

## 中药制剂 SHY 对新城疫、禽流感 H9、H5 亚型病毒的抑制和攻毒保护效果

何诚<sup>1</sup> 杨明<sup>2</sup> 杨建民<sup>1\*</sup> 刘泽源<sup>3</sup> 董华进<sup>2</sup> 杨利<sup>1</sup> 汪明<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 军事医学科学院 毒物与药理研究所, 北京 100850;  
3. 中国人民解放军 307 医院, 北京 100850)

**摘要** 本试验利用蔷薇科植物提取物(SHY)分别与新城疫、禽流感 H9、H5 亚型病毒作用后,接种 10 d SPF 鸡胚,评价 SHY 对病毒的抑制作用;给 21 d SPF 鸡连续口服该中药提取物 5 d 后,分别用新城疫、禽流感病毒攻击,观察对 SPF 鸡的保护作用。结果表明:SHY 测试剂量对 SPF 鸡胚没有毒性;20、10、5 和 2.5 mg/mL 提取物与一定量的新城疫、禽流感 H9 亚型病毒作用后,鸡胚全部存活,病毒测定为阴性;与禽流感 H5 亚型病毒作用后,2.5 mg/mL 组不能完全保护鸡胚存活(6/8),病毒分离阳性。在攻毒试验中,SPF 鸡分别按 60、50、40 和 20 mg 口服后,用新城疫和禽流感 H9 亚型攻毒保护分别为 5/5、5/5、5/5 和 4/5。显示 SHY 不但能显著抑制新城疫、禽流感 H9 和 H5 亚型在鸡胚上增殖,而且能保护新城疫、禽流感 H9 亚型病毒的攻击。对 SHY 深入的研究,有望开发出有效抗禽流感药物。

**关键词** 植物提取物(SHY);新城疫病毒;禽流感病毒;保护

中图分类号 S 858.287.34

文章编号 1007-4333(2005)06-0007-04

文献标识码 A

## Effect of herb extract SHY on the inhibition and protection of avian challenged with Newcastle disease virus and avian influenza virus (AIV-H9 and AIV-H5 subtype)

He Cheng<sup>1</sup>, Yang Ming<sup>2</sup>, Yang Jianmin<sup>1\*</sup>, Liu Zeyuan<sup>3</sup>, Dong Huajin<sup>2</sup>, Yang Li<sup>1</sup>, Wang Ming<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094;

2. Institute of Toxicology and Pharmacology, Military Medical Academy, Beijing 100850;

3. 307 Hospital of China People's Liberation Army, Beijing 100850)

**Abstract** In order to assess virus inhibition of the extract liquid originated from herb medicine, the extract liquid was mixed with Newcastle disease virus (ND), H9N2 subtype and H5 subtype of avian influenza virus (AIV) respectively before inoculation into chicken embryo on day 10. In the meantime, the extract liquid was applied continually to 21-day old specific pathogen free (SPF) chickens by oral drop. After five days of oral administration, the SPF avian challenged by ND virus and AIV-H9N2 virus respectively was monitored every day to determine the protection against above two pathogens. The results implied that the extract liquid had no toxin for chicken embryo; ND and AIV-H9N2 virus could not proliferated and proved to be negative in chicken embryo after treating with 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL and 2.5 mg/mL herb medicine respectively. Only 6/8 chicken embryos remained alive during the inoculating with AIV-H5 subtype virus and the specific virus could be isolated on urine sac of the chicken embryo after treating by 2.5 mg/mL herb medicine. In the challenging experiment against NDV and AIV-H9N2 virus, 5/5, 5/5, 5/5 and 4/5 SPF chickens could survive respectively. The above evidence implies that the extract herb medicine can inhibit the proliferation and prevents the challenge by above two virus. It is anticipated to develop the effective medicine for preventing avian influenza if the main substances in herb medicine will be identified in future.

**Key words** herb medicine (SHY); Newcastle disease virus; avian influenza virus; protection

收稿日期: 2006-12-08

基金项目: 天然中草药新制剂防治出口家禽疫病科技成果中试熟化项目(农计函 2004-111 号)和云南省省校省院科技合作计划项目(2003FCBFA00A004)

作者简介: 何诚, 副教授, 通讯作者, 主要从事家禽疫病防治研究, E-mail: hecheng@cau.edu.cn; \*: 杨建民为同等贡献作者。

新城疫和禽流感严重威胁我国养禽业的发展,已经造成了很大经济损失。近期报道的禽流感感染人致死,引起了社会的恐慌<sup>[1-2]</sup>。养殖户使用新城疫苗弱毒疫苗、灭活疫苗,禽流感灭活疫苗成功控制了新城疫、禽流感的暴发和大流行。目前我国养殖格局主要是以农村农民为主体,局部地区高密度养殖,造成生物安全环境极度恶化。同时养殖技术存在严重参差不齐,导致散发性、非典型新城疫和禽流感在今后很长一段时间内仍会流行,因此从其他途径研究和开发高效防治药物实为必要。

瑞士公司成功开发抗流感新药磷酸奥司他韦,商品名为“达菲”,再次证实了植物提取物及其衍生物可以有效控制病毒性疾病的流行<sup>[3]</sup>。使用植物提取物是否可以防治家禽新城疫和禽流感,一直成为目前养殖企业和制药企业研究的热点。本课题组利用蔷薇科植物提取物 SHY,通过病毒抑制试验、攻击保护试验来探讨本中药制剂的防治禽流感、新城疫的效果,同时为开发防治人禽流感新药奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物提取物 SHY

SHY 为蔷薇科植物经乙醇粗提取,再经氯仿萃取取得有效成分 SHY,配制成 100 mg/mL 水溶液, pH 3.0~3.5,呈微黄色,室温放置稳定。

### 1.2 毒株

新城疫病毒标准北京株强毒(F4)、购自中国兽药监察所,测定病毒对 SPF 鸡胚的半数致死量为  $10^{6.0}$  ELD<sub>50</sub>,对 21 d SPF 鸡半数致死量(LD<sub>50</sub>)为  $10^{4.0}$  LD<sub>50</sub>。禽流感 H9N2 亚型、禽流感 H5 亚型用前使用鸡胚复壮,测定病毒对 SPF 鸡胚半数致死量分别为  $10^{8.8}$  ELD<sub>50</sub>和  $10^{7.3}$  ELD<sub>50</sub>。禽流感 H9N2 亚型对 21 d SPF 鸡的半数感染量为  $10^{6.6}$  ID<sub>50</sub>。

### 1.3 鸡胚和鸡

10 d SPF 鸡胚、21 d SPF 公鸡购自北京梅里亚维通实验动物公司,实验动物许可证号为 SCYK(京)2005-0002;饲料购自北京市科澳协力饲料有限公司,许可证号为 SCYK(京)2005-0007。SPF 鸡饲养在不锈钢正压隔离器中,空气经过过滤除菌,饮水和饲料经过消毒处理后通过传递舱进入饲养室,所有试验均在生物安全三级实验室进行。

### 1.4 植物提取物 SHY 对 SPF 鸡胚最大无毒剂量的测定

将 SHY 用无菌生理盐水做 60、40、20、10、5、

2.5 和 1.25 mg/mL 稀释,然后经尿囊腔接种于生长良好的 10 d 鸡胚,每个稀释度分别接种 5 枚鸡胚,0.2 mL/胚,对照组鸡胚同法接种等剂量的生理盐水。弃去 24 h 内死亡的鸡胚,连续观察 6 d 观察,以不出现死亡和鸡胚体病变为该药对鸡胚的无毒浓度。

### 1.5 植物提取物 SHY 抑制鸡胚中新城疫病毒增殖试验

将提取物 SHY 按对鸡胚无毒剂量 20、10、5 和 2.5 mg/mL 分别与等量的  $10^4$  ELD<sub>50</sub> 的新城疫病毒液混合,在(25 ± 1) 条件下作用 15 min,分别接种 8 枚 10 d SPF 鸡胚的尿囊腔,37 °C 下孵化至 120 h,记录鸡胚死亡情况,弃去 24 h 内死亡鸡胚,收集尿囊液,测定鸡胚的尿囊液的血凝效价,并观察鸡胚体的病理学变化<sup>[4]</sup>。

### 1.6 植物提取物 SHY 抑制鸡胚中禽流感病毒增殖的试验

取 20、10、5 和 2.5 mg/mL SHY 分别与一定量的 H9N2 和 H5 亚型病毒液混合,作用条件同上,分别接种 10 d 的 SPF 鸡胚的尿囊腔,37 °C 孵化连续观察鸡胚存活状况,收集尿囊液,测定血凝效价<sup>[5]</sup>。试验结束后废弃物做高压灭菌处理。

### 1.7 植物提取物 SHY 对 SPF 鸡的新城疫病毒、禽流感 H9N2 病毒攻毒保护试验

分别以每日 60、50、40 和 20 mg/只经口给药,分 2 次给药,5 d 后颈部皮下注射 H9N2 病毒 0.2 mL/只,攻毒后继续口服 SHY 5 d。记录其精神状况、死亡情况、是否咳嗽、体重改变、食欲等情况,并统计成活率和死亡率。试验结束后,剩余鸡只使用安乐死后高压灭菌处理。

## 2 结 果

### 2.1 植物提取物 SHY 对鸡胚的无毒剂量

使用灭菌生理盐水稀释植物提取物 SHY(每毫升含 60、50、40、20、10、5 和 2.5 mg)尿囊腔接种鸡胚,连续观察 6 d,每组的 5 枚鸡胚全部存活,发育健康,说明该制剂原提取物及其本试验各种稀释度对鸡胚在观察时间内无毒性作用。

### 2.2 植物提取物 SHY 对鸡胚新城疫病毒增殖的影响

使用灭菌生理盐水稀释为 20、10、5 和 2.5 mg/mL 的提取物分别与新城疫病毒作用 15 min 后接种鸡胚,SPF 鸡胚全部存活,尿囊液血凝效价全部为阴

性。对照组鸡胚全部死亡,鸡胚的尿囊液存在血凝特性,血液凝集效价平均值为  $(7.5 \pm 1.2) \log_2$  (表 1)。

表 1 不同剂量植物提取物 SHY 抑制新城疫病毒在鸡胚中的增殖

Table 1 Proliferation of Newcastle disease virus in chicken embryo after treating with different dilution of herb extract liquid

稀释剂量 (mg/mL)	数量 (枚)	死亡数 (枚)	存活数 (枚)	病毒效价 (Log <sub>2</sub> )
20	8	0	8	0
10	8	0	8	0
5	8	0	8	0
2.5	8	0	8	0
对照组	8	8	0	$7.5 \pm 1.2$

### 2.3 植物提取物 SHY 对鸡胚禽流感病毒增殖的抑制

含 20、10、5 和 2.5 mg/mL 植物提取物 SHY 与禽流感 H9 亚型病毒作用后,不同剂量试验组鸡胚全部存活,其尿囊液血凝效价为阴性,对照组接种 H9N2 病毒鸡胚 5/8 死亡。各测试剂量植物提取物组 SHY 与禽流感 H5 亚型病毒作用后,20、10 和 5 mg/mL 可以全部保护鸡胚存活,2.5 mg/mL 剂量组 6/8 保护,对照组接种 H5 亚型病毒全部死亡。接种 2 种亚型禽流感病毒后,对照组存活和死亡鸡胚的尿囊液存在血凝特性,效价分别为  $(8.2 \pm 1.4) \log_2$  和  $(5.2 \pm 1.2) \log_2$  (表 2)。

表 2 不同剂量植物提取物 SHY 抑制禽流感病毒 H9N2 和 H5 亚型在鸡胚中的增殖

Table 2 Proliferation of avian influenza virus in chicken embryo after treating with different dilution of herb extract liquid

稀释剂量 (mg/只)	数量 (枚)	鸡胚存活数(枚)		病毒效价(Log <sub>2</sub> )	
		H9N2	H5 亚型	H9N2	H5 亚型
20	8	8	8	0	0
10	8	8	8	0	0
5	8	8	8	0	0
2.5	8	8	6	0	$1.6 \pm 1.1$
对照组	8	5	0	$8.2 \pm 1.4$	$5.2 \pm 1.2$

### 2.4 植物提取物 SHY 对鸡新城疫病毒感染的预防效果

接种新城疫强毒(F4)后,60、50 和 40 mg/只试

验组 SPF 鸡全部存活,剖检病变显示 40 和 20 mg/只试验组鸡的腺胃、肠道出现出血病变,并且从 20 mg/只组鸡的气管和喉头中分离病毒呈阳性(表 3)。由此可见中药提取物高剂量(60 和 50 mg/只)能有效降低病毒造成的胃肠道出血性病变,从而有效控制新城疫造成的死亡。

### 2.5 植物提取物 SHY 对 21 d SPF 鸡流感感染的预防效果

使用禽流感 H9N2 攻毒后,试验组和对照组均未出现死亡鸡只,仅发现 20 mg/只组攻毒 48 h 后出现采食量下降、咳嗽、流鼻液症状,持续 24 h。剖检发现 20 mg/只组 SPF 鸡出现不同程度的气管发红、淤血。对照组出现 50% 的气管环发红。试验组 60、50 和 40 mg/只组,病毒分离呈阴性,20 mg/只和对照组病毒分离阳性(表 4)。

表 3 不同剂量植物提取物 SHY 防治鸡新城疫病毒株的结果  
Table 3 Protective efficacy against vivid Newcastle disease virus after treating with different dilution of herb extract liquid

口服剂量 (mg/只)	鸡数量 (只)	死亡 (只)	胃、肠道出血性病变(只)	病毒分离
60	5	0	0	-
50	5	0	0	-
40	5	0	1	-
20	5	1	3	+ (5/5)
对照组	5	5	5	+ (5/5)

表 4 不同剂量植物提取物 SHY 防治鸡禽流感 H9 亚型的结果

Table 4 Protective efficacy against H9 subtype avian influenza virus after treating with different dilution of herb extract liquid

口服剂量 (mg/只)	鸡数量 (只)	死 (只)	气管发病 (只)	病毒分离
60	5	0	0	-
50	5	0	0	-
40	5	0	1	-
20	5	1	2	+ (5/5)
对照组	5	1	5	+ (5/5)

## 3 讨论

### 3.1 植物提取物 SHY 提取物攻毒保护鸡新城疫和禽流感病毒可能的机制 新城疫强毒株、禽流感弱病毒能在尿囊腔增殖

并产生感染性子代病毒,也可以在许多组织和器官中增殖,引起全身性感染,造成鸡胚死亡<sup>[6]</sup>。常常根据药物能否抑制以上2种病毒在SPF鸡胚上增殖特性来评价药效。

本试验中植物提取物SHY抑制ND和AIV病毒在SPF鸡胚上增殖原因有二:其一,可能与提取的中药SHY的pH值显酸性有关。研究表明酸性物质与病毒作用后导致病毒失活,病毒失去了在鸡胚上的增殖特性。其二,植物提取物SHY提取物可能对新城疫、流感病毒具有杀灭作用。药物活性成分使病毒失活,导致病毒失去了感染鸡胚的活性,从而保证了鸡胚的存活。本课题组以前的研究发现植物提取物SHY稀释到1/28倍时,仍能抑制家禽大肠杆菌、葡萄球菌的生长,这也间接证实SHY中存在抗病毒、抗细菌活性成分。

本试验表明植物提取物SHY每只按60、50和40 mg/只剂量口服5 d后,可以保护ND强毒、AIV病毒的攻击。其可能的原因是SHY提取物通过血液吸收后,进入机体全身细胞,通过抑制禽流感、新城疫病毒在鸡体靶细胞上的增殖,降低了病毒的感染和侵害机会,缓解了病毒在气管、胃、肠道等靶器官的出血性病变,消除了机体弥散性血管内出血,从而控制了病毒攻击引起的死亡。本试验中高剂量组(60和50 mg/只)鸡体内靶器官病变减轻,也证实植物提取物SHY可以减轻病毒的侵害。这提示植物提取物60、50、40 mg/只使用可以预防家禽新城疫和禽流感流行。

### 3.2 植物提取物SHY有效成分预防人禽流感的可能性

2003年亚洲地区爆发禽流感以来,亚洲地区已

经66人死于禽流感<sup>[7]</sup>。我国2005年12月已经证实5名患不明原因肺炎患者被禽流感感染<sup>[7]</sup>。

本试验中植物提取物SHY通过液相色谱仪分析,证实存在24条特征性吸收峰,具体何种成分具有抑制病毒的作用,仍然需要进一步探索。在进一步的研究中,将以SPF鸡人工感染禽流感作为发病模型,开展SHY不同组分抗新城疫、禽流感试验,探讨SHY及其有效成分防治人禽流感的可能性。

### 参 考 文 献

- [1] 叶金戈. 直击流感病毒-奥司他伟[EB/02]. [http://www.tamiflu.com.cn/2001/2001-09-10/dfxw\\_6.htm](http://www.tamiflu.com.cn/2001/2001-09-10/dfxw_6.htm)
- [2] 韦伟, 王晓文, 魏传民. 禽流感病毒对人的感染[J]. 中国检验检疫, 2005(9):32-35
- [3] 程能能, 陈斌艳, 王永铭. 新型口服抗流感药-奥司他伟[J]. 中国临床医药杂志, 2002(1):18-20
- [4] 农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程(2000版)[S]. 北京:化学工业出版社.
- [5] 任慧英, 朱连勤, 李文立, 等. 中药制剂“瘟毒杀”对IBDV、NDV和AIV的抑制试验[J]. 中国兽药杂志, 2001, (5):57-59
- [6] 卡尔尼克B W主编. 禽病学[M]. 高福, 苏敬良主译. 北京:中国农业出版社, 1999. 695-699
- [7] 张庆华. 全球禽流感感染者共133人, 死亡累计达66人[EB/02]. <http://www.chinanews.com.cn/news/2005/2005-12-05/8/660777.shtml>
- [8] 邱观史. 中国目前已有5位患者被确认为人患禽流感病例[EB/02]. <http://www.chinanews.com.cn/news/2005/2005-12-09/8/663098.shtml>