（－）- 萜品 -4- 醇抗人呼吸道合胞病毒感染的动物试验研究

郭名扬[1]，陶 玲[2]，沈祥春[2]，王建新[3]，罗语思[4*]，张 科[1,2*]

（1. 贵州医科大学基础医学院，人体寄生虫学教研室，现代病原生物学特色重点实验室，贵州贵阳 550025；
2. 贵州医科大学药学院，贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心，贵州贵阳 550025；
3. 复旦大学药学院，上海 201203；4. 贵州医科大学附属医院急诊科，贵州贵阳 550004）

摘要：该研究的目的是考察（－）- 萜品 -4- 醇（**1**）在体内抗人呼吸道合胞病毒（hRSV）感染的活性。先将 **1** 和利巴韦林分别与 hRSV 高毒力小鼠适应株 GZ08-18 进行体外孵育，得到治疗组和阳性对照组的病毒株，用以感染小鼠，同时设置未经处理的病毒对照组。分别检测小鼠的体质量、存活率、肺匀浆病毒滴度、肺组织病理切片、免疫荧光强度，以及肺匀浆中炎症因子［巨噬细胞炎症蛋白 -1 α（MIP-1α）、白细胞介素（IL）-1α、IL-1β、IL-6 和肿瘤坏死因子 -α］的表达水平，以评价 **1** 的抗炎作用。结果显示，与病毒对照组相比，各治疗组小鼠的体质量回升效果显著、存活率较高、肺匀浆病毒滴度较低。病理切片的苏木精 - 伊红染色结果显示，治疗组与阳性对照组小鼠的肺泡结构能基本维持、肺泡间隔无增厚、未见融合；免疫荧光结果显示，各治疗组小鼠肺部的病毒蛋白表达显著降低，且肺匀浆中各炎症因子的表达水平均有所下调。其中 MIP-1α 和 IL-1α 表达下调较为显著。该研究首次报道 **1** 具有良好的体内抗 hRSV 感染活性。

关键词：人呼吸道合胞病毒；（－）- 萜品 -4- 醇；抗病毒药；体内研究

中图分类号：R965 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2023）06-0937-08

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.06.015

Animal Study of（－）-Terpinen-4-ol against Human Respiratory Syncytial Virus Infection

GUO Mingyang[1], TAO Ling[2], SHEN Xiangchun[2], WANG Jianxin[3], LUO Yusi[4*], ZHANG Ke[1,2*]

（*1. Key and Characteristic Lab. of Modern Pathogenicity Biology, Dept. of Human Parasitology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025; 2. The Hight Efficacy Application of Natural Medicine Resources Engineering Center of Guizhou Province, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025; 3. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 4. Dept. of Emergency, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004*）

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the activity of（－）-terpinen-4-ol（**1**）against human respiratory syncytial virus（hRSV）infection *in vivo*. Firstly, **1** and ribavirin were respectively incubated with the hRSV high-virulence strain GZ08-18. Then, the obtained strains were used to infect mice as the treatment group and positive control group. The virus control group without any treatment was set up at the same time also. Assays for evaluation of mouse body weight, survival rate, virus titers of lung tissue homogenates, pathological sections of lung tissues, immunofluorescence intensity, and detecting the expressions of macrophage inflammatory protein（MIP-1α）, interleukin（IL）-1α, IL-1β, IL-6, and tumor necrosis factor-α（TNF-α）in lung homogenates were conducted to check the anti-inflammatory effect of **1**. The results showed that, compared to the virus control group, all treatment groups showed better weight recovery, survival rates, and lower lung homogenate viral titers. HE staining results of pathological sections showed the alveolar structure of the mice in the treatment groups and the positive control group were maintained, the alveolar septum was not thickened, and no fusion was observed. Immunofluorescence results showed that the expressions of viral protein in lung tissues significantly decreased in the treatment groups. The expressions of inflammatory cytokines in lung homogenates were downregulated, especially the decoding of MIP-1α and IL-1α decreased remarkably. This study reported a significant effect of **1** against hRSV infection *in vivo* for the first time.

Key Words: human respiratory syncytial virus;（－）-terpinen-4-ol; antiviral drug; *in vivo* experiment

1956 年，人呼吸道合胞病毒（human respiratory syncytial virus，hRSV）首次自患鼻炎的幼年黑猩猩咽拭子样本中被分离出来，随后在下呼吸道感染的婴幼儿中被发现。hRSV 是一种非节段性单股负链 RNA 病毒，属于正肺病毒属肺炎病毒科，基因组全长约 15 200 bp，共编码 11 个病毒蛋白 [1]。hRSV 感染可导致婴幼儿、免疫缺陷人群以及老年人发生急性下呼吸道感染（acute lower respiratory tract infection，ALRTI），甚至死亡 [2]。儿童在 2 岁前感染 hRSV 导致的 ALRTI 是引起新生儿死亡的主因之一 [3]。该病毒感染造成的社会负担可能比数据表现出来的更为严重，并且目前仍没有一种安全有效的 hRSV 疫苗问世 [4]。帕利珠单克隆抗体的被动免疫预防是唯一被美国 FDA 批准的特异性治疗方法，但仅限于高危婴儿，费用高且应用范围有限 [5]。具有广谱抗病毒活性的核苷类似物利巴韦林（ribavirin，**2**）虽被证实对 hRSV 感染有一定疗效，但可能伴有严重的不良反应和婴儿致畸作用，已不推荐临床常规使用。因此，开发安全、可靠和平价的治疗药物迫在眉睫。

（－）- 萜品 -4- 醇［（－）-terpinen-4-ol，**1**］是茶树挥发油中的重要组分，有文献 [6] 报道茶树挥发油可显著抑制甲型流感病毒感染细胞，而 **1** 可能发挥了主要作用。另一项研究 [7] 亦提示茶树挥发油中的 **1** 等成分可能具有抑制猫冠状病毒和人冠状病毒 OC43 的活性。缅甸产刺花椒（*Zanthoxylum acanthopodium* DC.）挥发油对登革病毒感染具显著抑制能力，其主要成分亦为 **1**[8]。另外，研究 [9] 亦证实含有 **1** 的精油有一定的抗 1 型疱疹病毒活性。上述研究均说明 **1** 具有潜在的抗病毒药用价值，其作用机制可能与提高机体免疫力和增强病毒清除能力有关。茶树和刺花椒挥发油治疗感染性疾病的历史悠久，且药效温和；同时，**1** 作为挥发油的主要成分已能被化学合成，成本可控。因此，**1** 可能是一种安全、可靠和平价的抗病毒候选药物，具有一定的应用前景和研究价值。

本实验室前期开展了鱼腥草挥发油芳香水抗 hRSV 感染的动物试验研究，结果表现出显著的抗感染效果，随后采用气相色谱 - 质谱（GC-MS）联用技术分析了鱼腥草挥发油芳香水的主要成分，结果显示其中包含 **1** 等小分子化合物。据此，本研究以前期建立的 hRSV 感染小鼠致死性动物模型为基础进行体内试验，将 **1** 与 hRSV 高毒力小鼠适应株 GZ08-18 共孵育，用于感染 BALB/c 小鼠，以探究 **1** 的抗病毒效果。

1　仪器与试药

1.1　仪器

BB150 型 CO_2 培养箱、ND2000 型超微量微孔板分光光度计（美国 Thermo Fisher 公司）；FV1000 型激光共聚焦显微镜（日本 Olympus 株式会社）；R500IE 型小动物麻醉机（深圳市瑞沃德生命科技有限公司）；Sorvall Legend Micro 17R 型冷冻离心机（美国贝克曼库尔特有限公司）；CFX96 型实时荧光定量聚合酶链反应（RT-qPCR）仪（美国 Bio-Rad 公司）。

1.2　试剂

1（美国 Sigma-Aldrich 公司，纯度 95 %，批号 BCBX2173）；**2**［阿拉丁试剂（上海）有限公司，纯度 98%，批号 A2122411］；酶联免疫吸附试验（ELISA）测定试剂盒［巨噬细胞炎症蛋白 -1α（MIP-1α），美国 Thermo Fisher 公司，批号 309466-002；肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-6、IL-1α、IL-1β，美国 BioLegend 公司，批号 B357289、B358226、B352595 和 B352599］；hRSV F 蛋白抗体（美国 Santa Cruz Biotechnology 公司，批号 A1818）；荧光二抗 488 山羊抗小鼠（武汉塞维尔生物科技有限公司，批号 CR2212112）；CCK8 试剂盒（美国 MedChemExpress 公司，批号 121506）；胎牛血清（FBS，美国 Thermo Fisher Scientific 公司，批号 2412072）；青 / 链霉素混合液（100×，PS，北京索莱宝科技有限公司，批号 20221020）；病毒

收稿日期：2023-02-06

基金项目：贵州省卫生健康委科学技术基金项目（No. gzwkj2021-463，No. gzwkj2022-230）；贵州省中医药管理局中医药、民族药科学技术研究课题（No. QZYY-2021-018）；贵阳市科技局（筑科合同［2020］号16-9）；贵州医科大学、贵州医科大学附属医院国家自然科学基金培育项目（No. I-2020-06, No. 20NSP010）。

作者简介：郭名扬（1993—），女，硕士研究生，专业方向：病毒免疫学。

通信作者：张　科（1978—），男，博士，副教授，从事病毒免疫学研究。

E-mail：kevin312_112@aliyun.com

罗语思（1979—），女，博士，主任医师，从事重症感染相关研究。

E-mail：2608777366@qq.com

RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、RT-qPCR 试剂盒［宝生物工程（大连）有限公司，批号 AK40808A、AL20634A 和 AL13544A］；DMEM/F12-GlutaMAX 培养基（美国 Gibco 公司，批号 2186678）；22 号导管（22G surflo® I.V. Catheter，菲律宾 Terumo 公司）。

1.3 实验动物

SPF 级 8 月龄 BALB/c 雌鼠［体质量 23 ～ 30 g，江苏华创信诺医药科技有限公司，实验动物生产许可证编号 SCXK（苏）2020-0009，动物试验经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准（编号 2100080）］。

1.4 细胞与病毒株

人喉表皮样癌细胞（HEp-2 细胞，美国典型培养物保藏中心，CCL-23）；本试验所用 hRSV 毒株为高毒力小鼠适应株 GZ08-18[10]，系由一株临床分离的 hRSV 在 SPF 级 8 月龄 BALB/c 雌鼠中连续传代后分离、纯化获得，由本实验室保存。

2 方法与结果

2.1 HEp-2 单层细胞的制备及病毒培养方法

HEp-2 细胞单层细胞制备：取对数生长期的 HEp-2 细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板，用含 5% FBS 和 1% PS 的 DMEM/F12-GlutaMAX 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

病毒培养方法：HEp-2 细胞以每孔 1.8×10^4 个的密度接种于 T25 培养瓶，用含 5% FBS 和 1% PS 的 DMEM/F12-GlutaMAX 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，取病毒 25 μL 感染 HEp-2 细胞，孵育 1 h 后换含 2% FBS 的 DMEM/F12-GlutaMAX 维持液于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 3 d，再用于感染小鼠。

2.2 药物毒性试验

采用 CCK8 法测定经药物处理后的细胞活性。先以每孔 1×10^4 个的密度接种 HEp-2 细胞至 96 孔板，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，将 **1** 从 5 mg/mL 开始倍比稀释 8 个浓度，**2** 从 10 mg/mL 开始倍比稀释 7 个浓度，并设置空白细胞对照孔，计算细胞存活率（*Y*）。以 *Y* 为纵坐标、药物质量浓度（*c*）为横坐标，分别得 **1** 和 **2** 的线性回归方程为 $Y=-23.35c+94.58$（$R^2=0.974\,0$）和 $Y=-5.963c+76.05$（$R^2=0.954\,5$），计算得其半数毒性浓度（TC_{50}）分别为 1.247 和 2.023 mg/mL，如图 1 所示。

2.3 1 与病毒共孵育后感染 BALB/c 小鼠

hRSV 感染 BALB/c 小鼠致死模型的构建：以前期报道中构建的 BALB/c 小鼠致死模型为基础[11]，以插喉方式感染小鼠。将小鼠麻醉后固定在铁丝上，使其呈仰卧位，嘴自然张开，通过冷光源光纤找到小鼠气管，迅速将 22 号导管插入气管，退出导管针头后加入病毒［含病毒 1×10^{10} 半数组织培养感染剂量（$TCID_{50}$）］100 μL，每日 3 次，每只小鼠共吸入病毒 300 μL。

参考文献[12]中的感染方式，使用预先与药物共孵育的病毒感染小鼠。基于小鼠体质量，配制终质量浓度分别为 7.5、5.0 和 2.5 mg/kg 的 **1** 为治疗组，以终质量浓度 7.5 mg/kg 的 **2** 为阳性对照组，以磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.2 ～ 7.4，浓度为 0.01 mol/L）为病毒对照组，每组给药体积均为 50 μL，分别与等体积病毒充分混合后置 37 ℃条件下孵育 1 h，并设置不含病毒的 PBS 100 μL 为空白组（MOCK），以 BALB/c 小鼠致死模型构建方法攻毒 BALB/c 小

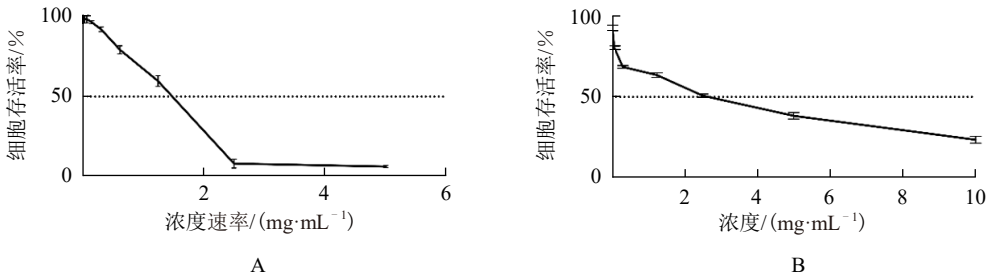


图 1 1（A）和 **2**（B）对 **HEp-2** 细胞的毒性（*n*=3）

Fig.1 Cytotoxicity of **1**（A）and **2**（B）against HEp-2 Cells（*n*=3）

鼠，以病毒最后一次感染日为 d0，小鼠感染模式及后续试验设计如图 2 所示。

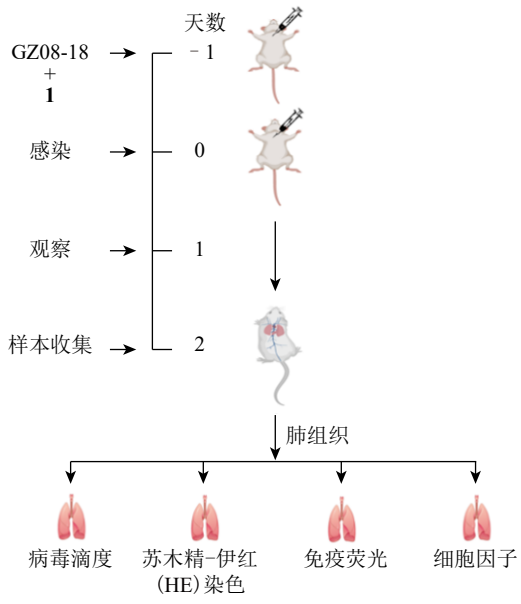


图 2　试验基本流程图

Fig.2　Basic Flow Chart of the Experiment

2.4　小鼠体质量变化以及存活情况

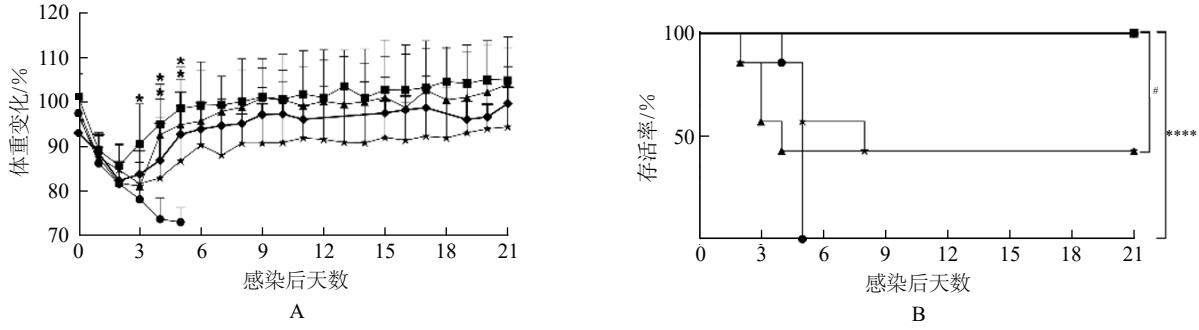
照“**2.3**”项下方法，以 d1 攻毒之前的小鼠体质量为基准，其后每日观察小鼠状态并记录体质量和存活情况。每组 7 只小鼠，试验终点为感染后 d21。图 3A 表示各组小鼠的体质量变化情况，药物治疗组及阳性对照组体质量均呈现逐步回升趋势，其中 7.5 mg/kg 的 **1** 治疗组小鼠在 d3、d4、d5 时体质量显著回升（P<0.05），且小鼠生存状态良好，毛发光滑、精神活跃，未观察到全身发抖、呼吸急促和呼吸困难现象，5.0 mg/kg 的 **1** 治疗组小鼠在 d3 和 d4 时体质量显著回升（P<0.05）；与此相反，病毒对照组小鼠体质量呈下降趋势，且小鼠出现精神萎靡不振、行动迟缓、毛发耸立和全身发抖的现象，至 d5 时全部死亡。

存活率（图 3B）结果显示，7.5 mg/kg 的 **1** 治疗组及阳性对照组存活率 100%（P<0.001），5.0 和 2.5 mg/kg 治疗组存活率均为 42.9%，病毒对照组存活率为 0，说明 **1** 处理对 GZ08-18 感染小鼠保护作用显著。

2.5　肺组织匀浆病毒滴度测定

小鼠感染后于指定时间点取右肺匀浆，采用病毒 RNA 提取试剂盒提取病毒 RNA，反转录试剂盒合成病毒 cDNA，随后以 RT-qPCR 法根据绝对定量法构建病毒 *N* 基因标准曲线[13]，定量测定病毒基因拷贝数，比较各组病毒基因拷贝数与对应小鼠肺重的比值。

各组小鼠感染后 d2 肺匀浆中病毒滴度的 RT-qPCR 结果如图 4 所示［图中虚线表示检测下限



●—PBS+GZ08-18；◆—7.5 mg/kg **2**+GZ08-18；
■—7.5 mg/kg **1**+GZ08-18；▲—5 mg/kg **1**+GZ08-18；★—2.5 mg/kg **1**+GZ08-18。

图 3　GZ08-18 菌株感染小鼠的体质量曲线和存活率（与病毒对照组比较，* 表示 P<0.05，**** 表示 P<0.000 1；与 5.0 mg/kg **1** 治疗组比较，# 表示 P<0.05；n=7）

Fig.3　Body Weight Curves (A) and Survival Rates (B) of Mice Infected with GZ08-18 Strains (Compared with the Viral Control Group, * Represents P<0.05, **** Represents P<0.0001; Compared with 5.0 mg/kg **1** Treatment Group, #Represents P<0.05; n=7)

（DL）]，药物治疗各组、阳性对照组与病毒对照组相比，肺匀浆中病毒滴度均显著下调（P<0.05），提示不同剂量 **1** 和 **2** 处理对病毒在动物体内复制均有显著抑制效果，不同剂量 **1** 和 7.5 mg/kg **2** 组之间无统计学差异，提示本试验范围内 **1** 与 **2** 对病毒在动物体内复制的抑制能力无显著差异。

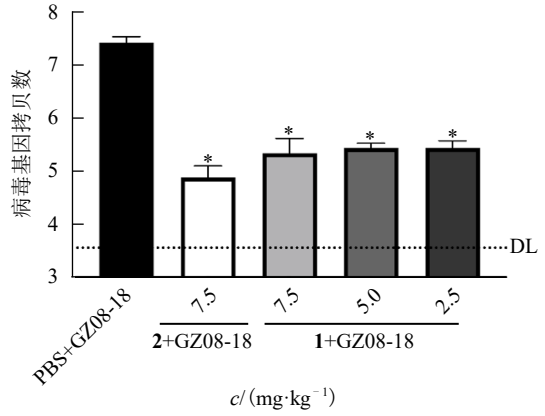


图 4 GZ08-18 菌株感染小鼠的肺组织匀浆病毒滴度测定结果（与病毒对照组比较，* 表示 P<0.05；n=3）

Fig.4 Determination Results of Viral Titers of Lung Homogenates of Mice Infected with GZ08-18 Strains (Compared with the Viral Control Group, * Represents P<0.05; n=3)

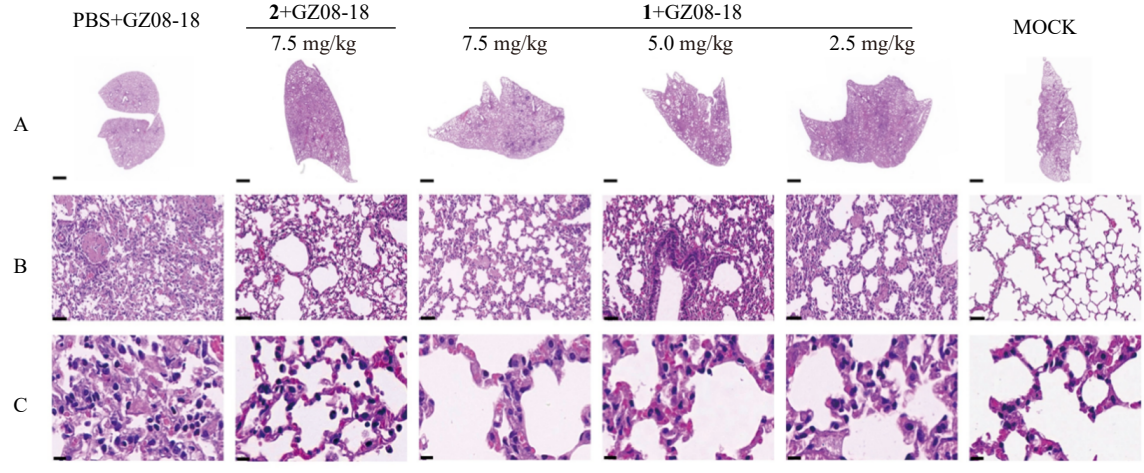
2.6 HE 染色观察肺组织病理学变化

小鼠感染后于指定时间点取左肺用 4% 多聚甲醛固定、脱水、包埋，制成石蜡切片，二甲苯脱蜡后经乙醇逐步脱水；经苏木精染色、盐酸乙醇分色、自来水浸泡、伊红染色、常规脱水后，用透明、中性的树脂封片，然后在显微镜下观察并采集图像。

各组小鼠感染后 d2 肺组织病理切片 HE 结果如图 5 所示（每组试验独立重复 2 次）。经不同剂量 **1** 或 **2** 处理后，虽在小鼠肺小血管和支气管基部可见少量炎症细胞浸润，但大部分肺泡结构保持完整，未见大量肺泡融合、破坏；而病毒对照组小鼠的肺部病变严重，出现大量肺泡融合、破坏，肺泡腔中可见较明显的红细胞渗漏、肺间质水肿增厚和大量炎症细胞浸润。结果表明，不同剂量 **1** 和 7.5 mg/kg **2** 处理可明显缓解小鼠的肺部损伤，使其肺泡基本结构得以维持，肺通气或换气功能得以保持。值得注意的是，经 7.5 mg/kg **1** 处理后的小鼠肺泡结构较 7.5 mg/kg **2** 组更加完整，且炎症细胞浸润较少、肺间质水肿增厚程度较轻，表明 7.5 mg/kg **1** 处理的效果优于同剂量的 **2**。

2.7 肺组织病毒融合（fusion，F）蛋白表达水平

小鼠感染后于指定时间点取左肺，经脱蜡、脱水、抗原修复、封闭后，进行 hRSV F 蛋白一抗孵育、



A—标尺 =1 000 μm；B—标尺 =50 μm；C—标尺 =10 μm。

图 5 1 处理改善 GZ08-18 感染小鼠肺组织病变（n=3）

Fig.5 **1** Treatment Improves Lung Tissue Lesions after GZ08-18 Infection（n=3）

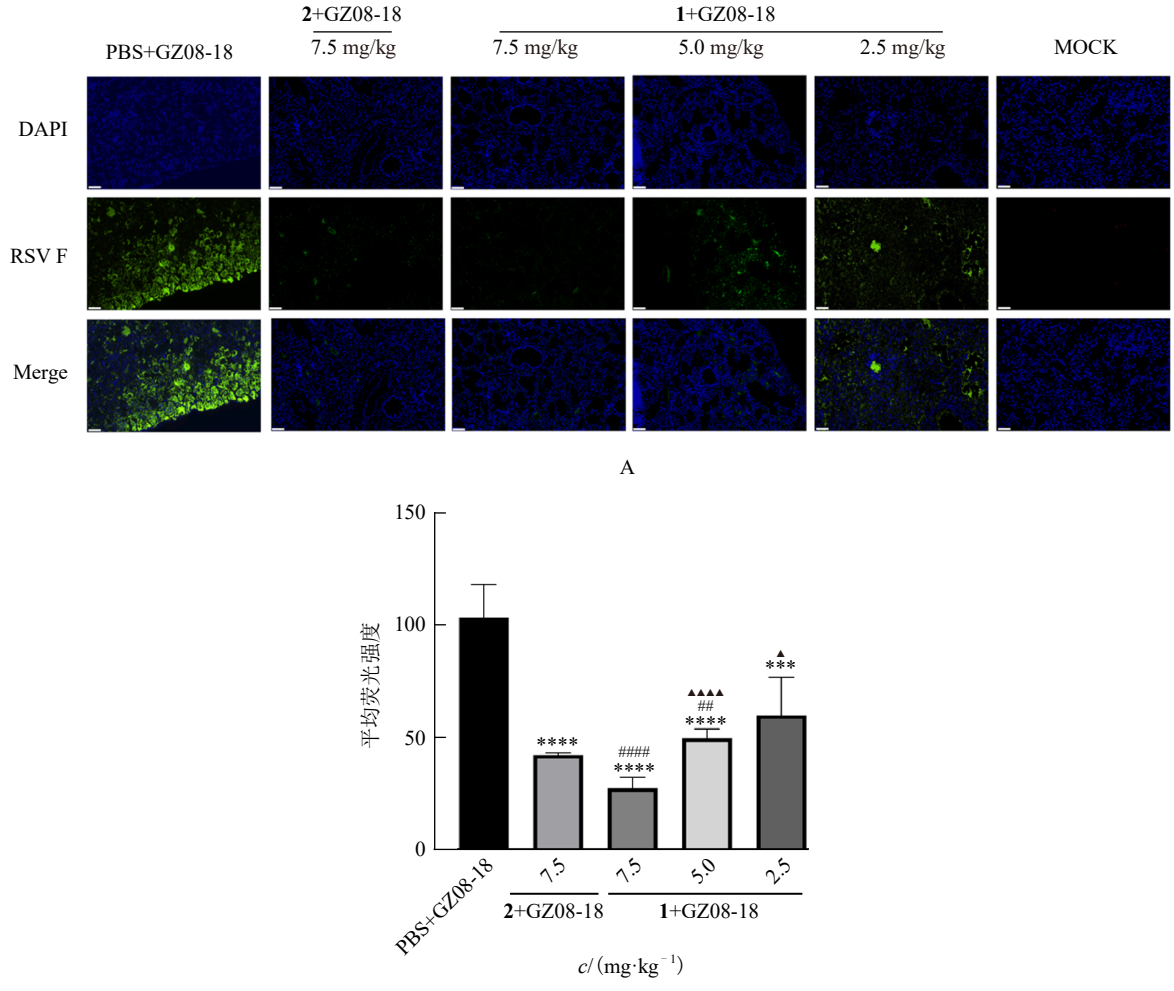
二抗孵育，并用 DAPI 和染色液复染、组织自发荧光淬灭剂孵育，封片后于显微镜下观察并采集图像。每组试验独立重复 2 次。

肺病理切片及免疫荧光强度量化结果显示，**1** 治疗组及阳性对照组小鼠肺组织内病毒 F 蛋白（绿色荧光）表达水平较病毒对照组均显著减弱（图 6）。该结果表明不同剂量 **1** 与 7.5 mg/kg **2** 均对病毒 F 蛋白表达有显著抑制作用。值得注意的是，7.5 mg/kg **1** 对病毒的抑制效果显著强于同剂量的 **2**。

2.8　肺匀浆中炎症因子的表达量

炎症因子与呼吸道损伤密切相关，为了进一步确认不同剂量的药物是否有抗炎效果，采用 ELISA 法检测各组小鼠感染后 d2 日肺匀浆中炎症因子 MIP-1α、IL-1α、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的表达量。于指定时间点取右肺匀浆，离心、取上清，照 ELISA 试剂盒操作步骤加入样本、空白对照以及标准品，测量肺匀浆中 MIP-1α、IL-1α、IL-1β、IL-6 以及 TNF-α 的含量。

结果如图 7 所示，**1** 治疗组和阳性对照组处理后小鼠肺匀浆中各炎症标志物的表达量均有所下降并低于病毒对照组，且以 2.5 mg/kg **1** 抗炎效果最佳（n=3），经其处理后的所有炎症标志物表达量均低



A—肺组织内病毒 F 蛋白共聚焦显微图（标尺 =50 μm）；B—肺组织免疫荧光强度（与病毒对照组比较，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1；与 **2** 治疗组比较，## 表示 P<0.01，#### 表示 P<0.000 1；与 7.5 mg/kg **1** 比较，▲表示 P<0.05，▲▲▲▲表示 P<0.000 1；n=3）。

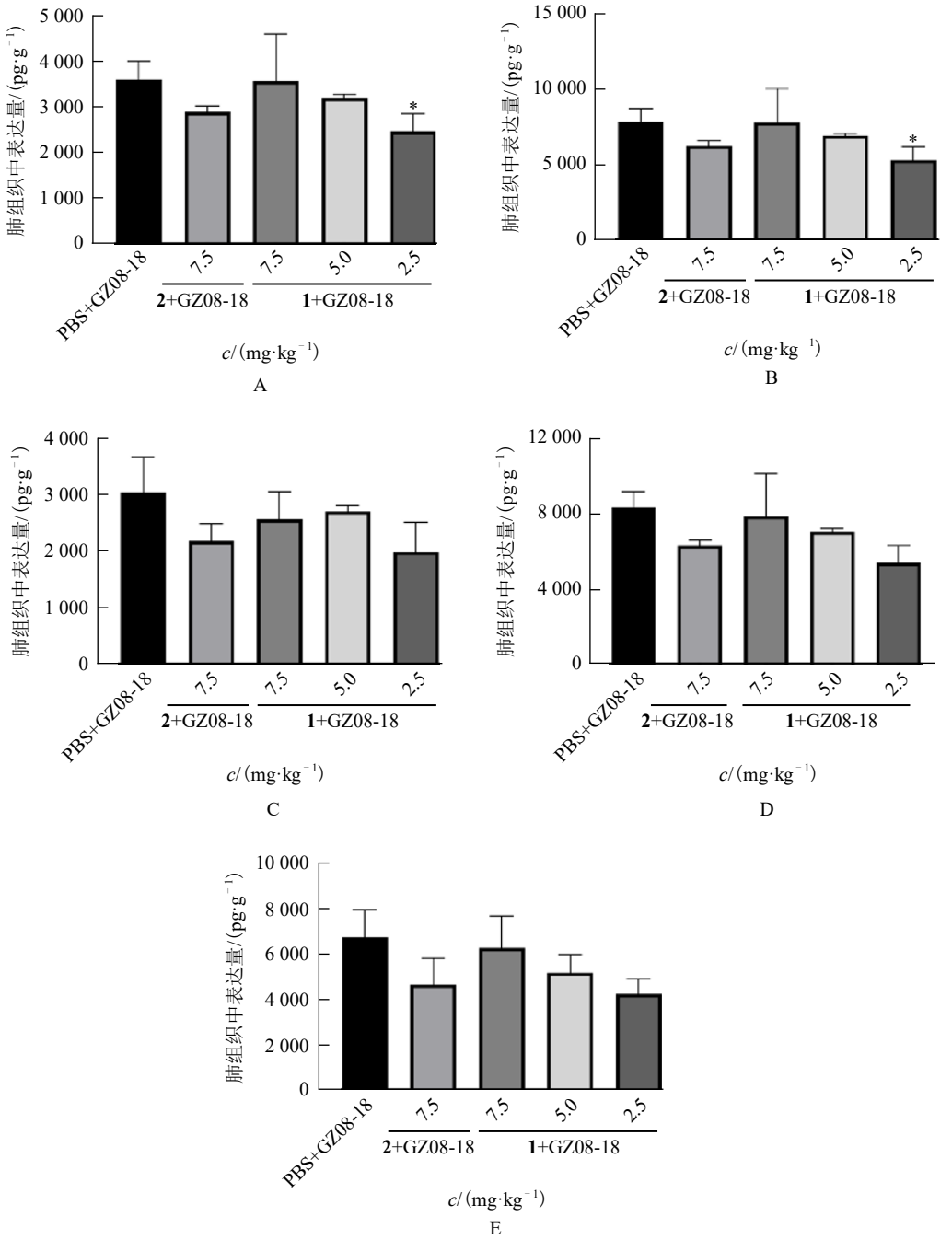
图 6　肺组织中病毒 F 蛋白的表达（n=3）

Fig.6　Expression of Viral F Proteins in Lung Tissue（n=3）

于阳性对照组。值得注意的是，2.5 mg/kg **1** 能够显著降低 MIP-1α 和 IL-1α 水平（P<0.05）。

3 总结与讨论

小分子药物对治疗人类疾病和推动医学进步具有巨大贡献，因具有给药方便、价格实惠、可口服等优势一直是当前药物研发的主流方向[14]。然而，鱼腥草活性成分抗病毒感染的体内研究报道较缺乏[15]。本研究依托 hRSV 感染小鼠致死性动物模型，



A—MIP-1α；B—IL-1α；C—IL-1β；D—IL-6；E—TNF-α。

图 7 肺匀浆中炎症因子的表达量（与病毒对照组比较，* 表示 P<0.05；n=3）

Fig.7 expressions of inflammatory cytokines in lung homogenates

(Compared with the viral Control Group, *Represents P<0.05; n=3)

首次采用已被证实具有抗病毒效果的中草药鱼腥草活性成分 **1** 进行体内试验，探究其对 hRSV 的抗病毒效果。结果显示，**1** 治疗可显著提高小鼠生存率。肺病理切片 HE 染色试验结果显示，**1** 治疗明显改善肺部损伤程度，可维持肺泡基本结构，且会显著降低肺部病毒蛋白表达。并且，**1** 可下调肺部 MIP-1α、IL-1α、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 炎症标志物的表达量，以 MIP-1α、IL-1α 炎症因子表达量下调较为显著，表明 **1** 能减轻肺部炎症，特别是 2.5 mg/kg **1** 处理后所有炎症标志物的表达量均低于 **2**。综上所述，高浓度 **1** 有较好的抗病毒效果，但低剂量具有较好的抗炎效果。因该药物功能的多效性、多面性以及复杂性，可以应用于多种情况，同时可以考虑联合用药。然而，本研究的局限性在于需将药物与病毒共孵育后才能起效，可能会造成临床上应用的不便。本研究曾经尝试病毒感染小鼠后再给予药物治疗，但效果不佳。造成该现象的原因可能是 **1** 作为挥发油成分的不稳定性（易挥发和光热条件下分解）和疏水性限制了其体内递送，而某些小分子纳米材料如胶束等作为一种通过自组装形成的药物递送载体，具有粒径小、结构稳定和低毒性等优点[16]，可能是未来包被挥发油小分子成分，降低挥发性、提高水溶性和稳定性，用于体内有效递送的新型工具[17]。药物与病毒孵育后才能起效的特点表明 **1** 可能具有直接结合病毒粒子的能力，且鱼腥草挥发油中的甲基正壬酮、月桂基醛和辛基醛可直接干扰流感病毒包膜蛋白[18]，可能是后续机制研究的方向。需要注意的是，虽然研究表明 **1** 具有一定的抗病毒活性，但目前仍处于研究阶段，尚未作为正式的抗病毒药物应用于临床治疗。在未来的研究中，还需要深入探索其抗病毒机制、优化其药理学特性，并进行进一步的临床试验。

参考文献：

[1] NAM H H, ISON M G. Respiratory syncytial virus infection in adults [J]. *BMJ*, 2019, **366**: l5021.

[2] RUSSELL C D, UNGER S A, WALTON M, *et al*. The human immune response to respiratory syncytial virus infection [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2017, **30**(2): 481-502.

[3] 夏　薇, 韦　红. 新生儿呼吸道合胞病毒感染及预防研究现状[J]. 儿科药学杂志, 2022, **28**(3): 56-58.

[4] BERGERON H C, TRIPP R A. Immunopathology of RSV: an updated review [J]. *Viruses*, 2021, **13**(12): 2478.

[5] DOMACHOWSKE J B, ANDERSON E J, GOLDSTEIN M. The future of respiratory syncytial virus disease prevention and treatment [J]. *Infect Dis Ther*, 2021, **10**(S1): 47-60.

[6] GAROZZO A, TIMPANARO R, BISIGNANO B, *et al*. *In vitro* antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2009, **49**(6): 806-808.

[7] ROMEO A, IACOVELLI F, SCAGNOLARI C, *et al*. Potential use of tea tree oil as a disinfectant agent against coronaviruses: a combined experimental and simulation study [J]. *Molecules*, 2022, **27**(12): 3786.

[8] YANG J J, SONG X Z, HU H B, *et al*. Chemical composition and antifungal, anti-inflammatory, antiviral, and larvicidal activities of the essential oils of *Zanthoxylum acanthopodium* DC. from China and Myanmar [J]. *Molecules*, 2022, **27**(16): 5243.

[9] GAVANJI S, SAYEDIPOUR S S, LARKI B, *et al*. Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture [J]. *J Acute Med*, 2015, **5**(3): 62-68.

[10] ZHANG K, HE J, LI C, *et al*. Complete genome sequences of one human respiratory syncytial antigenic group a virus from China and its four mouse-adapted isolates [J]. *Genome Announc*, 2015, **3**(2): e00062-15.

[11] ZHANG K, LI C, LUO Y S, *et al*. Establishment of a lethal aged mouse model of human respiratory syncytial virus infection [J]. *Antiviral Res*, 2019, **161**: 125-133.

[12] ASTANI A, REICHLING J, SCHNITZLER P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils [J]. *Phytother Res*, 2010, **24**(5): 673-679.

[13] 刘春源, 杨筱萌, 罗语思, 等. 人呼吸道合胞病毒qRT-PCR绝对定量检测法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, **12**(9): 1033-1036.

[14] 杜晓利, 陈慧慧, 叶向阳, 等. 以RNA为靶标的小分子药物的研究进展[J]. 药学学报, 2022, **57**(10): 2902-2913.

[15] 廖健婷, 郝晨静, 李　博. 鱼腥草抗病毒作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2021, **37**(5): 224-228.

[16] CA Y F, QI J P, LU Y, *et al*. The *in vivo* fate of polymeric micelles [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, **188**: 114463.

[17] YUN P, DEVAHASTIN S, CHIEWCHAN N. Microstructures of encapsulates and their relations with encapsulation efficiency and controlled release of bioactive constituents: a review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2021, **20**(2): 1768-1799.

[18] HAYASHI K, KAMIYA M, HAYASHI T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV [J]. *Planta Med*, 1995, **61**(3): 237-241.