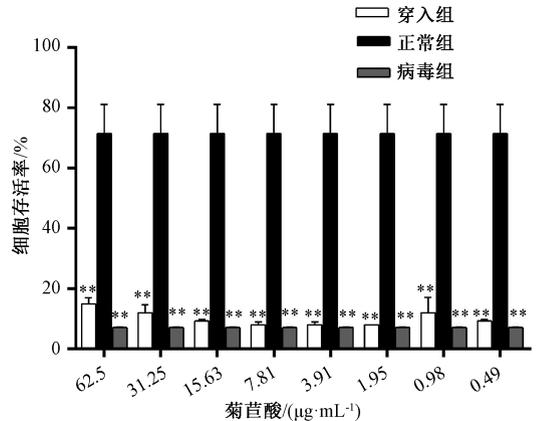
苣酸的干预而延缓细胞病变。由此表明，菊苣酸对 RSV 吸附和穿入细胞的过程无抑制作用，菊苣酸的抗 RSV 作用应发生在病毒穿入细胞以后的某个阶段，见图 5~6。



注：与正常组比较，** $P < 0.01$ 。

图5 菊苣酸对 RSV 吸附细胞的阻断作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 菊苣酸对 RSV 基因组复制的影响 与病毒对照组比



注：与正常组比较，** $P < 0.01$ 。

图6 菊苣酸对 RSV 穿入细胞的阻断作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

较，菊苣酸组和阳性对照利巴韦林组 RSV-F mRNA 表达低于病毒对照组 ($P < 0.01$)，说明在复制阶段，菊苣酸能够抑制 RSV 的复制表达 ($P < 0.01$)，见表 2。

表2 菊苣酸对 RSV 基因组复制的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	RSV-F mRNA 相对表达量
病毒对照组	0.775 ± 0.200
正常对照组	0.004 ± 0.001 ^{##}
菊苣酸组	0.014 ± 0.012 ^{##}
利巴韦林组	0.349 ± 0.101 ^{##}

注：与病毒组比较，^{##} $P < 0.01$ 。

4 讨论

本研究通过细胞病变效应法在细胞水平研究菊苣酸抗 RSV 的作用，结果表明，菊苣酸对 RSV 在 Hep-2 细胞内的复制过程具有抑制作用，其 EC_{50} 值为 $0.083 \mu\text{g/mL}$ ，TI 为 2 071，根据新药药理毒理学研究指导原则， $TI > 2$ 则视为高效低毒^[15]。不同给药方式的实验结果显示，无论是先感染 RSV 还是先加入菊苣酸，菊苣酸都具有抑制 RSV 的作用，表明菊苣酸在 RSV 侵入细胞的阶段并未发挥其抗病毒作用。菊苣酸阻断 RSV 穿入与吸附的实验研究表明，干预组细胞存活率与病毒对照组无显著差异，并未因为菊苣酸的干扰而延缓细胞病变，即菊苣酸对 RSV 吸附和穿入细胞的过程均无抑制作用。RT-qPCR 结果表明，菊苣酸可以抑制 RSV 基因组的复制。因此，可以确定菊苣酸对 RSV 的抑制是发生在病毒穿入细胞后的阶段。

菊苣酸是从天然植物中提取出来的活性成分，成分单一明确，安全性相对较高。目前，临床上常用的抗 RSV 药物为西药利巴韦林，然而其只适合病重者及高危人群的治疗

疗^[16]，并且在临床上具有一定的不良反应，如头痛、恶心、出血、高剂量利巴韦林对心脏还有损伤^[17-18]，因此其治疗的有效性和安全性依然有待研究^[19]。本研究还发现其阳性对照利巴韦林的TI为4.2，抑制RSV的效果弱于菊苣酸，提示菊苣酸有望成为抗RSV的候选药物的主要有效成分。

另外，菊苣酸对RSV穿入细胞后的抗病毒机制可能为①阻止RSV的蛋白表达，或阻断非结构蛋白的功能；②诱导细胞产生IFN；③刺激免疫细胞或诱导多种细胞因子发挥免疫调节作用。菊苣酸确切的抗病毒机制还需要进一步的研究。

综上所述，菊苣酸具有显著的抗RSV作用，提示其具有用于治疗RSV感染的良好前景，且为进一步的体内实验和临床应用提供了理论基础。

参考文献：

[1] Sedeyn K, Schepens B. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2: exceptional disrupters of innate immune responses[J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(10): e1007984.

[2] Pandya M C, Callahan S M, Savchenko K G, et al. A contemporary view of respiratory syncytial virus (RSV) biology and strain-specific differences[J]. *Pathogens*, 2019, 8(2): 67.

[3] Barr R, Green C A, Sande C J, et al. Respiratory syncytial virus: diagnosis, prevention and management [J]. *Ther Adv Infect Dis*, 2019, 6: 2049936119865798.

[4] Nair H, Nokes D J, Gessner B D, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet*, 2010, 375(9725): 1545-1555.

[5] 吴启林. 紫锥菊中菊苣酸提取纯化工艺研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2004.

[6] 郭建伟. 紫锥菊中菊苣酸和单咖啡酰酒石酸纯化工艺及菊苣酸性质研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2009.

[7] 刘铁琛. 中国引种紫锥菊中酚酸类成分的研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2008.

[8] 王晓琴, 吴 华, 张 辉. 紫锥菊提取物菊苣酸对高寒放牧牦牛抗氧化能力的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(7): 51-54.

[9] Zhang H L, Dai L H, Wu Y H, et al. Evaluation of hepatocyteprotective and anti-hepatitis B virus properties of cichoric acid from cichorium intybus leaves in cell culture[J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(7): 1214-1220.

[10] Langland J, Jacobs B, Wagner C, et al. Antiviral activity of metal chelates of caffeic acid and similar compounds towards herpes simplex, VSV-Ebola pseudotyped and vaccinia viruses [J]. *Antiviral Res*, 2018, 160: 143-150.

[11] Robinson W E Jr. L-chicoric acid, an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase, improves on the *in vitro* anti-HIV-1 effect of Zidovudine plus a protease inhibitor (AG1350) [J]. *Antiviral Res*, 1998, 39(2): 101-111.

[12] Ramakrishnan M A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula[J]. *World J Virol*, 2016, 5(2): 85-86.

[13] Haas B, Weber-Lassalle K, Frötschl R, et al. Is sunitinib a narrow therapeutic index drug? —A systematic review and *in vitro* toxicology-analysis of sunitinib vs. imatinib in cells from different tissues [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 77: 25-34.

[14] Liu Q, Lu L, Hua M L, et al. Jiawei-Yupingfeng-Tang, a Chinese herbal formula, inhibits respiratory viral infections *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(2): 521-528.

[15] 何立巍, 杨婧妍, 侯宪邦. 板蓝根正丁醇部位抗病毒活性组分及相关化学成分研究[J]. *中草药*, 2017, 48(14): 2843-2849.

[16] Nokes J D, Cane P A. New strategies for control of respiratory syncytial virus infection [J]. *Curr Opin Infection Dis*, 2008, 21(6): 639-643.

[17] 李亚兰, 杜建红, 鄯革红. 广谱抗病毒核苷类药物利巴韦林的研究进展[J]. *西藏医药杂志*, 2012, 33(2): 37-38.

[18] 金 金, 吕 健, 王志飞, 等. 感咳双清胶囊治疗急性上呼吸道感染有效性与安全性的系统评价与Meta分析[J]. *世界中医药*, 2020, 15(1): 24-29.

[19] Douglas J L. In search of a small-molecule inhibitor for respiratory syncytial virus [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2004, 2(4): 625-639.