

3 种中药体外抗猪繁殖与呼吸综合征病毒的作用

曾强¹, 黄良宗¹, 李丹¹, 朱燕秋², 谢海燕², 顾万军^{1*}

(1.佛山科学技术学院 生命科学学院, 广东 佛山 528231; 2.东莞市动物疫病预防控制中心, 广东 东莞 523107)

摘 要: 为研究板蓝根、甘草和鱼腥草 3 种中药粗提物体外抗猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)的作用, 采用体外细胞培养法, 在 Marc-145 单层细胞上, 对 3 种中药粗提物进行直接抗 PRRSV 活性试验. 结果表明, 板蓝根和甘草粗提物阻断 PRRSV 的最佳质量浓度分别为 3.125、0.391 mg/mL, 抑制 PRRSV 感染的最佳质量浓度分别为 3.125、0.782 mg/mL, 直接灭活 PRRSV 的最佳质量浓度分别为 1.563、0.782 mg/mL, 鱼腥草粗提物质量浓度为 0.782 mg/mL 时, 阻断和抑制 PRRSV 感染的效果最好, 但对 PRRSV 没有直接灭活作用. 3 种中药粗提物均有不同程度的体外抗 PRRSV 活性作用, 其中板蓝根的效果最好.

关 键 词: 板蓝根; 甘草; 鱼腥草; 猪繁殖与呼吸综合征病毒

中图分类号: S853.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)04-0459-05

Anti-virus activity of three Chinese herbs against porcine reproductive and respiratory syndrome virus *in Vitro*

ZENG Qiang¹, HUANG Liang-zong¹, LI Dan¹, ZHU Yan-qi², XIE Hai-yan², GU Wan-jun^{1*}

(1.College of Life Science, Foshan University, Foshan, Guangdong 528231, China; 2.Center for Animal Disease Control and Prevention of Dongguan, Dongguan, Guangdong 523107, China)

Abstract: Antiviral activity of isatis tinctoria, glycyrrhiza and houttuynia cordata extraction against porcine reproductive and respiratory syndrome virus was estimated in the monolayer Marc-145 cell. The result showed that as for precaution, inhibition and the direct killing function, the best concentration of isatis tinctori were 3.125, 3.125 and 1.563 mg/mL; the optimum concentration of glycyrrhiza were 0.391, 0.782 and 0.782 mg/mL, respectively. The optimum concentration of houttuynia cordata for precaution and inhibition was 0.782 mg/mL, while with on the direct killing function. It indicated that all of these three Chinese traditional medicines had different degrees of antiviral activity against PRRSV and the isatis tinctoria behaved the best in these chinese traditional medicines.in vitro.

Key words: isatis tinctoria; glycyrrhiz; houttuynia cordata; porcine reproductive and respiratory syndrome virus

猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)感染主要损伤巨噬细胞, 降低机体免疫力, 引起继发感染, 防治难度大. 使用抗生素和抗病毒药易产生污染和毒副作用. 目前主要靠接种疫苗来对该病进行预防, 尚无有效的治疗药物^[1]. 弱毒疫苗免疫效果较好, 但本身存在散毒危险^[2-3]. 灭活疫苗接种后, 特异性抗体产生的滴度低, 速度慢, 只能提供部分免疫保

护^[4-6]. 母安雄等^[6]发现国内主要厂家生产的猪 PRRSV 灭活苗免疫效果不理想, 所以, 提高疫苗免疫的保护抗体水平和细胞免疫是抗 PRRSV 感染的关键^[7]. 较多中药具有免疫调节作用和抗病毒作用, 作为保健防病药物和添加剂, 可改善和提高机体的免疫功能^[8], 提高机体的抗病力和抵抗力^[1]. 抗病毒感染的单味中药具有抑制病毒增殖或灭活, 阻止病毒吸附细胞的作用^[9]. 中国中药资源丰富, 在治

收稿日期: 2010-03-3

基金项目: 广东省科技计划项目(2008A020100020); 广东省自然科学基金(34064); 东莞市高等院校科研机构科技项目(2007108101114)

作者简介: 曾强(1970—), 男, 广东翁源县人, 硕士, 兽医师, 主要从事预防兽医研究; *通讯作者, guwanjun@163.com

疗病毒感染性疾病方面具有独特的优势^[10]。采用体外细胞培养的方法,在Marc-145单层细胞上,对板蓝根、甘草和鱼腥草粗提物进行抗PRRSV PX株试验,旨在探明3种中药体外抗PRRSV PX株的作用效果。

1 材料与方法

1.1 材料

板蓝根、甘草、鱼腥草均购自广州清平中药专业市场。PRRSV PX株、Marc-145细胞由广东省农业科学院兽医研究所人畜共患病室保存。PRRSV PX株临用前于37℃解冻,用Marc-145细胞维持液稀释成100TCID₅₀备用。

细胞生长液含低糖DMEM(GIBCO产品),加10%新生小牛血清(GIBCO产品),每100 mL营养液加入1 mL 10 000 IU青霉素和链霉素。细胞维持液含5%新生小牛血清、MTT、3-(4,6-二甲基噻唑-2-基)-2,5-乙苯基-四唑溴盐(购自Amresco公司)、二甲基亚砜(DMSO,分析纯,购自天津福晨化学试剂有限公司)。

酶联免疫检测仪(168-1000XC)为Bio-RAD公司产品。

1.2 方法

1.2.1 3种中药粗提物的提取

用常规水煎煮法粗提3种中药粗提物:取板蓝根、甘草和鱼腥草各100 g,煎煮3次(第1次加8倍水浸泡,用武火加热,沸腾后用文火加热1 h,6层纱布过滤得初滤液;第2次将第1次过滤后的药渣加5倍水煎煮50 min,过滤;第3次将第2次过滤后的药渣加5倍水煎煮50 min,过滤),合并3次滤液,水浴浓缩至含生药1 g/mL,3 000 r/min离心20 min,得上清液,用孔径0.22 μm滤器过滤,除菌后分装,4℃冷藏备用。

1.2.2 PRRSV PX株的50%组织培养感染剂量测定

将Marc-145细胞进行消化传代,每1 mL细胞数调整至1×10⁶个,加入到96孔细胞培养板中(0.1 mL/孔),于5% CO₂培养箱中37℃培养^[11]。待细胞长成单层后,接种稀释度10⁻⁸~10⁻¹的病毒液(0.1 mL/孔),每个稀释度接种8孔,于5%CO₂培养箱中

37℃培养120 h,每天观察细胞病变(CPE)情况^[12]。根据Reed-Muench公式,计算50%组织培养感染剂量(TCID₅₀)^[13]。TCID₅₀=(高于50%病变累积阳性率-50%)/(高于50%病变累积阳性率-低于50%病变累积阳性率)。

1.2.3 3种中药粗提物安全浓度的测定

参照文献[14],用细胞维持液将试验中药粗提物作连续的倍比稀释(表1)后,加到已长成Marc-145细胞单层的细胞培养板上,每个稀释度重复8孔,另设细胞对照(不加中药),置5%CO₂培养箱中37℃培养120 h,每天观察细胞病变情况,以能长成或维持良好单层细胞的最高药物浓度作为药物的安全浓度,进行抗PRRSV PX株试验。

表1 3种中药粗提物的稀释倍数
Table 1 Dilution of 3 Chinese herbal medicine

孔号	药物质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	稀释倍数
1	50.000	2
2	25.000	4
3	12.500	8
4	6.250	16
5	3.125	32
6	1.563	64
7	0.782	128
8	0.391	256
9	0.196	512
10	0.098	1 024
11	0.049	2 048

1.2.4 3种中药粗提物抗PRRSV PX株试验

以中药最大安全浓度为基准,用细胞维持液依倍比稀释成4个浓度,以如下3种方式研究3种中药粗提物抗PRRSV PX株的作用。

(1) 对PRRSV PX株的阻断作用。先加中药粗提物,后接病毒液。在细胞已基本长满的96孔细胞培养板上,加入从低浓度到高浓度稀释好的同一种中药粗提物,每孔100 μL,每个浓度重复8孔。置5%CO₂培养箱中37℃培养4 h后,加入100TCID₅₀ PRRSV PX株病毒液作用2 h,再加入细胞生长液,每孔100 μL,置5%CO₂培养箱中37℃培养72 h。

(2) 对PRRSV PX株的抑制作用。先接PRRSV PX株病毒液,再加中药粗提物。用病毒液作用2 h,再加药液作用4 h,其他操作与(1)相同。

(3) 对PRRSV PX株的直接灭活作用 .中药粗提物与PRRSV PX株病毒液体外作用 2 h后 ,加入到培养液中 .在小试管中 ,将中药粗提物原液稀释成不同的浓度 ,盖上盖子 ,置 5%CO₂培养箱中 37 ℃培养 2 h ;将经处理的药液加入到已经长好细胞的细胞培养板孔中 ,置 5%CO₂培养箱中 37 ℃培养 4 h ,加入含 100TCID₅₀病毒的培养基 ,每孔 100 μL ,置 5%CO₂培养箱中 37 ℃培养 72 h .

上述 3 种作用方式试验均设置正常细胞对照组(细胞对照 ,不加中药 ,不攻毒)和 PRRSV PX 株接种对照组(病毒对照 ,不加中药 ,攻毒) .以上各组每天用显微镜观察 CPE 情况并记录 ,根据 CPE 和 MTT 试验结果判断药物的作用效果 .MTT 吸收法采用酶联免疫检测仪 570 nm/630 nm 双波长模式测定细胞 OD 值 ,以敏感波长与非敏感波长 OD 值之差作为中药粗提物抗 PRRSV PX 株感染细胞的指标 ,细胞 OD 值越大 ,抗 PRRSV PX 株效果越好 .用 SPSS11.5 软件统计分析组间的差异性 .

2 结果与分析

2.1 PRRSV PX株的TCID₅₀测定结果

由表 2 可知 ,病毒稀释度 10⁻⁴的病变孔累积阳性率高于 50% ,而 10⁻⁶的低于 50% ,50%阳性率终点分布于两者之间 ,按公式计算得TCID₅₀=10^{-4.5} ,也就是说 ,病毒稀释度为 10^{-4.5}时 ,以 0.1 mL接种一组细胞孔后使 50%细胞感染 ,即 50%的细胞存在

病变的可能 ,故该病毒感染的滴度为 10^{-4.5} .

表 2 PRRSV PX株不同稀释度TCID₅₀测定结果
Table 2 Tested results of TCID₅₀ at different diluted concentration of PRRSV PX strains

病 毒 稀释度	接种孔 数/个	阳性孔 数/个	病变孔数/个		积累孔数/个		病变 率/%
			阳性	阴性	阳性	阴性	
10 ⁻¹	8	8	8	0	36	0	100
10 ⁻²	8	8	8	0	28	0	100
10 ⁻³	8	8	8	0	20	0	100
10 ⁻⁴	8	5	5	3	12	3	80
10 ⁻⁵	8	4	4	4	7	7	50
10 ⁻⁶	8	3	3	5	3	12	20
10 ⁻⁷	8	0	0	8	0	20	0
10 ⁻⁸	8	0	0	8	0	28	0

2.2 3 种中药粗提物的安全浓度

天然药物毒性与其浓度呈正相关^[15-17] .从表 3 可知 ,试验药物浓度高于某一值时都会对Marc-145 细胞产生毒性作用 ,使细胞产生病变 ,且随着其浓度的增加 ,所产生的毒性作用愈强 ,细胞的病变愈严重 .当板蓝根、甘草、鱼腥草的质量浓度由 50 mg/mL 分别降至 3.125、3.125、1.563 mg/mL时 ,Marc-145 细胞基本不产生病变 ,即没有表现出毒性 ,故此质量浓度为最大安全浓度 .通常情况下 ,药物与毒物只有量的差别 ,而无质的区别 ,中药也是如此 ,使用太多或超量使用也可引起毒副反应^[18] ,因此 ,进行抗病毒试验时 ,要从试验药物最大安全浓度开始稀释 ,以排除中药本身引起的细胞病变效应的干扰 ,保证试验结果的正确、可靠 .

表 3 中药粗提物对 Marc-145 细胞作用的安全浓度
Table 3 Safety concentration of extracts of Chinese herbal medicines on Marc-145

中药	药物不同质量浓度(mg/mL)下的细胞病变情况											细胞对照
	50.000	25.000	12.500	6.250	3.125	1.563	0.782	0.391	0.196	0.098	0.049	
板蓝根	++++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
甘 草	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
鱼腥草	++++	++++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-

细胞病变 75% ~ 100% 记为“++++” , 50% ~ 75% 记为“+++” , 25% ~ 50% 记为“++” , 0 ~ 25% 记为“+” ; 基本无病变记为“-” . 下同 .

2.3 3 种中药粗提物对抗 PRRSV PX 株的阻断作用

中药中的黄酮类、多糖及其衍生物、三萜类化合物及其衍生物(如甘草甜素衍生物)、生物碱及苷类等 ,都通过阻止病毒颗粒对宿主细胞的吸附而发挥抗病毒作用^[19-20] .由表 4、表 5 可知 ,3 种中药

粗提物对抗PRRSV PX株均有不同程度的阻断作用 .3.125 mg/mL板蓝根、0.391 mg/mL甘草、0.782 mg/mL鱼腥草的阻断作用最好 ,与病毒对照差异显著($P < 0.05$) ,对细胞保护效果好 ,与细胞对照差异不显著 .这可能是先加药后接病毒 ,中药粗提物的

某些有效活性成分增强了细胞膜的稳定性，阻止了 了抗病毒感染能力。
病毒颗粒吸附靶细胞，使感染细胞受到保护，提高

表 4 3 种作用方式的各组细胞病变效应
Table 4 CPE of cell treated by precaution, inhibition and direct killing against PRRSV PX

处理	阻断作用			抑制作用			直接灭活作用		
	板蓝根	甘 草	鱼腥草	板蓝根	甘 草	鱼腥草	板蓝根	甘 草	鱼腥草
A ₁	-	+++	+	++	+++	++	++	++++	++++
A ₂	+++	+	-	+++	++	+	+	++++	++++
A ₃	++	+	+	++++	++	+++	++++	+++	++++
A ₄	++++	-	++++	++++	++	+++	++++	+++	++++
病毒对照	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
细胞对照	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A₁~A₄示不同质量浓度(板蓝根分别为 3.125, 1.563, 0.782, 0.391 mg/mL; 甘草分别为 3.125, 1.563, 0.782, 0.391 mg/mL; 鱼腥草分别为 1.563, 0.782, 0.391, 0.196 mg/mL)中药粗提物处理。下同。

表 5 3 种作用下测得各组细胞的 OD 值
Table 5 OD values of the cell treated by precaution, inhibition and direct killing against PRRSV PX

处理	阻断作用 OD 值		
	板蓝根	甘 草	鱼腥草
A ₁	(0.285±0.018)b	(0.213±0.037)a	(0.257±0.013)b
A ₂	(0.175±0.042)c	(0.231±0.036)ab	(0.265±0.011)b
A ₃	(0.199±0.063)c	(0.233±0.031)ab	(0.248±0.022)b
A ₄	(0.078±0.008)d	(0.244±0.035)b	(0.146±0.022)c
病毒对照	(0.127±0.020)a	(0.188±0.018a	(0.186±0.013)a
细胞对照	(0.283±0.024)b	(0.246±0.014)b	(0.266±0.025)b

处理	抑制作用 OD 值		
	板蓝根	甘 草	鱼腥草
A ₁	(0.234±0.029)c	(0.205±0.016)df	(0.228±0.019)cd
A ₂	(0.201±0.021)d	(0.226±0.037)c	(0.241±0.034)d
A ₃	(0.086±0.015)a	(0.233±0.019)c	(0.202±0.030)c
A ₄	(0.076±0.010)a	(0.226±0.028)cf	(0.205±0.022)c
病毒对照	(0.065±0.009)a	(0.183±0.028)ad	(0.111±0.006)a
细胞对照	(0.331±0.036)b	(0.419±0.032)b	(0.399±0.040)b

处理	直接灭活作用 OD 值		
	板蓝根	甘 草	鱼腥草
A ₁	(0.479±0.043)b	(0.358±0.049)a	(0.184±0.014)a
A ₂	(0.491±0.052)b	(0.351±0.020)a	(0.164±0.011)a
A ₃	(0.311±0.063)c	(0.390±0.031)c	(0.145±0.011)c
A ₄	(0.389±0.028)a	(0.372±0.020)ac	(0.155±0.012)c
病毒对照	(0.409±0.039)a	(0.336±0.030)a	(0.177±0.018)a
细胞对照	(0.520±0.030)b	(0.475±0.018)b	(0.400±0.036)b

2.4 3 种中药粗提物对 PRRSV PX 株的抑制作用

中药中的多酚类物质，可以抑制流感病毒蛋白质和RNA的合成，也可以抑制流感病毒的吸附作用^[21]。由表 4、表 5 可知，3 种中药粗提物对 PRRSV

PX株均有不同程度的抑制作用。板蓝根、甘草、鱼腥草分别在质量浓度 3.125、0.782、0.782 mg/mL时的抑制作用最强，与病毒对照和细胞对照差异显著(P<0.05)，对细胞有一定的保护效果。可见，3 种中药抑制作用较其阻断作用效果差。这可能是接种病毒后，已侵入的病毒对细胞产生破坏，加入中药粗提物后，粗提物的有效成分干扰病毒的复制，从而抑制病毒增殖，产生抗病毒感染的抑制作用。

2.5 3 种中药粗提物对 PRRSV PX 株的直接灭活作用

板蓝根对疱疹病毒有杀灭作用，而非抑制作用^[10]。甘草甜素对带状疱疹病毒具有直接杀灭作用^[22]。由表 4、表 5 可知，1.563 mg/mL板蓝根、0.782 mg/mL甘草的直接灭活作用最好，与病毒对照差异显著(P<0.05)；板蓝根对细胞的保护效果最好，与细胞对照差异不显著；鱼腥草对 PRRSV PX 株没有直接灭活作用，与病毒对照差异不显著，表明板蓝根、甘草可能含有促进抗病毒抗体生成的有效活性成分，但哪种成分占主要地位，是对单一靶点作用还是对不同部位协同作用，在临床上是否可以作为治疗药物等还有待研究。

3 结论与讨论

采用体外细胞培养的方法，测得板蓝根、甘草和鱼腥草粗提物对 Marc-145 细胞的最大安全浓度分别为 3.125、3.125、1.563 mg/mL，病毒感染的滴度(TCID₅₀)为 10^{-4.5}。3 种单一味中药粗提物对

PRRSV PX株均有不同程度的阻断和抑制作用, 3.125 mg/mL板蓝根、0.391 mg/mL甘草、0.782 mg/mL鱼腥草的阻断作用最好, 3.125 mg/mL板蓝根、0.782 mg/mL甘草、0.782 mg/mL鱼腥草的抑制作用最好, 1.563 mg/mL板蓝根、0.782 mg/mL甘草的直接灭活作用最好, 与病毒对照差异显著($P < 0.05$), 鱼腥草对PRRSV PX株没有直接灭活作用. 综合比较3种中药粗提物体外抗PRRSV PX株感染细胞的作用, 板蓝根的效果最好. 板蓝根、甘草、鱼腥草可作为抗PRRSV PX株的预防用药, 但其效果有待进一步研究.

参考文献:

- [1] 王学斌, 魏战勇, 崔保安, 等. 板蓝根、黄芪对猪繁殖与呼吸综合征病毒的体外抑制作用[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(4): 11-14.
- [2] Mengeling W L, Lager K M, Vorwald A C. Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. Vet Res, 1999, 60(7): 796-801.
- [3] Botner A, Nielsen J, Oleksiewicz M B, et al. Heterologous challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine virus: No evidence of reactivation of previous european-type PRRS virus infectious[J]. Vet Microbiol, 1999, 68(3/4): 187-195.
- [4] Nielsen T L, Nielsen J, Have P, et al. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Vet Microbiol, 1997, 54(2): 101-112.
- [5] Nilubol D, Platt K B, Halbur P G, et al. The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs[J]. Vet Microbiol, 2004, 102(1/2): 11-18.
- [6] 母安雄, 濮文正, 蒋建一, 等. 4种猪生殖和呼吸综合征灭活疫苗免疫效果比较[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(9): 18-19.
- [7] 张红英, 崔保安, 王学兵, 等. 2种植物多糖对PRRSV灭活疫苗免疫猪抗体及T淋巴细胞亚群的影响[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(2): 210-214.
- [8] 秦华珍, 时博, 李世阳, 等. 南板蓝根和北板蓝根抗甲型流感病毒作用的比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(1): 168-169.
- [9] 史利田. 抗呼吸道病毒中药的实验研究述评[J]. 中国中医基础医学杂志, 1998, 12(4): 54.
- [10] 张其威, 张楚瑜. 抗病毒中药研究的最新进展[J]. 中成药, 2005, 27(1): 116-119.
- [11] 颜其贵, 郭万柱, 陈斌, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 CQ 株的分离鉴定[J]. 畜禽业, 2006(15): 6-9.
- [12] 王向阳, 刘志苏, 姜合作, 等. 金丝桃素体外抗巨细胞病毒效应的实验研究[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2006(5): 302-306.
- [13] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 189-210.
- [14] Boernfund E, Babich H, Martin Alguacil N. Comparison of two invitro cytotoxicity assays: The neutral red (NR) and tetrazolium (MTT) tests[J]. Toxicology in vitro, 1988(2): 1-6.
- [15] 刘家国, 胡元亮, 陈玉库, 等. 几种天然药物成分在体外 CEF 中最大安全浓度的测定[J]. 动物医学进展, 2002, 23(3): 88-92.
- [16] 刘家国, 胡元亮, 陈玉库, 等. 天然复方药物在 CEF 上的安全浓度筛选及其抗 IBDV 感染的试验研究[J]. 中兽医医药杂志, 2002(5): 12-15.
- [17] 胡元亮, 孔祥峰, 张宝康. 10 种中药成分对鸡胚成纤维细胞生长的影响[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(6): 601-603.
- [18] 艾国良. 中药饲料添加剂提高母猪繁殖性能的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(2): 196-199.
- [19] 许小琴, 申海青, 韦旭斌. 中药抗病毒实验药理学研究现状与展望[J]. 中兽医医药杂志, 2004(4): 48.
- [20] 付秀花, 王恬, 顾宏伟. 中药的免疫增强作用[J]. 畜牧与兽医, 2002, 34(8): 40-42.
- [21] 杨海燕, 张传美, 杜绍范, 等. 抗流感病毒中药研究进展[J]. 辽宁畜牧兽医, 2004(3): 39.
- [22] 李铁民, 梁再赋. 甘草提取物及其衍生物的抗病毒研究现状[J]. 中药, 1994, 25(12): 655-658.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠