

中药大黄抗新城疫病毒的试验研究

于海, 刘玉洁, 常维山

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 中药大黄具有抗菌、抗病毒、清热、滋阴凉血等作用。大黄的有效成分经乙醇提取, 然后在鸡胚上研究其抗新城疫病毒的作用。结果表明, 中药大黄提取液对新城疫 $F_{48}E_8$ 毒株具有显著的抑制作用。

关键词: 大黄; 新城疫病毒; 血凝; 鸡胚半数感染量

中图分类号: S852.65+9.5

文献标识码: B

文章编号: 1671-7236(2005)01-0050-02

新城疫也称亚洲鸡瘟或伪鸡瘟, 是由新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)引起的急性高度传染性疾病。该病严重危害养鸡业的发展, 目前尚无有效的治疗方法, 国内外均采用疫苗免疫接种进行预防(蔡宝祥, 1991)。近年来, 广大科技人员开展了大量关于中草药抗病毒和促进机体免疫功能的研究, 取得了可喜的成果; 中草药在畜禽疫病的防治上也越来越受到人们的重视, 并已显示出其独特的优势。大黄作为常用中药, 具有泻下、抗菌、抗病毒、导滞通便、利水通淋、舒肝利胆、积滞腹痛, 抗肿瘤、消炎、止血、止吐、止痛等多方面的功效, 因此成为人们的研究热点之一。大黄的化学成分主要是蒽醌类, 其中大黄的含量较高, 而大黄素具有抗病毒、抗肿瘤的作用(王浴生等, 1998; 张为民等, 2002; 唐雪明等, 1998; 邓桦等, 2001)。由此看来, 大黄很有可能成为一种很有发展前景的抗病毒药物。

1 材料

1.1 大黄 购于泰安市永春堂大药店。

1.2 病毒 新城疫 $F_{48}E_8$ 毒株, 由山东省畜牧局动物疾病诊断中心田夫林老师惠赠。

1.3 鸡胚 9~11 日龄鸡胚购于东岳种禽有限公司。

2 方法

收稿日期: 2004-05-14

2.1 大黄醇提取液及其成分鉴定 称取大黄根 50 g, 切碎, 用 95% 的乙醇浸泡过夜, 加热提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压浓缩, 在无菌条件下自然挥发至干, 用生理盐水配成 100 ml (浓度为 100 mg/ml) 的溶液。少许提取液滴在干净滤纸上, 待自然挥发至干时, 滴入 10% 的 NaOH 溶液, 滤纸变紫红色, 证明提取物是蒽醌类。最后以 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, -20℃ 冻存待用(王凡等, 1996; 蒋岩等, 1998)。

2.2 病毒毒力 (EID_{50}) 的测定 将病毒(新城疫 $F_{48}E_8$ 毒株)液依次作 10 倍稀释, 进行鸡胚尿囊腔接种, 每个稀释度接种 0.2 ml, 设 9 个重复, 同时设正常鸡胚对照。置 37℃ 孵化 48 h, 弃去 24 h 内死亡胚, 收获 24 h 后死亡胚及 48 h 活胚的尿囊液, 进行 HA 价的测定。

2.3 药物的毒性试验 将大黄提取液依次作 2 倍稀释, 每个稀释度于尿囊腔注射 0.2 ml, 设 9 个重复。置 37℃ 孵化 120 h, 定时观察鸡胚有无死亡及异常变化。

2.4 药物的抗病毒试验

2.4.1 药物的预防试验 将大黄提取液依次作适当倍数的稀释, 每个稀释度于尿囊腔注射 0.2 ml, 设 9 个重复。置 37℃ 孵化器 60 min 后取出, 每胚于尿囊腔接种 30 EID_{50} 病毒 0.2 ml。同时作病毒对照, 37℃ 孵化 48 h, 进行 HA 价的测定。

同意由小区专职防治人员进行免疫的, 当地动物防疫机构应派员到现场监督。定期或不定期地对小区内的防疫工作进行抽查监督, 查阅小区及各养殖户的疫病防治档案, 发现问题, 及时整改。一旦发生疫情, 各级政府和有关部门要迅速介入, 及时扑灭疫情, 防止扩大与蔓延。

2.8 落实责任制度, 严肃动物防疫工作纪律 对畜

牧小区的动物防疫工作要根据规模大小, 分类予以管理, 实行领导分级负责制, 要明确政府分管领导为行政责任人, 动物防疫主管部门的分管领导为技术责任人, 驻村干部和防疫员为直接责任人, 要层层签订动物防疫责任状, 严格遵守动物防疫工作纪律, 实行动物防疫责任追究制度, 凡因工作不負責任、防疫不到位, 造成严重后果的, 对责任人员一律严肃处理。

2.4.2 药物的治疗试验 先于尿囊腔接种 30EID₅₀ 病毒 0.2 ml, 设 9 个重复, 置 37℃ 孵化器 60 min 后取出。将大黄提取液作适当倍数的稀释, 每个稀释度于尿囊腔注射 0.2 ml。同样也作病毒对照, 37℃ 孵化 48 h, 进行 HA 价的测定。

2.4.3 药物对病毒杀伤试验 将不同稀释度的大黄提取液与等量 NDV F₄₈E₈ 毒株的病毒液(血凝效价为 2⁹)混合, 置 37℃ 作用 3、6、9 和 12 h, 进行 HA 价的测定。同时作不加药物、加等量生理盐水的病毒对照。

3 结果

3.1 病毒毒力(EID₅₀)的测定结果 记录不同稀释度的病毒液 HA 试验阳性和阴性的鸡胚数, 按照 Reed-Muench 法(殷震等, 1997)计算 NDV F₄₈E₈ 毒株的 EID₅₀ 为 10^{-6.44}。

3.2 药物的毒性试验结果 经过 120 h 的定时观察, 发现注射不同稀释度大黄提取液的鸡胚无死亡及异常变化。

3.3 药物的预防试验结果 药物治疗试验的鸡胚 HA 价的方差分析结果(表 1)表明: 当大黄提取液作 2¹、2² 倍稀释时, 差异极显著($P < 0.01$); 作 2³、10 倍稀释时, 差异显著($P < 0.05$); 作 100 倍稀释时, 差异不显著。这说明大黄提取液在鸡胚内能在一定程度上抑制 NDV F₄₈E₈ 毒株的增殖。

表 1 预防试验鸡胚 HA 价(log2)的测定结果

大黄提取液稀释度	鸡胚数	血凝效价($\bar{X} \pm S$)
原液	10	6.8 ± 0.83**
2 ⁻¹	10	6.8 ± 1.03**
2 ⁻²	10	7.3 ± 0.95**
2 ⁻³	10	8.0 ± 1.05*
10 ⁻¹	10	8.3 ± 0.67*
10 ⁻²	10	8.9 ± 0.67
病毒对照	10	9.1 ± 0.83

注: ** 表示差异极显著($P < 0.01$), * 表示差异显著($P < 0.05$), 下同。

表 2 治疗试验鸡胚 HA 价(log2)的测定结果

大黄提取液稀释度	胚数	血凝效价($\bar{X} \pm S$)
原液	10	6.3 ± 1.01**
2 ⁻¹	10	6.2 ± 0.98**
2 ⁻²	10	6.8 ± 0.75**
2 ⁻³	10	7.5 ± 1.02**
10 ⁻¹	10	7.9 ± 0.94*
10 ⁻²	10	9.0 ± 0.63
病毒对照	10	9.1 ± 0.83

3.4 药物的治疗试验结果 通过对药物治疗试验的鸡胚 HA 价进行方差分析, 结果(表 2)表明, 当大

黄提取液作 2¹、2²、2³ 倍稀释时, 差异极显著($P < 0.01$); 作 10 倍稀释时, 差异显著($P < 0.05$); 作 100 倍稀释时, 差异不显著。这同样说明大黄提取液在鸡胚内对 NDV F₄₈E₈ 毒株有一定的抑制作用。

3.5 药物对病毒的杀伤试验结果 药物的杀伤试验结果(表 3)表明: 大黄提取液对 NDV F₄₈E₈ 毒株有一定的杀伤作用, 从而降低病毒的血凝性。

表 3 杀伤试验 HA 价(log2)的测定结果

大黄提取液稀释度	作用时间			
	3 h	6 h	9 h	12 h
原液	5	4	4	4
10 ⁻¹	7	6	5	5
10 ⁻²	9	9	8	8
病毒对照	9	9	8	8

4 讨论

新城疫病毒在鸡胚中增殖, 释放到尿囊液中。新城疫病毒在一定条件下能使鸡红细胞发生肉眼可见的血凝现象。如在鸡胚内注入药物后, 尿囊液不出现血凝现象, 则表示药物在鸡胚内对新城疫病毒具有抑制作用。药物对新城疫病毒的预防试验、治疗试验和杀伤试验结果均表明: 中药大黄提取液对 30EID₅₀ 的新城疫 F₄₈E₈ 毒株有抑制作用, 且随药物浓度的增加抗病毒作用增强, 但是对于中药大黄的抗病毒机理还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 王凡, 等. 山东医科大学学报, 1996, 6(2): 166~168.
- 王浴生, 等主编. 中药药理与应用, 北京: 人民卫生出版社, 1998, 70~80.
- 邓桦, 等. 中国兽医学报, 2001(1): 96~97.
- 张为民, 等. 西北农林科技大学学报, 2002, 8(4): 98~100.
- 唐雪明, 等. 中国兽医学报, 1998, 18(3): 269~270.
- 殷震, 等主编. 动物病毒学, 北京: 科技出版社, 1997, 329~331.
- 蒋岩, 等. 中国病毒学, 1998, 12: 306~308.
- 蔡宝祥主编. 家畜传染病学, 北京: 中国农业出版社, 1991, 252.

祝贺山东省沂水县昌大仔猪交易市场隆重开业

常年批发零售 20~60 kg 长白、大约克、杜洛克内外二元、三元, 优良杂交商品仔猪和公母种仔猪, 为客户代办一切手续。

在新年到来之际, 总经理吴透昌携全体员工向全国广大养殖户拜年, 祝大家吉祥如意, 鸡年养猪发大财!

地址: 山东省沂水县吴家安子

电话: 0539-2303586 2303587 13805394710