

基于文献挖掘与分子对接技术的抗新型冠状病毒中药活性成分筛选

李 婧^{1,2}, 马小兵¹, 沈 杰¹, 张志锋^{1*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 四川大学 生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041

摘要: **目的** 采用文献挖掘与分子对接技术相结合的方法筛选潜在的中药抗新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 活性成分。**方法** 通过近期国家及各权威机构发布的防治新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 方案的中医方剂以及常用抗病毒中药筛选候选中药, 通过 TCMSP、CNKI 及 PubMed 搜集整理候选中药活性成分。SARS-CoV-2 3CL 水解酶 (Mpro) 蛋白结构由上海科技大学饶子和院士团队提供。采用 AutoDock Vina 进行分子对接。**结果** 通过文献查阅与处方筛选共得到 11 个高频使用抗病毒待研究中药, 通过 TCMSP 及文献查阅整合得到 469 个候选活性成分。通过分子对接得到结合能 < -33.44 kJ/mol 的成分 41 个, 其中柴胡皂苷 (E、B1、D、F、B2、C2、A)、甘草酸等多种成分与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白均有较好的亲和力。候选药物中柴胡、甘草、金银花等中药含有较多潜在抗 SARS-CoV-2 活性成分。**结论** 从传统抗病毒中药中筛选出潜在的抗 SARS-CoV-2 中药单体, 为抗 SARS-CoV-2 药物研究及处方筛选提供参考。

关键词: 新型冠状病毒; 新型冠状病毒疾病; 分子对接; 文献挖掘; 柴胡皂苷 E; 柴胡皂苷 B1; 柴胡皂苷 D; 柴胡皂苷 F; 柴胡皂苷 B2; 柴胡皂苷 C2; 柴胡皂苷 A; 甘草酸

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)04-0845-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.04.003

Screening of active components from Chinese materia medica against SARS-CoV-2 based on literature mining and molecular docking

LI Jing^{1,2}, MA Xiao-bing¹, SHEN Jie¹, ZHANG Zhi-feng¹

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To screen the active components from Chinese materia medica (CMM) against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) based on literature mining and molecular docking. **Methods** Candidate CMMs were collected from recently published prescriptions against COVID-19. The active components and protein targets of candidate CMMs were collected from TCMSP, CNKI and PubMed. SARS-CoV-2 3CL hydrolase (Mpro) has been determined by academician Zihao Rao's team at Shanghai Technical University. The molecular docking was performed by AutoDock vina software. **Results** A total of 11 high-frequency used candidate CMMs were obtained by literature mining, and 469 candidate components were found from TCMSP and literatures. The binding energy of all the components were calculated by molecular docking and 41 components of them were less than -33.44 kJ/mol. Among them, saikosaponin (E, B1, D, F, B2, C2, A) and glycyrrhizin had the lower binding energies. The results showed that *Bupleuri Radix*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and *Lonicerae Japonicae Flos* contained more active components against SARS-CoV-2. **Conclusion** The active components of CMMs against SARS-CoV-2 were screened based on literature mining and molecular docking, which provides a reference for exploration and discovery of new anti-SARS-CoV-2 drugs.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); COVID-19; Chinese materia medica; molecular docking; literature mining; saikosaponin E; saikosaponin B1; saikosaponin D; saikosaponin F; saikosaponin B2; saikosaponin C2; saikosaponin A; glycyrrhizin

2019 年 12 月在中国武汉发现了新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 患者, 目前全世界累计已有 6 万多

人被确诊, 死亡患者达到千人以上, 给我国甚至全世界人民的生命和健康带来了极大的威胁。COVID-19

收稿日期: 2020-02-12

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1712503)

作者简介: 李 婧, 博士在读, 实验师, 主要从事中药活性物质基础与药理学研究。E-mail: 27918716@qq.com

*通信作者 张志锋, 博士, 研究员, 从事中药资源品质评价相关研究。E-mail: zhangzhf99@gmail.com

由新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 感染所致, SARS-CoV-2 是先前未在人类中发现的一种全新的冠状病毒, 目前对这种病毒的认识还比较初浅, 故 COVID-19 的临床治疗主要是对症支持治疗, 尚无特效治疗药物。COVID-19 是一种急性感染性肺炎^[1], 患者初始症状多为呼吸道症状、发热、咳嗽、气促和呼吸困难等, 在较严重病例中, 感染可导致肺炎、严重急性呼吸综合征、肾衰竭, 甚至死亡^[2]。2020 年 1 月 31 日, 世界卫生组织 (WHO) 将新型冠状病毒疫情列为国际关注的突发公共卫生事件 (PHEIC), 因此, 研究抗 COVID-19 疗效显著的新治疗方法和抗 COVID-19 的药物迫在眉睫、意义重大。

中医药是我国人民长期与疾病作斗争积累下来的宝贵财富, 从《黄帝内经》的《素问·刺法论》到明代吴又可的《瘟疫论》, 再到清代吴鞠通的《温病条辨》等著作均对瘟疫进行了阐释, 同时中医药在历史上发生的疫病的治疗中发挥了积极的作用, 近年来在 SARS、H1N1 流感病毒等新突发传染病防治中, 中医药也发挥了独特作用^[3-5]。针对此时爆发的 COVID-19 疫情, 国家卫生健康委、国家中医药管理局印发了《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案 (试行第五版)》, 该方案细化了中医治疗方案相关内容, 明确 COVID-19 属于中医疫病范畴, 病因为感受疫戾之气, 病位在肺, 基本病机特点为“湿、热、毒、瘀”。因此, 国家相继出台一些中医药治疗的协定方药, 国内一些中医院、国医大师也先后发出一些治疗 COVID-19 的处方。经过近半个月的临床实践证明, 中医药对治疗此次 COVID-19 疾病具有独特的疗效。因此, 从传统医药中去发现具有独特疗效的中药成分具有重要的意义。

近年来, 分子对接技术已成为一种广泛应用的能快速准确地预测蛋白-配体复合物结合构象和亲和力并辅助筛选活性成分的重要研究技术^[6]。近期, 上海科技大学饶子和/杨海涛团队快速表达了 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白 (Mpro) 并获得了高分辨率晶体结构, 该结构目前被认为是 SARS-CoV-2 有效靶点, 为筛选抗 SARS-CoV-2 的活性成分提供了基础^[7]。本研究以 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白为受体, 与通过文献挖掘方法得到的 10 余种常用抗病毒中药中 400 余种活性成分进行分子对接, 筛选潜在抗 SARS-CoV-2 活性成分, 为快速准确寻找抗 SARS-CoV-2 有效化学成分及已有中药的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据库及软件

数据库包括 TCMSP 中药系统药理学分析平台数据库 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>); PubChem 有机小分子生物活性数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。使用软件包括 AutoDock Tools 1.5.6 软件、AutoDock Vina 软件 (<http://vina.scripps.edu/>)^[8]、PyMol 软件 (<https://pymol.org/>)、Chem3D 17.1、LigPlus 软件。

1.2 靶蛋白及活性中药成分筛选

靶蛋白 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白结构由上海科技大学饶子和院士团队解析提供。本研究候选中药来源于近期国家及各机构发布的防治 COVID-19 方案的中医方剂以及常用抗病毒中药。通过 TCMSP 数据库搜索待研究中药成分, 以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 类药性 (DL) ≥ 0.18 为参考筛选候选化合物。同时通过在 CNKI 及 PubMed 数据库中查阅相关文献, 搜集整理候选中药的主要活性成分及报道有抗病毒活性的成分, 与在 TCMSP 数据库筛选到的活性物质进行整合及验证, 筛选构建候选中药的活性成分数据库, 在 PubChem 数据库下载活性成分 3D 结构的 SDF 格式, 用 Chem3D 软件转化为 PDB 格式备用。

1.3 受体与配体的前处理及分子对接

采用 AutoDock Tools 1.5.6 软件删除 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白复合物中水分子, 分离配体和受体, 添加非极性氢, 计算 Gasteiger 电荷, 保存为 pdbqt 文件。从 Pubchem 下载小分子 3D 坐标文件, 在 pymol 中检查空间结构无误后, 利用 openbabel 转换为 pdb 格式。将结构件载入 AutoDock Tools 1.5.6 程序, 添加原子电荷, 分配原子类型, 所有柔性键均默认可旋转。保存为 pdbqt 格式, 作为对接配体。以 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白作为受体, 以中药候选成分作为配体, 根据靶蛋白复合物中配体的坐标确定分子对接的活性位点, 根据 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白活性口袋设置 Gridbox 坐标及大小, 采用 AutoDock Vina 进行分子对接, 对对接结果进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 抗 SARS-CoV-2 候选中药及活性成分筛选结果

通过对候选中药处方配伍的考察, 筛选出 23 个高频使用的中药, 根据《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案 (试行第五版)》推荐中药进行整合, 总

共筛选出板蓝根、金银花、黄芩、连翘、鱼腥草、麻黄、黄芪、甘草、虎杖、黄连、柴胡 11 个候选中药。采用 TCMSp 数据库,以 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 为标准筛选上述候选中药活性成分,与文献查阅搜集到的主要成分及抗病毒活性成分整合,去除重复成分,共得到 469 个候选活性成分。中药及活性成分筛选流程图见图 1。

2.2 抗 SARS-CoV-2 活性成分分子对接结果

以中药候选活性成分作为配体,以 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白为受体,根据靶蛋白复合物中配体的坐标以及靶蛋白活性口袋进行设置,采用 AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接。配体设置为柔性,受体刚性。活性中心 Gridbox 位置设置为 center_x = -26.284, center_y = -12.603, center_z = 58.96; 大小设置为 size_x = 44, size_y = 50, size_z = 44; spaces = 1, 搜寻精度(exhaustiveness)设为 32, 其他参数默认,生成一个格点文件。采用 AutoDock Vina 进行分子对接。选取打分最高(affinity 数值最低)的构象作为对接构象,利用 pymol 和 ligplus 程序对对接构象进行可视化分析。每种活性成分对接结果几种结

合构象中,选取结合能较低且构象较好的结果作为分子对接结果。结合能越小说明受体配体之间亲和力越大,对接得到结合能 < -33.44 kJ/mol 的成分 41 个,结合能排名前 30 位活性成分对接结果见表 1。

从对接结果可见,柴胡中几种柴胡皂苷(E、B1、D、F、B2、C2、A)对 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白均有较好的结合力,甘草中甘草酸也对 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白有潜在作用,另外金银花、板蓝根、黄芪、连翘等中药中的多种成分对 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白均有潜在活性。此外,对接结果显示候选中药柴胡、甘草、金银花含有较多潜在抗 SARS-CoV-2 活性成分。

2.3 结合模式分析

根据“2.2”项分子对接结果,对表 1 中结合能最低(潜在活性最高)的 2 种成分柴胡皂苷 E (saikosaponin E) 和甘草酸(glycyrrhizin)的分子对接模型进行分析。SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白与柴胡皂苷 E 和甘草酸相互作用图见图 2。2 个配体柴胡皂苷 E(a)和甘草酸(b)均结合于 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白 α 螺旋结构域和 β 折叠结构域交界处的柔性 loop 区。所不同的是,柴胡皂苷 E(a)结合于靠近 N 端的区域,而甘草酸(b)则结合于与之相对的更靠近 C 端的 loop 区(图 2)。柴胡皂苷 E(a)结合区域以疏水性为主(图 2),甘草酸(b)结合区域则具有亲水和疏水两性(图 2)。

SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白与柴胡皂苷 E 和甘草酸相互作用二维图见图 3。柴胡皂苷 E 互作残基如图 3 所示。其中,配体羟基可与 Ile249、Gln110、Asn151、Asp153、Ser158 形成氢键作用。图中虚线为氢键,数值为键长(重原子距离)。其他疏水残基如 Val297、Phe294、Val104、Ile106 等,可与配体疏水环形成较强的堆积作用,有利于其结合。甘草酸互作残基如图 3 所示,其中,配体羟基可与 Asn133、Asp197、Gly195、Tyr239、Leu287、Thr199、Asp289、Arg131 等形成氢键作用。图中虚线为氢键,数值为键长(重原子距离)。甘草酸周围疏水残基较少,主要通过静电作用(氢键)稳定结合。

3 讨论

本研究以饶子和院士团队提供的 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白为靶蛋白,对常用 11 种抗病毒中药中 469 种活性成分采用 AutoDock Vina 软件进行了分子对接,对接结果提示,柴胡中几种柴胡皂苷(E、B1、D、F、B2、C2、A)对 SARS-CoV-2 3CL 水解

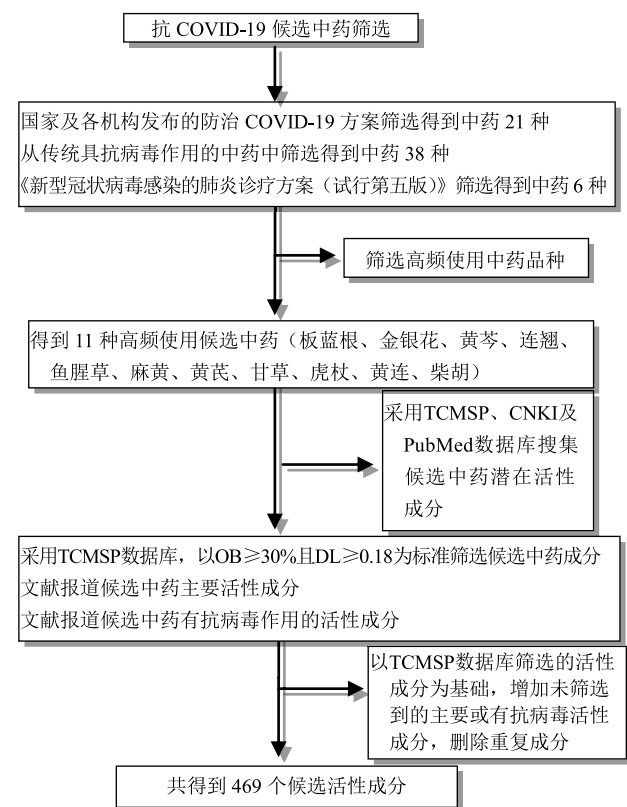


图 1 中药及活性成分筛选流程

Fig. 1 Screening flow chart of Chinese materia medica and active ingredients

表 1 结合能排名前 30 活性成分对接结果

Table 1 Binding energy value of candidate compounds (top 30)

活性顺序	化合物名称	结合自由能/(kJ·mol ⁻¹)	来源
1	柴胡皂苷 E (saikosaponin E)	-41.800	柴胡
2	甘草酸 (glycyrrhizin)	-38.874	甘草
3	柴胡皂苷 B1 (saikosaponin B1)	-38.874	柴胡
4	柴胡皂苷 D (saikosaponin D)	-38.874	柴胡
5	柴胡皂苷 F (saikosaponin F)	-38.874	柴胡
6	6-(3-oxoindolin-2-ylidene) indolo [2,1-b]quinazolin-12-one	-38.456	板蓝根
7	柴胡皂苷 B2 (saikosaponin B2)	-38.456	柴胡
8	ochnaflavone	-37.620	金银花
9	蒺藜 A (anthraglycoside A)	-36.784	虎杖
10	芦丁 (rutin)	-36.366	金银花、柴胡、甘草、黄芪、连翘、麻黄
11	金丝桃苷 (hyperin)	-36.366	金银花、柴胡、虎杖、连翘
12	异绿原酸 A (isochlorogenic acid A)	-36.366	金银花
13	忍冬苷 (veronicastroside)	-35.948	金银花
14	膜荚黄芪苷 IV (astragaloside IV)	-35.948	黄芪
15	emodin-8-glucoside	-35.948	虎杖、板蓝根
16	黄连碱 (coptisine)	-35.948	黄连、黄芩
17	蒙花苷 (linarin)	-35.530	板蓝根
18	齐墩果酸 (oleanolic acid)	-35.530	连翘、柴胡、甘草、虎杖、金银花、麻黄
19	黄芪苷 (astragalin)	-35.530	黄芪、甘草
20	甲基黄连碱 (worenine)	-35.530	黄连
21	柴胡皂苷 A (saikosaponin A)	-35.530	柴胡
22	新橙皮苷 (neohesperidin)	-35.112	板蓝根
23	all-trans-rhodoxanthin	-35.112	金银花
24	连翘酯苷 (forsythiaside)	-35.112	连翘
25	异槲皮苷 (isoquercitrin)	-35.112	柴胡、鱼腥草、甘草、虎杖、黄芪、连翘
26	甘油棕榈酸酯 A (palmidin A)	-35.112	黄连
27	木犀草苷 (cynaroside)	-34.694	金银花、虎杖
28	黄柏酮 (obacunone)	-34.694	黄连
29	β-胡萝卜素 (β-carotene)	-34.276	金银花
30	连翘酯苷 A (forsythoside A)	-34.276	连翘

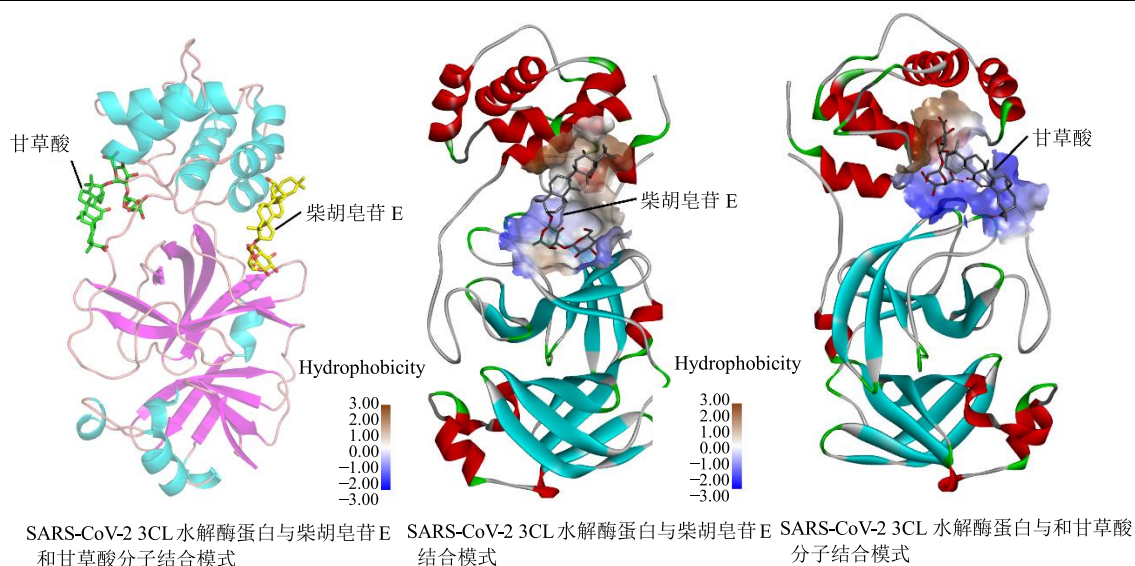


图 2 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白与柴胡皂苷 E 和甘草酸相互作用

Fig. 2 Diagrams of interaction between SARS-CoV-2 3CL protein and saikosaponin E and glycyrrhizin

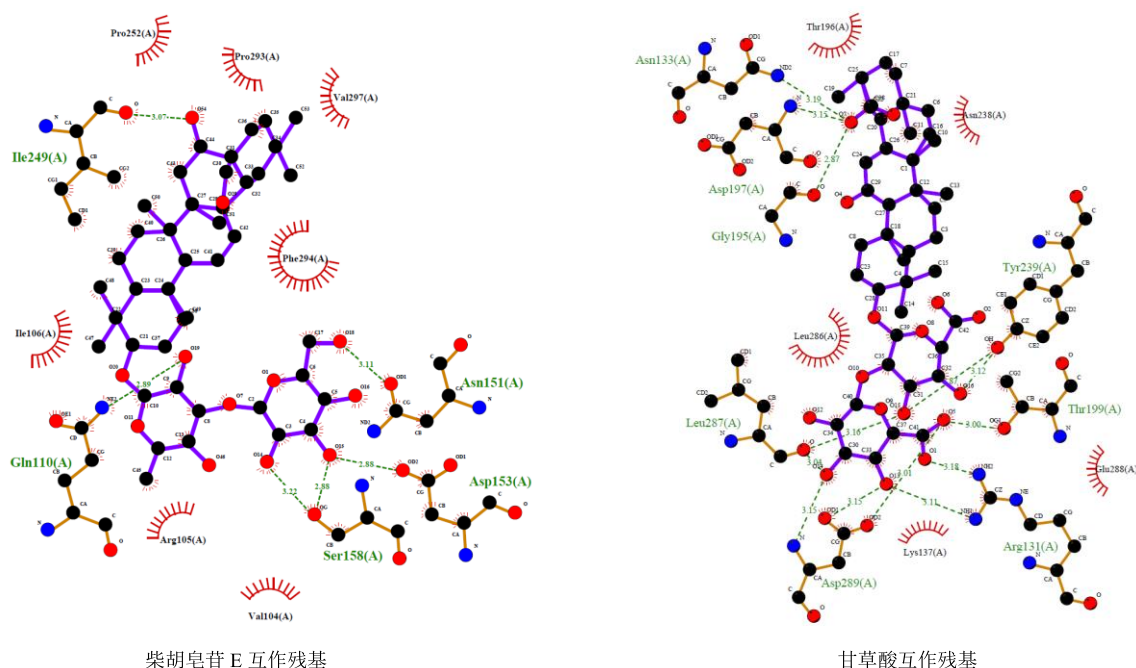


图 3 SARS-CoV-2 水解酶蛋白与柴胡皂苷 E 和甘草酸相互作用二维图

Fig. 3 Two-dimensional graph of interaction between SARS-CoV-2 3CL protein and saikosaponin E and glycyrrhizin

酶蛋白均有较好的结合力，柴胡皂苷是柴胡中提取的萜类物质，具有抗病毒作用，文献报道柴胡皂苷 A、D 对呼吸综合征病毒感染的仔猪有治疗作用^[9]，柴胡皂苷 A 能抑制甲型流感病毒复制^[10]，柴胡皂苷 B2 能有效抑制丙型肝炎病毒^[11]，基于本研究与文献报道结合，提示柴胡皂苷成分可能具有抗 SARS-CoV-2 活性。甘草中的甘草酸也对 SARS-CoV-2 蛋白有潜在作用。研究报道甘草酸可以通过抑制基因组 RNA、mRNA 和蛋白质合成来抑制 2 型人副流感病毒复制^[12]，甘草酸与利巴韦林联合对甲型 H1N1 流感病毒具有抑制作用^[13]。芦丁是广泛存在于植物中的黄酮醇配糖体，金银花、柴胡、甘草、黄芪、连翘、麻黄中均含有该成分。文献报道芦丁在小鼠体内具有抗诺如病毒的活性^[14]，芦丁可以通过影响单加氧酶活性抑制流感病毒^[15]。此外，金丝桃苷、异绿原酸 A、膜荚黄芪苷 IV 等成分也被报道具有抗病毒活性^[16-17]。由于皂苷类成分口服后会被肠道菌脱糖，其苷元吸收入血。因而本研究也对柴胡、甘草、黄芪等中药的皂苷类成分的苷元进行了同步测定，结果柴胡皂苷 E 苷元与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶 (Mpro) 的结合能为 -35.53 kJ/mol，表明其也具有较好的抑制活性，而柴胡皂苷 (B1、D、F、B2、C2、A) 苷元结合能均小于 -29.26

kJ/mol。因此，结合文献分析与本研究对接结果，推测这些成分可以作为抗 SARS-CoV-2 的潜在活性物质。另外，本研究提示柴胡、甘草、金银花等中药抗 SARS-CoV-2 活性成分较多，可在处方筛选及临床应用方面加以应用。

COVID-19 以“湿、热、毒、瘀”为主要特征，初期主要是温邪犯肺、发热微恶寒，因此可以用小柴胡汤或者小柴胡汤合桑菊饮。本研究筛选出的柴胡为该方君药，柴胡皂苷 E 是柴胡的主要活性成分，分子对接方法结果也对其进行了佐证。当病程出现邪犯胃肠时，有恶心欲呕、大便溏等症状，因为肺与胃肠相表里，可以用王氏连朴饮，黄连是君药，也是本次实验筛选出的频次出现较高的中药。当进入重症期，是邪热壅肺证，病人主要表现发热咳嗽、气喘息渴、胸闷、吐黄痰和脉滑数等，主方是麻杏石甘汤。方中甘草也是本研究分子对接筛选出来的使用频率最高的中药，其主要成分甘草酸可能是抑制 SARS-CoV-2 最有效的成分之一。本研究根据目前公布的一些处方，筛选出的 11 味高频出现中药，对后期进行抗 COVID-19 化学成分及活性机制的深入研究具有一定的指导意义。

2020 年 1 月 29 日上午，由中国工程院黄璐琦院士领衔的第一支国家级中医医疗队正式接管医疗

工作,并给予武汉金银潭医院南一区病房患者中药治疗。使用中药治疗后,临床观察初步显示患者在乏力、咳嗽、口干、心悸、喘促等症状均明显改善,且血氧饱和度也有较好改善。2020 年 2 月 3 日,该区 8 名确诊 COVID-19 患者出院。截止 2020 年 2 月 8 日,武汉金银潭医院在中医全面主导后治愈出院率超过 40%,远高于同期武汉水平(约 5%)。近日来,湖北省又发出通知,要求所有疑似病例都必须用上中药。可见,在未来治疗 COVID-19 的过程中,传统中医药将会发挥越来越重要的作用。

志谢:上海科技大学饶子和院士团队提供 SARS-CoV-2 3CL 水解酶蛋白结构。

参考文献

- [1] Rubin E J, Baden L R, Morrissey S, *et al.* Medical journals and the 2019-nCoV outbreak [J]. *N Engl J Med*, 2020, doi: 10.1056/NEJMe2001329.
- [2] Huang C, Wang Y, Li X, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [3] Zhang M M, Liu X M, He L. Effect of integrated traditional Chinese and Western medicine on SARS: A review of clinical evidence [J]. *World J Gastroenter*, 2004, 10(23): 3500-3505.
- [4] Luo Y, Wang C Z, Hesse-Fong J, *et al.* Application of Chinese medicine in acute and critical medical conditions [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(6): 1223.
- [5] 牛明,王睿林,王仲霞,等.基于临床经验和分子对接技术的抗新型冠状病毒中医组方快速筛选模式及应用[J].*中国中药杂志*, 2020, doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20200206.501.
- [6] Song C M, Lim S J, Tong J C. Recent advances in computer-aided drug design [J]. *Brief Bioinform*, 2009, 10(5): 579-591.
- [7] 宗阳,丁美林,贾可可,等.基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒(2019-nCoV)肺炎活性化合物的研究[J/OL].*中草药*, [2020-02-14]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.r.20200209.1038.002.html>.
- [8] 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 Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [9] Hu Y, Zhang B, Wang W, *et al.* Therapeutic effects of saponin components on porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected piglets [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2020, doi: 10.1111/jpn.13302.
- [10] Chen J, Duan M, Zhao Y, *et al.* Saikosaponin A inhibits influenza A virus replication and lung immunopathology [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(40): 42541-42556.
- [11] Lin L T, Chung C Y, Hsu W C, *et al.* Saikosaponin b2 is a naturally occurring terpenoid that efficiently inhibits hepatitis C virus entry [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(3): 541-548.
- [12] Sakai-Sugino K, Uematsu J, Kamada M, *et al.* Glycyrrhizin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication by the inhibition of genome RNA, mRNA and protein syntheses [J]. *Drug Discov Ther*, 2017, 11(5): 246-252.
- [13] 陈秀秀,周红霞,元文宝,等.甘草酸联合利巴韦林体内抗甲型 H1N1 流感病毒作用[J].*药学报*, 2015, 50(8): 966-972.
- [14] Chéron N, Yu C, Kolawole A O, *et al.* Repurposing of rutin for the inhibition of norovirus replication [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(9): 2353-2358.
- [15] Savov V M, Galabov A S, Tantcheva L P, *et al.* Effects of rutin and quercetin on monooxygenase activities in experimental influenza virus infection [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2006, 58(1): 59-64.
- [16] Hao B J, Wu Y H, Wang J G, *et al.* Hepatoprotective and antiviral properties of isochlorogenic acid A from *Laggera alata* against hepatitis B virus infection [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(1): 190-194.
- [17] Wang S, Li J, Huang H, *et al.* Anti-hepatitis B virus activities of astragaloside IV isolated from *Radix Astragali* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(1): 132-135.