

黄芪和板蓝根对猪细小病毒的体外抑制作用

钟 华^{1,2}, 赵宝玉¹, 范国英², 刘俊伟², 陈俊杰²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003)

【摘 要】 【目的】探讨黄芪和板蓝根对猪细小病毒(PPV)的体外抑制作用。【方法】选用中草药黄芪、板蓝根作为抗病毒药物,利用细胞病变(CPE)抑制试验,测定黄芪与板蓝根单独使用及等体积合用,在 PK-15 单层细胞上对猪细小病毒的抑制作用。【结果】板蓝根单独使用时,体外试验对 PPV 有明显的抑制作用,对 PPV 的最小直接杀灭质量浓度为 0.63 mg/mL,最小阻断质量浓度为 0.31 mg/mL;黄芪单独使用时对 PPV 无明显的抑制作用;板蓝根与黄芪等体积合用时,对 PPV 的抑制作用显著增强,最小直接杀灭质量浓度提高为 0.31 mg/mL,最小阻断质量浓度提高为 0.038 mg/mL。【结论】黄芪与板蓝根联合使用抗病毒能力增强,且毒性较弱。

【关键词】 黄芪;板蓝根;猪细小病毒(PPV)

【中图分类号】 S853.74

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)10-0048-05

Study on inhibitive effect of Radix Astragali and Radix Isatidis *in vitro* on porcine parvovirus

ZHONG Hua^{1,2}, ZHAO Bao-yu¹, FAN Guo-ying², LIU Jun-wei², CHEN Jun-jie²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to investigate inhibitive effect on porcine parvovirus by Radix Astragali and Radix Isatidis *in vitro*. 【Method】 Chinese herbs Radix Astragali and Radix Isatidis were adopted as antiviral drugs by utilizing the cytophthic effect(CPE) inhibitive experiment to measure the inhibitive effect on porcine parvovirus(PPV) by pig kidney(PK)-15 cell monolayer, when Radix Astragali and Radix Isatidis were used alone and association by equal volume. 【Result】 Radix Isatidis has obviously inhibitive effect on experiment *in vitro* by individual using, the minimum concentration of direct kill was 0.63 mg/mL, the minimum concentration of blocking was 0.31 mg/mL; the Radix Astragali has not obviously inhibitive effect in experiment *in vitro* used alone. When Radix Astragali and Radix Isatidis were associated by one to one, the inhibitive effect on PPV has been enhanced obviously; the minimum concentration of direct killing was 0.31 mg/mL; and the minimum concentration of blocking was 0.038 mg/mL. 【Conclusion】 The anti-virus capability were enhanced when Radix Astragali and Radix Isatidis were used in combination, at the same time toxicity were weakened.

Key words: Radix Astragali; Radix Isatidis; porcine parvovirus(PPV)

猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV)是引起 母猪繁殖障碍的主要病原体之一,1967年在英国首

* [收稿日期] 2008-04-08

[基金项目] 河南省科技攻关项目(322011000)

[作者简介] 钟 华(1972—),男,河南新蔡人,讲师,主要从事中兽药的研制与开发。E-mail: zhonghua20043@163.com

[通讯作者] 赵宝玉(1964—),男,陕西宝鸡人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事动物中毒性疾病与营养代谢性疾病研究。
E-mail: zhaobaoyu12005@163.com

次报道,其后欧、美、亚洲及大洋洲的很多国家均有报道。PPV 临床表现为初产母猪不孕、流产、产木乃伊胎和早产,母猪本身并不表现临床症状,其他猪感染后也无明显的临床症状^[1]。PPV 在猪原代细胞如猪肾、猪睾丸细胞及传代细胞 PK-15 细胞、S7、IBRS₂ 等细胞上均能生长繁殖,并出现细胞病变(CPE)^[2]。

近年研究证实,许多中草药具有增强免疫力、抑制和杀灭病原微生物的作用^[3-4]。由于中草药具有毒副作用小、残留量低、安全高效等特点,因此一直是新药研发的热点。黄芪(Radix Astragali)为豆科植物膜荚黄芪或内蒙黄芪的根,具有促进机体体液免疫和细胞免疫的功能,可抑制和杀灭微生物。黄芪多糖能促进机体产生抗病毒干扰素,抑制病毒蛋白的合成,从而使机体产生抗病毒感染的作用^[5-8]。板蓝根(Radix Isatidis)为十字花科植物菘蓝的根,具有清热解毒、凉血止血的作用,含芥子苷、吲哚苷、腺苷等。板蓝根作为清热解毒药,可直接作用于免疫系统的免疫器官、免疫细胞及其分泌后的抗体、细胞因子或作用于中枢神经系统,对免疫系统进行调节,通过提高机体免疫功能激发机体自身的抗菌、抗病毒、抗氧化作用^[9-10]。为进一步验证黄芪和板蓝根对微生物在动物体外的杀灭和抑制作用,本试验以黄芪和板蓝根为试验药物,以 PPV 为受试病毒,观察了两种中药提取物对病毒的体外抑制效果。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验药物 黄芪注射液,由成都地奥九泓制药厂生产,批准文号国药准字 Z51021776,规格 6×10 mL,10 mL 相当于原药材 20 g;板蓝根水煎剂,取原药板蓝根,去渣,煎煮 3 次,第 1 次加水 1 000 mL 煎煮 1 h,第 2 次加水 1 000 mL 煎煮 50 min,第 3 次加水 800 mL 煎煮 50 min,加热煮沸后改文火煎煮,开始记时。合并 3 次滤液并浓缩至 0.4 g/mL,

4 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用细菌滤器(孔径 0.22 μm)过滤即得板蓝根水煎剂。使用时用 70 g/L 的 NaHCO₃ 溶液调 pH 值至 7.0,分装于青霉素瓶中,灭菌备用。

1.1.2 试剂与仪器 PK-15 细胞,由河南农业大学牛业研究所提供;PPV,购于中国兽药监察所。新生牛血清,郑州伯安生物工程有限公司产品;1640 培养基,购于 GIBCO 公司;96 孔细胞培养板,购于 GREINER 公司;胰蛋白酶,批号 2653B44,AM-RESCO 公司产品;NaHCO₃,购于天津市科密欧化学试剂开发中心;EDTA,购于莱阳化工实验厂。3701 型 CO₂ 细胞培养箱,美国 Precision 公司生产;超净工作台,江苏安泰空气技术有限公司生产;Nikom Ts-100 倒置显微镜,日本尼康公司生产;水浴锅,江苏常熟医疗器械厂生产。PBS 液、双抗(青霉素和链霉素)和 1640 培养基,按文献^[11]方法制备。

1.2 方 法

1.2.1 PPV 毒力的测定 将长满单层的 PK-15 细胞消化后,制成细胞悬液,用细胞悬液对 PPV 在灭菌的青霉素瓶内进行 10 倍稀释,依次稀释 11 个稀释度。分别取不同稀释度的悬液加入 96 孔培养板,每孔 100 μL,培养 96 h 后于显微镜下观察。根据细胞病变情况,利用 Reed-Muench 公式计算细胞半数感染量(TCID₅₀)。

1.2.2 黄芪和板蓝根对 PK-15 无毒浓度的测定 试验在 96 孔板上进行,将浓度为 10⁵/mL 的 PK-15 加入无菌 96 孔板上,每孔 200 μL,待细胞生长至单层后,用 PBS 液冲洗细胞,加入含体积分数 5% 胎牛血清的 1640 培养液和倍比稀释成不同质量浓度(表 1)的受试药物悬液。在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养 96 h,每天观察细胞形态的变化及有无细胞病变,并设空白细胞对照,黄芪和板蓝根的每个稀释度各做 4 孔,并设 3 次重复。96 h 后测定黄芪、板蓝根对 PK-15 细胞的最大无毒质量浓度(mg/mL)。

表 1 黄芪和板蓝根的稀释质量浓度

Table 1 Dilute concentration of Radix Astragali and Radix Isatidis											mg/mL	
孔 号 Pore number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
黄芪质量浓度 Concentration of astragali	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0
板蓝根质量浓度 Concentration of isatidis	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.15	0.075	0.037 5	0.019	0.009 5	0.004 8	0

1.2.3 黄芪和板蓝根单用时对 PPV 直接杀灭作用的测定 试验在 96 孔细胞培养板上进行,先用维持液将 PPV 作 100 倍的 TCID₅₀ 稀释度,再用 1 000 倍

TCID₅₀ 稀释度的 PPV,将无毒质量浓度的黄芪、板蓝根倍比稀释,每孔 200 μL,每个稀释度做 4 孔,黄芪、板蓝根在同一块 96 孔培养板上进行,1~4 排为

黄芪,5~8 排为板蓝根。将倍比稀释后的药物与 PPV 混悬液混匀密封后于体积分数 5% CO₂ 培养箱培养 1 h,然后加到另一块各孔长成单层 PK-15 细胞的 96 孔培养板孔中,每孔加 100 μL,并设细胞对照(C)、病毒对照(V)。继续培养 96 h 后,记录细胞病变结果,出现 75% 以上细胞病变记为 + + +,50%~75% 记为 + +,25%~50% 记为 +,0~25% 为无病变,记为 —^[12]。

1.2.4 黄芪和板蓝根单用时对 PPV 阻断作用的测定 试验在 96 孔板上进行,先将无毒质量浓度的黄芪、板蓝根药液分别用维持液作倍比稀释后加入长成单层 PK-15 的细胞培养板,每孔 100 μL,放入体积分数 5% CO₂ 培养箱培养 2 h,然后加入 1 000 倍的 TCID₅₀ 稀释度的 PPV,每孔 100 μL,并设细胞对照和病毒对照。96 h 后记录细胞病变,记录方法同 1.2.3。

表 2 PPV 在 PK-15 细胞上的 TCID₅₀
Table 2 Measure of TCID₅₀ of PPV to PK-15 cells

PPV 浓度 Concentration of PPV	观察结果 Results of observing			累计结果 Results of acculation		
	CPE 数 The number of CPE	无 CPE 数 The number of no CPE	CPE/%	CPE 数 The number of CPE	无 CPE 数 The number of no CPE	CPE/%
10 ⁻⁶	7	1	87.5	31	1	97
10 ⁻⁷	6	2	75	24	3	90
10 ⁻⁸	6	2	75	18	5	78
10 ⁻⁹	5	3	62.5	12	8	60
10 ⁻¹⁰	4	4	50	7	12	36.8
10 ⁻¹¹	3	5	37.5	3	17	15

2.3 黄芪和板蓝根单用时对 PPV 的直接杀灭作用 由表 3 可知,黄芪在 25~0.05 mg/mL 质量浓度时,体外对 PPV 的直接杀灭作用不明显。由表 4

1.2.5 黄芪与板蓝根等体积合用对 PPV 直接杀灭作用的测定 试验方法和记录方法同 1.2.3。
1.2.6 黄芪与板蓝根等体积合用对 PPV 阻断作用的测定 试验方法和记录方法同 1.2.4。

2 结果与分析

2.1 PPV 在 PK-15 细胞上的毒力测定结果
PPV 在 PK-15 细胞上的 TCID₅₀ 测定结果见表 2。将表 1 中的数据代入 Reed-muench 公式,可求得 96 h 后 PPV 病毒液的 TCID₅₀,即每 1 mL 病毒液的病毒含量为 10⁻¹⁰。
2.2 黄芪和板蓝根对 PK-15 的细胞无毒质量浓度
试验结果显示,黄芪对 PK-15 细胞的最大无毒质量浓度为 25 mg/mL,板蓝根对 PK-15 的最大无毒质量浓度为 1.25 mg/mL。

可知,板蓝根与 PPV 作用后,PPV 对 PK-15 细胞的致 CPE 作用明显减弱,板蓝根体外直接杀灭 PPV 的最小质量浓度为 0.63 mg/mL。

表 3 与黄芪作用后的 PPV 对 PK-15 细胞 CPE 的影响
Table 3 Effect of Radix Astragali to CPE of PK-15 cells on PPV

排号 Rank number	药物质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration of drugs										V	C
	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	0.05		
1	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
2	++	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
3	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
4	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—

表 4 与板蓝根作用后的 PPV 对 PK-15 细胞 CPE 的影响
Table 4 Effect of Radix Isatidis to CPE of PK-15 cells on PPV

排号 Rank number	药物质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration of drugs										V	C
	1.25	0.63	0.31	0.15	0.075	0.037 5	0.019	0.009 5	0.004 8	0.002 4		
5	—	—	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
6	—	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
7	—	—	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
8	—	—	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	—

2.4 黄芪和板蓝根单用时对 PPV 的阻断作用 由表 5 可知,黄芪与 PK-15 细胞作用后对 PPV

引起的 CPE 有阻断作用,但作用不明显。由表 6 可知,板蓝根对 PPV 的体外最小阻断质量浓度为 0.31

mg/mL。

表 5 黄芪与 PK-15 细胞作用后对 PPV 引起的 CPE 阻断作用
Table 5 Blocking effect of PK-15 by Radix Astragali to CPE on PPV

排号 Rank number	药物质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration of drugs										V	C
	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.1	0.05		
1	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
2	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
3	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
4	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—

表 6 板蓝根与 PK-15 细胞作用后对 PPV 引起的 CPE 阻断作用
Table 6 Blocking effect of PK-15 by Radix Isatidis to CPE of PPV

排号 Rank number	药物质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration of drugs										V	C
	1.25	0.63	0.31	0.15	0.075	0.0375	0.019	0.095	0.004 8	0.002 4		
5	—	—	—	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	—
6	—	—	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	—
7	—	—	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	—
8	—	—	—	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	—

2.5 黄芪与板蓝根等体积合用对 PPV 的体外直接
杀灭作用

PPV 的体外直接杀灭质量浓度为 0.31 mg/mL。当
质量浓度在 0.075~0.15 mg/mL 时,少数孔 CPE
由表 7 可知,黄芪与板蓝根等体积合用时,对
被抑制,多数孔 CPE 减轻,CPE 比例降低 50%。

表 7 黄芪与板蓝根等体积合用对 PPV 的体外直接杀灭作用
Table 7 Effect of the associated Radix Astragali and Radix Isatidis
by equal volume of PPV direct killing in experiment *in vitro*

排号 Rank number	药物质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration of drugs										V	C
	1.25	0.63	0.31	0.15	0.075	0.038	0.019	0.009 5	0.004 8	0.002 4		
1	—	—	—	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	—
2	—	—	+	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	—
3	—	—	+	++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	—
4	—	—	—	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	—

2.6 黄芪与板蓝根等体积合用对 PPV 的体外阻断
作用

mg/mL 时,其对 PPV 致 CPE 的抑制作用降低;当
质量浓度为 0.009 5 和 0.004 8 mg/mL 时,细胞接
种 PPV 96 h 后有 50% 出现病变。试验结果显示,
黄芪与板蓝根合用,药效增强,抗 CPE 作用明显。

表 8 黄芪与板蓝根等体积合用对 PPV 的体外阻断作用
Table 8 Blocking effect of the associated Radix Astragali and Radix Isatidis
by one to one on PPV in experiment *in vitro*

排号 Rank number	药物质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration of drugs										V	C
	1.25	0.63	0.31	0.15	0.075	0.038	0.019	0.009 5	0.004 8	0.002 4		
1	—	—	—	—	—	—	+	+	++	++	+++	—
2	—	—	—	—	—	—	+	++	++	++	+++	—
3	—	—	—	—	—	+	+	++	++	+++	+++	—
4	—	—	—	—	—	—	+	++	++	++	+++	—

3 讨 论

3.1 黄芪和板蓝根对 PK-15 细胞的无毒质量浓度
本试验结果表明,黄芪对 PK-15 的最大无毒质量
浓度为 25 mg/mL,板蓝根对 PK-15 细胞的最大
无毒质量浓度为 1.25 mg/mL,为进一步测定其抑

制和阻断作用提供了依据。王志洁^[13]测得黄芪对
Hep-2 细胞的最大无毒质量浓度为 82.43 mg/mL,
高于本试验结果,这与不同病毒的耐受性有关。刘
家国等^[14]测得板蓝根在鸡胚成纤维细胞上(CPF)
的无毒质量浓度为 0.78 mg/mL,稍低于本试验结
果,这是由于 PK-15 细胞比 CPF 细胞的耐受性稍

强。总之,黄芪对细胞的无毒质量浓度明显大于板蓝根。

3.2 黄芪单用对 PPV 的抑制和阻断作用

本试验结果表明,黄芪对 PPV 无直接杀灭作用,阻断作用也不太明显,在 PK-15 细胞上不能抑制 CPE 形成,这与张素梅等^[15]报道的关于黄芪对伪狂犬病病毒无抑制作用的结果相一致。据高海等^[16]有关中草药免疫作用的研究进展可知,黄芪多糖(APS)具有较强的免疫促进作用,可增加病毒诱生干扰素的能力。由本试验结果分析可知,黄芪本身对病毒没有很好的抑杀作用,其主要功能体现在能够增强机体的免疫力,通过激发机体自身的抵抗力而达到抗病毒的作用,并且黄芪还可以协同其他抗病毒药物一起来提高对病毒的抑杀效果。

3.3 板蓝根单用对 PPV 的抑制和阻断作用

本试验结果表明,板蓝根在体外单用对 PPV 有明显的抑制作用,且阻断作用优于直接杀灭作用,阻断质量浓度降至 0.63 mg/mL 时,仍能抑制部分 PK-15 细胞的 CPE 形成,这与张素梅等^[15]的试验结果基本一致,体现了板蓝根的清熱解毒、抗病原微生物及抗病毒的作用,这为板蓝根在兽医上对病毒的预防和治疗提供了理论依据。

3.4 黄芪与板蓝根合用对 PPV 的体外抑制作用和阻断作用

本试验结果表明,黄芪与板蓝根在体外合用,对 PPV 的直接杀灭作用和阻断作用均增强,质量浓度达到 0.075 mg/mL 时,抑制 CPE 作用明显优于板蓝根单独用药,这说明黄芪与板蓝根联合使用后抗病毒能力增强,且毒性较弱,二者有协同作用,这与王学林等^[17]的报道基本一致。

[参考文献]

[1] 金喜新,刘占通,崔保安.猪细小病毒 VP₂ 基因及其编码蛋白研究进展 [J].上海畜牧兽医通讯,2004(1):4-5.
Jin X X,Liu Z T,Cui B A. Progress in research of VP₂ gene and coding protein of Porcine parvovirus [J]. Shanghai Livestock and Veterinary Communication,2004(1):4-5. (in Chinese)

[2] 李冒文,仇华吉,童光志,等.猪细小病毒研究进展 [J].动物医学进展,2004,25(1):36-38.
Li M W,Qiu H J,Tong G Z,et al. Progress in research of Porcine parvovirus [J]. Progress in Veterinary Medicine,2004,25(1):36-38. (in Chinese)

[3] Levy D E,Garcia-Sartre A. The virus battles;IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion [J]. Cytokine Growth Factor Reviews,2001,12:143-156.

[4] Donnan S,Holland S M. Interferon-gamma and interleuk 12 path-way defects and human disease [J]. Cytokine Growth Factor Reviews,2000,11:321-323.

[5] 李丽娅,凌秋,崔洪波,等.黄芪多糖抗流感病毒的试验研究 [J].中国中医药科技,2002,9(6):354-355.
Li L Y,Ling Q,Cui H B,et al. The experiment research of anti-influenza virus of astragalus membranaceus polysaccharide [J]. China Chinese Medical Science Technology,2002,9(6):354-355. (in Chinese)

[6] 郭小清,唐莉苹,杜海.黄芪多糖的药理作用及其在畜禽保健中的应用 [J].中国动物保健,2004(3):45-47.
Guo X Q,Tang L P,Du H. The pharmacologic action of astragalus membranaceus polysaccharide and utilizing in livestock and poultry health [J]. China Annimal Health,2004(3):45-47. (in Chinese)

[7] 李宏全.黄芪多糖提高鸡抗氧化作用对免疫功能的影响 [J].山西农业大学学报,2002,22(1):78-81.
Li H Q. The effection of enhancement antioxidation of astragalus membranaceus polysaccharide to immune function [J]. Journal of Shanxi Agriculture College,2002,22(1):78-81. (in Chinese)

[8] 陈芳艳,梁永彬,王林川,等.黄芪多糖提取方法的研究 [J].广东畜牧兽医科技,2004,29(5):37-38.
Chen F Y,Liang Y B,Wang L C,et al. The reseach of extractive method of astragalus membranaceus polysaccharide [J]. Guangdong Livestock and Veterinary Science Technology,2004,29(5):37-38. (in Chinese)

[9] 史玉荣,张立华,谢广茹,等.甘草多糖的体内抑瘤及其机制的研究 [J].临床肿瘤学杂志,2003,8(2):85-87.
Shi Y R,Zhang L H,Xie G R,et al. The reseach of restrain mechanism to tumor of Glycyrrhiza uralensis polysaccharide *in vivo* [J]. Magazine Oncology Clinical,2003,8(2):85-87. (in Chinese)

[10] 许琳,王天益.清热药抗畜禽病毒感染的机理研究进展 [J].中国兽医杂志,2003,39(5):20-21.
Xu L,Wang T Y. Progress in research of mechanism of heat-clearing drugs anti-Avian viruses infection [J]. China Magazine Veterinary,2003,39(5):20-21. (in Chinese)

[11] 陆承平.兽医微生物学[M].北京:中国农业出版社,2001:120.
Lu C P. Veterinary microbiology [M]. Beijing:China Agriculture Publishing Company,2001:120. (in Chinese)

[12] 袁淑珍,刘玉梅,赵利平.用 96 孔微量板代替小八角瓶培养 BTC 测定山羊痘细胞弱毒 TCID₅₀ 的试验 [J].畜牧与饲料科学,2006,25(6):18-19.
Yuan S Z,Liu Y M,Zhao L P. The experiment of mensuration TCID₅₀ of goat ovine smallpox ambly viruses with ninth six pores microdosis instead of anise tree to cultivate BTC [J]. Science of Livestock and Forage,2006,25(6):18-19. (in Chinese)