

中草药与卵黄抗体复合气雾剂体外抑制病毒试验

朱达文¹, 王冬梅¹, 王寿轩², 朱本康², 刘俊栋³, 方希修^{1*}, 朱涛² (1. 江苏畜牧兽医职业技术学院饲料与营养研究所, 江苏泰州 225300; 2. 江苏省徐州金牌药业有限公司, 江苏徐州 221600; 3. 江苏畜牧兽医职业技术学院兽医系, 江苏泰州 225300)

摘要 [目的]将不同配比的中草药与卵黄抗体复合气雾剂体外抑制病毒的能力进行比较,以确定中草药与卵黄抗体的最佳配比。[方法]试验样品为不同配比的中草药“禽喘康复散”与卵黄抗体复合气雾剂,配比分别为1:1.0、1:0.8、1:0.5、1:0.2,分别记为样品I、II、III、IV。采用病毒致细胞病变抑制试验和血凝抑制试验,测定样品抑制病毒的能力。[结果]结果表明,样品I对腺病毒7型(AdV7)的最小抑制浓度为1/640 g/ml,作用弱于样品II,而对其他病毒的作用都最强。样品IV除对腺病毒3型(AdV3)的最小抑制浓度为1/640 g/ml,对其余病毒的抑制作用在4种样品中最弱。体外抑制病毒试验表明中草药与卵黄抗体配比为1:1.0对各病毒的抑制效果最好。[结论]选用1:1.0配比的复合气雾剂最能有效防治呼吸道疾病。

关键词 中草药;卵黄抗体;气雾剂;抑病毒

中图分类号 S853.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)30-14715-02

Restraining Virus Experiment of Complex Aerosol of Chinese Herbal Medicine and Yolk Antibody *in Vitro*

ZHU Da-wen et al (Jiangsu Animal Husbandry and Veterinarian College, Taizhou, Jiangsu 225300)

Abstract [Objective]The research aimed to compare restraining abilities on virus *in vitro* of different complex aerosol of Chinese herbal medicine and yolk antibody, and to establish the best ratios of Chinese herbal medicine and yolk antibody. [Method]Taken different mixture ratios of Chinese herbal medicine avian pant recovery powder and yolk antibody complex aerosol as materials, and the ratios of 1:1.0, 1:0.8, 1:0.5, 1:0.2 were recorded as sample I, II, III and IV. Cytopathic inhibition test of different virus and the inhibition test of TPHA were carried out to determine the abilities of virus inhibition. [Result]The results showed that the minimum virustatic concentration of sample I for AdV7 is 1/640 g/ml, which is less than sample II, but for other virus is strongest. Other than the minimum virustatic concentration for AdV3 is 1/640 g/ml, the inhibition to other virus of sample IV is weakest among four samples. The experiments of virustatic *in vitro* suggest that compound aerosol with ratio of Chinese herbal medicine and yolk antibody 1:1.0 has best inhibitory activity on different virus. [Conclusion]Ratio of 1:1.0 compound aerosol had the best effects on the control of breath illness.

Key words Chinese herbal medicine; Yolk antibody; Aerosol; Virustatic

鸡上呼吸道感染是指鸡上呼吸道受病原微生物侵袭所致的疾病。鸡常见呼吸道病主要由病毒、细菌和败血霉形体等引起,其主要临床特征为流泪、流鼻涕、咳嗽、气喘、罗音和呼吸困难、面部水肿。中兽药不仅可用于治疗细菌、钩端螺旋体、致病性真菌和原虫感染,还能用于防治病毒感染。试验通过比较不同配比的中草药与卵黄抗体复合气雾剂在体外抑制病毒的能力来选择最佳配比,从而为防治家禽病毒性呼吸道感染寻求有效途径。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 试验药品。中草药喘康制剂由江苏天成保健品有限公司生产,利用超声波提取其有效成分,用低温冷冻干燥机制成粉剂;卵黄抗体粉剂由江苏畜牧兽医职业技术学院饲料与营养研究所制备。试验样品为不同配比的中草药“禽喘康复散”与卵黄抗体复合气雾剂,配比分别为1:1.0、1:0.8、1:0.5、1:0.2,分别记为样品I、II、III、IV。提取溶剂为70%乙醇,在水浴上加热回流提取1 h,趁热过滤,药渣再重复提取1次,合并滤液,浓缩至原液浓度为1 g/ml,采用间歇法灭菌。

1.1.2 仪器设备。超净工作台,CO₂培养箱,96孔培养板,微量滴定板,普通显微镜。

1.1.3 试验用病毒及细胞。试验用病毒:柯萨奇病毒3、5型(CB3、CB5),腺病毒3、7型(AdV3、AdV7),合胞病毒(RSV),流感病毒(F),副流感病毒(P)。试验用细胞:Hep-2细胞单层培养物。选用9~10日龄鸡胚、1%的鸡红细胞。

基金项目 江苏省科技攻关项目(BE2003618)。

作者简介 朱达文(1954-),男,江苏兴化人,副教授,从事兽医临床研究。*通讯作者,博士,教授, E-mail: fxxiu2008@yahoo.com.cn。

收稿日期 2009-06-09

1.1.4 组织培养基。生长液浓度为10%小牛血清MEM培养液,含青霉素、链霉素各100 IU/ml。维持液为浓度2%小牛血清MEM培养液。

1.2 方法

1.2.1 样品对细胞毒性的测定。选用的4种样品以浓度0.1 g/ml为原液,按(2~n)×10⁻¹倍比稀释,分别加入已长成单层Hep-2细胞的96孔培养板中,放入37℃CO₂温箱过夜,观察各配比制剂对细胞的毒性作用,以对细胞不产生毒性时的样品浓度记为CC₀,作为抑制病毒试验的起始浓度。

1.2.2 病毒感染滴度测定^[1]。取CB3、CB5、AdV3、AdV7、RSV的新鲜病毒悬液,以10倍递次稀释法稀释成不同稀释度,分别接种到组织培养单层细胞管内,每管接种100 μl,每个稀释度接种4支细胞管,使病毒与细胞充分接触,37℃吸附1 h,以Hanks液洗3次,加入细胞维持液,37℃培养,逐日在普通显微镜下观察记录细胞病变情况,观察1~5 d,测定组织培养半数感染量TCID₅₀。试验选用不同病毒的100TCID₅₀/0.1 ml。

1.2.3 中和试验。将样品从CC₀起作系列倍比稀释,样品与100TCID₅₀的病毒等量相加、摇匀,放置37℃水浴作用1.5 h,接种到形成单层细胞的96孔培养板内,同时设病毒对照组、正常细胞对照组、样品对照组,以产生50%细胞病变的样品最高稀释度作为判定结果。

1.2.4 血凝抑制试验^[1]。取96孔培养板,将样品顺序作倍比稀释至1:5 120,每孔加入4个单位的血凝素100 μl等量混合,37℃作用1 h,加入浓度1%鸡红细胞各100 μl,摇匀后置室温30、45 min各观察1次结果,以45 min为准。对照设样品对照组、病毒对照组(分别加入4、2、1、1/2单位血凝素各100 μl+生理盐水各100 μl)、红细胞对照组,以上各对照

组再分别加入浓度 1% 鸡红细胞 100 μl , 摇匀, 在相同条件下观察结果。以能完全抑制红细胞凝集的最小药物浓度为终点。

2 结果与分析

样品对细胞毒性的测定结果见表 1。由表 1 可见, 样品初始浓度选择对 Hep-2 出现无细胞病变的浓度, 样品 I 为 1/640, 样品 II 为 1/320, 样品 III 为 1/160, 样品 IV 为 1/80。

表 1 样品对 Hep-2 细胞毒性的作用

Table 1 Effects of samples on Hep-2 cell toxicity

药物浓度//g/ml Drug concentration	样品 I Sample I	样品 II Sample II	样品 III Sample III	样品 IV Sample IV
1/10	@	@	@	@
1/20	@	@	#	#
1/40	#	#	\$	\$
1/80	#	\$ &	&	*
1/160	\$	&	*	*
1/320	&	*	*	*
1/640	*	*	*	*
1/1280	*	*	*	*
1/2560	*	*	*	*

注: @ 表示 100% 的细胞病变, # 表示 50% 的细胞病变, \$ 表示 25% 的细胞病变, & 表示 12.5% 的细胞病变, * 表示无细胞病变。

Note: @. 100% cytopathic effect, #. 50% cytopathic effect, \$. 25% cytopathic effect, &. 12.5% cytopathic effect, *. No cytopathic effect.

中草药与卵黄抗体复合气雾剂的最小抑制病毒浓度见表 2、表 3。从 5 种病毒 7 个分型的呼吸道病患常见病毒的抑制病毒的试验结果来看, 样品 I 除对 AdV7 作用较弱外, 对其他病毒的作用都强于其余样品。样品 II 对病毒的作用相对强于样品 III、样品 IV, 而样品 IV 对病毒的作用最弱。

表 2 CB3、CB5、AdV3、AdV7、RSV 的最小抑制病毒浓度

Table 2 Minimum virustatic concentration of CB3, CB5, AdV3, AdV7, RSV

样品 Samples	CB3	CB5	AdV3	AdV7	RSV
I	1/640	1/2560	1/1 280	1/640	1/2 560
II	1/320	1/640	1/640	1/1 280	1/1 280
III	1/320	1/160	1/320	1/320	1/640
IV	1/80	1/160	1/640	1/320	1/320

(上接第 14663 页)

80 000 kg/hm^2 左右, 比固原三营园区产量略高, 可能是由于银川地处平原, 灌溉方便, 不存在用水问题, 而黄瓜在整个生育期用水量, 三营园区主要依靠扬黄水进行灌溉, 冬季遇黄枯水期, 园区灌水困难, 黄瓜产量下降。在内蒙乌达区乌兰淖尔镇, 设施栽培黄瓜品种博耐 33E, 其表现为高抗性和丰产性, 已成为当地设施黄瓜主栽品种之一。

(4) 黄瓜津优 33 号是天津科润黄瓜研究筛选出的黄瓜新品种。自 2002 年, 在河北固安、青县, 天津西青区、武清区和宁夏吴忠及山东等地进行了较大面积的生产试验, 从各生产试验地的反馈信息看, 津优 33 号产量高、抗病性突出, 瓜条品质好、商品性优良, 适合日光温室越冬栽培^[6]。由此可

表 3 样品对流感、副流感病毒的最小抑制病毒浓度

Table 3 Minimum virustatic concentration of influenza and parainfluenza

样品 Samples	流感 Influenza	副流感 Parainfluenza
I	1/1 280	1/640
II	1/320	1/320
III	1/80	1/320
IV	1/40	1/160

3 结论与讨论

70% ~ 80% 急性上呼吸道感染病例是由病毒引起的, 试验所选 7 种病毒均为呼吸道感染最常见的病毒性病原, 尤其是合胞病毒, 对呼吸道病毒感染具有一定代表性^[2-3]。试验结果表明, 中草药与卵黄抗体配比为 1:1.0, 对各病毒的抑制效果最强, 说明此配比浓度防治病毒性呼吸道疾病效果最佳。该结果与此配比浓度能显著提高肉鸡日增重和饲料转化效率, 促进蛋鸡法氏囊发育, 有效保护传染性支气管炎等前期研究结果一致。该试验是相同条件下的体外抑病毒试验, 但在临床应用中, 常因给药途径、剂量、作用方式的不同, 使疗效有一定差异, 笔者认为若早期能及时气雾吸入, 继之静点粉剂, 将收到较好疗效。

参考文献

- [1] 徐叔云, 下如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [2] 樊宏伟, 王翔, 肖大伟. 喉咽清气雾剂中甘草酸抑菌、抑病毒及诱生干扰素作用的研究[J]. 中国中医药科技, 2002, 9(6): 343-344.
- [3] 胡克杰, 徐凯建, 王跃红, 等. 双黄连粉针与气雾剂体外抑病毒实验的对比研究[J]. 中国中医药科技, 1999, 6(1): 21.
- [4] YUAN Z W, PU W X, CHEN G S, et al. Effect of Chinese herbal feed additive on meat quality of rex rabbit[J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(2): 122-126.
- [5] 龚伟, 蔡尔问, 方希修, 等. "禽喘康复散" 与卵黄抗体复合气雾剂治疗传染性支气管炎试验[J]. 中国动物保健, 2005(10): 37-39.
- [6] ZHAO Z, CHEN X W, LI S J, et al. Study on the effects of Chinese herb additive on milk yield and anti-heat stress ability of holstein cow[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3): 111-114.
- [7] 何良志, 张秋红, 王书臣, 等. 五味解毒颗粒剂对呼吸道感染作用的实验研究[J]. 中医杂志, 2001, 42(11): 689-691.
- [8] YANG H W, AI L, LUO Q J. Effects of the compatibility of Chinese medical herbs on health and growth performance of broilers[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 88-91.

以看出, 博耐 33E 和津优 33 地域适应性强, 表现稳定, 是设施栽培的优良品种。

参考文献

- [1] 彭传生, 李刚, 王腾飞, 等. 延秋黄瓜品种比试验[J]. 长江蔬菜, 2001(8): 37.
- [2] 叶五二. 闽中山区春黄瓜品种比较试验[J]. 现代园艺, 2007(3): 9-10.
- [3] 马洪英, 张远芳, 刘书亭, 等. 适合藏东高海拔地区栽培的瓜类新品种引进和筛选[J]. 天津农业科学, 2007, 13(4): 23-25.
- [4] 郭国雄, 聂晓文, 张军. 黄瓜夏秋栽培品种比试验[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(33): 10632-10694.
- [5] 周克福, 邵艳艳, 王玲, 等. 迷你型黄瓜品种比试验[J]. 上海蔬菜, 2005(1): 29-30.
- [6] 杨瑞环, 哈玉洁. 日光温室黄瓜品种——津优 33[J]. 西北园艺, 2006(7): 34.