

7 种中药成分对新城疫病毒感染鸡胚成纤维细胞能力的影响

邢玉娟¹, 陈玉库¹, 胡元亮², 王德云², 郭振环¹, 蔡丙严¹

(1. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏 泰州 225300; 2. 南京农业大学中兽医学研究室, 江苏 南京 210095)

摘要:将氧化苦参碱、甘草酸、黄芪多糖、栀子苷、绿原酸、虎杖苷和木犀草素等 7 种中药成分稀释成安全浓度范围内的高、中、低 3 种浓度, 分别与 NDV 以 3 种方式加入到培养成单层的 CEF 的培养体系中, 用 MTT 法测定 NDV 感染细胞能力的变化。结果表明, 先加中药后加病毒时, 氧化苦参碱、甘草酸、黄芪多糖的高、中浓度、栀子苷高浓度显著抑制病毒感染细胞; 先加病毒后加中药时, 氧化苦参碱的高、中浓度、黄芪多糖的中、低浓度显著抑制病毒感染细胞; 中药与病毒同时加入时, 氧化苦参碱的高、中浓度, 黄芪多糖的高、中、低浓度和甘草酸高浓度显著抑制病毒感染细胞。绿原酸、虎杖苷和木犀草素 3 种中药成分无论是哪种加药方式均无抑制 NDV 感染细胞的作用。

关键词: 中药成分; 病毒感染细胞能力; 抗病毒作用

中图分类号: S852.65⁺9.5 文献标识码: A 文章编号: 0529-6005(2011)09-0046-03

Effects of seven CHMIs on the cellular infectivity of NDV

XING Yu-juan¹, CHEN Yu-ku¹, HU Yuan-liang², WANG De-yun², GUO Zhen-huan¹, CAI Bing-yan¹

(1. Jiangsu Animal Husbandry & Veterinary College, Taizhou 225300, China;

2. College of Veterinary Medicine Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Seven CHMIs were diluted into high, middle and low concentrations within safety concentrations and added into CEF with Newcastle disease virus (NDV) in three different ways (pre-, post- and synchronously). The effects of seven CHMIs on the infectivity of NDV were assayed by MTT method. The results show that OM, GA and APS at high and middle doses and GP at high dose could inhibit NDV from infecting CEF significantly if pre-added. OM at high and middle doses and APS at middle and low doses could inhibit infectivity obviously if post-added. APS at high, middle and low doses, OM at high and middle doses, and GA at high dose all could inhibit infectivity significantly in simultaneous adding CHMIs and NDV. While CA, PD and LT had no effect.

Key words: Chinese herbal medicinal ingredients (CHMIs); cellular infectivity of virus; antiviral activity

Corresponding author: CHEN Yu-ku

为了研究抗病毒的新型中药成分复方制剂, 首先要筛选主药。本试验以新城疫病毒(NDV)为研究对象, 在测定氧化苦参碱(oxymatrine, OM)、甘草酸(glycyrrhizic acid, GA)、绿原酸(chlorogenic acid, CA)、栀子苷(geniposide, GP)、虎杖苷(polydatin, PD)、木犀草素(luteolin, LT)、黄芪多糖(as-tragalus polysaccharide, APS)等 7 种中药成分对鸡胚成纤维细胞(chickembryo fibroblast, CEF)生长

均呈现促进作用的基础上^[1], 选取安全浓度范围内的高、中、低 3 种浓度, 分别与 NDV 以 3 种方式加入到培养 24 h 已长成单层的 CEF 中, 测定它们对 NDV 感染细胞能力的影响, 为研制抗 NDV 的中药成分复方提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 中药成分 GA、CA、LT 购自南京青泽医药科技开发有限公司, 含量分别为 98.03%、98.4%、98.03%; GP、PD 购自中国生物制品检定所, 含量均为 99.0%; OM 购自西安富捷生物技术发展公司, 含量为 98.8%; APS 购自南通四海植物精华有限公司, 含量为 91.9%。根据药物对 CEF 安全浓度测定结果, 将 OM、GA、CA、LT、GP、PD 和 APS 分别用细胞维持液稀释成以下浓度($\mu\text{g/mL}$): PD 为

收稿日期: 2010-10-22

基金项目: 国家科技支撑计划(2008BADB4B06); 江苏青蓝工程骨干教师资助项目; 江苏楠森动物保健有限公司与江苏畜牧兽医职业技术学院横向联合课题(200836)

作者简介: 邢玉娟(1964-), 女, 副教授, 学士, 从事中药药理研究工作

通讯作者: 陈玉库, E-mail: chen-yuku1965@yahoo.com.cn

500、250、125;GA 为 250、125、62.5;APS 和 CA 为 125、62.5、31.25;OM 和 GP 为 32、16、8;LT 为 1.6、0.8、0.4,常规消毒后备用。

1.2 病毒 新城疫病毒(NDV) $F_{48}E_8$ 株,由中国农业科学院上海兽医研究所惠赠。将病毒按常规方法接种 9 日龄 SPF 鸡胚(购自中牧股份南京药械厂),恒温培养 72 h,收获尿囊液,按 Reed-Muench 法^[2]测定 CEF 半数组织培养感染剂量(TCID₅₀),用细胞维持液配成 100 TCID₅₀ 浓度备用。

1.3 主要试剂和仪器 MEM 细胞培养液,Gibco 公司产品,按说明书配制,再加入犊牛血清,达 5% 为细胞生长液,2% 为细胞维持液,再按常规量加入谷胺酞氨和双抗;胰蛋白酶,进口分装,用 PBS(pH 值 7.4)配制成 0.25% 溶液,0.22 μ m 混合纤维素酯微孔滤膜过滤除菌,分装后 -20℃ 保存备用;MTT (四唑溴盐)溶液,Sigma 公司产品,按说明书配制,使终浓度为 5 mg/mL,0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,分装后 4℃ 冰箱保存,1 周内用完。

MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱,XDS-1B 型生物倒置显微镜,DG-5031 型酶联免疫检测仪,FA-2004N 型电子分析天平,MH-1 型微量振荡器,24 孔、96 孔细胞培养板,细胞培养瓶等。

1.4 试验方法 根据文献^[2]介绍的方法制备 CEF,将细胞数调整至 1×10^6 个/mL 后加入到 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μ L,37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h,细胞长成均匀单层后,翻转细胞板于灭菌纱布上倾去生长液,用 D-Hank's 液洗两次,按以下 3 种方式^[3]开始分组加药。

1.4.1 先加中药后接种病毒 将高、中、低 3 种浓度的中药成分加入到 CEF 单层中,每个中药浓度重复 4 孔,每孔 100 μ L,继续培养 24 h 后取出,加中药的各孔再加入 100 TCID₅₀ 的病毒液,每孔 100 μ L。

每个稀释度分别设中药对照(中药 100 μ L,细胞维持液 100 μ L)、病毒对照(接种病毒 100 μ L,细胞维持液 100 μ L)和细胞对照(只加 0.2 mL 细胞维持液)各 4 孔。继续培养,每组以加入病毒液后开始计算时间,每隔 12 h 观察 1 次 CPE 变化,详细记录结果,直至细胞对照组出现典型的 CPE 病变后为纪录终点,用 MTT 法^[4]测定 570 nm 处 A_{570} 值。

1.4.2 先接种病毒后加中药 将 100 TCID₅₀ 的病毒液加入到 CEF 中,每孔 100 μ L,每个稀释度重复 4 孔;同时设中药对照、病毒对照和细胞对照。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h 后取出,然后加入高、中、低 3 种浓度的中药成分,每孔 100 μ L。以下方法同 1.4.1。

1.4.3 病毒和中药同时加入 先将 100 TCID₅₀ 的病毒液加入到 CEF 中,每孔 100 μ L,每个浓度重复 6 孔,紧接加入高、中、低 3 种浓度的中药成分,每孔 100 μ L。同时设中药对照、病毒对照和细胞对照。以下方法同 1.4.1。此外,设仅加维持液的无细胞孔作为测定时调零孔。

1.5 数据处理 计算 4 孔平均值和标准差,数据以 Means \pm SD 表示,用 SPSS 统计分析软件进行方差分析和多重比较。比较中药-病毒组与病毒对照组和中药-病毒组与同浓度中药组之间的 A_{570} 值差异性,判定中药的抗病毒活性强弱。

2 结果

2.1 OM 组的变化 先加中药、后加病毒,16 μ g/mL 和 32 μ g/mL 浓度 A_{570} 值显著高于病毒对照组 ($P < 0.05$),显著高于和高于细胞对照组;先加病毒、后加中药,32 μ g/mL 和 16 μ g/mL 浓度 A_{570} 值显著高于病毒对照组 ($P < 0.05$);中药与病毒同时加,16 μ g/mL 和 32 μ g/mL 浓度 A_{570} 值均显著高于病毒对照组 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 OM 在先加、后加和与病毒同时加入时各组细胞 A_{570} 值

浓度(μ g/mL)	先加中药、后加病毒	先加病毒、后加中药	中药与病毒同时加
32	0.315 \pm 0.021 ^a	0.221 \pm 0.018 ^{ab}	0.221 \pm 0.014 ^b
16	0.304 \pm 0.008 ^{ab}	0.201 \pm 0.011 ^{bc}	0.229 \pm 0.015 ^b
8	0.132 \pm 0.016 ^c	0.186 \pm 0.026 ^{cd}	0.132 \pm 0.013 ^c
病毒对照	0.133 \pm 0.014 ^c	0.167 \pm 0.014 ^d	0.151 \pm 0.016 ^c
细胞对照	0.282 \pm 0.018 ^b	0.237 \pm 0.019 ^a	0.301 \pm 0.021 ^a

注:同列数据标注无相同字母者差异显著 ($P < 0.05$),下表同

2.2 APS 组的变化 先加中药、后加病毒时,62.5 μ g/mL 和 125 μ g/mL 浓度组的 A_{570} 值显著高于病毒对照组 ($P < 0.05$)。62.5 μ g/mL 浓度组的 A_{570} 值高于细胞对照组;先加病毒、后加中药时,31.25 μ g/mL 和 62.5 μ g/mL 浓度组 A_{570} 值显著高于病毒对照组 ($P < 0.05$);与病毒同时加,125、62.5、31.25 μ g/mL 浓度 A_{570} 值显著高于病毒对照组 ($P < 0.05$)。31.25 μ g/mL A_{570} 值高于细胞对照组

(表 2)。

2.3 GP 组的变化 先加中药、后加病毒,32 μ g/mL 浓度 A_{570} 值显著高于病毒对照组 ($P < 0.05$);先加病毒、后加中药,32 μ g/mL 浓度 A_{570} 值高于病毒对照组,但不显著,中、低浓度的 A_{570} 值低于病毒对照组;中药与病毒同时加,32 μ g/mL 和 8 μ g/mL 浓度组的 A_{570} 值稍高于病毒对照组(表 3)。

表 2 APS 在先加、后加和与病毒同时加入时各组细胞 A_{570} 值

浓度($\mu\text{g/mL}$)	先加中药、后加病毒	先加病毒、后加中药	中药与病毒同时加
125	0.267 ± 0.025^b	0.176 ± 0.017^{bc}	0.201 ± 0.011^b
62.5	0.331 ± 0.028^a	0.192 ± 0.010^b	0.224 ± 0.015^b
31.25	0.123 ± 0.008^d	0.255 ± 0.014^a	0.303 ± 0.018^a
病毒对照	0.175 ± 0.016^c	0.159 ± 0.013^c	0.173 ± 0.015^c
细胞对照	0.316 ± 0.057^a	0.260 ± 0.014^a	0.296 ± 0.018^a

表 3 GP 在先加、后加和与病毒同时加入时各组细胞 A_{570} 值

浓度($\mu\text{g/mL}$)	先加中药、后加病毒	先加病毒、后加中药	中药与病毒同时加
32	0.215 ± 0.012^b	0.177 ± 0.016^b	0.181 ± 0.015^b
16	0.180 ± 0.016^c	0.140 ± 0.012^d	0.147 ± 0.009^c
8	0.145 ± 0.011^d	0.144 ± 0.024^d	0.177 ± 0.013^b
病毒对照	0.175 ± 0.016^c	0.159 ± 0.014^{bc}	0.173 ± 0.014^b
细胞对照	0.269 ± 0.031^a	0.281 ± 0.011^a	0.280 ± 0.019^a

2.4 GA 组的变化 先加中药、后加病毒,250 $\mu\text{g/mL}$ 和 125 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 A_{570} 值显著高于病毒对照组 ($P < 0.05$);先加病毒、后加中药,只有 125 $\mu\text{g/mL}$

浓度 A_{570} 值高于病毒对照组,但不显著;与病毒同时加,250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 A_{570} 值显著高于病毒对照组 ($P < 0.05$)(表 4)。

表 4 GA 在先加、后加和与病毒同时加入时各组细胞 A_{570} 值

浓度($\mu\text{g/mL}$)	先加中药、后加病毒	先加病毒、后加中药	中药与病毒同时加
250	0.208 ± 0.012^b	0.153 ± 0.013^b	0.216 ± 0.015^b
125	0.175 ± 0.015^c	0.179 ± 0.018^b	0.126 ± 0.009^d
62.5	0.109 ± 0.014^c	0.160 ± 0.018^b	0.161 ± 0.015^c
病毒对照	0.133 ± 0.019^d	0.167 ± 0.011^b	0.151 ± 0.014^c
细胞对照	0.282 ± 0.009^a	0.237 ± 0.022^a	0.282 ± 0.019^a

2.5 CA、PD 和 LT 组的变化 CA、PD 和 LT 3 种中药成分无论是哪种加药方式均无抑制病毒感染细胞能力的作用。

3 讨论

3.1 中药成分对 NDV 感染 CEF 能力的影响 本试验结果表明,在先加中药、后加病毒时,OM 在高、中浓度,GA 在高、中浓度,APS 在高、中浓度,GP 在高浓度时具有显著的抑制病毒感染细胞能力的作用;先加病毒、后加中药时,OM 高、中浓度,APS 中、低浓度有显著的抑制病毒生长作用;中药与病毒同时加入时,OM 高、中浓度,APS 高、中、低浓度,GA 高浓度有显著抑制病毒感染细胞能力的作用。综合以上结果,4 种中药成分抑制病毒感染细胞能力的作用依次为:OM>APS>GA>GP。而 CA、PD 和 LT 3 种中药成分无论是哪种加药方式均无抑制 NDV 增殖作用。

3.2 中药成分抑制病毒感染细胞能力的量效关系

试验中发现,中药先于病毒加入时,OM、APS、GA 在高、中浓度,GP 在高浓度对病毒生长有抑制作用;在后于病毒加入时,OM 在高、中浓度、APS 在中、低浓度有抑制病毒生长作用;在与病毒同时加入时,OM 在高、中浓度,GA 在高浓度,APS 在高、中、低浓度对病毒生长有抑制作用。说明中药成分必须有合适的剂量才能发挥最佳效应,很多研究都

证明了这一结论^[5-7]。

3.3 关于中药成分抑制 NDV 感染细胞能力的作用机制 本试验中,4 个中药成分在先于病毒加入时抑制作用最强,在与病毒同时加时也起到了很显著的抑制作用,表明中药成分或通过改变细胞膜表面的病毒吸附蛋白受体,或作用于细胞内而提高其抵抗力,阻止病毒侵入细胞而发挥预防作用,或通过直接灭活病毒来保护细胞^[8-9];先接种病毒后加中药,OM 和 APS 高、中、低浓度,GP 高浓度,GA 中浓度均有一定的抑制作用,表明中药成分特别是 OM 和 APS 在病毒感染细胞后也可发挥抗感染能力,从而起到治疗作用。

参考文献:

- [1] 陈玉库,邢玉娟,蔡丙彦,等.氧化苦参碱等七种中药成分对鸡胚或纤维细胞增殖的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2009,8:103-105.
- [2] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].2版.北京:科学出版社,1997:204-246.
- [3] 任宇皓,胡元亮,刘家国.黄芪多糖、淫羊藿多糖和淫羊藿总黄酮对新城疫病毒感染细胞的影响[J].南京农业大学学报,2001,24(2):102-105.
- [4] 刘钊,杨占秋,肖红,等.MTT 法在抗病毒药物筛选中的应用[J].武汉大学学报:医学版,2004,25(3):332-335.
- [5] 杨玉成,田勇,乔健,等.“病毒克”颗粒剂对 NDV 在鸡胚成纤维细胞中增殖的影响[J].中国农业大学学报,2006,11(5):51-54.

鹅巴氏杆菌病病原分离鉴定与中药的筛选

马 驿, 陈钦旭, 陈秀眉, 陈均玉, 彭金菊

(广东海洋大学动物医学系, 广东 湛江 524088)

摘要:应用常规分离鉴定技术,对湛江市某养鹅场的病鹅进行病原分离与鉴定,通过试管二倍稀释法测定鱼腥草、五倍子、黄芩等 30 种中药药液对病原菌的最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC),筛选出抗菌作用较强的中药作为主药,与其他中药组成复方,测定中药复方对病原菌的体外抑制效果。结果表明:分离的病原菌符合巴氏杆菌的生化特性;五倍子(MIC=3.125mg/mL)和诃子(MIC=12.5mg/mL)对巴氏杆菌有较强抑菌活性,选取五倍子、诃子、五味子、乌梅、山茱萸、石榴皮、栀子和虎杖作为主药与其他中药分别组成复方,主药与大多数中药组成的复方抗菌作用增强。

关键词:中药;中药复方;巴氏杆菌

中图分类号:S852.61⁺2

文献标识码:A

文章编号:0529-6005(2011)09-0049-04

Isolation and identification of pathogen from diseased goose with Pasteurellosis and screening sensitive Chinese herb and their compounds

MA Yi, CHEN Qin-xu, CHEN Xiu-mei, CHEN Jun-yu, PENG Jin-ju

(Department of Veterinary Medicine, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Pathogenic bacteria were isolated from the infected geese which were collected from a goose farm in Zhanjiang by routine bacterial isolation and identification technology. Moreover, the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of 30 kinds of Chinese herbs affected on pathogenic bacteria were measured, such as *Herba Houttuyniae*, *Galla Chinensis*, *Radices Scutellaria*, etc, and the antibacterial effects of other Chinese herbs combined with the selected Chinese herbs which had the significant inhibitory effects on pathogenic bacteria were measured. The results show that the biochemical character of the isolated pathogenic bacteria were same as those of *Pasteurella multocida*, and the Chinese herbs such as *Galla Chinensis* (MIC=3.125 mg/mL) and *Fructus Chebulae* (MIC=12.5 mg/mL) had significant inhibitory effects on *Pasteurella multocida*, the inhibitory effects were improved when *Galla Chinensis*, *Fructus Chebulae*, *Fructus Schizandrae*, *Fructus Mume*, *Fructus Corni*, *Pericarpium Granati*, *Fructus Gardeniae* and *Rhizoma Polygoni Cuspidati* were combined with many other Chinese herbs.

Key words: Chinese herbs; Chinese medicine formula; *Pasteurella multocida*

Corresponding author: PENG Jin-ju

鹅巴氏杆菌病是由禽多杀性巴氏杆菌引起鹅的一种急性、败血性、高度接触性传染病。该病的传播途径广泛,具有较高的死亡率以及导致生产性能低下等特点,给养鹅业造成较大的经济损失。目前,治

疗细菌性疾病的最常用药物是抗生素和合成抗菌药,但具有产生耐药性、导致药物残留等缺点。我国传统中药除可克服前述缺点外,还可增强动物免疫力,因此,从中药中提取有效的活性成分,以取代部分高残留药物的研究尤为重要。研究表明,中药及中药复方对巴氏杆菌有较好的体外抑制效果^[1-3]。本试验从湛江市某养鹅场采集病料,进行病原分离鉴定,同时选取30种常用中药,通过测定各中药及

收稿日期:2010-10-08

作者简介:马驿(1976-),男,副教授,博士,从事兽医药理学与毒理学的教学与科研工作,E-mail: mayi761@163.com

通讯作者:彭金菊,E-mail: pengjinju74@163.com

- [6] 许斌,周双,黄玉仙,等. 氧化苦参碱在鸭原代肝细胞中抗鸭乙型肝炎病毒(DHBV)作用的研究[J]. 病毒学报,2006,22(5):369-374.
- [7] 胡元亮,孔祥峰,李祥瑞,等. 10 种中药成分对 CEF 的增殖和抵抗 NDV 感染的影响[J]. 畜牧兽医学报,2004,35(3):301-

305.

- [8] 李继强,陈紫霞,曾民德,等. 氧化苦参碱抗乙型肝炎病毒的体外实验研究[J]. 中华消化杂志,2001,21(9):550.
- [9] 杨志伟,周娅,曹秀琴. 苦豆子生物碱体外抗柯萨奇 B3 病毒的作用[J]. 四川中医,2003,21(3):14.