

黄芩苷抑制 H5N1 禽流感病毒进入的机制研究

杨 洁, 李日婵

南方医科大学药学院, 广东 广州 510515

摘要: 研究黄芩苷抑制 H5N1 禽流感假病毒的活性及其作用机理。采用 H5N1 假病毒检测体系, 观察黄芩苷对不同 H5N1 禽流感假病毒株进入的抑制作用; 并结合 VSVG 假病毒为阴性对照, 判定黄芩苷是特异性的作用于 H5N1 禽流感病毒的进入环节; 采用血凝抑制实验、ELISA 实验分析其作用机理, 采用 MTT 法测定黄芩苷毒性。黄芩苷能特异性的抑制 A/Anhui/1/2005, A/Xinjiang/1/2006, A/Hong Kong/156/1997, A/Qinghai/59/2005, A/Thailand/Kan353/2004, A/VietNam/1194/2004 H5N1 禽流感假病毒株的进入, IC_{50} 分别为 $65.76 \pm 5.61 \mu\text{M}$ 、 $54.98 \pm 4.38 \mu\text{M}$ 、 $46.81 \pm 5.12 \mu\text{M}$ 、 $32.88 \pm 4.18 \mu\text{M}$ 、 $63.30 \pm 1.59 \mu\text{M}$ 、 $43.23 \pm 3.43 \mu\text{M}$; 黄芩苷对血凝素 HA2 亚基有抑制作用, IC_{50} 为 $35.86 \pm 3.09 \mu\text{M}$ 。黄芩苷在体外具有抑制 H5N1 禽流感进入的作用, 其作用机制为抑制血凝素 HA2 亚基。

关键词: 黄芩苷; H5N1 亚型; 血凝素; HA2 亚基

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.018

Inhibitory Mechanism of Baicalin on H5N1 Influenza Virus

YANG Jie, LI Ri-chan

School of Pharmaceutical Sciences Southern Medical University, Guangzhou Guangdong 510515, China

Abstract: To study the inhibitory activity and mechanism of baicalin against H5N1 pseudovirus. Inhibition of viral-entry by baicalin was determined with H5N1 pseudoviruses system infected with different H5N1 pseudovirus strains, while VSVG pseudoviruses was used as negative control. Hemagglutination inhibition assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were performed to investigate the mechanism for its anti-influenza activity. The cytotoxicity of baicalin was measured using MTT assay. The results demonstrated that baicalin specifically inhibited the entry of H5N1 pseudovirus strains, including A/Anhui/1/2005, A/Xinjiang/1/2006, A/Hong Kong/156/1997, A/Qinghai/59/2005, A/Thailand/Kan353/2004, A/VietNam/1194/2004, and the IC_{50} values were $65.76 \pm 5.61 \mu\text{M}$, $54.98 \pm 4.38 \mu\text{M}$, $46.81 \pm 5.12 \mu\text{M}$, $32.88 \pm 4.18 \mu\text{M}$, $63.30 \pm 1.59 \mu\text{M}$ and $43.23 \pm 3.43 \mu\text{M}$, respectively. Moreover, baicalin targeted HA2 subunit of hemagglutinin with IC_{50} of $35.86 \pm 3.09 \mu\text{M}$. These findings suggested that baicalin blocked entry of H5N1 influenza virus directly. The action mechanisms may be potential target to HA2 subunit of hemagglutinin.

Key words: baicalin; H5N1 subtype; hemagglutinin; HA2 subunit

流行性感冒病毒(简称流感病毒)是经急性呼吸道传播的流感致病因子,属于 RNA 病毒的正粘病毒科,分为甲、乙、丙三型。其中甲型流感病毒最为常见,同时造成的危害也最大。1918 年流感的爆发是最严重的一次,全世界患者数在 5 亿以上,死于流感的人数达 5000 万^[1]。2009 年新甲型 H1N1 流感病毒造成了世界范围的流感爆发^[2],而自 1997 年香港首先报道 18 例人感染高致病性 H5N1 型禽流感

病毒以来,全球 H5N1 感染病例已达 620 人,死亡 367 人,死亡率接近 60%,远远高于 SARS 等突发性传染病,且很多是青壮年人群^[3]。2013 年 3 月在我国上海和安徽发现 H7N9 禽流感病毒,死亡率 30%,受到了世界许多国家和世界卫生组织的关注^[4]。2014 年德国、荷兰和英国相继出现了 H5N8 禽流感。因此,流感的防治,尤其是药物的防治已是迫在眉睫。目前,现有的治疗药物仅 4 种,且只作用于 M2 离子通道和神经氨酸酶两个靶点,远不能满足临床和社会的需求。积极研究防治流感病毒的药物,尤其是新作用机制的药物,不仅是当前医学界面临的挑战,也是关乎社会发展的重要课题。作

用于流感病毒包膜血凝素蛋白的病毒进入抑制剂,是一类新机制的抗流感药物,已成为当前研究的热点。

天然药物在抗流感病毒方面具有得天独厚的优势和广阔的发展前景。例如:由金银花、黄芩、连翘三味药材组成的著名方剂为双黄连口服液,双黄连制剂在 2005 年被卫生部列入其官方发布的《人禽流感诊疗方案》之中。此外,在卫生部《甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年第三版)》提出的中医防治甲流的方案中,双黄连口服制剂是重点推荐的药品之一。其中黄芩的有效成分之一黄芩苷具有抗癌、抗菌、抗病毒、清除氧自由基及抗氧化、解热、抗心律失常、降压和镇静、调节免疫功能、抗变态反应、抑制血管平滑肌细胞增殖、调节血脂、抗动脉粥样硬化等作用^[5]。近年来随着对黄芩苷研究的不断深入,认为黄芩苷具有明显的抗甲型 H1N1 流感病毒的作用,能够干扰病毒复制中后期 mRNA 的合成^[6-9]。然而,黄芩苷抗 H5N1 禽流感病毒作用的研究报道则较少,为此,本实验研究黄芩苷体外抑制高致病性 H5N1 禽流感病毒进入并探讨可能的作用机理,为 H5N1 禽流感病毒感染的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞与质粒

293T 细胞和 MDCK 细胞,由本实验室保存。细胞培养液为 10% 胎牛血清,10000 U/L 青霉素、链霉素的 DMEM 高糖培养基。

A/Thailand/Kan353/2004-HA 和 A/Thailand/Kan353/2004-NA 质粒由德国乌尔姆大学 Frank Kirchoff 教授惠赠。A/Qinghai/59/2005, A/Xinjiang/1/2006, A/Anhui/1/2005, A/Hong Kong/156/1997, A/VietNam/1194/2004 质粒由美国纽约血液中心姜世勃教授惠赠。His HA2 蛋白和 HA2-MAb 由美国纽约血液中心杜兰英教授惠赠。pNL4-3R-E-Luc 来自美 NIH 的 AIDS Research and Reference Reagent Program。pNL4-3R-E-Luc 是在 pNL4-3 进行移码突变使其不表达 Env 蛋白和 Vpr 蛋白,并插入绿色荧光蛋白基因的一个重组质粒。

1.1.2 试剂

DMEM 细胞培养基,新生胎牛血清,胰蛋白酶,青霉素及链霉素购自中国 Invitrogen 公司;荧光素酶检测试剂盒以及细胞裂解液购自 Promega 公司;感

受态细胞 DH5 α 由香港 Dgen 公司制备;转染试剂 PEI 购自起福生物科技有限公司;其余生化试剂均为国产分析纯。外源性细菌神经氨酸酶购自 Sigma 公司。

1.1.3 细胞

HEK293T 细胞(人胚肾细胞)和 MDCK 细胞(犬肾上皮细胞)为本研究室保存,生长于含 10% 胎牛血清,10 KU/L 青霉素、链霉素的 DMEM 高糖培养基中。其中 293T 细胞主要用于 H5N1 假病毒的转染,而 MDCK 细胞主要用于检测假病毒的感染能力。

1.1.4 化合物与样品

黄芩苷(纯度 >98%)购于上海源叶生物科技有限公司,批号 L39055;阳性对照药物 CL-385319^[10,11]由本实验室合成,含量 99.7%;利巴韦林盐酸盐由广州肇庆星湖生物化学制药厂生产,含量 99.5%;H5N1 抗原和抗体购自哈尔滨兽医研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 HA H5N1 假病毒的制备^[12]

将 H5N1 禽流感病毒包膜蛋白的 HA 质粒和表达荧光素酶报告基因的 HIV 骨架质粒(vpr 和 env 缺陷的 pNL4-3. Luc. R-E-),采用 PEI 法共转染 293T 细胞,8~10 h 后换新鲜培养基,继续培养。在 24 h 加入外源性细菌神经氨酸酶促进子代病毒释放。5% CO₂,37 °C 条件下继续培养 72 h,收集细胞培养上清,过滤,分装,进行 MDCK 细胞感染实验,成功构建 HA H5N1 毒株假病毒。用上述方法制备的 H5N1 假病毒分别命名为 A/Anhui/1/2005, A/Xinjiang/1/2006, A/Hong Kong/156/1997, A/Qinghai/59/2005, A/Thailand/Kan353/2004, A/VietNam/1194/2004。水泡性口炎病毒(VSVG)基因克隆质粒和 HIV 包膜蛋白基因缺失的骨架质粒构建的 VS-VG 假病毒按同样方法制备,作为阴性对照。

1.2.2 HA 假病毒中和实验^[13]

以每孔 1×10^4 个 MDCK 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,培养 24 h;50 μ L 不同浓度(200、100、50、25、12.5、6.25 μ M)的化合物与 50 μ L 假病毒在 37°C 下孵育 30 min,阳性对照药为 CL-385319。将孵育后的病毒与化合物的混合物共同加入到 MDCK 细胞中,48 h 后,根据荧光素酶检测试剂盒说明书,检测化学发光值,判断药物抑制病毒进入的活性。

化合物抑制率(%) = $[1 - (E - N) / (P - N)] \times 100$

E 代表实验组的化学发光值, N 代表阴性对照组的化学发光值, P 代表阳性对照组的化学发光值。化合物的半数抑制浓度 (IC_{50}) 作为化合物的抗流感病毒活性的指标。

1.2.3 血凝实验和血凝抑制实验^[14]

血凝实验(HA): 在 96 孔 V 型血凝板中 1-11 孔加入 25 μL PBS, 第 12 孔加入 50 μL PBS, 其次往第一孔加入 25 μL 的 H5 抗原, 然后再依次倍比稀释至第 11 孔, 最后每孔加入 25 μL 的 1% 鸡红细胞, 静置 30 min 左右, 观察鸡红细胞凝集情况, 算出凝集单位。

血凝抑制实验(HI): 在 96 孔 V 型血凝板中, 加入 25 μL 的生理盐水; 然后再加入 25 μL 各浓度梯度的化合物, 充分混合; 阳性对照孔加入 25 μL 血清, 阴性对照孔中加入 25 μL PBS; 最后在加入 4 个凝集单位的 H5 抗原 25 μL , 混匀, 室温静置 1 h, 使化合物与血凝素蛋白充分结合。

1.2.4 ELISA 试验

参照 Du 等^[15]的方法, 并做适当修改, 将 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ His-HA2 包被在 96 孔酶标板上, 每孔 100 μL ; 将梯度稀释的黄芩苷加入到已封闭好的酶标板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 不加药物为阳性对照。然后加入鼠抗 HA2 的单克隆抗体 IC9, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和显色底物, 检测吸光度值, 判断化合物对 HA2 的抑制活性。

1.2.5 MTT 实验^[12]

取处于指数生长期的 MDCK 细胞铺在 96 孔板上, 细胞数为 1×10^4 个/孔。待其生长至单层, 加入 DMEM 倍比稀释好的化合物, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 孵箱培养 48 h 后加 MTT 溶液 (5 mg/mL) 10 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 孵育 4 h 后, 吸去上清, 每孔加 100 μL 二甲基亚砷 (DMSO), 低速振荡 10 min, 选择 570 nm 波长测定各孔光吸收 (OD) 值, 采用 Reed-Muench 法^[16] 计算半数有毒浓度 (CC_{50})。每一药物浓度均重复 3 孔, 同时设正常细胞对照, 每次实验重复 3 次。

1.2.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析, 实验结果均以 Mean \pm SD 表示, 组间差异性检验采用单因素方差分析。

2 实验结果

2.1 黄芩苷对 H5N1 禽流感病毒的进入有抑制作用

我们利用高致病性禽流感 H5N1 假病毒体系评

价黄芩苷对 H5N1 A/Thailand/Kan353/2004、A/Qinghai/59/2005, A/Xinjiang/1/2006, A/Anhui/1/2005, A/Hong Kong/156/1997 毒株的抑制活性。其原理是 H5N1 假病毒具有单轮感染性, 只要病毒的进入途径受到阻断, 病毒就不能感染靶细胞。由于绿色荧光蛋白发光值与假病毒的感染能力成正比, 通过检查细胞裂解液中绿色荧光蛋白的发光值就可以判定抑制活性。并且结合以 VSVG 基因克隆质粒和 HIV 包膜蛋白基因缺失的骨架质粒构建的 VSVG 假病毒作为阴性对照, 可以判定抑制剂是特异性作用于禽流感病毒的进入环节。此前我们采用该体系筛选并发现化合物 CL-385319 具有明显抑制 H5N1 禽流感病毒进入靶细胞的活性, 而对 VSVG 假病毒入胞无抑制作用。因此, 我们选用 CL-385319 作为阳性对照药, 如图 1。研究表明, 黄芩苷能抑制 H5N1 禽流感病毒的进入, IC_{50} 分别为 $65.76 \pm 5.61 \mu\text{M}$ 、 $54.98 \pm 4.38 \mu\text{M}$ 、 $46.81 \pm 5.12 \mu\text{M}$ 、 $32.88 \pm 4.18 \mu\text{M}$ 、 $63.30 \pm 1.59 \mu\text{M}$ 、 $43.23 \pm 3.43 \mu\text{M}$, 且其靶点为包膜蛋白或神经氨酸酶。如图 2 所示。

2.2 黄芩苷不能阻止 HA1 引起的血凝抑制现象

HA 有两种亚基, HA1 和 HA2, 因此化合物抑制 HA1 介导的吸附或 HA2 介导的融合均可抑制 H5N1 假病毒入胞。血凝素 HA1 亚基上的唾液酸受

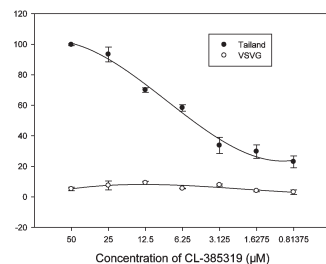


图 1 CL-385319 对 H5N1 A/Thailand/Kan353/2004 假病毒抑制活性

Fig. 1 Inhibitory activity of CL-385319 against H5N1 A/Thailand/Kan353/2004 pseudoviruses

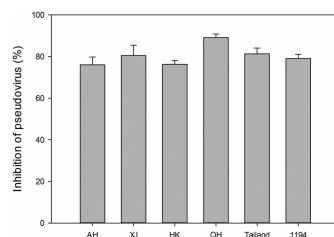


图 2 黄芩苷对不同 H5N1 假病毒株的抑制活性

Fig. 2 Inhibitory activities of baicalin at 200 μM against the different H5N1 pseudovirus strain

表 1 Baicalin 对不同 H5N1 假病毒株的 IC_{50} 和 IC_{90} (Mean \pm SD, $n = 3$)

Table 1 IC_{50} and IC_{90} of baicalin against different H5N1 pseudoviruses strain (Mean \pm SD, $n = 3$)

H5N1 假病毒株 H5N1 pseudovirus	黄芩苷 Baicalin	
	IC_{50} (μ M)	IC_{90} (μ M)
A/Anhui/1/2005A	65.76 \pm 5.61	337.68 \pm 6.55
A/Xinjiang/1/2006	54.98 \pm 4.38	314.95 \pm 10.72
A/Hong Kong/156/1997	46.81 \pm 5.12	314.95 \pm 11.59
A/Qinghai/59/2005	32.88 \pm 4.18	223.44 \pm 9.48
Thailand/Kan353/2004	63.30 \pm 1.59	478.22 \pm 4.33
A/VietNam/1194/2004	43.23 \pm 3.43	390.12 \pm 6.70

体与红细胞上的唾液酸结合能够引起红细胞凝集抑制现象,而作为阳性对照物的 H5N1 血凝素抗血清能够阻止红细胞凝集。如图 2 所示,黄芩苷不能阻止 HA1 引起的血凝抑制现象。

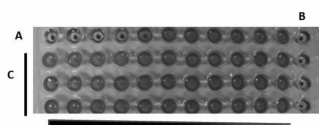


图 3 阳性对照 (A)、阴性对照 (B) 及黄芩苷 (C) 对 HA 引起的血凝抑制的影响

Fig. 3 Inhibitory activity of positive control (A), negative control (B) and baicalin (C) on HA-induced hemagglutination

2.3 黄芩苷抑制血凝素 HA2 亚基

HA2 亚基,与病毒囊膜相连,序列高度保守,在低 pH 条件下发生不可逆的结构重组介导病毒和细胞的膜融合,使病毒的遗传物质释放到细胞中。HA2 蛋白具有免疫原性强,能引起免疫反应,诱导中和抗体^[15]。我们检测了黄芩苷对血凝素 HA2 亚基的影响。结果如图 3 所示,黄芩苷对血凝素 HA2 亚基具有明显的抑制活性, IC_{50} 为 $35.86 \pm 3.09 \mu$ M。

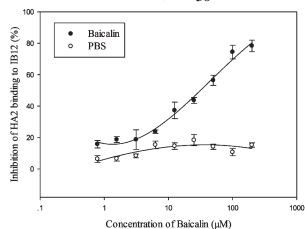


图 4 黄芩苷对血凝素 HA2 亚基的抑制活性

Fig. 4 Inhibitory activity of baicalin against HA2 subunit of hemagglutinin

2.4 黄芩苷对 MDCK 细胞的毒性

我们评价了黄芩苷对 MDCK 细胞的毒性,根据黄芩苷在不同浓度下对细胞的生长抑制率可以求出该药物的 CC_{50} 值, $CC_{50} > 250 \mu$ g/mL。

3 讨论

黄芩苷由于具有多种生物活性而备受关注,尤其对黄芩苷抗流感病毒的作用的研究日益加深。本研究采 H5N1 假病毒体系检测黄芩苷对病毒的抑制作用。H5N1 假病毒检测体系适用于高通量筛选流感病毒的进入抑制剂,具有高效、稳定、安全的特点^[13,14],其原理是 H5N1 的 HA 基因克隆质粒,与 HIV 包膜蛋白基因缺失的骨架质粒共转染得到的假病毒颗粒具有单轮感染性。只要病毒的进入途径受到阻断,病毒就不能感染靶细胞。由于绿色荧光蛋白发光值与假病毒感染力成正比,通过检测细胞裂解液中绿色荧光蛋白的含量就可以判定抑制剂活性。并且结合以 VSVG 基因克隆质粒和 HIV 包膜蛋白基因缺失的骨架质粒构建的 VSVG 假病毒作为阴性对照,可以判定抑制剂是特异性作用于禽流感病毒的进入环节。此方法避免了用 H5N1 活病毒检测体系中病毒复制等环节,检测周期更短,重复性更好。并且假病毒尚失了病毒的自我复制能力,只具有单轮感染性,生物安全性高,可以在生物安全 2 级实验室完成。作为先导化合物必须要有广谱的抗病毒活性,为此我们采用不同毒株的高致病性禽流感 H5N1 假病毒进行检测。这 6 种高致病性禽流感 H5N1 毒株都是人宿主的,具有爆发时间的先后性和地域的特异性,富有代表性。实验证明黄芩苷对多种 H5N1 假病毒毒株均有不同程度的抑制作用,但对 VSVG 假病毒没有抑制活性,表明黄芩苷是特异性作用于 H5N1,并且特异性的作用于病毒的进入环节,具有广谱的抗 H5N1 禽流感活性。今后,可以以黄芩苷为先导化合物进行结构改造以阐明其药效关系。

流感病毒进入靶细胞是由病毒包膜上的血凝素 (hemagglutinin, HA) 介导的。该蛋白由 HA1 和 HA2 两个亚基组成,其中 HA1 亚基与靶细胞膜上的唾液酸受体结合,然后病毒被胞饮进入细胞质,并被包裹在胞内体中;HA2 则为跨膜亚基,在病毒进入过程中,介导病毒膜与胞内体膜的融合^[17]。因此,HA 蛋白可作为抗流感药物的作用靶点,筛选抑制流感病毒进入靶细胞的抗流感病毒药物,即流感病毒进入

抑制剂^[18]。流感病毒进入抑制剂在病毒的早期预防和治疗中具有广阔的前景。我们对上述 6 株 H5N1 假病毒株的 HA 蛋白序列进行了对比,发现 HA1 段差别较大,HA2 段同源性高,我们推测黄芩苷抑制流感病毒进入的作用位点可能在血凝素 HA2。为了进一步确证黄芩苷的作用位点,我们利用血凝抑制实验证明黄芩苷的作用位点不是血凝素 HA1 亚基的唾液酸受体,通过 ELISA 试验证明黄芩苷靶向血凝素 HA2。近年来研究表明一些小分子化合物能作用于病毒感染的初始阶段,抑制 HA 介导的病毒融合。我们先前报道 CL-385319 对 H5N1 型流感病毒有抑制作用,且与 HA2 作用是一个“诱导契合”过程^[10]。在今后的工作中,我们将对黄芩苷在血凝素 HA2 的作用位点以及与靶穴的结合模式进行深入研究。

本研究结果提示了黄芩苷可能通过在一定程度上抑制病毒的血凝素 HA2 活性而抑制 H5N1 禽流感病毒的进入。本研究结果为黄芩苷抑制 H5N1 禽流感病毒提供了确切的体外实验证据,也为黄芩苷的开发利用提供了依据和思路。

参考文献

- 1 Morens DM, Fauci AS. The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century. *J Infect Dis*, 2007, 195: 1018-1028.
- 2 Pan C, Cheung B, Tan S, *et al.* Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9549.
- 3 Poovorawan Y, Pyungporn S, Prachayangprecha S, *et al.* Global alert to avian influenza virus infection: from H5N1 to H7N9. *Pathog Glob Health*, 2013, 107(5): 217-223.
- 4 To KK, Song W, Lau SY, *et al.* Unique reassortant of influenza A (H7N9) virus associated with severe disease emerging in Hong Kong. *J Infect*, 2014, 69(1): 60-68.
- 5 Xin WS (辛文好), Song JK (宋俊科), He GR (何国荣), *et al.* Progress in pharmacological study and the underlying mechanism of baicalein and baicalin. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2013, 6: 647-653.
- 6 Li JH (李健猴), Ling FF (凌芳芳), Du JY (杜金燕), *et al.* Antiviral effects of baicalin combined with peramivir a-

gainst pandemic 2009 H1N1 virus *in vitro* and *in vivo*. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2013, 5: 617-621.

- 7 Liu XT (刘晓婷), Zhang Y (张沂), Gu LG (顾立刚), *et al.* Inhibitory effect of baicalin on influenza virus A H1N1 *in vitro*. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 2015, 4: 229-233.
- 8 Wang QF (万巧凤), Gu LG (顾立刚), Yin SJ (殷胜骏), *et al.* Protection effect of baicalin on lung injury of mice infected with influenza FMI. *Chin J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2011, 12: 2848-2851.
- 9 Su ZZ, Dou J, Xu ZP, *et al.* A novel inhibitory mechanism of baicalein on influenza A/FM1/1/47 (H1N1) virus: interference with midlate mRNA synthesis in cell culture. *Chin J Nat Med*, 2012, 10: 415-420.
- 10 Liu S, Li R, Zhang R, *et al.* CL-385319 inhibits H5N1 avian influenza A virus infection by blocking viral entry. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660: 460-467.
- 11 Zhu Z, Li R, Xiao G, *et al.* Design, synthesis and structure-activity relationship of novel inhibitors against H5N1 hemagglutinin-mediated membrane fusion. *Eur J Med Chem*, 2012, 57: 211-216.
- 12 Du L, Zhao G, Zhang X, *et al.* Development of a safe and convenient neutralization assay for rapid screening of influenza HA-specific neutralizing monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397: 580-585.
- 13 Li XL (李湘激), Liu SW (刘叔文), Yang J (杨洁). Anti-influenza A virus activity of epigallocatechin gallate. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2013, 5: 622-625.
- 14 Li XL (李湘激), Liu SW (刘叔文), Yang J (杨洁). Effect of theaflavin derivatives on influenza A virus. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2013, 17: 2437-2441.
- 15 Du L, Jin L, Zhao G, *et al.* Identification and structural characterization of a broadly neutralizing antibody targeting a novel conserved epitope on the influenza virus H5N1 hemagglutinin. *J Virol*, 2013, 87: 2215-2225.
- 16 Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol*, 1938, 27: 493-497.
- 17 Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Ann Rev Biochem*, 2001, 70: 777-810.
- 18 Yang J, Li M, Shen X, *et al.* Influenza A virus entry inhibitors targeting the hemagglutinin. *Viruses*, 2013, 5: 352-373.