OL]. [2021-11-19]. http://www.who.int/foodsafety/publications/jecfa-reports/en.html.
[26] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary report of the seventy-second meeting of JECFA[EB/OL]. [2021-11-21]. http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/summary72.pdf?ua=1.html.
[27] 聂黎行, 查祎凡, 左甜甜, 等. 基于 ICP-MS 和对照制剂的牛黄清胃丸中重金属及有害元素残留量测定及风险评估[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1): 82-87.
[28] 刘丽君, 韩静磊, 钱益斌, 等. 利用靶器官毒性剂量法(TTD)和证据权重分析法(WOE)评估固化飞灰中重金属非致癌健康风险[J]. 环境化学, 2019, 38(5): 1014-1020.
[29] US EPA. Risk assessment guidance for superfund, vol. I: human health evalution manual[EB/OL]. [2022-02-20]. https://www.epa.gov/sites/production/files/documents/rags_a.pdf.

6 种中成药对 SARS-CoV-2 3CLpro 和 PLP 活性的抑制作用

刘衍梁[1], 韩雨秀[1], 王含雪[1], 杜瑞坤[1,2], 容 蓉[1,3], 叶冬雪[1,2,3,4], 齐冬梅[1,2,3,4], 刘孝云[1,2,3,4*], 杨 勇[1,2,3,4*]
(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东省中医药抗病毒工程研究中心, 山东 济南 250355; 3. 中医药经典理论教育部重点实验室, 山东 济南 250355; 4. 中医药基础研究山东省重点实验室, 山东 济南 250355)

摘要: 目的 研究治疗新型冠状病毒肺炎不同时期的 6 种中成药对 3C 样蛋白酶(3CLpro)和木瓜样蛋白酶(PLP)的抑制作用, 探讨其干预新型冠状病毒肺炎的机制。**方法** 经镍柱纯化获得原核表达且纯度高的 3CLpro 和 PLP。基于荧光共振能量转移原理, 建立 3CLpro 和 PLP 活性检测的药物筛选模型, 分别以 3CLpro 抑制剂依布硒、PLP 抑制剂 GRL0617 验证筛选模型的有效性。在此基础上, 开展针对新型冠状病毒肺炎临床不同时期(医学观察期、轻型、普通型、重型、危重型)的代表性 6 种中成药靶向抑制 3CLpro 和 PLP 活性的研究。**结果** 金花清感颗粒、疏风解毒胶囊、热毒宁注射液、血必净注射液、痰热清注射液对 3CLpro 具有较强的抑制作用(抑制率>80%), 同时疏风解毒胶囊、痰热清注射液、热毒宁注射液对 PLP 也具有较强的抑制作用(抑制率>80%)。**结论** 金花清感颗粒等 6 种中成药对 3CLpro 或 PLP 都有较强的抑制作用, 这可能是它们针对新型冠状病毒肺炎临床不同时期发挥抗 SARS-CoV-2 的内在机制。另外, 疏风解毒胶囊、痰热清注射液、热毒宁注射液对新型冠状病毒 2 个靶蛋白酶活性的抑制作用都较强, 可能具有潜在抗病毒活性。

关键词: 中成药; 新型冠状病毒; 3CLpro; PLP; 荧光共振能量转移; 抗病毒
中图分类号: R373 **文献标志码**: B **文章编号**: 1001-1528(2023)04-1279-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.042

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)属于 β 型冠状病毒, 是一种有包膜的单链正义 RNA 病毒, 病毒的基因组 RNA 含有大约 30 000 个碱基[1]。SARS-CoV-2 进入宿主细胞后, 分解并释放出病毒 RNA, 借由宿主细胞的核糖体翻译产生 2 种多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab, 随后被 3C 样蛋白酶(3CLpro)和木瓜样蛋白酶(PLP)切割, 产生 16 种成熟的非结构蛋白, 组成复制-转录复合物[2], 以完成后续病毒基因组的复制和结构蛋白的合成。3CLpro 对病毒复制所需要的功能蛋白的成熟起到剪切、加工的重要作用, 同时, 3CLpro 进化保守且人体缺乏其同源蛋白酶。PLP 除调控病毒复制与转录之外, 还可以催化去泛素化以及从宿主蛋白中移除干扰素刺激基因 15[3-4], 以帮助冠状病毒逃避宿主的先天免疫反应, PLP 在冠状病毒的进化过程中高度保守且不易发生突变。因此, 3CLpro 和 PLP 是广谱抗新型冠状病毒药物开发的重要靶标。到目前为止, 已有报道的 3CLpro 抑制剂有博赛泼维、GC-376、钙蛋白酶抑制剂 II、

收稿日期: 2022-08-02
基金项目: 国家自然科学基金项目(81873220); 山东省自然科学基金项目(ZR2021LZY012); 自主培养创新团队项目(2021GXRC028); 山东省中医药科技项目(2020Q001); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2020CXGC010505)
作者简介: 刘衍梁(1997—), 女, 硕士, 从事中药抗病毒机制研究。Tel: 17854111125, E-mail: liuyanliangww@126.com
*通信作者: 刘孝云(1990—), 女, 博士, 讲师, 从事病毒致病机制及其抑制剂发现研究。Tel: 15634006362, E-mail: yunliu1123@163.com
杨 勇(1972—), 男, 博士, 教授, 从事中药抗病毒机制研究。Tel: 13953102044, E-mail: yy7204@163.com

XII[5]、依布硒[6]等；PLP 抑制剂有隐丹参酮、丹参酮 I[7]、YM155、GRL0617[8]等，但以上抑制剂目前均未用于新型冠状病毒肺炎（COVID-19）的临床治疗。

中医药在早期就积极介入 COVID-19 治疗并取得显著效果，在我国所确诊的病例中，中医药参与率达 91.5%，总有效率高达 90%[9]。国家卫生健康委员会将新冠肺炎的发展分为医学观察期、临床治疗期（轻型、普通型、重型、危重型）、恢复期 3 个阶段。虽然中医药发挥了重要的作用，但中药存在有效成分不确定、作用靶点和机制不明等问题，影响了其在临床上更合理和靶向性的应用。因此，本研究选择了在 SARS-CoV-2 复制中起重要作用的蛋白酶 3CLpro 与 PLP 作为靶点，对《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》推荐的 6 种中成药进行靶向抑制 3CLpro 和 PLP 活性的比较，以期为相关中成药在 COVID-19 治疗中的应用提供基础研究证据和参考。

1 材料

1.1 试剂 氨苄青霉素、胰蛋白胨、琼脂粉、酵母提取物、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）、二硫苏糖醇（DTT）、甘氨酸、TRIS、SDS、EDTA（北京索莱宝科技有限公司）；3CLpro 荧光底物 Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans、PLP 荧光底物 Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC（南京肽业生物科技有限公司）；12% SDS-PAGE 凝胶超快速配制试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（5×）（上海碧云天生物技术有限公司）；蛋白 Marker（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；β-巯基乙醇（美国 Amresco 公司）；考马斯亮蓝染液试剂盒［赛文创新（北京）科技有限公司］。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 药物 依布硒、GRL0617（美国 MedChemExpress 公司）；金花清感颗粒［聚协昌（北京）药业有限公司，批号 20201008］；疏风解毒胶囊（安徽济人药业股份有限公司，批号 3201004）；藿香正气胶囊（云南白药集团股份有限公司，批号 ZDB2104）；痰热清注射液（上海凯宝药业股份有限公司，批号 2101309）；热毒宁注射液（江苏康缘药业股份有限公司，批号 200702）；血必净注射液（天津红日药业股份有限公司，批号 2102012）。

1.3 仪器 AKTA Pure 纯化仪、HisTrap HP 亲和层析柱（美国 Cytiva 公司）；超声波细胞粉碎仪（宁波新芝生物科技股份有限公司）；超微量分光光度计（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；数显恒温振荡器（常州上特仪器制造有限公司）；蛋白质电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；胶片观察灯（北京六一生物科技有限公司）；Neo2 型多功能酶标仪（美国 BioTek 公司）。

2 方法

2.1 3CLpro、PLP 表达与纯化 含有 pGEX-6P-1-SARS-CoV-2-3CL 质粒（C 端携带 His 标签）的大肠杆菌表达菌株 BL21、含有 pET-32a（+）-SARS-CoV-2-PLP 质粒（N 端携带 Trix-His6-S 标签）的大肠杆菌表达菌株 BL21 均由山东中医药大学杜瑞坤博士馈赠。当 3CLpro 或 PLP 表达菌株的光密度（OD）为 0.4～0.6 时，加入 IPTG（终浓度 1 mmol/L），在 25 ℃下诱导 6 h，菌液离心后保留菌体。用裂解缓冲液（20 mmol/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$、0.5 mol/L NaCl，pH 7.4）重悬，使用超声波细胞破碎仪破碎菌体，离心后保留上清液。利用 AKTA Pure 纯化仪及 HisTrap HP 亲和层析柱纯化 3CLpro 或 PLP，纯化后的 3CLpro 或 PLP 经 12% SDS-PAGE 凝胶分离并用考马斯亮蓝染色后检测其纯度。

2.2 3CLpro、PLP 最佳反应浓度确定 用 3CLpro 酶活缓冲液（50 mmol/L Tris-buffer、1 mmol/L EDTA，pH 7.3）或 PLP 酶活缓冲液（20 mmol/L Tris-buffer、4 mmol/L DTT，pH 8.0）将纯化所得的 3CLpro 或 PLP 及其荧光底物稀释，在黑色透明底的 96 孔板中，将不同浓度的 3CLpro 或 PLP（40 μL/孔）与 DMSO（10 μL/孔）混匀，室温孵育 30 min 后，加入 3CLpro 或 PLP 荧光底物（50 μL/孔，终浓度为 25 nmol/L 或 30 nmol/L）。立即用多功能酶标仪检测荧光强度，检测条件为增益值为 100，温度为室温，激发光为 336 nm（3CLpro）、360 nm（PLP），发射光为 490 nm，检测间隔为 30 s，检测总时间为 60 min。

2.3 药物配制 依布硒、GRL0617 及 6 种中成药均用 DMSO 溶解。在药物抑制蛋白酶活性实验中，依布硒、GRL0617 以 2 倍倍比稀释，共 6 个梯度。

3 种口服中成药取其内容物，碾磨成粉末并混合均匀，分别取一定量用 DMSO 溶解，根据药物说明书中每日总用药量的 1/13 000 稀释，即为实验中每孔实际用量，具体见表 1。文献报道部分口服中成药体外实验用药量范围为 0.125～2 mg/mL[10-11]，而本研究中为 0.185～1.154 mg/mL。

表 1 口服中成药用药量

名称	每日总用量/g	实验用量/(mg·孔$^{-1}$)
金花清感颗粒	15	0.115 4
藿香正气胶囊	2.4	0.018 5
疏风解毒胶囊	6.24	0.048 0

3 种注射中成药各取 3 支，分别混匀后再取一定体积用于后续实验，根据每日总用药量的 1/2 000 稀释，即为实验中每孔实际用量，具体见表 2。文献报道部分注射中成药体外实验用药量范围为 2～320 μL/mL[12-13]，而本研究中为 10～100 μL/mL。

表 2 注射中成药用药量

名称	每日总用量/mL	实验用量/(μL·孔$^{-1}$)
痰热清注射液	80	4
血必净注射液	200	10
热毒宁注射液	20	1

2.4 药物对 3CLpro、PLP 活性的抑制作用 在黑色透明底的 96 孔板中，将 3CLpro 或 PLP（40 μL/孔，终浓度 100 nmol/L）与不同药物（10 μL/孔，药物体积不足 10 μL/孔者用 DMSO 补足）混匀，室温孵育 30 min 后加入 3CLpro 或 PLP 荧光底物（50 μL/孔，终浓度 25 nmol/L 或 30 nmol/L），立即用多功能酶标仪按“2.2”项下条件检测荧光强度。根据反应 1 h 时不同药物荧光强度的增加值计算药物抑制

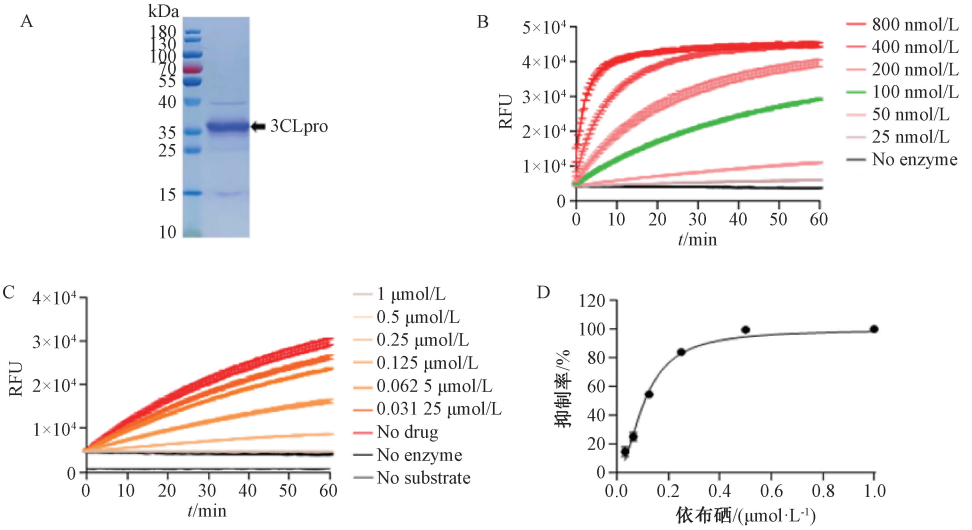
率，公式为抑制率 =（1 − $\Delta RFU_{药物}/\Delta RFU_{不含药物}$）×100%，并用 GraphPad Prism 8.0 拟合依布硒、GRL0617 的抑制曲线，计算其 IC_{50} 值。

3　结果

3.1　基于 3CLpro 活性的药物筛选体系的建立与验证　如图 1A 所示，3CLpro 在相对分子量为 35 kDa 位置上有明显的蛋白条带，与预测的 3CLpro 大小一致，表明 3CLpro 的纯化效果较好。

切割 25 nmol/L 3CLpro 荧光底物时，800 nmol/L 3CLpro 仅需约 10 min 即可基本完全切割荧光底物，产生的荧光强度约为 43 000，400 nmol/L 3CLpro 则需要约 25 min；其他浓度 3CLpro 则不能完全切割荧光底物。1 h 内 200、100、50、25 nmol/L 3CLpro 切割荧光底物所产生的荧光强度分别为 40 000、29 000、11 000、6 000，见图 1B。其中，100 nmol/L 3CLpro 的酶促曲线线性较好，1 h 内的荧光强度增加值适中，约为 24 000，因此选择 100 nmol/L 3CLpro 切割 25 nmol/L 3CLpro 荧光底物作为后续的酶促反应条件，并检测 1 h 内荧光强度的增加值。文献［14］报道，250 nmol/L 3CLpro 切割 50 nmol/L 3CLpro 荧光底物，检测 30 min 后荧光强度增加值略有差异，而本研究节约了 3CLpro 蛋白酶与 3CLpro 底物用量，检测时间延长，更能完整反映抑制剂的作用。

为了验证上述建立的 3CLpro 的酶促反应条件是否适用于药物筛选，选用已报道可抑制 3CLpro 活性的药物依布硒[7]对该体系进行验证。如图 1C 所示，随着依布硒浓度的增加，荧光强度的增加值逐渐降低，为 1.000、0.500、0.250、0.125、0.063、0.031 μmol/L 时，1 h 内的增加值分别为 − 80、30、4 000、11 000、19 000、21 000，对 3CLpro 的抑制率分别为（100.339 ± 0.151）%、（99.870 ± 0.110）%、（84.270 ± 0.420）%、（54.721 ± 1.724）%、（25.282 ± 2.940）%、（14.772 ± 3.343）%，表明依布硒对 3CLpro 活性有良好的抑制作用，并且该筛选体系可反映药物剂量依赖关系。通过拟合计算，得出依布硒对 3CLpro 的 IC_{50} 为（0.107 ± 0.006）μmol/L，见图 1D，虽然与文献［14］报道的（0.670 ± 0.033）μmol/L 相比偏小，但标准差更小，重复性更好，可用于筛选 3CLpro 的抑制剂。



注：A 为 3CLpro 的纯化，B 为不同浓度 3CLpro 的酶促反应曲线，C 为不同浓度依布硒作用下 3CLpro 的酶促反应曲线，D 为依布硒的量效曲线及 IC_{50}。No drug 为不含药物只含 DMSO 的阴性对照，No enzyme 为不含 3CLpro 的空白对照，No substrate 为不含 3CLpro 荧光底物的空白对照。

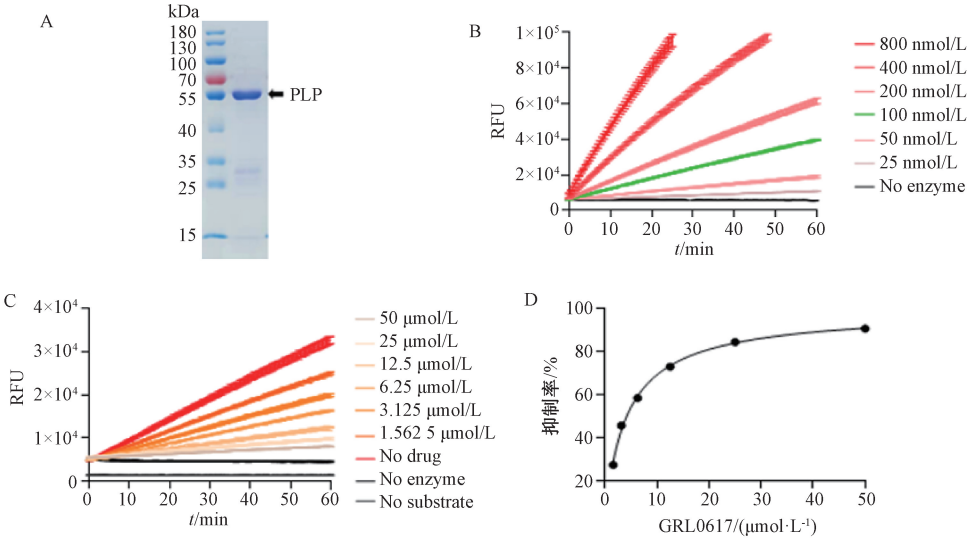
图 1　基于 3CLpro 活性的药物筛选体系（n=3）

3.2　基于 PLP 活性的药物筛选体系的建立与验证　如图 2A 所示，PLP 在相对分子量为 55 kDa 位置上有明显的蛋白条带，与预测值一致，表明 PLP 的纯化效果较好。

切割 30 nmol/L PLP 荧光底物时，800 nmol/L PLP 在反应约 25 min 时，荧光强度超出检测限，约为 100 000，400 nmol/L PLP 则需反应约 48 min；其他浓度 PLP 则不能完全切割荧光底物。1 h 内 200、100、50、25 nmol/L PLP 荧光强度分别为 60 000、40 000、20 000、10 000，见图 2B。其中，100 nmol/L PLP 的酶促曲线线性较好，1 h 内的荧光强度增加值适中，约为 33 000，因此选择 100 nmol/L PLP 切割 30 nmol/L PLP 荧光底物作为后续的酶促反应条件，并检测 1 h 内荧光强度的增加值，与文献［14］报道一致。

为了验证上述建立的 PLP 的酶促反应条件是否适用于药物筛选，选用已报道可抑制 PLP 活性的药物 GRL0617[3]对该体系进行验证。如图 2C 所示，随着 GRL0617 浓度的增加，荧光强度的增加值逐渐降低，为 50.000、25.000、12.500、6.250、3.125、1.563 μmol/L 时，1 h 内的增加值分别为 2 600、4 300、7 500、12 000、15 000、20 000，对 PLP 的抑制率分别为（90.684 ± 0.195）%、（84.516 ± 0.221）%、（73.023 ± 0.406）%、（58.488 ± 0.626）%、（45.797 ± 1.173）%、（27.485 ± 0.439）%，表明 GRL0617 对 PLP 活性有良好的抑制作用，并且该筛选体系可反映药物

剂量依赖关系。通过拟合计算得出 GRL0617 对 PLP 的 IC_{50} 为（4.141±0.132）μmol/L，见图 2D，与文献［3］报道的（2.1±0.2）μmol/L 较接近，并且标准差更小，可用于筛选 PLP 的抑制剂。

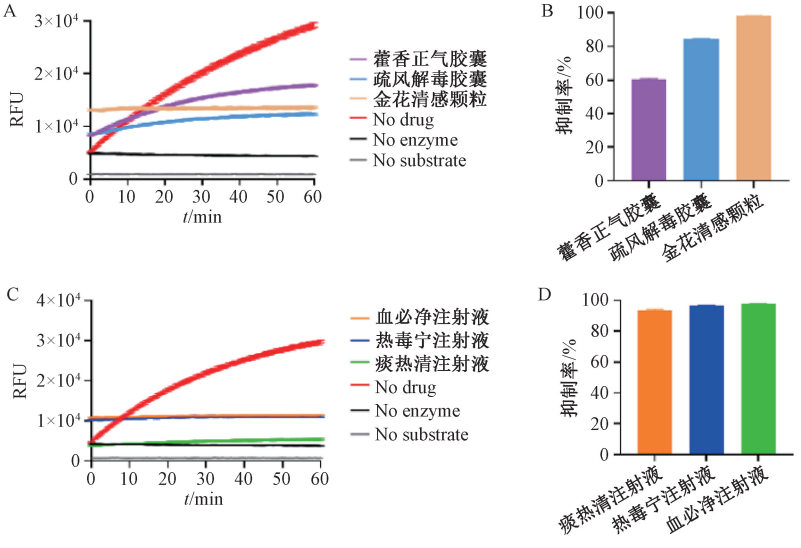


注：A 为 PLP 的纯化，B 为不同浓度 PLP 的酶促反应曲线，C 为不同浓度 GRL0617 作用下 PLP 的酶促反应曲线，D 为 GRL0617 的量效曲线及 IC_{50}。No drug 为不含药物只含 DMSO 的阴性对照，No enzyme 为不含 PLP 的空白对照，No substrate 为不含 PLP 荧光底物的空白对照。

图 2　基于 PLP 活性的药物筛选体系（n=3）

3.3　6 种中成药对 3CLpro 的抑制效果　口服中成药藿香正气胶囊、疏风解毒胶囊、金花清感颗粒在 1 h 内的荧光强度增加值分别为 9 500、3 700、500，见图 3A；对 3CLpro 的抑制率分别为（60.485±0.485）%、（84.566±0.069）%、（98.019±0.380）%，见图 3B。结果表明，藿香正气胶囊对 3CLpro 的抑制效果相对较差，而疏风解毒胶囊、金花清感颗粒对 3CLpro 的抑制率在 80% 以上，抑制效果较好。

注射中成药痰热清注射液、热毒宁注射液、血必净注射液在 1 h 内的荧光强度增加值分别为 1 700、900、600，见图 3C；对 3CLpro 的抑制率分别为（93.388±0.854）%、（96.511±0.346）%、（97.721±0.154）%，见图 3D。结果表明，痰热清注射液、热毒宁注射液、血必净注射液对 3CLpro 的抑制率均在 90% 以上，抑制效果较好。



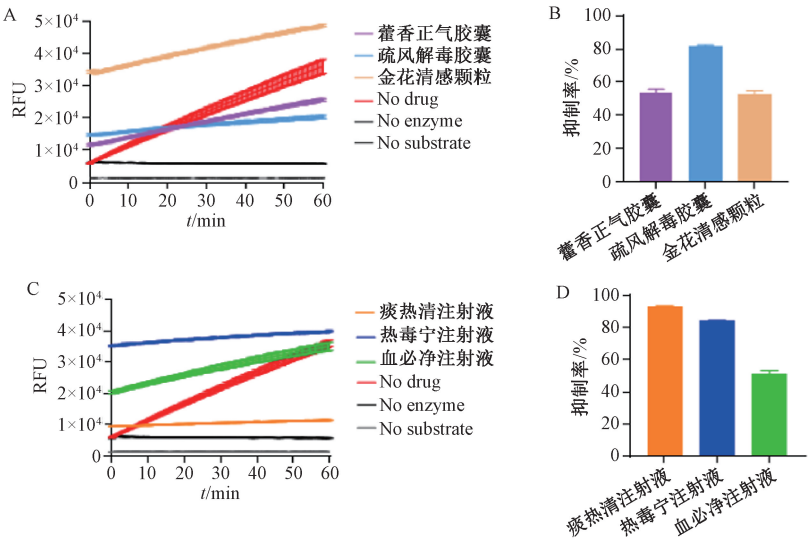
注：A 为口服中成药的 3CLpro 的酶促反应曲线，B 为口服中成药对 3CLpro 的抑制率，C 为注射中成药的 3CLpro 的酶促反应曲线，D 为注射中成药对 3CLpro 的抑制率。No drug 为不含药物只含 DMSO 的阴性对照，No enzyme 为不含 3CLpro 的空白对照，No substrate 为不含 3CLpro 荧光底物的空白对照。

图 3　不同中成药对 3CLpro 的抑制效果

3.4　6 种中成药对 PLP 的抑制效果　口服中成药金花清感颗粒、藿香正气胶囊、疏风解毒胶囊在 1 h 内的荧光强度增

加值分别为 15 000、14 000、5 600，见图 4A；对 PLP 的抑制率分别为（52.276 ± 2.490）%、（53.120 ± 2.600）%、（81.536±0.832）%，见图 4B。结果表明，疏风解毒胶囊对 PLP 的抑制率在 80% 以上，抑制效果较好，而金花清感颗粒、藿香正气胶囊对 PLP 的抑制效果相对较差。

注射中成药血必净注射液、热毒宁注射液、痰热清注射液在 1 h 内的荧光强度增加值分别为 15 000、5 000、2 000，见图 4C；对 PLP 的抑制率分别为（50.874 ± 2.213）%、（84.305±0.129）%、（93.390±0.097）%，见图 4D。结果表明，热毒宁注射液、痰热清注射液对 PLP 的抑制率在 80% 以上，抑制效果较好，而血必净注射液对 PLP 的抑制效果相对较差。



注：A 为口服中成药的 PLP 的酶促反应曲线，B 为口服中成药对 PLP 的抑制率，C 为注射中成药的 PLP 的酶促反应曲线，D 为注射中成药对 PLP 的抑制率。No drug 为不含药物只含 DMSO 的阴性对照，No enzyme 为不含 PLP 的空白对照，No substrate 为不含 PLP 荧光底物的空白对照。

图 4　不同中成药对 PLP 的抑制效果

6 种中成药对 3CLpro 和 PLP 的抑制率效果比较见图 5，可知疏风解毒胶囊、痰热清注射液、热毒宁注射液对 3CLpro 和 PLP 均有较好的抑制效果。

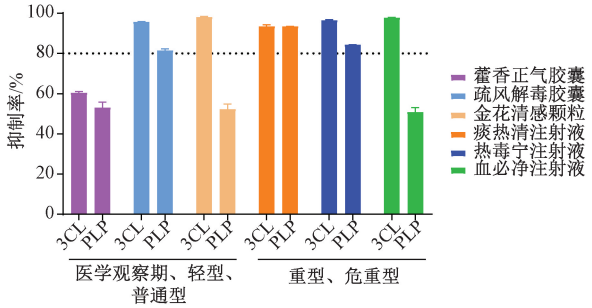


图 5　6 种中成药对 3CLpro 和 PLP 的抑制率比较

4　讨论

与成分明确但抗病毒谱局限、易出现耐药性的化学药相比，中药具有多成分、多层次、多靶点的特征，广谱抗病毒、不易产生耐药性等特点，可以发挥整体干预作用。

3CLpro 和 PLP 是 SARS-CoV-2 所含的与病毒复制、转录相关的重要蛋白酶，且不易发生突变，因此，3CLpro 和 PLP 是抗 SARS-CoV-2 药物研发的重要靶标。本研究在成功制备高纯度原核表达的 3CLpro 和 PLP 基础上，利用荧光共振能量转移原理，对酶促反应中的蛋白质浓度进行优化，建立基于 3CLpro 和 PLP 活性的抗 SARS-CoV-2 药物的筛选模型，并用 3CLpro 抑制剂依布硒和 PLP 抑制剂 GRL0617 验证筛选体系的可靠性和灵敏度。

基于建立的药物筛选模型，本课题研究了国家卫健委发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》第九版中的 6 种中成药靶向抑制 3CLpro 和 PLP 活性的作用。按照临床给药剂量稀释一定比例后，发现金花清感颗粒、疏风解毒胶囊、热毒宁注射液、血必净注射液、痰热清注射液对 3CLpro 抑制率均大于 90%，藿香正气胶囊的抑制率约为 60%，以上中成药中出现频率较高的药材为金银花、连翘、甘草以及青蒿。文献［15-19］报道的分子对接结果显示，这些药材中包括的重要活性成分槲皮素、山柰酚、木犀草素、β-谷甾醇以及豆甾醇与 3CLpro 有较好的结合活性，而血必净注射液中红花、丹参同样含有这些化合物[20]，因此这些中成药可能通过抑制 3CLpro 活性从而发挥抗 SARS-CoV-2 的作用。

疏风解毒胶囊、痰热清注射液、热毒宁注射液同样对 PLP 有较好的抑制作用，抑制率均大于 80%，推测其潜在的抗病毒活性更强。而金花清感颗粒、血必净注射液、藿香正气胶囊对 PLP 的抑制率均在 50% 以上。报道称丹参酮类化合物可抑制 PLP 活性[7]，血必净注射液中含有丹参提取物，其抗 PLP 作用应该与这类成分有关。由于与 PLP 抑制剂的相关研究报道较少，根据这些中成药共有的药材推测，金银花、连翘、甘草、青蒿中的成分可能具有抑制

PLP 活性作用。

疏风解毒胶囊、藿香正气胶囊，金花清感颗粒均为 COVID-19 医学观察期、轻型、普通型用药，痰热清注射液、热毒宁注射液、血必净注射液为 COVID-19 重型、危重型用药，以上中成药对 3CLpro、PLP 均有抑制作用。它们一方面可对症治疗，另外也有助于增强免疫力，从而抵抗病毒侵袭[21-22]。目前已有文献报道黄酮类化合物如芦荟素、木犀草素、槲皮素等通过抑制 3CLpro 直接发挥抗冠状病毒活性[23]，与本研究的中成药多含有此类成分相吻合。因此，黄酮类化合物对 3CLpro、PLP 靶点及 SARS-CoV-2 的抑制研究将是中药有效成分抗新冠病毒的一个重要方向。

参考文献：

[1] Mathieu C, Touret F, Jacquemin C, *et al*. A Bioluminescent $3CL^{Pro}$ activity assay to monitor SARS-CoV-2 replication and identify inhibitors[J]. *Viruses*, 2021, 13(9): 1814.

[2] Hu B, Guo H, Zhou P, *et al*. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3): 141-154.

[3] Arya R, Prashar V, Kumar M. Evaluating stability and activity of SARS-CoV-2 PLpro for high-throughput screening of inhibitors [J]. *Mol Biotechnol*, 2022, 64(1): 1-8.

[4] Smith E, Davis-Gardner M E, Garcia-Ordonez R D, *et al*. High-throughput screening for drugs that inhibit papain-like protease in SARS-CoV-2[J]. *SLAS Discov*, 2020, 25(10): 1152-1161.

[5] Ma C L, Sacco M D, Hurst B, *et al*. Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease[J]. *Cell Res*, 2020, 30 (8): 678-692.

[6] Brown A S, Ackerley D F, Calcott M J. High-throughput screening for inhibitors of the SARS-CoV-2 protease using a FRET-biosensor[J]. *Molecules*, 2020, 25(20): 4666.

[7] Ma C L, Wang J. Validation and invalidation of SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors[J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2022, 5(2): 102-109.

[8] Ma C L, Sacco M D, Xia Z L, *et al*. Discovery of SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors through a combination of high-throughput screening and a FlipGFP-based reporter assay[J]. *ACS Cent Sci*, 2021, 7(7): 1245-1260.

[9] 彭文潘，徐 泳，韩 迪，等. 基于网络药理学和分子对接探究金花清感颗粒治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制[J]. 天然产物研究与开发，2020，32(12)：1992-2002.

[10] 刘倩茹，王新陆，朱明军，等. 参附益心颗粒对 Ang Ⅱ 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤及 PGC-1α 信号通路相关因子的影响[J]. 中医杂志，2022，63(7)：679-687.

[11] 邱剑飞，杨 珏，张知音，等. 金骨莲胶囊对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(24)：78-83.

[12] 李红娟，杨 军，姜 英，等. 参麦注射液对 p53 缺失 Hep3B 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中华中医药学刊，2016，34(10)：2500-2503.

[13] 林鑫山，胡 漫，徐恒卫，等. 血必净注射液对人鼻咽癌细胞生物学行为的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志，2016，23(7)：431-435.

[14] Chen Z N, Cui Q H, Cooper L, *et al*. Ginkgolic acid and anacardic acid are specific covalent inhibitors of SARS-CoV-2 cysteine proteases[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 45.

[15] 沈 浮，付中应，吴泳蓉，等. 基于网络药理学及高通量分子对接研究金花清感颗粒中结合 SARS-CoV-2 特定靶蛋白的活性化合物干预 COVID-19 的潜在分子机制[J]. 世界科学技术（中医药现代化），2020，22(3)：622-631.

[16] 谢 平，王晨情，叶雅惠，等. 基于网络药理学及分子对接虚拟筛选疏风解毒胶囊治疗新冠病毒肺炎（COVID-19）活性成分研究[J]. 药学研究，2021，40(9)：590-597；604.

[17] 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.

[18] 孔 艺，吴红卫，陈 永，等. 基于网络药理学和分子对接探讨痰热清注射液治疗新型冠状病毒肺炎（COVID-19）的机制[J]. 中草药，2020，51(7)：1785-1794.

[19] 殷 贝，毕艺鸣，李安香，等. 基于网络药理学和分子对接方法探讨热毒宁注射液抗新型冠状病毒的作用机制[J]. 中药新药与临床药理，2020，31(9)：1061-1069.

[20] 黄爱昊，张 颖，李晓凤，等. 基于网络药理学和分子对接技术初步探索血必净治疗新型冠状病毒肺炎作用机制[J]. 中药材，2020，43(9)：2324-2331.

[21] 王泽想，卢 丹，张 鹏，等. 藿香正气方的化学成分与药理作用及质量标志物的预测分析[J]. 中国医药科学，2019，9(21)：28-34；59.

[22] 王 亮，陶玉龙，陈万生. 痰热清注射液化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中草药，2020，51(12)：3318-3328.

[23] Malekmohammad K, Rafieian-Kopaei M. Mechanistic aspects of medicinal plants and secondary metabolites against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [J]. *Curr Pharm Des*, 2021, 27(38): 3996-4007.