

## 银花青蒿栀子方抗 A6 型柯萨奇病毒活性成分的分离

李 菲<sup>1</sup>, 赵新亚<sup>1#</sup>, 赵雪梅<sup>1</sup>, 毕研平<sup>1</sup>, 李 娟<sup>1</sup>, 崔清华<sup>2</sup>, 田景振<sup>2\*</sup>

1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学院, 新发传染病病因流行病学重点实验室, 山东 泰安 271016

2. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

**摘要:**目的 研究银花青蒿栀子方(Yinhua Qinghao Zhizi Description, YQZ)抗 A6 型柯萨奇病毒(Coxsavirus A6, CV-A6)的活性成分。方法 对 YQZ 进行提取、分离和结构鉴定,以病毒抑制率为指标追踪其抗 CV-A6 活性成分,利用 Discovery Studio2017 软件将其与受体蛋白进行分子对接。结果 YQZ 醇提物的石油醚部位分离得到的青蒿酸和青蒿素、正丁醇部位分离得到的栀子苷、绿原酸和木犀草苷对 CV-A6 的抑制率显著高于阳性对照利巴韦林( $P < 0.05, 0.01$ ),上述成分分子和 CV-A6 衣壳蛋白 VP1 之间均存在多个氢键、范德华引力等作用,亲和力大。结论 YQZ 中的青蒿酸、青蒿素、栀子苷、绿原酸和木犀草苷具有良好的抗 CV-A6 活性,可能与抑制病毒衣壳蛋白 VP1 有关。

**关键词:** 银花青蒿栀子方; A6 型柯萨奇病毒; 抗病毒; 活性成分; 分子对接; 青蒿酸; 青蒿素; 栀子苷; 绿原酸; 木犀草苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)05-1365-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.011

## Isolation of antiviral constituents of Yinhua Qinghao-Zhizi Description against Coxsavirus A6

LI Fei<sup>1</sup>, ZHAO Xin-ya<sup>1</sup>, ZHAO Xue-mei<sup>1</sup>, BI Yan-ping<sup>1</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, CUI Qing-hua<sup>2</sup>, TIAN Jing-zhen<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Etiology and Epidemiology of Emerging Infectious Diseases, Department of Pharmacy, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Taian 271016, China

2. Department of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

**Abstract: Objective** To explore the active constituents of YQZ (Yinhua Qinghao Zhizi Description, YQZ) against Coxsavirus A6 (CV-A6). **Methods** Active constituents were extracted and isolated from YQZ and identified, which was proceeded with virus inhibition rate as the evaluation index. Molecule docking between active constituents and target protein was performed using Discovery Studio 2017 software. **Results** Compared with ribavirin, the virus inhibition rate of artemisic acid and artemisinin separated from petroleum ether extract, and geniposide, chlorogenic acid as well as luteoloside from *n*-Butanol extract from YQZ ethanol extract was significantly higher ( $P < 0.01, 0.05$ ). Dense interaction involving hydrogen bonds and van der waals force, etc. existed between molecules of the aboved constituents and CV-A6 capsid protein VP1. **Conclusion** Artemisic acid, artemisinin, geniposide, chlorogenic acid, and luteoloside in YQZ has significant anti-CV-A6 effect, which may be related with the inhibition of capsid protein VP1.

**Key words:** Yinhua-Qinghao-Zhizi Description; CV-A6; antiviral; active constituents; molecule docking; artemisic acid; artemisinin; geniposide; chlorogenic acid; luteoloside

自 2008 年 A6 型柯萨奇病毒 (coxsavirus A6, CV-A6) 首次引起手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD) 暴发流行以来, CV-A6 感染致 HFMD 发病率呈上升趋势, 并成为部分地区的主要流行株<sup>[1-3]</sup>。但是, 国内外对 HFMD 病原体的研究

主要集中于肠道病毒 71 型 (enterovirus, EV71) 和 CV-A16, 围绕 CV-A6 的相关研究匮乏, 对于抗 CV-A6 药物的研究迫在眉睫。

清热解毒类中药制剂在病毒性感染疾病的治疗上不仅能抗病毒、消炎、退热, 还能提高人体

收稿日期: 2021-09-23

基金项目: 山东省重点研发计划 (2017GSF19106); 山东省中医药科技发展计划 (2017-248); 山东第一医科大学学术提升计划 (2019LJ003)

作者简介: 李 菲 (1980—), 女, 山东肥城人, 副教授, 博士, 研究方向为中药抗病毒。

\*通讯作者: 田景振, 教授, 研究方向为中药抗病毒。E-mail: tianjingzhen@163.com

#并列第一作者: 赵新亚, 药物制剂专业。E-mail: zxy19980519@126.com

免疫力,具有多靶点治疗、整体调节的特点<sup>[4-5]</sup>。银花青蒿栀子方(Yinhua Qinghao Zhizi Description, YQZ)源于名老中医经验方,组方为金银花3~15 g、青蒿6~25 g和栀子3~12 g,具有清热解毒、疏风解表之功效<sup>[6]</sup>。近年来,研究发现该方开发的中药制剂对甲型H1N1流感病毒、新型冠状病毒及肠道病毒EV71和CV-A16等均有一定程度的抑制作用<sup>[7-9]</sup>。

基于前期研究发现YQZ具有抗CV-A6作用,本研究以活性追踪为主线,将YQZ醇提物进行分离和结构鉴定,并采用分子对接技术分析活性成分和病毒靶点蛋白之间的相互作用,以期明确YQZ抗CV-A6的活性成分,并为后期作用机制研究和制剂制备、质量控制及药动学研究提供目标成分。

## 1 材料与仪器

### 1.1 病毒和细胞

CV-A6引自中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所毒种室;人横纹肌瘤RD细胞,引自中国预防医学研究所病毒研究室。

### 1.2 药材

金银花(批号20170306)、青蒿(批号20170306)、栀子(批号20170306)均购自泰安市金泰联药店,经泰山医学院高红莉教授鉴定分别为忍冬科忍冬属植物忍冬*Lonicera japonica* Thunb.的干燥花蕾、菊科蒿属植物黄花蒿*Artemisia annua* L.的干燥地上部分、茜草科栀子属植物栀子*Gardenia jasminoides* Elis的干燥果实。

### 1.3 试剂

MEM培养基(Gbico公司,批号10098-143);胎牛血清(Gbico公司,批号10098-143);CCK-8(联科生物,批号6366831);柱色谱硅胶(200~300目,国药集团化学试剂有限公司);D101大孔树脂(天津海光化工有限公司);聚酰胺(国药集团化学试剂有限公司);Sephadex LH-20凝胶(GE公司);利巴韦林(ribavirin, RBV, 中国食品药品检定研究院,批号140629-201713)。

### 1.4 仪器

植物粉碎机FW-177型(天津市泰新特仪器有限公司);KQ-100DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);生物安全柜(Thermo Fisher Scientific);二氧化碳恒温培养箱(Thermo Fisher Scientific);倒置显微镜(尼康株式会社);Infinite M 200 Pro酶标仪(Tecan公司);Varian Mercury-Plus

400 MHz型核磁共振仪(美国Varian公司)。

## 2 方法

### 2.1 提取与分离

按3:15:2比例称取金银花、青蒿、栀子粗粉共计6.0 kg,加入8倍量75%乙醇浸泡2 h,室温超声提取2次,每次20 min。合并提取液,40℃减压回收乙醇得粗提液,依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取得石油醚部位(petroleum ether extract, PEE)、醋酸乙酯部位(ethyl acetate extract, EAE)、正丁醇部位(*n*-butanol extract, BE)和水部位(water extract, WE)。

采用硅胶柱色谱法分离PEE(100 g),以石油醚-醋酸乙酯(10:0→7:3)梯度洗脱,TLC分析合并得11个组分Fr. 1~11。组分Fr. 8和Fr. 10具有抗病毒活性,采用硅胶柱色谱法分离。组分Fr. 8(1.17 g)以石油醚-醋酸乙酯(95:5→90:10)梯度洗脱,合并相同组分,其中Fr. 8-2出现结晶,经石油醚重结晶得化合物1(23.1 mg)。组分Fr. 10(2.63 g)以石油醚-醋酸乙酯(90:10→80:20)梯度洗脱,合并相同组分,其中Fr. 10-3出现结晶,经丙酮重结晶得化合物2(35.7 mg)。

采用硅胶柱色谱法分离EAE(166 g),以二氯甲烷-甲醇(10:0→7:3)梯度洗脱,TLC分析合并得9个组分Fr. 1~9。其中,Fr. 3、Fr. 5和Fr. 9具有抗CV-A6活性,Fr. 3活性小,Fr. 9与BE的成分相似,对Fr. 5进行分离。采用硅胶柱色谱法分离Fr. 5(11.2 g),以二氯甲烷-甲醇(95:5→80:20)梯度洗脱,得组分Fr. 5-1~5-5。组分Fr. 5-4具有抗病毒活性,采用Sephadex LH-20凝胶柱、以甲醇为洗脱液进行分离,得化合物3(19.0 mg)。

BE(175 g)经D-101大孔吸附树脂依次用水及30%、60%、95%乙醇溶液洗脱,继续分离30%乙醇洗脱物(Fr. 1)和60%乙醇洗脱物(Fr. 2)。Fr. 1(39 g)采用硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(90:10→80:20)梯度洗脱,得到5个组分Fr. 1-1~1-5。Fr. 1-2经醋酸乙酯重结晶得到化合物4(1.1 g),Fr. 1-4经甲醇重结晶得到化合物5(0.2 g)。Fr. 2(75 g)采用聚酰胺柱色谱分离,以50→75%乙醇梯度洗脱,合并相同组分,Fr. 2-2经95%乙醇重结晶得化合物6(36.0 mg)。

### 2.2 细胞毒性测定

在96孔板接种 $5 \times 10^4$ /mL的RD细胞,每孔100  $\mu$ L。细胞形成单层后,将PEE、EAE和BE分

离得到组分和单体分别加二甲亚砜和 PBS 溶解,再用维持液进行倍比稀释,接种于细胞,每孔 100  $\mu\text{L}$ 。置于 37  $^{\circ}\text{C}$  含 5% $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中孵育 48 h,正常细胞对照组加入同体积维持液。采用 CCK8 法测定波长 450 nm 的吸光度 ( $A$ ) 值,计算细胞存活率,Probit 回归法确定半数毒性浓度 (median toxic concentration,  $\text{TC}_{50}$ ) 和最大无毒浓度 (maximal atoxic concentration,  $\text{TC}_0$ )。

### 2.3 抗病毒活性测定

在 96 孔板接种 RD 细胞,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h,弃液。将药液和病毒液 1:1 混合,加到细胞中,每孔 100  $\mu\text{L}$  [药物浓度= $\text{TC}_0$ ,感染复数 (MOI) = 1]。正常对照组加入同体积维持液,模型组加入维持液和病毒液的 1:1 混合液,阳性对照组加入 RBV 溶液 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和病毒液的 1:1 混合液。置于 37  $^{\circ}\text{C}$  含 5% $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养 1 h。弃液,加维持液继续孵育至 48 h。显微镜下观察 CPE, CCK8 法测定细胞存活率,计算病毒抑制率。

### 2.4 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据处理分析,组间数据进行单因素方差分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差别有统计学意义,  $P < 0.01$  表示显著性差异。

### 2.5 活性成分与病毒靶点蛋白之间的相互作用

通过药物设计软件 Discovery Studio2017 R2 进行病毒蛋白靶点和潜在目标化合物的分子对接,对化合物和蛋白之间的相互作用进行分析。从蛋白质结构数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中下载标记为 5YHQ 的 CV-A6 病毒样颗粒结构 (virus-like particle, VLP),选择衣壳蛋白 VP1 作为靶点蛋白。VP1 的 surface-exposed loops 和 C 端结构是主要的免疫原性位点<sup>[10]</sup>,作为分子对接的结合部位。对接前将靶点蛋白进行去水、加氢处理,将化合物的二维结构转变成三维结构,作为配体与受体蛋白进行对接。

## 3 实验结果

### 3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色结晶 (石油醚)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 12.42 (1H, s, 12-COOH), 6.17 (1H, brs, H-1), 5.40 (1H, brs, H-13), 4.94 (1H, brs, H-13), 2.71 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-3), 2.59 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-3), 1.94 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-10), 1.86 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-5), 1.75 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-4), 1.69

(1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-8), 1.66 (1H, m, H-9), 1.53 (1H, dd,  $J = 14.1, 7.8$  Hz, H-6), 1.40 (1H, m, H-8), 1.56 (3H, s, H-14), 1.33 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-4), 1.27 (1H, dd,  $J = 12.5, 3.1$  Hz, H-7), 1.03 (1H, dd,  $J = 11.6, 3.4$  Hz, H-7), 0.87 (3H, d,  $J = 5.8$  Hz, H-15); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 173.3 (C-12), 148.8 (C-2), 139.4 (C-11), 128.7 (C-1), 125.3 (C-13), 46.9 (C-10), 46.1 (C-9), 42.6 (C-5), 39.9 (C-6), 32.4 (C-4), 31.1 (C-8), 30.7 (C-3), 30.4 (C-7), 28.8 (C-14), 24.8 (C-15)。以上数据与文献对比基本一致<sup>[11]</sup>,故鉴定化合物 1 为青蒿酸。

化合物 2: 白色针状结晶 (丙酮); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.13 (1H, s, H-5), 3.16 (1H, dd,  $J = 7.1, 5.5$  Hz, H-11), 2.26 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 2.05 (1H, dd,  $J = 17.4, 4.1$  Hz, H-3 $\beta$ ), 1.93 (1H, dd,  $J = 7.1, 3.9$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 1.72 (1H, m, H-8 $\alpha$ ), 1.64 (1H, dd,  $J = 13.0, 3.3$  Hz, H-9 $\beta$ ), 1.50 (1H, m, H-10), 1.36 (3H, s, H-15), 1.32 (1H, m, H-2 $\beta$ ), 1.29 (1H, m, H-1), 1.15 (1H, dd,  $J = 13.1, 2.9$  Hz, H-8 $\beta$ ), 1.07 (3H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-13), 0.92 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-14); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.0 (C-12), 105.2 (C-4), 93.8 (C-5), 80.1 (C-6), 50.0 (C-1), 44.4 (C-7), 36.6 (C-10), 36.0 (C-3), 33.6 (C-9), 33.0 (C-11), 25.4 (C-15), 24.9 (C-2), 22.9 (C-8), 20.1 (C-14), 12.9 (C-13)。以上数据与文献对比基本一致<sup>[12]</sup>,故鉴定化合物 2 为青蒿素。

化合物 3: 黄色结晶 (甲醇)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 12.98 (1H, s, 5-OH), 10.08 (3H, brs, 7, 3', 4'-OH), 7.43 (1H, dd,  $J = 2.0, 8.0$  Hz, H-6'), 7.41 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 6.90 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.67 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.20 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 182.1 (C-4), 164.6 (C-7), 164.3 (C-2), 162.7 (C-9), 161.9 (C-5), 157.7 (C-4'), 150.1 (C-3'), 121.9 (C-6'), 119.4 (C-1'), 116.5 (C-5'), 113.8 (C-2'), 104.1 (C-10), 103.3 (C-3), 99.3 (C-6), 94.3 (C-8)。以上数据与文献对比基本一致<sup>[13]</sup>,故鉴定化合物 3 为木犀草素。

化合物 4: 白色结晶性粉末; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.47 (1H, d,  $J = 0.9$  Hz, H-3), 6.09 (1H, dd,  $J = 5.6, 3.0$  Hz, H-6), 5.68 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz, H-7), 5.12 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-1), 4.53 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-1'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 167.3

(C-11), 152.0 (C-3), 144.5 (C-8), 125.9 (C-7), 111.4 (C-4), 99.0 (C-1'), 96.2 (C-1), 77.7 (C-3'), 77.1 (C-5'), 73.7 (C-2'), 70.4 (C-4'), 61.4 (C-6'), 59.8 (C-10), 51.5 (-OCH<sub>3</sub>), 46.3 (C-9), 38.4 (C-6), 34.9 (C-5)。以上数据与文献对比基本一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **4** 为梔子苷。

化合物 **5**: 白色粉末; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.40 (1H, s, 5'-COOH), 9.57 (1H, s, 4-OH), 9.13 (1H, s, 3-OH), 7.44 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7), 7.04 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-2), 6.98 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, H-6), 6.76 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 6.13 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8), 5.07 (1H, m, H-1'), 3.93 (1H, m, H-2'), 3.57 (1H, m, H-3'), 2.02~1.97 (4H, m, H-4', 6'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 175.3 (C-7), 166.1 (C-9'), 148.8 (C-4'), 146.0 (C-3'), 145.4 (C-7'), 126.0 (C-1'), 121.8 (C-6'), 116.2 (C-5'), 115.2 (C-2'), 114.7 (C-8'), 73.9 (C-3), 71.3 (C-4), 70.8 (C-5), 68.5 (C-1), 37.6 (C-6), 36.7 (C-2)。以上数据与文献对比基本一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物 **5** 为绿原酸。

化合物 **6**: 黄色粉末; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.98 (1H, s, 5-OH), 7.62~7.44 (1H, m, H-6'), 7.43 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 6.91 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5'), 6.79 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.75 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 5.09 (2H, d, *J* = 7.3 Hz, H-1''), 3.18~3.72 (4H, m, H-2''~5''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 182.3 (C-4), 164.9 (C-2), 163.4 (C-7), 161.6 (C-5), 157.4 (C-9), 150.4 (C-4'), 146.2 (C-3'), 121.8 (C-1'), 119.6 (C-6'), 116.4 (C-5'), 114.0 (C-2'), 105.8 (C-10), 103.6 (C-3), 100.3 (C-6), 100.0 (C-8), 95.2 (C-1''), 77.6 (C-5''), 76.8 (C-3''), 73.6 (C-2''), 70.0 (C-4''), 61.1 (C-6'')。以上数据与文献对比基本一致<sup>[16]</sup>, 故鉴定化合物 **6** 为木犀草苷。

### 3.2 细胞毒性研究

YQZ 醇提物的各萃取部位及分离得到的组分和单体对 RD 细胞的 TC<sub>50</sub> 和 TC<sub>0</sub> 见表 1。

### 3.3 抗病毒活性研究

YQZ 醇提物的 PEE、EAE 和 BE 体外对 CV-A6 的抑制率均大于对照 RBV, PEE 和对照组之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), WE 无活性。PEE 分离得到的组分 Fr. 8、Fr. 10 和分离得到的化合物 **1** (青蒿酸) 和 **2** (青蒿素) 对 CV-A6 的抑制率显著高于 RBV ( $P < 0.05$ 、0.01)。EAE 中分离得到组分 Fr. 5 及其分离得到的 Fr. 5-4 病毒抑制率高于 RBV, 分离

得到的化合物 **3** (木犀草素) 活性较低。BE 分离得到的 Fr. 1 及化合物 **4** (梔子苷)、**5** (绿原酸) 和 **6** (木犀草苷) 对 CV-A6 的抑制率显著高于对照 RBV ( $P < 0.01$ )。见图 1。

表 1 对 RD 细胞的细胞毒性

Table 1 Evaluation of cytotoxicity of samples in RD cells

部位	组分	单体	TC <sub>50</sub> /(μg·mL <sup>-1</sup> )	TC <sub>0</sub> /(μg·mL <sup>-1</sup> )
PEE			86.1	25.2
	Fr. 1		86.5	25.3
	Fr. 2		59.7	17.3
	Fr. 3		65.5	19.2
	Fr. 4		77.3	22.6
	Fr. 5		86.5	25.3
	Fr. 6		88.0	25.7
	Fr. 7		67.9	19.6
	Fr. 8		95.2	29.0
	Fr. 9		89.0	26.1
	Fr. 10		96.1	30.0
EAE	Fr. 11		89.0	25.9
		化合物 <b>1</b>	90.9	27.6
		化合物 <b>2</b>	99.2	31.0
			75.9	19.6
	Fr. 1		99.5	26.2
	Fr. 2		89.0	23.3
	Fr. 3		62.3	16.9
	Fr. 4		66.0	17.4
	Fr. 5		76.4	19.9
	Fr. 6		55.9	14.6
	Fr. 7		85.1	22.1
Fr. 8		96.1	25.3	
Fr. 9		76.9	20.0	
Fr. 5-1		77.9	20.3	
Fr. 5-2		85.6	22.2	
Fr. 5-3		62.0	16.5	
Fr. 5-4		68.9	17.9	
Fr. 5-5		75.5	19.6	
	化合物 <b>3</b>		13.9	5.0
BE			1 200.0	75.0
	Fr. 1		363.0	51.6
	Fr. 2		200.0	45.0
		化合物 <b>4</b>	232.6	75.0
		化合物 <b>5</b>	276.0	100.0
		化合物 <b>6</b>	21.6	9.0
WE			3 162.0	300.0

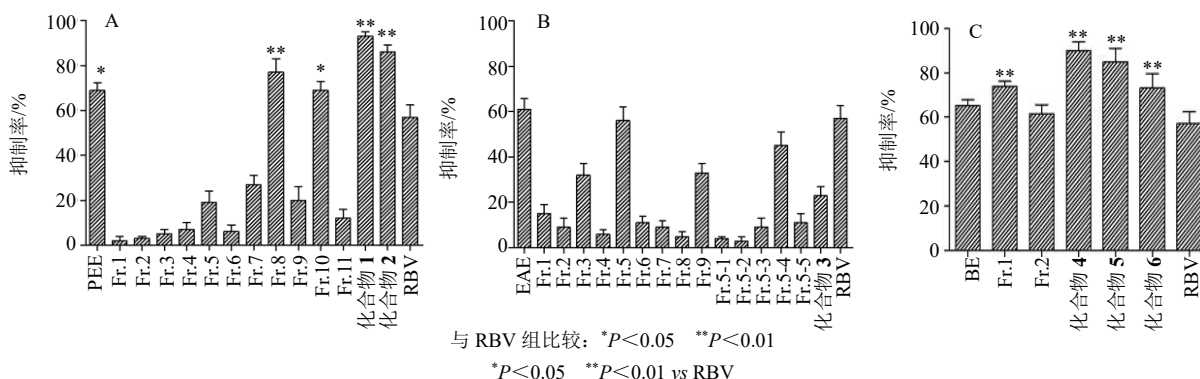


图 1 石油醚部位 (A)、醋酸乙酯部位 (B) 和正丁醇部位 (C) 对 CV-A6 的抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Inhibition rate of PEE (A), EAE (B) and BE (C) against CV-A6 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.4 活性成分与病毒靶点蛋白之间的相互作用

活性成分作为配体与受体蛋白 VP1 进行分子对接, 相关参数见表 2。表 2 中各成分和靶蛋白分子对接的绝对自由能和 Lib Dock 得分均较高, 说明其与蛋白结合紧密。分子对接的二维和三维结构示意图见图 2。

表 2 分子对接的相关参数

Table 2 Parameters of molecular docking

序号	成分	绝对自由能/ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	Lib Dock 得分
1	绿原酸	222.42	132.01
2	栀子苷	170.41	123.73
3	青蒿酸	32.34	84.13
4	青蒿素	170.50	94.81
5	木犀草苷	260.58	160.74

由图 2 可见, 绿原酸分子和 VP1 蛋白的 ASN、TYR 等 6 个氨基酸残基之间存在氢键作用, 栀子苷分子与 MET、ASP 等 7 个氨基酸之间形成氢键, 亲和力强。青蒿酸分子和氨基酸 ARG、GLU 之间形成氢键, 和 ASP、TYR 等多个残基之间存在范德华引力。木犀草苷分子与 ASN、CYS 等 5 个氨基酸之间存在氢键作用, 同时与其他氨基酸存在碳氢键、范德华引力、Pi-Sulfur 等相互作用。上述成分分子与氨基酸残基之间的相互作用使二者具有良好的亲和力, 使其起到抑制 VP1 蛋白的作用。

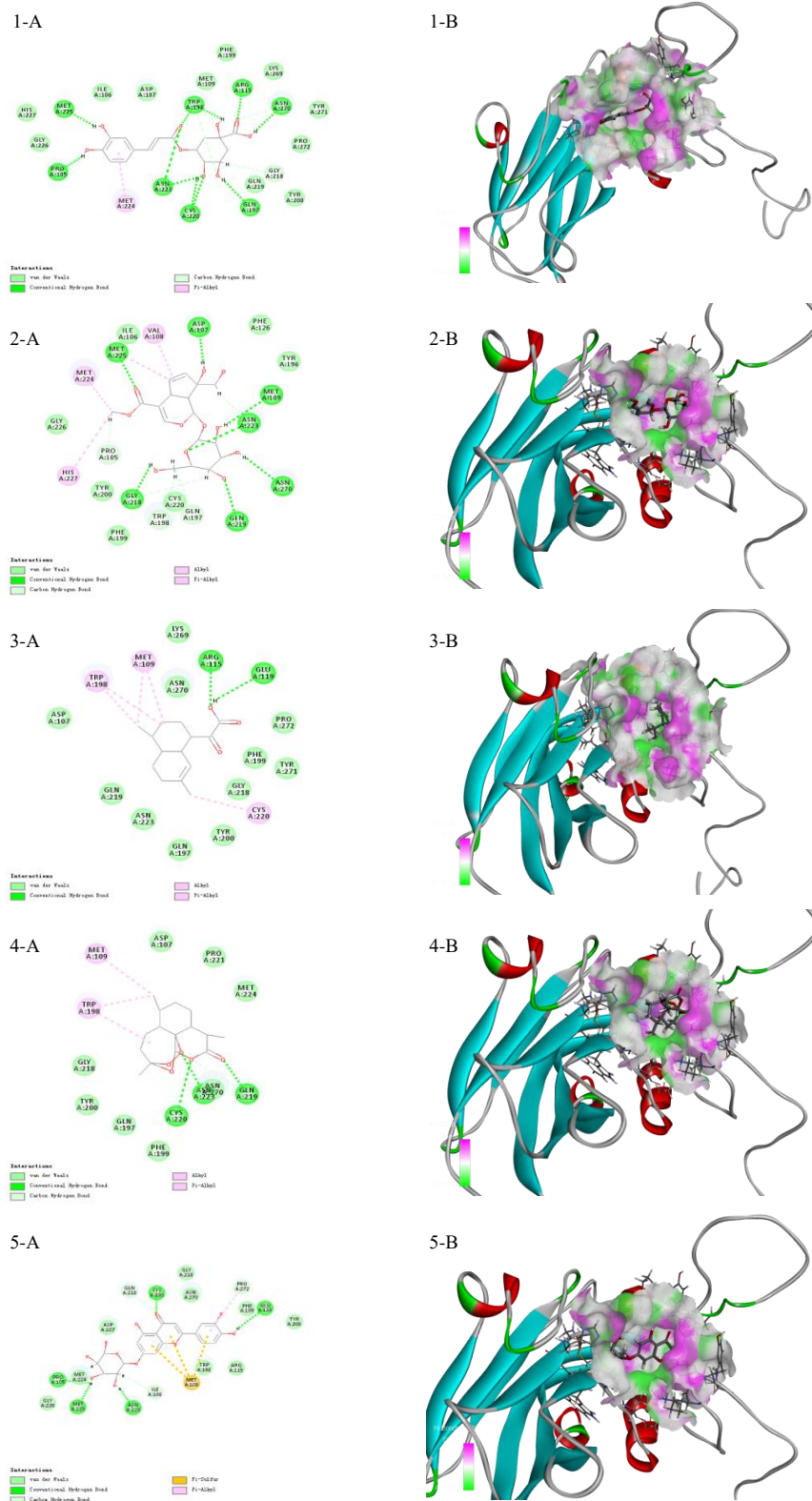
### 4 讨论

中药药效物质基础是指中药发挥治疗作用的化学成分(群)<sup>[17]</sup>, 明确药效物质基础是阐明中药作用机制的关键, 是优化制剂处方工艺的依据, 是保证质量控制具有科学性的核心, 是实现中药现代化

和国际化的重要研究内容<sup>[18-20]</sup>。本研究将 YQZ 醇提物采用萃取、硅胶柱色谱、大孔吸附树脂、凝胶柱色谱、聚酰胺柱色谱、重结晶等多种方式进行分离, 通过测定分离产物的病毒抑制率进行活性追踪。结果表明 YQZ 醇提物的 PEE、EAE 和 BE 具有良好的抗 CV-A6 活性, WE 基本无活性, 这和前期研究中水提物和醇提物的体外抗病毒活性筛选结果是一致的。PEE 和 BE 分别分离得到的青蒿酸和青蒿素、木犀草苷、绿原酸和栀子苷具有良好的抗 CV-A6 活性。

CV-A6 属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属, 病毒颗粒基因组编码的多聚蛋白水解为 3 个蛋白前体 (P1~P3)。P1 进一步水解为 4 个结构蛋白 (VP1~VP4), 共同构成病毒衣壳。VP4 位于病毒衣壳内侧, VP1~VP3 位于衣壳表面, 是抗原决定簇存在的主要部位。其中, VP1 的 surface-exposed loops 和 C 端结构是主要的免疫原性位点, 作为分子对接的结合部位。分子对接结果表明, 青蒿酸、青蒿素、绿原酸、栀子苷和木犀草苷分子均与 CV-A6 衣壳蛋白存在多个氢键、范德华引力等作用, 生成稳定的复合物。因此, 青蒿酸、青蒿素、绿原酸、栀子苷和木犀草苷成分是 YQZ 抗 CV-A6 的重要活性成分, 其抗病毒作用可能与抑制衣壳蛋白有关。

近年来, 清热解毒类中药及其活性成分的抗病毒作用和在治疗病毒性感染性疾病中的应用得到广泛关注。研究表明, 中药青蒿中的青蒿素及其衍生物具有抗病毒活性, 其中青蒿素具有抑制巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV)、乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒等多种病毒的作用<sup>[21-22]</sup>。中药栀子和金银花均为常用清热解毒药, 栀子中的主要成分栀子苷具有抗甲型



1-绿原酸 2-栀子苷 3-青蒿酸 4-青蒿素 5-木犀草苷  
 1-chlorogenic acid 2-geniposide 3- artemisic acid 4-artemisinin 5-luteoloside

图 2 分子对接的二维 (A) 与三维 (B) 示意图  
 Fig. 2 2D (A) and 3D (B) diagram of molecular docking

H1N1 流感病毒和 EV71 活性<sup>[23-24]</sup>; 绿原酸为金银花的主要成分之一, 对 EV71、腺病毒、HBV、HSV 等多种病毒具有抑制作用<sup>[25-26]</sup>。迄今为止, 尚未有上述活性成分抗 CV-A6 作用的报道。因此, 对上述成分抗 CV-A6 的体内作用及其他作用机制值得进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 樊晔, 田新贵, 张日新. 我国手足口病分子流行病学及防控管理措施探讨 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2018, 38(2): 139-148.
- [2] 李方, 许红梅. 手足口病柯萨奇病毒 A6 和 A10 流行病学特点 [J]. 儿科药学杂志, 2017, 23(7): 60-63.
- [3] 金美彤. 浙江省手足口病流行病学和病原学特征分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [4] 刘旭. 清热解毒中药的抗病毒作用刍议 [J]. 国医论坛, 2012, 27(4): 39.
- [5] 邢世华, 李晓波. 清热解毒类中药抗病毒活性及作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(4): 464-468.
- [6] 张平. 一种用于清热解毒的药物及其制备方法: 中国, CN1374126A [P]. 2012-01-04.
- [7] 王振中, 鲍琳琳, 孙兰, 等. 热毒宁注射液抗甲型 H1N1 流感病毒作用机制研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 90-93.
- [8] 常秀娟, 孙晓萍, 胡晗绯, 等. 热毒宁注射液对 EV71 病毒感染 Vero 细胞和乳鼠的作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2097-2102.
- [9] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. 热毒宁注射液治疗新型冠状病毒肺炎的活性成分与潜在作用机制初探 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(3): 381-387.
- [10] Chen J H, Zhang C, Zhou Y, *et al.* A 3.0-angstrom resolution cryo-electron microscopy structure and antigenic sites of coxsackievirus A6-like particles [J]. *J Virol*, 2018, 92(2): e01257-e01217.
- [11] 陈靖, 周玉波, 张欣, 等. 黄花蒿幼嫩叶的化学成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(11): 866-870.
- [12] 黄敬坚, Nicholls K M, 陈朝环, 等. 青蒿素的二维核磁共振研究 [J]. 化学学报, 1987, 45(3): 305-308.
- [13] 胡峻, 石任兵, 张援虎, 等. 荆芥穗化学成分研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(1): 38-40.
- [14] 李敏, 胡庆华, 李磊, 等. 梔子柏皮汤化学成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(9): 2069-2071.
- [15] 魏伟, 范春林, 王贵阳, 等. 广王不留行的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 615-621.
- [16] 张永欣, 张启伟, 李春, 等. 忍冬叶中抗氧化化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2372-2377.
- [17] 汪小莉, 刘晓, 韩燕全, 等. 中药药效物质基础研究方法概述 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 941-947.
- [18] 罗奇志. 双黄连方药抗病毒物质基础研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2009.
- [19] 肖平, 李祥, 陈建伟, 等. 中药药效物质基础研究思路与方法概述 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 1935-1938.
- [20] 张创峰, 沈硕, 宋联强, 等. 连花清瘟胶囊的化学成分研究(II) [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3222-3225.
- [21] Efferth T, Romero M R, Wolf D G, *et al.* The antiviral activities of artemisinin and artesunate [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(6): 804-811.
- [22] Romero M R, Efferth T, Serrano M A, *et al.* Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system [J]. *Antivir Res*, 2005, 68(2): 75-83.
- [23] Zhang Y S, Yao J, Qi X, *et al.* Geniposide demonstrates anti-inflammatory and antiviral activity against pandemic A/Jiangsu/1/2009 (H1N1) influenza virus infection *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antivir Ther*, 2017, 22(7): 599-611.
- [24] Lin Y J, Lai C C, Lai C H, *et al.* Inhibition of Enterovirus 71 infections and viral IRES activity by Fructus gardeniae and geniposide [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 62C: 206-213.
- [25] Li X, Liu Y Y, Hou X L, *et al.* Chlorogenic acid inhibits the replication and viability of Enterovirus 71 *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e76007.
- [26] Wang G F, Shi L P, Ren Y D, *et al.* Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro* [J]. *Antiviral Res*, 2009, 83(2): 186-190.

[责任编辑 王文倩]