KPC-rg1 抗 H1N1 流感病毒活性研究初探

李 滢 董艳萍 任 超 黄 茜 李 宁 杨兆祥 张建文*

(昆药集团股份有限公司药物研究院,云南 昆明 650100)

摘要:为了研究肉桂提取物 KPC-rg1 对 H1N1 流感病毒的抗病毒活性. 本研究以 C57BL/6 近交系小鼠为研究对象,并将小鼠分为 3 组,分别是健康空白组、对照组和实验组,分别对应给予磷酸缓冲盐(PBS)溶液、H1N1 流感病毒溶液和 H1N1 流感病毒 + KPC-rg1 混合溶液,饲养 28 d,观察实验过程中各组小鼠的存活率,通过红细胞凝集抑制实验(HI)分析 KPC-rg1 抗 H1N1 流感病毒的血凝抑制效价,并采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法定量检测病毒载量. 与健康空白组相比,对照组小鼠接受 H1N1 病毒攻击后,体质量急剧下降,并在第 3 天出现死亡,而实验组小鼠给药后 2 d 内体质量略微下降,之后恢复到正常增长水平,且无小鼠死亡;小鼠感染 28 d 后,对照组和实验组小鼠血清中均检测出高滴度的血凝抑制效价(128 HAV);病毒攻击后 3 d,对照组和实验组小鼠肺部病毒载量均达到 1×10^7 copies/50 mg(1 IU≈5.6 copies);实验终点所有攻毒存活小鼠的肺组织病毒均得到了有效的清除. 由此可知,KPC-rg1 可有效地灭活 H1N1 流感病毒,对小鼠有显著的保护预防作用;被灭活的病毒保留了完整的抗原性,形成"原位固化灭活"效应;KPC-rg1 可促使小鼠产生强烈的免疫应答反应,使机体产生高滴度的抗病毒抗体.

关键词:中药;肉桂提取物;KPC-rg1;H1N1 流感病毒;抗病毒活性

中图分类号:TS205 **DOI**:10.19789/j.1004-9398.2020.04.009

0 引 言

病毒是人和动物的重要病原体. 据统计,病毒所导致的疾病占所有感染性疾病的 75.0% 以上,抗病毒治疗在临床上显得尤为重要[1],目前接种疫苗仍然是防止病毒性疾病扩散的最有效方法.

传统病毒疫苗灭活制备工艺中常用的灭活剂有甲醛和 β-丙内酯,但制作这类灭活剂疫苗不仅耗时、工艺复杂,而且灭活过程中难以保证病毒抗原的完整性. 因此,在保证灭活绝对安全的前提下,缩短灭活时间,降低有效抗原的损失和简化纯化工艺步骤一直是疫苗制作追求的目标,探索新型病毒灭活制剂与佐剂技术成为当今国际研发抗病毒疫苗领域新的热点之一.

使用不同性质的材料进行病毒灭活和相关防毒设备的研发已有大量报道,如高硫酸化 K5 大肠杆菌多糖衍生物[2]、硫酸乙酰肝素[3]和各种材料制备的纳米制剂[4]等,这些物质主要通过与病毒表面的黏附蛋白配基(viral attachment ligands,VALs)发生强烈的结合而阻止病毒感染细胞. 在自然界也存在一些天然物质(如肝素)能模拟细胞膜对应受体的构像(mimicking heparan sulfate proteoglycans,MHSP),与病毒外壳的 VALs 形成稳定结合从而屏蔽病毒进入细胞. 科研人员也努力尝试将 MHSP 连接到不同的纳米载体上以获得与各种病毒结合力更强且病毒灭活效果更高的广谱抗病毒灭活剂[5].

尽管传统的中医药中没有特效杀灭病毒的单味药或复方,但不可否认的是中医药已对某些病毒性疾病的治疗,如获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)、病毒性感冒、荨麻疹和乙型病毒性肝炎,显示出了一定的优势[6]. 已有报道中药植物多酚类物质具有强大的抗病毒活性[7],而多糖类拥有抗病毒的活性早已为人所知[8].

肉桂及其所含的成分具有多方面的药理作用,包括降血糖[9-10]、抗氧化[11]、抗肿瘤[12]、抗炎[13]和神经保护[14]等作用. 近期有研究报道肉桂用于预防和治疗病毒感染,周明等[15]的研究显示肉桂中的桂皮醛具有抗病毒活性,美国福克斯健康新闻报道 Milton Schiffenbauer 博士团队在家养肉桂植物中发现抗病毒活性成分[16],以色列特拉维夫大学在中国专利局公开了 1 项与肉桂提取物抗病毒相关的专

收稿日期:2019-10-28

* 通信作者:zhanguab@yahoo.com

利[17].本研究组也使用不同的病毒细胞感染模型对肉桂抗病毒有效组分进行了系统分析,已证明肉桂水提物 KPC-rg1 在细胞水平可以对包括单纯疱疹(HSV-1)病毒[18]和人类免疫缺陷(human immunodeficiency virus,HIV)病毒在内的多种包膜病毒产生有效的攻击.

为了进一步研究肉桂提取物 KPC-rg1 对 H1N1 流感病毒的抗病毒活性,本研究使用小鼠适应型 H1N1 流感病毒进行动物攻毒感染实验,研究 KPC-rg1 对在抗 H1N1 流感病毒的抗病毒活性,以为其进一步研发成为新型病毒灭活材料提供理论支撑.

1　实验部分

1.1　实验材料与仪器

小鼠适应型 H1N1 流感病毒(A/Puerto Rico/8/1934)由中国医学科学院医学生物学研究所呼吸道病毒研究室提供;Vero E6 细胞株购自美国模式菌种收集中心(ATCCCRL-1586);肉桂购自滇芝堂中药材经营部,经鉴定为樟科植物肉桂的干燥树皮;细胞计数试剂盒-8(Cell Counting Kit-8,CCK-8)购自天津百莹生物科技有限公司;Gibco16010-078 小牛血清购自上海素冉生物科技有限公司;DMEM 高糖完全培养基[含 10% 胎牛血清(FBS)]购自上海雅吉生物科技有限公司,使用时稀释为 5% FBS 的 DMEM 培养基;TRN zol A + 试剂购自天根生化科技(北京)有限公司;One Step Prime Script ™ RT-PCR Kit 购自 TAKARA Biotechnologies 公司;分析纯硫酸铜($CuSO_4$)购自天津化学试剂三厂;分析纯三氯化铁($FeCl_3$)、氯化钾(KCl)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)和磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)均购自西陇化工股份有限公司;分析纯盐酸(HCl)购自汕滇药业有限公司;鼠用配合饲料购自浙江科力饲料有限公司;0.1% 新洁尔灭消毒液购自江西草珊瑚消毒用品有限公司;0.5% 过氧乙酸消毒液购自福建维真园医药科技有限公司.实验所用水(H_2O)均为蒸馏水.

使用美国 Molecular Devices 公司生产的 Spectra Max 340 PC 384 型酶标仪进行溶液吸光度的测定;使用丹佛仪器有限公司 UB-7 型 pH 计测量溶液 pH;使用腾泉生命科技有限公司的 Acumen eX3 血细胞分析仪检测小鼠血凝抑制效价(抗体水平);使用美国 Life Technologies 公司的 ABI 7500 Real-Time PCR 仪进行逆转录-聚合酶链(RT-PCR)反应;使用赛默飞世尔科技(中国)有限公司的二氧化碳(CO_2)培养箱进行细胞培养;使用梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司的 METTLER TOLEDO MS 电子天平称量试剂;使用赛默飞世尔科技(中国)有限公司的 Thermo Biofuge Stratos 高速冷冻离心机进行溶液的离心;使用江南光学仪器厂的 XD-202 型光学显微镜进行细胞观察.

1.2　研究对象

雌性 28 ~ 30 日龄 C57BL/6 近交系小鼠由中国医学科学院医学生物学研究所实验动物中心提供.将小鼠分为 3 组:健康空白组、对照组和实验组,每组 8 只.小鼠每日喂饲鼠用配合饲料,自由饮水,隔日更换垫料;动物房控制温度为(20.0 ± 2.0)℃,相对湿度 45.0% ~ 50.0%,换气次数为每小时 10 ~ 20 次,气流速度 0.1 ~ 0.2 m/s,噪音 ≤ 60 dB,工作光照强度 150 ~ 300 lx,明、暗照明交替时间为 12 h;动物房每周消毒 2 次,消毒剂以 0.1% 新洁尔灭和 0.5% 过氧乙酸交替使用.本研究涉及的动物病毒攻击(以下简称攻毒)保护实验方案严格按国家实验动物指南设计,并得到中国医学科学院医学生物学研究所动物伦理委员会批准(审批号:2015-03).

1.3　KPC-rg1 制备

将 200.0 g 肉桂干燥树皮经粉碎后置于 10 倍质量的 H_2O(2.0 L)中 20.0 ℃浸泡提取,滤液浓缩后加入 KCl 至终浓度 0.5 mol/L 并用 HCl 调至 pH 4.0,室温静置后取沉淀减压干燥得 KPC-rg1.取干燥至恒质量的 KPC-rg1 样品 100.0 mg,以配制的磷酸缓冲盐(PBS)溶液进行溶解并定容至 100.0 mL,得终质量浓度为 1.00 mg/mL 的 KPC-rg1 溶液;从中分别取 20.0、12.5 和 2.5 mL 放至 25 mL 的容量瓶中,以 PBS 溶液定容得 KPC-rg1 质量浓度为 0.80、0.50 和 0.10 mg/mL 的溶液;再从质量浓度为 0.10 mg/mL 的溶液中分别取 5.0 和 1.0 mL 放至 10 mL 的容量瓶中,以 PBS 缓冲液定容得 KPC-rg1 质量浓度为 0.01 和 0.05 mg/mL 的溶液.

取干燥至恒质量的 KPC-rg1 样品 800.0 mg,以 PBS 溶液进行溶解并定容至 100.0 mL,得终质量浓度为 8.00 mg/mL 的 KPC-rg1 溶液备用.

1.4　KPC-rg1 细胞不良反应实验

取 Vero 细胞铺 96 孔板,每孔铺细胞液 100.0 μL,在 37.0 ℃、5.0% CO_2 培养箱过夜培养,至单层铺满后,于预设定的孔内加入 5.0 μL 不同质量浓度的 KPC-rg1 溶液使之形成药物质量浓度梯

度,作为实验组;于预设定的孔内加入 5.0 μL 的 PBS 溶液作为对照组;于未接种细胞的孔内加入等体积的培养液[DMEM 培养基(5% FBS) 100.0 μL]和溶剂(PBS 5.0 μL),作为空白组,即 KPC-rg1 的质量浓度为 0.将 96 孔板置于培养箱中培养 48 h 后,使用 CCK-8 检测不同质量浓度下,入射光为 570 nm 时的吸光度(A)值,根据 A 值计算细胞存活率(P),公式如下[19]:

$$P = [(A_2 - A_1)/(A_0 - A_1)] \times 100\%,$$

式中 A_0、A_1 和 A_2 分别是空白组、对照组和实验组的吸光度.

1.5 H1N1 流感病毒溶液制备

将 H1N1 流感病毒稀释液混合到经复苏传代的 Vero 细胞悬液中,共同孵育进行流感病毒的繁殖并收集[20].使用 PBS 溶液将 H1N1 流感病毒原溶液稀释至预定的滴度(29 HAU/50.0 μL)备用.

1.6 H1N1 流感病毒攻毒实验

健康空白组:每只小鼠左鼻内接种 50.0 μL PBS 缓冲液;对照组:取 24.4 μL 病毒稀释液,加入 25.6 μL PBS 溶液,得到 250 HAU/50.0 μL 的 H1N1 流感病毒溶液,每只小鼠左鼻内接种 50.0 μL H1N1 流感病毒溶液;实验组:取 24.4 μL 病毒稀释液加入 12.5 μL 的 8.0 mg/mL KPC-rg1 溶液,再加 13.1 μL PBS 缓冲液,37.0 ℃、5.0% CO_2 培养箱中温育 5 ~ 10 min,得到 250 HAU/50.0 μL 的 H1N1 流感病毒 + 2.0 mg/mL 的 KPC-rg1 混合稀释液,每只小鼠左鼻内接种 50.0 μL 混合溶液.接种过程中不麻醉.

1.7 小鼠体质量变化及存活率

观察并记录小鼠 28 d 体质量变化和存活情况.体质量增长指数(w)为从实验开始之日起每隔 2 ~ 3 d 对每只小鼠进行精确称体质量(m_i)至实验结束或动物死亡.小鼠的 w 和存活率(r)计算公式如下:

$$w = m_i/m_0,$$

$$r = (n_i/n_0) \times 100\%,$$

式中 m_0 为首次体质量,n_i 为第 i 天存活只数,n_0 为起始只数.

1.8 小鼠血凝抑制效价(抗体水平)

本研究使用 Hirst[21]的方法确定小鼠左鼻接种后抗 H1N1 流感病毒抗体产生情况,即使用已知病毒来检查被检血清中的相应抗体和滴定抗体的含量.在培养 28 d 后,采集眼球血清,每只小鼠采血 0.2 ~ 0.3 mL,根据国家流感中心标准操作规程进行红细胞凝集抑制实验(HI),检测小鼠血清中针对 H1N1 流感病毒的 HI 效价[22].血凝抑制结果 ≥ 20 HAU 为阳性有效 HI 效价.

1.9 小鼠肺部病毒载量检测

实验各设平行组,给药第 3 和 28 天,处死平行组中的任何一组,获取小鼠的肺,研磨制备匀浆后利用 TRN zol A + 试剂提取总 RNA.利用紫外-可见分光光度计进行定量测定样品 RNA 浓度.每100 ng 总 RNA 逆转录为 cDNA 并进行 RT-PCR 定量检测病毒载量.检测引物针对 H1N1 流感病毒 M 基因编码区进行设定,序列如下:

FluA-F GACCAATCCTGTCACCTCTGAC,

FluA-R AGGGCATTTTGGACAAAGCGTCTA,

Flu-probe(FAM)-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG-(BHQ1).

1.10 数据统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示.运用 SPSS 11.0 统计分析软件,组间实验数据比较采用 t 检验分析.$P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 实验结果

2.1 KPC-rg1 细胞不良反应实验

当 KPC-rg1 溶液质量浓度为 0.01、0.05、0.08、0.10、0.50、0.80 和 1.00 mg/mL 时,Vero 细胞存活率分别是 89.3%、84.1%、82.7%、78.4%、26.9%、20.6% 和 19.2%.即细胞培养 48 h 后,与 KPC-rg1 质量浓度为 0 相比,0.50、0.80 和 1.00 mg/mL 时 Vero 细胞的存活率明显低于 100%($t = 0.017$、0.048 和 0.025,$P < 0.05$);而质量浓度为 0.01、0.05、0.08 和 0.10 mg/mL 时,KPC-rg1 对 Vero 细胞生长无明显的不良反应($P > 0.05$).因此,将 KPC-rg1 质量浓度为0.10 mg/mL作为本实验小鼠攻毒保护实验时剂量设计的基础.

2.2 小鼠存活率和体质量变化

H1N1 流感病毒攻毒后,各组小鼠的 w 和 r 变化情况如图 1 所示.健康空白组小鼠无死亡现象,小鼠平均体质量随喂养时间的延长有一定的增长(23.5 ~ 26.8 g);对照组小鼠接受攻毒后,在第 3 天出现死亡,第 3 ~ 5 天,小鼠体质量急剧下降(14.5 ~ 18.9 g),至第 7 天仅存活 3 只,即 r = 37.5%;第 6 天开始,存活小鼠体质量也有一定的增长(15.8 ~ 29.3 g);实验组小鼠无死亡现象,小鼠接受攻毒后 2 d 内平均体质量略微下降(20.2 ~ 20.5 g),之后恢复到正常增长水平,且喂

养第 10 天后小鼠平均体质量略高于健康空白组(27.3 ~ 30.6 g);对各组小鼠最终平均体质量进行组间 t 检验比较,各组之间平均体质量差异无统计学意义($P > 0.05$),说明小鼠自身免疫抵抗及 KPC-rg1 预防 H1N1 流感病毒对存活小鼠最终体质量不会产生显著性影响. 通过小鼠体质量变化和生存率结果推测 KPC-rg1 可以在短时间内,即病毒与 KPC-rg1 混合温育的过程中(5 ~ 10 min)将 H1N1 流感病毒灭活,起到预防 H1N1 流感病毒的作用.

3 组小鼠接受攻毒后第 15 天鼻部变化如图 2 所示,健康空白组和实验组小鼠均未出现鼻毛脱落的现象,而对照组存活小鼠鼻毛出现严重的脱落现象,脱落面积约 20.0% ~33.3%.

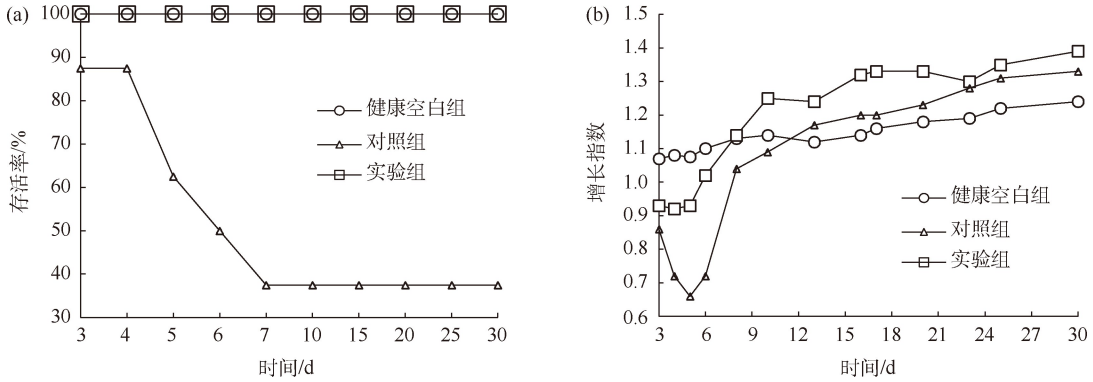


图 1　H1N1 攻毒后各组小鼠基本情况

(a)存活率;(b)增长指数

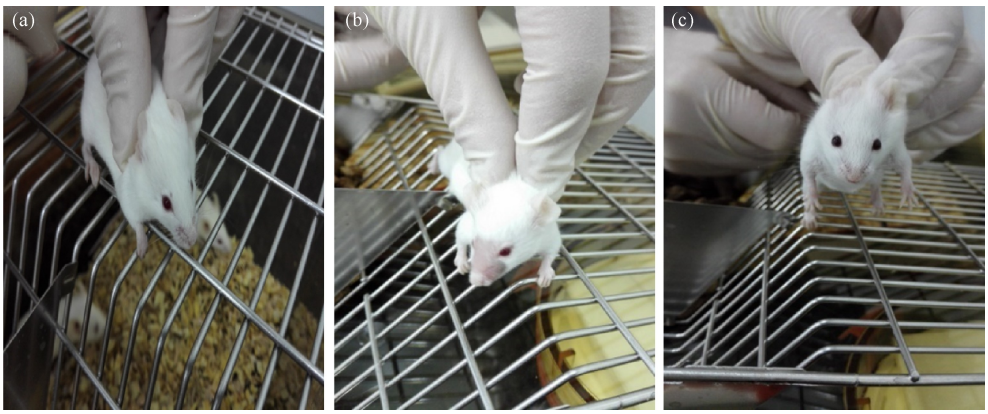


图 2　小鼠接种后第 15 天鼻部变化

(a)健康空白组;(b)对照组;(c)实验组

2.3　小鼠血凝抑制效价(抗体水平)检测

小鼠攻毒后 28 d,对照组和实验组小鼠血清中均检测出高滴度的血凝抑制效价,2 组 HI 效价均为 128 HAU,表明 H1N1 流感病毒对小鼠的攻击使小鼠免疫系统产生了相应抗体和保护性. 对照组存活动物血清出现高滴度的血凝抑制效价属于天然免疫所致,而实验组小鼠的血凝抑制效价特征则属于人工免疫的结果. 这提示 KPC-rg1 与 H1N1 流感病毒的接触使病毒失去攻击活性,还有可能保留了病毒完整的中和免疫原性.

2.4　小鼠肺部病毒载量检测

对攻毒 3 d 后的小鼠肺组织进行病毒载毒量分析,对照组和实验组小鼠肺部病毒载量均达到 1×10^7 copies/50 mg(1 IU≈5.6 copies)肺组织,表明攻毒后小鼠肺部受到严重感染. 在第 28 天对 19 只存活小鼠的肺组织进行载毒量分析,在肺组织没有发现残留病毒,表明体内病毒已被小鼠免疫系统有效清除.

综上所述,通过鼻黏膜点样感染 H1N1 流感病毒的小鼠均发生了肺部感染,对照组小鼠在攻毒后 7 d 内死亡率为 62.5%,存活的 3 只小鼠在感染后第 15 天出现了严重的鼻毛脱落症状;而实验组在攻毒后 2 d 出现体质量不增长或降低现象,但 7 d 后恢复正常增长状态,动物的 $r = 100\%$,且没有出

现鼻毛脱落现象.针对 H1N1 流感病毒的血凝抑制实验及肺部病毒载量分析结果表明,实验组小鼠在攻毒后产生了强烈的免疫应答反应,使机体产生高滴度的抗病毒抗体,这可能是小鼠清除病毒的关键机制.本研究数据提示 KPC-rg1 对 H1N1 流感病毒有一定的灭活作用,可用于抗浅表皮病毒感染用药研制,这也为下一步探索 KPC-rg1 处理后病毒中和抗原的完整性以及可能的病毒灭活疫苗的制备研究打下基础.

3 结束语

本研究显示 KPC-rg1 对 H1N1 流感病毒的灭活作用不但强大,而且推测可以在短时间内(室温下温育 5 min)即可达到病毒的完全失活效果,对小鼠有显著的保护预防作用;被灭活的病毒保留了完整的抗原性,形成了"原位固化灭活"效应;KPC-rg1 可促使小鼠产生强烈的免疫应答反应,使机体产生高滴度的抗病毒抗体.

除此之外,本研究组还开展了 KPC-rg1 对 H3N2 流感病毒、单纯疱疹(HSV-1)病毒、人巨细胞(HCMV)病毒和 HIV 病毒等也有显著的灭活作用研究,研究结果证明 KPC-rg1 具有相当广谱的抗病毒作用[18].

鉴于 KPC-rg1 具有的快速、强大和广谱的病毒灭活作用特点,对 KPC-rg1 进一步研发极有可能使其发展成为制备包括流感病毒在内的多种病毒灭活疫苗制备所必须的新型病毒灭活材料,也可用于治疗各种包膜类病毒感染的皮肤类用药的研制.

致谢:感谢中国医学科学院医学生物学研究所李琦涵、刘龙丁和陈元鼎 3 位教授对本研究进行的指导.

参 考 文 献

[1] 周雅萍, 王明艳. 中医药抗病毒感染的研究进展[J]. 中医学报, 2012, 27(173): 1300 – 1302.

[2] CAGNO V, MANUELA D, ANDREA C, et al. Highly sulfated K5 Escherichia coli polysaccharide derivatives inhibit respiratory syncytial virus infectivity in cell lines and human tracheal-bronchial histocultures[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(8): 4782 – 4794.

[3] LEMBO D, DONALISIO M, LAINE C, et al. Auto-associative heparin nanoassemblies: a biomimetic platform against the heparan sulfate-dependent viruses HSV-1, HSV-2, HPV-16 and RSV[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2014, 88(1): 275 – 282.

[4] BROGLIE J J, ALSTON B, YANG C, et al. Antiviral activity of gold/copper sulfide core/shell nanoparticles against human norovirus virus-like particles[J]. PLoS One, 2015, 10(10):e0141050.

[5] CAGNO V, ANDREOZZI P, D′ALICARNASSO M, et al. Broad-spectrum non-toxic antiviral nanoparticles with a virucidal inhibition mechanism[J]. Nat Mater, 2018, 17(2): 195 – 203.

[6] 罗云坚, 罗翌, 李际强. 中医药治疗病毒性传染病的研究现状与思考[J].广州中医药大学学报, 2005, 22 (3): 246 – 249.

[7] SEKIZAWA H, IKUTA K, MIZUTA K, et al. Relationship between polyphenol content and anti-influenza viral effects of berries[J]. J Sci Food Agricul, 2013, 93(9): 2239 – 2241.

[8] GONZALE Z, ENGENIA M, ALARCON B, et al. Polysaccharideet alantiviral age: antiviral activity of carrageenan[J]. Antimicrob Agents and Chemother,1989, 33(9): 1482 – 1486.

[9] 卢兆莲, 黄才国. 肉桂多酚改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 276 – 279.

[10] JIAO L H, ZHANG X, HUANG L Q, et al. Proanthocyanidins are the major anti-diabetic components of cinnamon water extract[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 56(6): 398 – 405.

[11] LI R, LIANG T, XU L Y, et al. Protective effect of cinnamon polyphenols against STZ-diabetic mice fed high-sugar, high-fat diet and its underlying mechanism[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 51(1): 419 – 425.

[12] ASSADOLLAHI V, PARIVAR K, ROUDBARI N H, et al. The effect of aqueous cinnamon extract on the apoptotic process in acute myeloid leukemia HL-60 cells[J]. Advan Biomed Res, 2013, 2(1): 25.

[13] RATHI B, BODHANKAR S, MOHAN V, et al. Ameliorative effects of a polyphenolic fraction of cinnamomum

zeylanicum l. bark in animal models of inflammation and arthritis[J]. Sci Pharm, 2013, 81(2): 567 – 589.

[14] QIN B L, PANICKAR K S, ANDERSON R A. Cinnamon polyphenols regulate S100β, sirtuins, and neuroactive proteins in rat C6 glioma cells[J]. Nutrition, 2013, 30(2): 210 – 217.

[15] 周明, 陈征义, 申书婷. 肉桂醛的制备方法和生物学功能[J]. 动物营养学报, 2014, 26(8): 2040 – 2045.

[16] SEAN R. Cinnamon may protect against infection, study finds[EB/OL]. (2017-11-25)[2019-05-07]. https://www.usatoday.com/story/news/nation-now/2017/11/25/cinnamon-may-help-attack-fat-fight-obesity-study-finds/894486001/.

[17] 特拉维夫大学拉玛特有限公司. 从天然肉桂提取物中获得的抗病毒制剂: 中国, CN200480038781.8[P]. 2007-01-17.

[18] 任超, 黄茜, 王萍, 等. 一种肉桂水提物抗单纯疱疹病毒 1 型活性研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2018, 32(5): 520 – 524.

[19] 肖琨珉, 孔晨帆, 姚树坤. 龙胆苦苷对过氧化氢诱导 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(11): 1530 – 1534.

[20] MONTOMOLI E, KHADANG B, PICCIRELLA S, et al. Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production[J]. Expert Rev Vaccines, 2012, 11(5): 587 – 594.

[21] HIRST G K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination[J]. J Exp Med, 1942, 75(1): 49 – 64.

[22] 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所. 国家流感中心标准操作规程(修订版)[Z/OL]. (2007-03-19)[2019-05-07]. http://ivdc.chinacdc.cn/cnic/zyzx/syssc/201605/t20160520_129703.htm.

Primary Research on Anti-H1N1 Flu Virus Activity of KPC-rg1

LI Ying　DONG Yanping　REN Chao　HUANG Xi　LI Ning　YANG Zhaoxiang　ZHANG Jianwen

(Institute of Drug Discovery & Development, KPC Pharmaceuticals, Inc., Kunming Yunnan　650100)

Abstract: To investigate the activity of anti-H1N1 flu virus activity by the aqueous extract from cinnamon (KPC-rg1). The C57BL/6 inbred mice were divided into 3 groups: healthy group, control group and experimental group. Phosphate buffered saline (PBS), H1N1 flu virus solution, and viral + KPC-rg1 mixed solution were given to the 3 groups respectively. 28 d later, survival rate of the mice was recorded. The hemagglutination inhibition titer for antiviral by KPC-rg1 was studied in the hemagglutination inhibition tests (HI). Methods reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to measure H1N1 flu virus load. Compared with the healthy group, the weight of mice in the control group decreased sharply after being attacked by H1N1 flu virus, and died on the third day. However, the weight of mice in the experimental group decreased slightly within 2 d after administration, and then returned to the normal growth level, and no mice died. After 28 d of infection, the high titer of hemagglutination inhibition (128 HAU) was detected in the serum of mice in the control group and the experimental group. 3 d after virus attack, pulmonary viral load of control group and experimental group reached 1×10^7 copies/50 mg(1 IU≈5.6 copies). At the end of the experiment, the virus was effectively eliminated in the recipient mice experienced toxicity attack test. It can be seen that the KPC-rg1 is a potent H1N1 flu virus viricide with highly antiviral efficiency and has significant protective and preventive effects on mice. The inactivated virus retained intact antigenicity and formed the effect of "in situ curing and inactivation". KPC-rg1 can induce strong immune response in mice, and make the body produce antiviral antibody with high titer.

Keywords: traditional Chinese medicine; cinnamon extract; KPC-rg1; H1N1 flu virus; antiviral activity