

几种中药在鸡胚上对鸡常见病毒的作用效果试验

王学兵,张红英,徐端红,崔保安,程晓静,李欣,马姣
(河南农业大学牧医工程学院,郑州 450002)

摘要:为筛选抗病毒中药,提取桑叶、茵陈蒿、马齿苋、野菊花等4种中药的有效成分,并以其为实验药物,观察在10~12日龄鸡胚上对禽流感病毒(AIV)、新城疫病毒(NDV)和鸡传染性支气管炎病毒(IBV)的作用效果。结果表明,在安全浓度范围内,几种中药对以上病毒均具有一定的阻断和抑制作用。其中,茵陈蒿全成分提取液对AIV和NDV的阻断和抑制作用较为突出。

关键词:桑叶;茵陈蒿;马齿苋;野菊花;禽流感病毒;鸡新城疫病毒

中图分类号:S855.3 **文献标识码:**A

Effects of Several Chinese Tradional Medicine Extracts on Several Fowl Viruses in Chicken Embryo

Wang Xuebing, Zhang Hongying, Xu Duanhong, Cui Baoan, Cheng Xiaojing, Li Xin, Ma Jiao
(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: The active ingredients were extracted from several Chinese tradional medicine by water (for mulberry leaves, yinchenhao, portulaca oleracea) or alcohol (for wild chrysanthemum) and their effects on reproduction of avian influenza virus (AIV), Newcastle disease virus (NDV) and avian infectious bronchitis virus (IBV) in chicken embryo were observed evaluated. The results showed that extracts from these Chinese tradional medicines possess certain blocking and inhibitory effect on these viruses reproduction within the range of safe concentration, especially the extract from Yinchenhao on AIV and NDV.

Key words: Mulberry leaves, Yinchenhao, purslane, wild chrysanthemum, avian influenza virus, Newcastle disease virus

0 引言

畜禽病毒性疾病是由病毒引起的、严重危害畜牧业生产的一类传染病,它不仅造成大批畜禽死亡和畜产品质量下降。影响经济收入和对外贸易,而且某些人畜共患病还威胁人类健康^[1]。

禽流行性感(Avian influenza),简称禽流感,由禽流行性感病毒引起的一种呼吸系统、全身性败血症等多种病症的禽类烈性传染病。该病1878年首先发现与意大利,以后欧洲、美洲、非洲、亚洲的许多国家相继发生,1994年中国广东省某些鸡场发生一种以产蛋下降、呼吸困难等为主要特征的传染病,确定了该病在中国的存在。禽流感的爆发和流行给中国养禽业造成很大损失^[2]。

鸡新城疫(Newcastle disease)是由鸡新城疫病毒引起的一种急性发热性、高度接触性传染病,常呈败血性经过。出现以呼吸困难、下痢、神经机能紊乱、粘膜和浆膜出血等症状和病变^[2]。此病毒广泛分布于世界上许多国家,是危害养鸡业的主要疾病之一。

鸡传染性支气管炎(Avian infectious bronchitis)是由鸡传染性支气管炎病毒一起的鸡的急性、高度接触性呼吸道疾病,其特征为病鸡咳嗽、喷嚏,发出啰音;幼鸡流鼻涕,蛋鸡产蛋数量和质量下降;肾形病鸡肾肿大、苍白,有大量尿酸盐沉积等^[3]。该病首先在1931年报道于美国,中国1972首次在广东发现该病,近年来流行较广。

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶。生用

基金项目:国家农业科技成果转化项目(项目编号:2007D00020578)新型兽用抗微生物药物及免疫促生长剂的中试与示范。

第一作者简介:王学兵,男,1974年出生,河南农业大学副教授,从事中兽药抗微生物及免疫调节作用研究, Tel: 0371-63558519, Email: xbwang74@163.com。

通讯作者:崔保安,男,1948年出生,河南农业大学教授,博士生导师,预防兽医学科学学术带头人,主要从事兽医病原分子生物学和免疫学研究。

收稿日期:2009-04-17, **修回日期:**2009-05-05。

或秘制用。性寒味苦、甘,有疏风散热,清肝明目的功效。主要成分含黄酮甙、酚类、氨基酸、有机酸等^[4]。

茵陈蒿为菊科植物茵陈蒿 *Artemisia capillaries* Thunb.或滨蒿 *Artemisia scoparia* Waldst.et Kit.的干燥幼嫩茎叶。晒干生用。性微寒,味苦。清湿热,利黄疸。主要成分含有挥发油,主要为茵陈炔、茵陈酮及叶酸。乙醇提取物对流感病毒有抑制作用^[5]。

马齿苋为马齿苋科植物马齿苋的幼嫩茎叶。性寒,味甘酸。清热解毒,利水去湿,散血消肿,除尘杀菌,消炎止痛,止血凉血。马齿苋成分十分复杂,它含有大量的脂肪酸(主要是W-3脂肪酸、SL3脂肪酸等不饱和脂肪酸)、去甲肾上腺素、二羟基苯乙胺、钾元素、VE、VC、 β -胡萝卜素、谷胱甘肽、生物类黄酮等多种对人体有营养保健和医疗作用的物质^[6]。

野菊花为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat.的干燥头状花序。烘干或蒸后晒干入药。性微寒,味甘、苦。功效有疏风散热,清肝明目,解毒。主要成分含菊甙、腺嘌呤、氨基酸、胆碱、水苏碱、黄酮类等。全草含挥发油。有抗菌、消炎、解热和降血压的作用。对葡萄球菌、链球菌、痢疾杆菌、绿脓杆菌、流感病毒等,均有抑制作用^[7]。

传统中医认为,由细菌和病毒等微生物引起的传染病在中国传统中医中称之为“瘟疫”或者“疫病”,认为它是由一种天地间不正之气“疠气”侵犯机体而造成的,又叫“疫疔”^[8]。在中医的病因病理学说中,疫疔和六淫(风、寒、暑、湿、燥、火)同属于外感致病因素,多从体表、口、鼻、肺经等侵袭机体,初期表现为肺卫证候。由于疫疔之气多属于湿热外邪,并且力量亢盛、传播迅速、病情发展快,往往造成多个脏腑受病,出现高热、脉洪、出血等里热症状,按照卫气营血辨证法,证候多属于气分、营分和血分证。遵循中医辨证论治的观点,对于疫疔造成的疫病,多选用清热泻火、清热燥湿、清热解毒、清热凉血等治疗原则,对于热毒造成的气亏血虚、阴虚,还要选用补气血、滋阴生津的药材辅助治疗,这就给中药治疗病毒性疾病提供了中医基础理论。

现代中药化学研究表明,中草药具有多种有效成分,主要分为生物碱、苷类、糖类、有机酸、挥发油、黄酮、鞣质、树脂、油脂、色素、糖肽、氨基酸等^[9]。目前,已发现多种中草药有效成分与抗病毒和机体的免疫功能有关,主要为多糖类、黄酮类、皂甙类、挥发油、有机酸类和生物碱类等。这些中药成分具有抗病毒疗效或免疫增强效果。中医药抗病毒和免疫增强功能,已经成为现代医学的重要分支。具有抗病毒作用或能够提

高机体免疫功能的中草药在治疗人与动物的病毒病、肿瘤病、免疫抑制性传染病、寄生虫病方面有很好的研究价值和开发前景,这就给中药提供了广阔的发展空间。

近年来,抗病毒西药长期应用易产生耐药性,降低疗效,病情复发,成为临床治疗及新药开发的重要问题^[10]。中国中草药资源丰富、有害残留少、毒副作用小以及病原菌不易产生耐药性的优点而在疫病防治中备受关注^[11]。作者选用和制作桑叶、茵陈蒿、马齿苋、野菊花的提取物,在鸡胚水平上进行了抗禽流感病毒、新城疫病毒和鸡传染性支气管炎病毒作用研究,为临床用药提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 地点、时间

河南省动物性食品安全重点实验室,2008年7月20日至2008年9月

1.2 实验材料

1.2.1 桑叶全成分提取 桑叶购于河南省药材公司,产自安徽。按照常规水煎法进行提取,取桑叶100 g,以1:15的比例加水1500 ml,用电热炉煎煮,煮沸2 h。三层纱布趁热过滤后,所得提取液高压灭菌,4℃冰箱保存备用。

1.2.2 茵陈蒿全成分提取 茵陈蒿购于河南省药材公司,产自东北。按照常规水煎法进行提取,取茵陈蒿100 g,以1:15的比例加水1500 ml,用电热炉煎煮,煮沸2h。三层纱布趁热过滤后,所得提取液高压灭菌,4℃冰箱保存备用。

1.2.3 马齿苋全成分提取 新鲜马齿苋采自郑州,按照常规水煎法进行提取。新鲜马齿苋750g,取1/3烘干(新鲜马齿苋湿重250 g,烘干后干重15.3 g,含水量6.12%);2/3水煎,晾干后湿重472.3 g,加水710 ml,用电热炉煎煮,煮沸2 h。三层纱布趁热过滤后,所得提取液高压灭菌,4℃冰箱保存备用。

1.2.4 野菊花有效成分提取 野菊花购于河南省药材公司,产自河南。按照常规醇沉法进行提取,取野菊花100 g,以1:5的比例加入50%乙醇溶液常温下浸泡24 h后,60℃恒温热浸3 h。取上清再经三层纱布过滤后,所得野菊花浸出液高压灭菌,4℃冰箱保存备用。

1.2.5 毒株、鸡胚 AIV H₁N₂、NDV Lasota、IBV HN0501 标准毒株:购自中国兽药监察所,由河南省动物性食品安全重点实验室保存。鸡胚:SPF鸡胚,购自北京梅利亚公司。

1.2.6 试剂 50%乙醇、生理盐水、PBS液等。

1.2.7 仪器 恒温箱、高压灭菌锅、离心机、无菌操作台、水浴锅。

1.3 方法

1.3.1 AIV 标准毒株 EID₅₀ 的测定 将 AIV 标准毒株按照 10 倍比连续稀释成 8 个稀释度, 取 10⁵ 至 10⁸ 稀释度的稀释液接种于 10 日龄鸡胚, 每个稀释度接种 4 枚鸡胚, 每枚鸡胚接种 0.1 ml, 另设 4 枚鸡胚为空白对照。将鸡胚置于 37.5 °C 恒温箱中孵化, 经 10 h 间隔照蛋, 弃去死亡鸡胚。连续观察三天, 每天观察鸡胚发育情况, 记录死胚情况。

1.3.2 NDV 标准毒株 EID₅₀ 的测定 将 NDV 标准毒株按照 10 倍比连续稀释成 9 个稀释度, 取 10⁶ 至 10⁹ 稀释度的稀释液接种于 10 日龄鸡胚, 每个稀释度接种 4 枚鸡胚, 每枚鸡胚接种 0.1 ml, 另设 4 枚鸡胚为空白对照。将鸡胚置于 37.5 °C 恒温箱中孵化, 经 10 h 间隔照蛋, 弃去死亡鸡胚。连续观察三天, 每天观察鸡胚发育情况, 记录死胚情况。

1.3.3 IBV 标准毒株 EID₅₀ 的测定 将 IBV 标准毒株按照 10 倍比连续稀释成 8 个稀释度, 取 10⁵ 至 10⁸ 稀释度的稀释液接种于 10 日龄鸡胚, 每个稀释度接种 4 枚鸡胚, 每枚鸡胚接种 0.1 ml, 另设 4 枚鸡胚为空白对照。将鸡胚置于 37.5 °C 恒温箱中孵化, 经 10 h 间隔照蛋, 弃去死亡鸡胚。连续观察三天, 每天观察鸡胚发育情况, 记录死胚情况。

1.3.4 中药提取液安全浓度的测定 将 4 种中药液用生理盐水分别做 100 倍稀释后再做连续 2 倍比稀释, 取连续 5 个稀释度的稀释液接种 10 日龄鸡胚, 每个稀释度接种 2 枚鸡胚, 每枚鸡胚接种 0.2 ml, 另设 2 枚鸡胚为空白对照。将鸡胚置于 37.5 °C 恒温箱中孵化, 经 10 h 间隔照蛋, 弃去死亡鸡胚。连续观察三天, 每天观察鸡胚发育情况, 记录死胚情况。最后根据存活鸡胚数判定中药对鸡胚的毒性。找到无毒性最大浓度, 该浓度即为对鸡胚的最大安全浓度。

1.3.5 中药提取液在鸡胚水平上对病毒毒力阻断作用的测定 先将最大安全浓度的中药液接种于 10 日龄鸡胚, 将鸡胚置于 37.5 °C 恒温箱中保温, 4 h 后取出, 再将含有 100×EID₅₀ 的病毒液按 0.1 ml/枚接种于鸡胚。每种方法接种 3 枚鸡胚。另设 3 枚鸡胚做空白对照。将鸡胚置于 37.5 °C 恒温箱中孵化, 经 10 h 间隔照蛋, 弃去死亡鸡胚。连续观察三天, 每天观察鸡胚发育情况, 记录死胚情况。

1.3.6 中药提取液在鸡胚水平上对病毒毒力抑制作用的测定 先将含有 100×EID₅₀ 的病毒液接种于 10 日龄鸡胚, 将鸡胚置于 37.5 °C 恒温箱中保温, 4 h 后取出, 再将最大安全浓度的中药液按 0.1 ml/枚接种于鸡胚。每种方法接种 3 枚鸡胚。另设 3 枚鸡胚做空白对照。将鸡胚置于 37.5 °C 恒温箱中孵化, 经 10 h 间隔照蛋, 弃去

死亡鸡胚。连续观察三天, 每天观察鸡胚发育情况, 记录死胚情况。

2 结果

2.1 中药提取液药物浓度

将四种中药煎煮、提取、过滤、灭菌后, 还原成原药, 每毫升药液有效药物浓度分别为桑叶全成分提取液浓度为 384.6154 mg/ml, 茵陈蒿全成分提取液浓度为 294.1177 mg/ml, 马齿苋全成分提取液浓度为 82.585 mg/ml, 野菊花有效成分提取液浓度为 500.000 mg/ml。

2.2 EID₅₀ 的测定结果

结果见表 1、表 2 和表 3。

AIV 病毒的 EID₅₀ 为 0.1ml 10⁴ 倍稀释的病毒液。鸡胚整体发育情况不良。空白对照组全部存活。

表 1 鸡胚接种 AIV 72 h 后死胚记录

病毒稀释倍数	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
死胚数量(枚)	1	0	0	1

表 2 鸡胚接种 NDV 72 h 后死胚记录

病毒稀释倍数	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
死胚数量(枚)	1	0	0	0

表 3 鸡胚接种 IBV 72 h 后死胚记录

病毒稀释倍数	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
死胚数量(枚)	2	2	1	2	1	1

NDV 病毒的 EID₅₀ 为 0.1 ml 10⁵ 倍稀释的病毒液, 鸡胚整体发育正常。

IBV 病毒的 EID₅₀ 为 0.1ml 10^{4.8} 倍稀释的病毒液, 鸡胚整体发育不良, 胚体小, 畸形。空白对照组全部存活。

2.3 中药提取液安全浓度的测定结果

实验结果见表 4。

由表 4 可知:

(1) 桑叶全成分提取液在 100×2⁴ 倍稀释度时对鸡胚发育无影响。在 100×2¹ 至 100×2³ 倍稀释度时对鸡胚发育有致畸作用。桑叶全成分提取液最大安全浓度为 240.3846 μg/ml。

(2) 茵陈蒿全成分提取液在 100×2¹ 倍稀释度时对鸡胚发育影响不明显, 毒性不大。茵陈蒿全成分提取液最大安全浓度为 1470.5883 μg/ml。

(3) 马齿苋全成分提取液在 100×2² 倍稀释度时对鸡胚发育有影响, 与对照胚比较, 胚体发白, 个别头部有出血, 胚体发育小。马齿苋全成分提取液最大安全浓度为 206.4625 μg/ml。

表4 中药提取液安全浓度测定的试验结果

死胚数量(枚)	中药提取液稀释度				
	100×2 ¹	100×2 ²	00×2 ³	100×2 ⁴	100×2 ⁵
桑叶	1	1	0	0	0
茵陈蒿	0	1	0	0	0
马齿苋	1	0	0	1	0
野菊花	0	0	0	0	0

(4)野菊花有效成分提取液在100×2¹倍稀释度时对鸡胚发育影响小,毒性不明显。个别胚体头部有出血。野菊花有效成分提取液最大安全浓度为2500.00 μg/ml。

2.4 中药提取液对病毒毒力的阻断作用的测定结果
实验结果见表5。

由表5可知,马齿苋对AIV的阻断效果不显著,其

它中药对病毒的阻断效果均较好。

2.5 中药提取液对病毒毒力抑制作用的测定结果
实验结果见表6。

由表6可知,各中药对NDV的抑制效果较好,茵陈蒿全成分提取液对AIV和NDV的抑制作用较为突出。

表5 中药提取液对病毒毒力的阻断作用的测定结果

死胚数量(枚)	病毒		
	AIV	NDV	IBV
桑叶	1	0	0
茵陈蒿	0	0	1
马齿苋	3	0	0
野菊花	0	0	0

表6 中药提取液对病毒毒力抑制作用的测定结果

死胚数量(枚)	病毒		
	AIV	NDV	IBV
桑叶	2	0	2
茵陈蒿	0	0	1
马齿苋	1	0	1
野菊花	3	0	3

3 分析与讨论

(1)此试验测得桑叶对鸡胚的最大安全浓度为240.3846 μg/mL,茵陈蒿对鸡胚的最大安全浓度为1470.5883 μg/mL,马齿苋对鸡胚的最大安全浓度为206.4625 μg/mL,野菊花对鸡胚的最大安全浓度为2500.00 μg/mL,即在小于最大安全浓度下测定各中药的抗病毒作用才有效,否则视为药物的毒性作用。

(2)从试验可以看出:(1)先接种中药再接种AIV,只有茵陈蒿和野菊花没有死亡鸡胚出现,其他均有不同程度的死亡,说明茵陈蒿和野菊花对AIV的阻断效果较好,而先接种AIV再接种中药时,只有茵陈蒿没有死亡鸡胚出现,综上所述说明茵陈蒿对病毒的阻断效果和抑制效果均较好,因此对AIV作用效果最佳的是茵陈蒿。(2)先接种中药再接种IBV时,桑叶、马齿苋和野菊花均没有死亡鸡胚出现,说明三者对IBV的抑制

效果均较好。先接种IBV再接种中药时,茵陈蒿和马齿苋有一枚鸡胚死亡,其他均死亡两枚以上,说明二者对IBV的阻断效果较好,综上,只有马齿苋对IBV阻断效果和抑制效果均较好,因此对IBV作用效果最佳的是马齿苋。(3)先接种中药再接种NDV和先接种NDV再接种中药时,均没有死亡鸡胚出现,说明各中药对NDV阻断效果和抑制效果均较好,各中药在安全浓度范围内对NDV作用效果都较好。

(3)在中药液对病毒毒力的阻断作用与中药液对病毒毒力抑制作用的试验中,马齿苋的试验结果与预期不一致,可能由于鸡胚是弱胚,或者病毒毒力强,药液浓度小,也可能是操作失误,但不排除这个试验结果是正确的,因此其结果有待于进一步探明。

(4)此试验共设计两种加药方式,即第1组采用最大安全浓度的中药与鸡胚互作4h后接种病毒、第2组

采用病毒侵染鸡胚4 h后添加最大安全浓度的中药。两组间相比较,第1组中药样品对病毒的阻断效果作用更为明显。其作用机理可能为:第1组,中药与鸡胚作用后,中药样品提高了鸡胚的免疫力,有效阻止了病毒的吸附和侵入;第2组病毒侵染鸡胚后添加中药,中药样品对鸡胚内的病毒起一定的抑制作用,抑制了病毒的生物合成及成熟释放^[10]。其具体作用机理有待于进一步探明。

参考文献

- [1] 周岷江.中草药防治畜禽病毒性疾病研究概况及展望[J].中兽医学杂志,2001,(4):23-25.
- [2] 崔保安.动物微生物学[M].中国农业出版社,第三版,243-248.
- [3] 韩梅,李思源,王雪岩,等.鸡传染性支气肺炎的防治进展[J].畜牧兽医科技信息,2008,10:84.
- [4] 邱进,王晓静,王元书,等.桑叶化学成分的研究[J].中成药,2008,30,(9):10001-10002.
- [5] 褚明艳,胡一桥.茵陈蒿的化学及药理学研究进展[J].中草药,1998,29,(8):564-566.
- [6] 丁怀伟,姚佳琪,宋少江.马齿苋的化学成分和药理活性研究进展[J].沈阳药科大学学报,2008,25,(10):831-838.
- [7] 裴姗姗,毕跃峰,田野,等.野菊花的研究进展[J].河南中医学报,2007,22,(6):83-85.
- [8] 刘钟杰,许剑琴.中兽医学[M].中国农业出版社,2005,01:48-49.
- [9] 雷载权,陈松育,高学敏.中药学[M].上海科学技术出版社,2003,09:276-277.
- [10] 王玮,高永翔.中药抗病毒研究进展[J].现代中西医结合杂志,2008,(17):2753-2754.
- [11] 干振华综述,李金恒审校.中药抗病毒药理作用的研究进展[J].医学研究生学报,2007(12):1290-1293.