

抗 EV71 3C 蛋白酶活性中药单体的虚拟筛选

张倩, 陈恬, 李祖锐, 潘渠, 曹康

成都医学院基础医学院, 四川 成都 610500

摘要: **目的** 通过虚拟筛选寻找抑制肠道病毒 71 型 (EV71) 3C 蛋白酶活性的中药单体化合物。 **方法** 从 TCM Database@Taiwan 数据库下载抗病毒中药的 1998 个化合物作为筛选对象, 以 EV71 3C 蛋白酶为药物靶点, 利用 AutoDock Vina 进行分子对接, 模拟中草药单体与 EV71 3C 蛋白酶的结合, 根据结合自由能大小对中药单体进行排序; 使用 Discovery Studio 2018 Visualizer 对得分 ≤ -37.673 kJ/mol 的中草药单体与 EV71 3C 蛋白酶进行相互作用分析, 观察其结合模式。 **结果** 虚拟筛选得到 2 个与 EV71 3C 蛋白酶结合较好的中药单体, 分别是原花青素 B5 (procyanidin B5) 和 1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -D-葡萄糖 (1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose)。 **结论** 从传统中药中筛选出抗 EV71 3C 蛋白酶的候选中药单体, 为体外抗 EV71 实验研究提供参考。

关键词: 肠道病毒 71 型; 3C 蛋白酶; 分子对接; 原花青素 B5; 1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -D-葡萄糖

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)18-4405-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.021

Virtual screening of Chinese herbal monomer against EV71 3C protease

ZHANG Qian, CHEN Tian, LI Zu-rui, PAN Qu, CAO Kang

School of Basic Medical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

Abstract: **Objective** To search for Chinese herbal monomer with the antiviral activity of enterovirus 71 (EV71) 3C protease by virtual screening. **Methods** A total of 1998 monomers from antiviral Chinese herbs downloaded from TCM Database@Taiwan database were chosen as screening ligands, and EV71 3C protease was selected as a target. The binding mode of Chinese herbal monomer and EV71 3C protease was simulated through the molecular docking tools of AutoDock Vina. The monomers were sorted according to the binding free energy. The binding poses of the monomers with docking scores less than -37.673 kJ/mol were visualized by Discovery Studio 2018 Visualizer program. **Results** Two monomers, namely, procyanidin B5 and 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose, were obtained with the lowest binding energies. **Conclusion** The promising candidate monomers with anti-EV71 3C protease activity were screened out from traditional Chinese medicine, providing an alternative method for further development of therapeutically useful anti-EV71 agents.

Key words: enterovirus 71; 3C protease; molecular docking; procyanidin B5; 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose

肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 是导致手足口病 (hand-foot-and-mouth disease, HFMD) 重症病例或死亡病例的主要病原体^[1-2], EV71 感染可能会引发无菌性脑膜炎、脑干脑炎或急性迟缓型麻痹等中枢神经系统疾病, 以及神经源性肺水肿或循环衰竭等心肺系统疾病, 甚至死亡^[3-5]。目前, 我国研发的 EV71 灭活疫苗已上市, 但该疫苗是针对 EV71 C4 亚型的单价疫苗, 病毒易变异, 无交叉免疫保护作用^[6]; 并且该疫苗属于第 2 类疫苗, 疫苗

接种人群需要自费, 接种行为较差^[7]。临床上主要使用利巴韦林、糖皮质激素和免疫球蛋白等药物治疗 HFMD^[3], 但还没有针对 EV71 所有毒株的多价疫苗和治疗 EV71 病毒的特效药物。因此, 迫切需要开展抗 EV71 病毒药物的研究。

EV71 是单正链小 RNA 病毒, 由 RNA 核心和病毒衣壳组成, 无包膜和刺突, 呈球形^[8]。EV71 感染宿主细胞后, 吸附于细胞受体上, 进入细胞内, 脱去病毒衣壳, 释放 RNA, 翻译多聚蛋白, 2A 蛋

收稿日期: 2019-03-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81173637); 四川省卫生健康委员会普及应用项目 (19PJ031)

作者简介: 张倩 (1987—), 女, 研究生在读, 研究方向为病理学与病理生理学。Tel: 15882445662 E-mail: 937548767@qq.com

*通信作者 陈恬 (1967—), 女, 教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为抗病毒药理。Tel: 18010518322 E-mail: chentianchina@126.com

白酶催化多聚蛋白水解为 3 个前体蛋白 (P1、P2 和 P3); 然后 3C 蛋白酶将前体蛋白切割成 4 个成熟的结构蛋白 (VP1~VP4) 和 7 个非结构蛋白 (2A~2C、3A~3D) [9-10]。EV71 3C 蛋白酶属于半胱氨酸蛋白水解酶, 其结构与其他小 RNA 病毒相似。EV71 3C 蛋白酶在蛋白合成过程中起着决定性作用, 该蛋白酶切割除 VP1/2A 和 3C/3D 前体蛋白外的 8 个连接位点 [11]。因此, 3C 蛋白酶是 EV71 病毒翻译后修饰的关键酶, 已成为抗 EV71 药物的重要靶点。

中药常被用于手足口病的临床治疗, 但其化学成分复杂多样, 其中单体抗 EV71 的作用机制尚不明确。随机选择中药化合物进行抗病毒药物的筛选具有盲目性, 效率低。随着生物信息学和计算机技术的快速发展, 计算机辅助药物设计 (computer aided drug design, CADD) 已成为一种快速准确地预测蛋白-配体复合物结合构象和亲和力的重要研究技术, 并已得到广泛应用 [12]。通过计算机高通量虚拟筛选抗 EV71 病毒的中药活性成分, 打破了传统细胞模型和动物模型筛选抗病毒药物的模式, 具有速度快和成本低等优点, 对找到抗 EV71 活性化合物具有重要意义。林子峰等 [13] 使用虚拟筛选方法从热毒宁注射液中筛选出抗 HRV 3C 蛋白酶的中药小分子化合物。Wang 等 [14] 采用分子对接方法从黄酮类化合物中找到 EV71 3C 蛋白酶抑制剂白杨素及其磷酸酯类衍生物。叶艳 [15] 通过虚拟对接, 从 SPECS 数据库中发现抑制 EV71 3C 蛋白酶的化合物 DC07090。

本研究把 EV71 3C 蛋白酶作为受体, 中药小分子化合物作为配体, 建立分子对接虚拟筛选模型, 模拟 EV71 3C 蛋白酶和中药单体之间的相互作用, 包括氢键、疏水作用、静电作用和范德华力等。通过计算受体与配体之间的相互作用, 预测两者的结合模式和亲和力, 从而对中药单体进行虚拟筛选, 筛选出抗 EV71 3C 蛋白酶的候选化合物, 为体外实验研究提供依据和指导。

1 材料与方法

1.1 软件

所有计算均在联想 ThinkServer 服务器上执行, 使用软件包括 Scripps 研究所的 AutoDock Tools 1.5.6 软件、Raccoon 软件 (<http://AutoDock.scripps.edu/>)、AutoDock Vina 软件 (<http://vina.scripps.edu/>) [16] 和 PyMol 软件 (<https://pymol.org/>) 以及 Accelrys 公司

的 Discovery Studio 2018 Visualizer 软件 (<http://www.3dsbiovia.com/>)。

1.2 药物靶点的选择

从蛋白质结构数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 查询并下载 EV71 3C 蛋白酶晶体结构。蛋白晶体结构的选择原则: ①来源于人类; ②采用 X-射线晶体衍射方法, 分辨率 ≤ 0.25 nm; ③氨基酸残基无突变; ④晶体结构含有小分子配体。本研究选择 EV71 3C 蛋白酶晶体结构 ID 为 3SJO [17], 这是 EV71 3C 蛋白酶与芦平曲韦 (rupintrivir, AG7088) 的复合物。将 3C 蛋白酶作为靶蛋白, AG7088 作为阳性对照。

1.3 3C 蛋白酶的处理

EV71 3C 蛋白酶晶体结构是由 A、B、C、D、E、F、G 和 H 链组成的 8 聚体, 每个单体有 2 个反方向排列的 β -桶状结构 [18]。本研究只保留晶体结构中含有 AG7088 的 1 个单链, 使用 AutoDock Tools 1.5.6 软件删除复合物中水分子, 分离配体和受体, 添加非极性氢, 计算 Gasteiger 电荷, 保存为 .pdbqt 文件。

1.4 中药单体数据库的建立

常见的抗病毒中药有金银花、板蓝根、鱼腥草和甘草等 65 种 [19], 从 TCM Database@Taiwan 数据库 [20] 中下载, 得到 1 998 个不重复的化合物, 使用 Raccoon 软件将所有小分子的 .mol2 文件格式批量转换为 .pdbqt 文件格式, 为后面分子对接做准备。

1.5 分子对接可行性验证

根据原始配体坐标, 以 AG7088 为中心, 活性中心 Gridbox 位置设置为 center_x = 9.708, center_y = -9.448, center_z = 4.195; 大小设置为 size_x = 24, size_y = 24, size_z = 24; spaces = 1, 其他参数均为默认值, 生成一个格点文件。使用 AutoDock Vina 软件将原始配体 AG7088 重新对接到 3C 蛋白酶活性口袋中, 分子对接完成后将对结构象与原始配体构象分别导入 Discovery Studio 2018 Visualizer, 计算均方根差 (RMSD)。

1.6 虚拟筛选与结果分析

采用 AutoDock Vina 软件, 将中药单体逐一放在 3C 蛋白酶的活性位点, 通过不断调整单体的位置和构象, 对其进行综合评分, 找出与 3C 蛋白酶结合较好的单体。本研究采用批处理程序编写脚本语言实现自动分子对接, 从而对大量中药单体进行虚拟筛选。分子对接完成后, 以原始配体 AG7088 打分为参照, 对接打分值从低到高进行排序; 使

用 Discovery Studio 2018 Visualizer 对得分较好的单体进行分析。

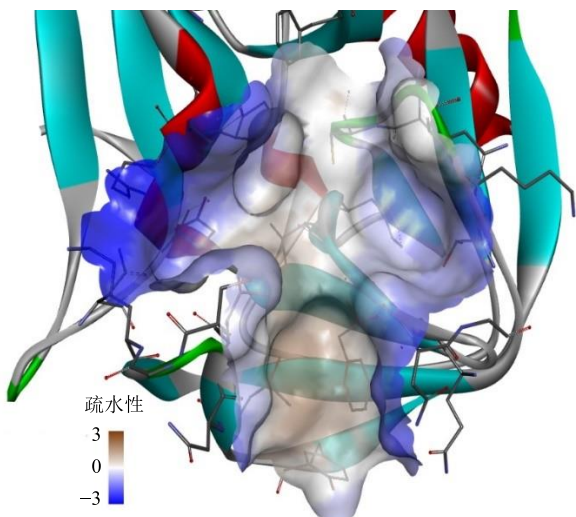
2 结果

2.1 分子对接模型验证

EV71 3C 蛋白酶 (3SJO) 活性口袋较深, 颜色由蓝色逐渐变为白色或棕色, 说明疏水性逐渐增强, 亲水性逐渐变弱, 这是一个疏水性的活性口袋, 适用于基于结构的虚拟筛选方法, 见图 1。对中药单体进行虚拟筛选前, 将 EV71 3C 蛋白酶与 AG7088 从复合晶体结构中分离, 然后使用 AutoDock Vina 软件将 3C 蛋白酶与 AG7088 重新进行分子对接, 检测对接程序和参数设置的适用性。分子对接完成后, 用 Discovery Studio 2018 Visualizer 计算对接构象与晶体构象的 RMSD 值等于 0.0822 1 nm。由图 2 可见, 对接构象与晶体构象非常接近。一般认为, $\text{RMSD} \leq 0.2 \text{ nm}$ 表示能较好地重复受体与配体原有的结合模式^[16], 该对接程序具有预测能力, 可用于虚拟筛选工作。

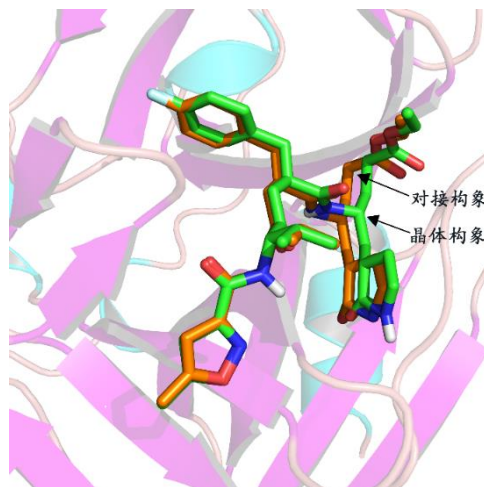
2.2 虚拟筛选

分子对接是通过计算小分子化合物与生物大分子的相互作用, 预测两者之间的亲和力。本研究使用 AutoDock Vina 软件, 将中药单体与 EV71 3C 蛋白酶 (3SJO) 进行分子对接, 计算受体与配体之间的结合自由能 (affinity)。根据自由能值排序, $\leq -33.487 \text{ kJ/mol}$ 的单体有 20 个, $\leq -37.673 \text{ kJ/mol}$ 的单体有



蓝色表示亲水性, 棕色表示疏水性
Blue indicates hydrophilicity, and brown indicates hydrophobicity

图 1 EV71 3C 蛋白酶 (3SJO) 活性口袋
Fig. 1 Binding pocket with EV71 3C protease



绿色棍棒状表示晶体构象, 橙色棍棒状表示对接构象
Green sticks indicate crystal conformation, and orange sticks indicate binding conformation

图 2 对接构象与晶体构象的叠合图

Fig. 2 Diagrams superposition of binding conformation and crystal conformation

2 个, 筛选结果见表 1。结合自由能是识别目标蛋白与小分子配体结合程度的评价标准, 自由能值越低, 表示二者结合力越强, 结合越紧密, 形成的复合物越稳定。由表 1 可见, 原花青素 B5 (procyanidin B5) 和 1,2,3,6-四-O-没食子酰基- β -D-葡萄糖 (1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose) 等中药单体可能抑制 EV71 3C 蛋白酶的生物活性。原花青素 B5 显示出最低的结合自由能, 其次是 1,2,3,6-四-O-没食子酰基- β -D-葡萄糖, 因此二者可能具有较好的抑制作用。

2.3 结合模式分析

Discovery Studio Visualizer 显示候选单体与 3C 靶蛋白酶 (3SJO) 的 3D 相互作用模式和 2D 相互作用模式。由图 3 可知, EV71 3C 蛋白酶与原花青素 B5 之间的相互作用不仅有氢键, 还有范德华力。原花青素 B5 与氨基酸 Ser128、Cys147 和 Thr142 形成常规氢键, 与 His40 形成碳氢键, 与 Gly164、Gly166 和 Asn165 有范德华引力, 还与 His40 形成 π - π 堆积作用, 与 Lys130 形成阳离子- π 相互作用, 这些作用力促使复合物的形成。

由图 4 可见, 1,2,3,6-四-O-没食子酰基- β -D-葡萄糖与 EV71 3C 蛋白酶之间的主要作用力是氢键和 π - π 堆积作用, 与 His24、Arg39、Thr142、Cys147 和 His161 形成常规氢键, 与 His24 和 Cys147 分别形成双氢键, 与 Ser128 和 His40 形成碳氢键, 还与 Phe25 和 His40 有 π - π 堆积作用, 与 Lys143 产生阳

表 1 候选中药单体
Table 1 Candidate monomers

TCM@ ID	化合物名称	药材来源	结合自由能/ (kJ·mol ⁻¹)
12541	原花青素 B5 (procyanidin B5)	山楂	-38.510
7902	1,2,3,6-四- <i>O</i> -没食子酰基- β - <i>D</i> -葡萄糖 (1,2,3,6-tetra- <i>O</i> -galloyl- β - <i>D</i> -glucose)	五倍子	-37.673
5927	杨梅素-3-(2'- <i>O</i> -没食子酰基)- <i>O</i> -吡喃鼠李糖 [myricetin-3-(2'- <i>O</i> -galloyl)- <i>O</i> -rhamnopyranoside]	儿茶	-37.254
15228	bisindigotin	板蓝根	-37.254
15213	scabrans G5	龙胆草	-36.835
8541	金莲木黄酮 (ochnaflavone)	金银花	-36.417
3573	丁子芽鞣素 (eugeniin)	丁香	-35.580
13410	异芍药苷 (isopaeoniflorin)	赤芍	-35.580
13803	槲皮素-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基 (1 $\rightarrow$ 6)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 {quercetin-7- <i>O</i> -[β - <i>D</i> -glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β - <i>D</i> -glucopyranoside]}	蒲公英	-35.580
3899	朝藿定 C (epimedin C)	淫羊藿	-35.161
9033	4- <i>O</i> -甲基-芍药苷 (4- <i>O</i> -methyl-paeoniflorin)	赤芍	-35.161
9521	4- <i>O</i> -没食子酰白芍苷 (4- <i>O</i> -galloylalbiflorin)	赤芍	-35.161
7447	康定玉竹苷 D (pratioside D)	黄精	-34.324
8922	loniflavone	金银花	-34.324
10302	连翘酯苷 G (forsythoside G)	连翘	-34.324
14629	连翘酯苷 B (forsythoside B)	连翘	-34.324
15167	alguds	蒲公英	-34.324
8059	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i>)-3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -桑布双糖苷 [(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i>)-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -sambubioside]	黄芪	-33.905
11812	木麻黄鞣亭 (casuarictin)	丁香	-33.905
14776	柴胡皂苷 C (saikosaponin C)	柴胡	-33.905

离子- π 相互作用。这些作用力使结合能降低, 亲和力增加, 候选单体与 3C 蛋白酶的活性部位紧密结合, 形成稳定的复合物, 使 3C 蛋白酶丧失裂解前体蛋白的能力, 从而有效抑制 EV71 3C 蛋白酶活性。

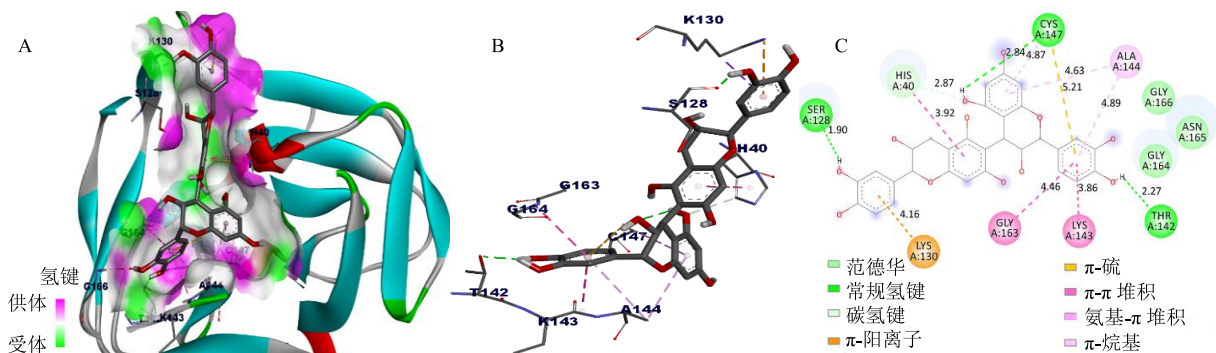
氢键在生物大分子中起着重要作用, 特别是在酶催化反应中。Discovery Studio Visualizer 生成的结果显示, 候选单体与氨基酸残基 His40、Glu71 或 Cys147 均形成氢键, 甚至形成双氢键, 这些残基是候选单体的氢键受体。这些单体具有较多的氧原子, 易与 3C 蛋白酶的活性氨基酸形成氢键, 氢键在催化过程中起到稳定单体与 3C 蛋白酶复合物结构的作用。虽然原花青素 B5 对 EV71 3C 蛋白酶表现出较高的结合亲和力, 并且有范德华力的参与, 但在结合位点只有 4 个氢键形成。而 1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖有 8 个氢键生成, 其中有 2 个双

氢键, 与 AG7088 的氢键个数和双氢键数量相近, 并且与 3C 蛋白酶的重要氨基酸残基形成氢键。因此, 1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖比原花青素 B5 可能具有更高的抑制作用。

3 讨论

EV71 和柯萨奇病毒 A16 型是引起手足口病的最常见病原体, EV71 感染引起的手足口病症状不典型, 大多数患者预后良好, 一周内痊愈, 但 EV71 可能会累及神经系统或心肺系统, 导致严重的后遗症, 甚至死亡^[3]。目前仍没有有效治疗药物, 因此寻找抗 EV71 活性药物具有重要意义。

EV71 抑制剂分为共价药物和非共价药物, 与非共价药物相比, 共价药物亲和力更强, 结合更紧密, 与靶标形成不可逆的共价键; 但一旦脱靶, 则是不可逆的。理想的抑制剂是非共价相互作用机制

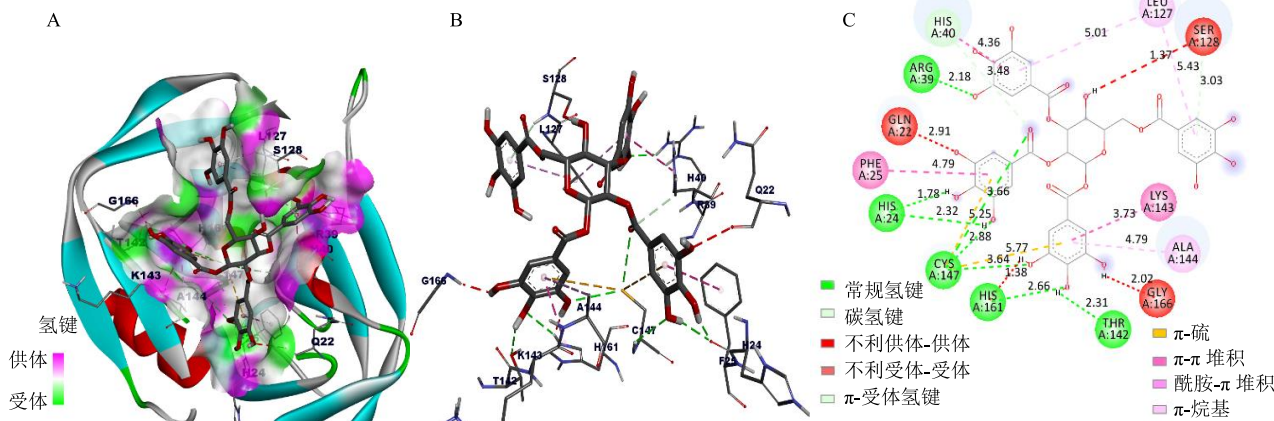


A-形成氢键的供体与受体区域, 紫色表示氢键供体, 绿色表示氢键受体 B-EV71 3C 蛋白酶与原花青素 B5 结合三维模式图 C-EV71 3C 蛋白酶与原花青素 B5 二维作用示意图

A-donor and acceptor regions forming hydrogen bonds, purple indicates hydrogen bond donor, and green indicates hydrogen bond acceptor B-three-dimensional diagram of EV71 3C protease and proanthocyanidin B5 C-two-dimensional diagram of EV71 3C protease and proanthocyanidin B5

图 3 EV71 3C 蛋白酶 (3SJO) 与原花青素 B5 相互作用

Fig. 3 Diagrams of interaction between EV71 3C protease and procyanidin B5



A-形成氢键的供体与受体区域, 紫色表示氢键供体, 绿色表示氢键受体 B-EV71 3C 蛋白酶与 1,2,3,6-四-O-没食子酰基- β -D-葡萄糖结合三维模式图 C-EV71 3C 蛋白酶与 1,2,3,6-四-O-没食子酰基- β -D-葡萄糖二维作用示意图

A-donor and acceptor regions forming hydrogen bonds, purple indicates hydrogen bond donor, green indicates hydrogen bond acceptor B-three-dimensional pattern diagram of EV71 3C protease combined with 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose C-two-dimensional diagram of EV71 3C protease and 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose

图 4 EV71 3C 蛋白酶 (3SJO) 与 1,2,3,6-四-O-没食子酰基- β -D-葡萄糖相互作用

Fig. 4 Diagrams of interaction between 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose and EV71 3C protease

的药物。我国中药资源丰富, 现已有多种中药具有抗病毒作用, 并广泛应用于临床治疗^[21-24], 因此本研究从常见的抗病毒中药中筛选出非共价作用的抗 EV71 感染的单体, 将 EV71 3C 蛋白酶 (3SJO) 作为药物靶点, 使用 AutoDock Vina 分子对接软件对中药单体进行虚拟筛选, 结合自由能值越小, 亲和力越强, 表示可能具有较好活性。从中药单体中筛选出 2 个对接打分值 ≤ -37.673 kJ/mol 的单体, 这些单体都含有较多氧原子, 更有利于与受体活性空腔中的氨基酸形成氢键。EV71 3C 蛋白酶活性中心

是由保守氨基酸残基 His40、Glu71 和 Cys147 组成的催化三联体^[11], 原花青素 B5 和 1,2,3,6-四-O-没食子酰基- β -D-葡萄糖分别与 His40 形成 π - π 堆积作用, 与 Cys147 形成常规氢键。而氨基酸残基 His40 和 Cys147 是 3C 蛋白酶的催化位点, 因此原花青素 B5 和 1,2,3,6-四-O-没食子酰基- β -D-葡萄糖可能具有抑制 3C 蛋白酶活性的作用。

分子对接结果表明, 原花青素 B5 和 1,2,3,6-四-O-没食子酰基- β -D-葡萄糖分别与 EV71 3C 蛋白酶的亲和力比其他单体高, 更易与受体氨基酸残基相

结合形成多种作用力,使形成的复合物结构更稳定,有望成为 EV71 3C 蛋白酶的有效抑制剂。本研究从分子水平探讨中药单体与 EV71 3C 蛋白酶的非共价相互作用,为抗 EV71 药物的研究提供了方向和指导。

参考文献

- [1] Nasri D, Bouslama L, Pillet S, *et al.* Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus [J]. *Exp Rev Mol Diagn*, 2007, 7(4): 419-434.
- [2] Chan K P, Goh K T, Chong C Y, *et al.* Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore [J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(1): 78-85.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 手足口病诊断 (节选) [J]. 中华临床感染病杂志, 2018, 11(2): 81-82.
- [4] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, *et al.* Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11): 778-790.
- [5] Mcminn P C. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance [J]. *Fems Microb Rev*, 2003, 26(1): 91-107.
- [6] Yi L, Lu J, Kung H F, *et al.* The virology and developments toward control of human enterovirus 71 [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2011, 37(4): 313-327.
- [7] 宋福真, 宋文秀. 重症手足口病流行病学特点及肠道病毒 71 型疫苗的研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24(4): 745-749.
- [8] 杨波, 王军, 郭钜旋, 等. EV71 疫苗接种意愿与接种行为差异分析 [J]. 中国公共卫生, 2017, 33(6): 861-866.
- [9] Brown B A, Pallansch M A. Complete nucleotide sequence of Enterovirus 71 is distinct from poliovirus [J]. *Virus Res*, 1996, 39(2/3): 195-205.
- [10] Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, *et al.* *Fields Virology* [M]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- [11] Shang L, Xu M, Yin Z. Antiviral drug discovery for the treatment of enterovirus 71 infections [J]. *Antivir Res*, 2013, 97(2): 183-194.
- [12] Song C M, Lim S J, Tong J C. Recent advances in computer-aided drug design [J]. *Brief Bioinform*, 2009, 10(5): 579-591.
- [13] 林子峰, 黄新安, 徐培平, 等. 基于虚拟筛选的热毒宁抗 HRV 3C 蛋白酶抑制剂作用的研究 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(4): 142-146.
- [14] Wang J M, Zhang T, Du J, *et al.* Anti-enterovirus 71 effects of chrysin and its phosphate ester [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89668.
- [15] 叶艳. 针对几种抗病毒、抗肿瘤靶标的活性化合物发现和作用机理研究 [D]. 上海: 中国科学院大学 (中国科学院上海药物研究所), 2017.
- [16] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comp Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [17] Lu G, Qi J, Chen Z, *et al.* Enterovirus 71 and coxsackievirus A16 3C proteases: Binding to rupintrivir and their substrates and anti-hand, foot, and mouth disease virus drug design [J]. *J Virol*, 2011, 85(19): 10319-10331.
- [18] Zunszain P A, Knox S R, Sweeney T R, *et al.* Insights into cleavage specificity from the crystal structure of foot-and-mouth disease virus 3C protease complexed with a peptide substrate [J]. *J Mol Biol*, 2010, 395(2): 375-389.
- [19] 汪鋆植, 刘朝奇. 抗病毒中草药学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [20] Chen Y C. TCM Database@Taiwan: The world's largest traditional Chinese medicine database for drug screening in silico [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15939.
- [21] 许小琴, 申海青, 韦旭斌. 中草药抗病毒实验药理学研究现状与展望 [J]. 中兽医医药杂志, 2004, 23(4): 48-51.
- [22] 曹泽或, 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.
- [23] 付华, 李艳静, 邢剑侠, 等. 蓝芩口服液结合肠外营养治疗小儿手足口病的临床观察 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1750-1752.
- [24] 冯雪, 田庆玲, 张双, 等. 热毒宁治疗小儿手足口病的疗效观察及对白细胞介素-4、白细胞介素-6、白细胞介素-10 的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20(4): 26-29.