

“病毒克”颗粒剂对 NDV 在鸡胚成纤维细胞中增殖的影响

杨玉成 田勇 乔健 赵立红 胡永峰 金继昌 董长贵

(中国农业大学 动物医学院, 北京 100094)

摘要 为评价中药“病毒克”颗粒剂体外抗新城疫病毒(NDV)的活性,采用细胞培养技术,通过细胞病变抑制法和 MTT 比色法检测“病毒克”颗粒剂在鸡胚成纤维细胞(CEF)中对新城疫病毒增殖的影响。结果表明“病毒克”颗粒剂对 CEF 的半数中毒质量浓度(TC_{50})为 61.35 mg/mL,抗 NDV 的半数有效质量浓度(EC_{50})为 3.2 mg/mL,治疗指数(TI)为 19.2,“病毒克”颗粒剂对新城疫病毒具有直接灭活作用和阻断其感染 CEF 的作用,并存在明显的量效关系($P < 0.01$);在感染后 9 h 内以 14 mg/mL 剂量给予“病毒克”颗粒剂,对新城疫病毒复制的抑制率为 42.8%~76.5%。说明“病毒克”颗粒剂对新城疫病毒在鸡胚成纤维细胞中的增殖具有明显的抑制作用。

关键词 新城疫病毒;抗病毒作用;“病毒克”颗粒剂;细胞培养

中图分类号 S 855.3; S 858.31

文章编号 1007-4333(2006)05-0051-04

文献标识码 A

Effect of bingduke granules on newcastle disease virus in vitro

Yang Yucheng, Tian Yong, Qiao Jian, Zhao Lihong, Hu Yongfeng, Jin Jichang, Dong Changgui

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The objective of this study was to observe the effect of Bingduke granules (Chinese medicinal herb) on Newcastle disease virus (NDV) in vitro. Cytopathic effect inhibition and MTT colorimetric assays were used to detect the anti-viral activity of Bingduke granules on NDV in chick embryo fibroblast (CEF) cells. The median toxic concentration (TC_{50}), median efficacious concentration (EC_{50}) and treatment index (TI) were 61.35 mg/mL, 3.2 mg/mL and 19.2, respectively. The NDV was inactivated directly and the function of NDV infection in CEF was blocked by Bingduke granules in a concentration-dependent manner ($P < 0.01$). Bingduke granules could effectively inhibit the replication of NDV when added to CEF cell within 9 hours at the dosage of 14 mg/mL after infection. These results show that Bingduke granules has significant inhibitory effect on NDV replication in vitro.

Key words Newcastle disease viruses; antiviral effect; Bingduke granules; cell culture

新城疫也称亚洲鸡瘟或伪鸡瘟,是由新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)引起的一种急性、高度接触性的禽类烈性传染病。主要特征是呼吸困难、下痢、神经紊乱、浆膜和黏膜出血^[1]。目前对本病尚无有效的治疗方法,国内外均采用弱毒疫苗和灭活疫苗接种进行免疫预防,但免疫鸡群仍然发生非典型新城疫和高致病新城疫^[2]。中药复方制剂具有抗病毒、促进机体免疫功能和诱生干扰素等作用,在防治畜禽病毒性疾病方面具有独特的优势^[3-5]。例如根据中兽医学理论筛选的具有清热、抗病毒、滋阴凉血等作用的中草药组方“病毒克”,经现

代工艺提取加工而成颗粒剂,对人工诱发新城疫病毒鸡有增强免疫功能和改善血液生化指标等效果^[6-9]。然而该制剂在体外抗新城疫病毒的研究未见报道。本试验在鸡胚成纤维细胞中对“病毒克”颗粒剂抗新城疫病毒增殖作用进行了研究,旨在证实其疗效,探讨其抗 NDV 作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 毒株。新城疫病毒 F48E9 毒株购自中国兽药监察所(批号为 040404)。

收稿日期: 2006-02-28

基金项目: 河北省科技厅资助项目(051127)

作者简介: 杨玉成,博士研究生,现工作单位河北张家口市政府;田勇为同等贡献作者;乔健,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事病毒与细胞生物学研究, E-mail: qiaojian@cau.edu.cn

2) 药品与试剂。“病毒克”颗粒剂,由板兰根、黄芩、黄芪、金银花、黄连等 10 多味中药组方,经水提醇沉后加辅料制粒而成;二甲基亚砜(DMSO),上海菲达有限公司产品;四甲基偶氮唑盐(MTT),sigma 公司产品。

3) 细胞。SPF 鸡胚制备鸡胚成纤维细胞(CEF)^[6],调整密度至 1 mL 含 1×10^6 个细胞。细胞生长液用 MEM 培养基(日本制药株式会社产品)+10%(体积分数)小牛血清(杭州四季青公司),常规加入青、链霉素。细胞维持液小牛血清含量为 2%(体积分数),其余同生长液。

1.2 方法

1.2.1 NDV 毒力测定 采用微量法^[10]测定组织半数感染量(TCID₅₀)。

1.2.2 “病毒克”颗粒剂对 CEF 细胞毒性测定 用细胞维持液将“病毒克”颗粒剂从 128 mg/mL 倍比系列稀释成 7 个剂量,分别加入已长成单层的 96 孔培养板中,每一药物质量浓度重复 4 孔,设正常细胞对照 4 孔。置 37 ℃、5%(体积分数,下同)CO₂ 温箱中培养,每天观察细胞病变(CPE)情况。当病毒对照组 CPE 出现 +++~++++ 时,用 MTT 法测定 OD 值,通过细胞存活率计算药物的半数中毒剂量(TC₅₀)和最大无毒剂量(TC₀)。

1.2.3 不同给药方法对 NDV 的抑制率的测定

1) 药物与 NDV 混合感作后感染 CEF。从细胞最大无毒剂量开始,将药物用细胞维持液 2 倍系列稀释成 6 个剂量。将不同剂量药物溶液与 100 TCID₅₀/0.1 mL NDV 等体积混合,37 ℃ 作用 45 min 后,加入已长成单层的 96 孔培养板中,再次在温箱中作用 1.5 h,弃混合液,更换正常细胞维持液,置温箱培养。

2) CEF 先用药物处理后感染 NDV。用含不同药物剂量的细胞维持液预先处理细胞 90 min,洗涤后以 100 TCID₅₀/0.1 mL 的 NDV 攻击细胞,37 ℃ 5% CO₂ 吸附 1.5 h 洗涤后加细胞维持液,置 37 ℃ 5% CO₂ 温箱培养。

3) CEF 先感染 NDV 后加药物。以 100 TCID₅₀/0.1 mL NDV 感染细胞,吸附 1.5 h 后洗涤,加入不同药物剂量的细胞维持液,置 37 ℃ 5% CO₂ 温箱培养。

1.2.4 不同给药时间对 NDV 抑制率的测定 以 100 TCID₅₀/0.1 mL 的 NDV 接种于已长成单层的 96 孔培养板中,37 ℃ 5% CO₂ 温箱内孵育 1.5 h,更

换维持液。在 0、3、6、9、12、18 和 24 h 时间点分别更换含 14 mg/mL “病毒克”颗粒剂的维持液,置温箱培养。

每一药物剂量重复 4 孔,设正常细胞对照和病毒对照各 4 孔。每日观察 CPE,当病毒对照组 CPE 出现 +++~++++ 时用 MTT 法测定 OD 值,计算病毒抑制率和治疗指数(treatment index, TI)。

1.2.5 CPE 观察记录和 MTT 测定方法

1) CPE 的观测记录方法参考文献[7]。即:无 CPE 为“-”;25%的细胞出现病变为“+”;25%~50%的细胞病变为“++”;50%~75%的细胞病变为“+++”;75%~100%的细胞病变为“++++”。

2) 细胞存活率测定:采用改进的 MTT 法^[11-13],吸出培养液后每孔加入 MTT(5 mg/mL) 100 μL,继续培养 2~3 h 后洗去 MTT 上清,每孔加 DMSO 溶解液 100 μL,振荡混匀后在 570 nm 波长下测定光密度(D_{570 nm})值。

病毒抑制率 = ((药物处理组平均 OD 值 - 病毒对照组平均 OD 值) / (细胞对照组平均 OD 值 - 病毒对照组平均 OD 值)) × 100%

1.3 统计学处理

根据试验结果计算细胞存活率和病毒抑制率,通过 SPSS11.5 软件使用 Probit 回归法计算药物的半数有效剂量(ED₅₀)、半数中毒剂量(TC₅₀)和治疗指数(TI);并对组间病毒抑制率和治疗指数的差异性进行分析;药物剂量对数和病毒抑制率进行相关性分析。

治疗指数(TI) = 半数中毒质量浓度(TC₅₀) / 半数有效质量浓度(EC₅₀)

2 结果与分析

2.1 病毒毒力测定结果

为了解 NDV 在 CEF 细胞中的毒力情况,确定抗病毒药效学试验中病毒攻击量,进行病毒毒力测定,根据所得数据采用 Reed-Muench 法^[10]计算 TCID₅₀/0.1 mL 为 $10^{-5.77}$ 。

2.2 “病毒克”颗粒剂对 CEF 的毒性

“病毒克”颗粒剂对 CEF 的细胞病变效应(CPE)表现为细胞增殖缓慢、颗粒较多、折光性强、形态改变和部分细胞破碎脱落。由于细胞代谢活性降低或死亡,MTT 法检测到 OD 值下降。根据所得数据,采用回归法计算“病毒克”的 TC₅₀和 TC₀ 分别为 61.35 和 28 mg/mL。

2.3 不同给药方法对 NDV 的抑制率和治疗指数

CEF 先用药物处理后接种病毒组和药物与病毒混合 37 感作 45 min 组，“病毒克”颗粒的 TI 分别为 17.5 和 19.2，经 *t* 检验 2 组差异不显著 ($P > 0.05$)，但这 2 种不同给药方式的 TI 极显著高于先接种病毒后给药组 (TI = 9.7 ($P < 0.01$))；当剂量大于 3.5 mg/mL 时“病毒克”颗粒剂对 NDV 病毒抑制

率极显著高于接毒对照组 ($P < 0.01$)，并且先给药后接毒组和药毒混合感作组对 NDV 的抑制率极显著高于同剂量先接毒后给药组 ($P < 0.01$)。说明“病毒克”颗粒剂对 NDV 感染 CEF 细胞的阻断作用和对 NDV 直接灭活作用的效果优于其干扰 NDV 在 CEF 中增殖的作用 (表 1)。

表 1 “病毒克”颗粒剂对 DNV 在 CEF 增殖的抑制率

Table 1 Inhibition ratio of Bingduke granules on NDV propagation in CEF %

给药方式	药物剂量 / (mg/mL)						半数有效浓度 IC ₅₀ / (mg/mL)	治疗指数
	0.86	1.75	3.50	7.00	14.00	28.00		
先给药后接毒	0.0	9.8	50.0 a	85.7 a	98.3 a	100.0 a	3.5	17.5 a
先接毒后给药	0.0	4.2	24.5 b	51.8 b	76.2 b	83.5 b	6.3	9.7 b
药毒混合感作	0.0	10.2	70.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	3.2	19.2 a
细胞对照	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	—	—
病毒对照	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—

注：同一列数据不同字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

2.4 “病毒克”颗粒剂对 NDV 抑制率的量效关系

以药物剂量的对数为横坐标，以抑制率为纵坐标绘图 1。由图可见，“病毒克”颗粒剂对 NDV 在 CEF 上增殖的抑制率随着药物剂量的增加而增强；对药物剂量对数和病毒抑制率进行相关分析结果显示，二者存在着明显的正相关关系，“病毒克”颗粒剂的相关系数 *r* 分别为 0.923 156 ($P = 0.016$)，0.962 57 ($P = 0.012$)，0.983 68 ($P = 0.000 5$)。

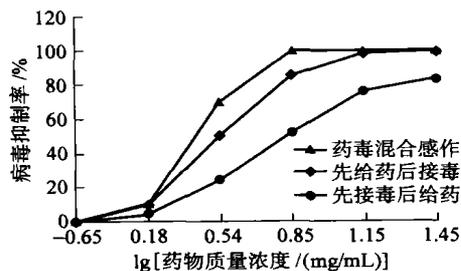


图 1 “病毒克”颗粒剂剂量与 NDV 抑制率之间的关系图

Fig. 1 Dose-dependent effect of Bingduke granules on NDV replication

2.5 不同给药时间对 NDV 的抑制率

细胞感染病毒后 0、3、4 和 9 h 给予“病毒克”颗粒剂，与病毒对照组相比，对 NDV 有明显抑制作用 ($P < 0.01$) (表 2)。

表 2 “病毒克”颗粒剂不同给药时间对 NDV 的抑制率

Table 2 Inhibition ratio of Bingduke granules on NDV propagation in CEF at different time %

组别	感染后时间 / h						
	0	3	6	9	12	18	24
实验组	76.5	71.7	59.5	42.8	11.5	2.3	0.0
病毒对照	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
正常对照	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

3 讨论与小结

“病毒克”颗粒剂体外对 NDV 在 CEF 上的增殖具有明显的抑制作用，治疗指数 (TI) 为 19.2，表明该中药制剂低毒、安全疗效好。对 NDV 抑制作用的大小随药物浓度的增加而增强，二者呈现明显的正相关关系 ($P < 0.01$)。

“病毒克”颗粒剂对 NDV 作用机制是多方面的。本试验中先加药后染病毒组和药物与病毒混合感作后再与 CEF 细胞作用组，病毒的抑制率较高，CPE 不明显，表现出较强的抗病毒活性。说明“病毒克”颗粒剂或通过改变细胞膜表面的病毒吸附蛋白受体，或作用于细胞内而提高其抵抗力，或通过直

接灭活病毒来保护细胞,或者三者兼有;先接种病毒后加中药组,病毒抑制率较低,孔内细胞均产生了不完全细胞病变,可能是病毒侵入并破坏细胞后“病毒克”颗粒剂有效成分再无法提高细胞的抗感染能力而不再起作用,这也是临床上病毒病难治的主要原因。通过在细胞感染病毒后不同时间给药的研究表明病毒感染后9 h以内给药,可有效抑制NDV在CEF细胞上的增殖。提示在临床上预防给药及发病早期给予“病毒克”颗粒剂会获得较好的疗效。

“病毒克”颗粒剂是有效的抗病毒中药复方制剂,活性较强、毒副作用较小,在抗病毒方面有广阔的应用前景。本试验为临床应用“病毒克”治疗新城疫、法氏囊等病毒性畜禽疾病提供了体外实验的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 252-257
- [2] 王永坤. 新城疫高抗体水平鸡群产蛋下降的病因及防控对策的探讨[J]. 中国禽业导刊, 2000, 17(5): 10-12
- [3] Glatthaar-Saalmuller B, Sacher F, Esperester A. Antiviral activity of an extract derived from roots of *Eleutherococcus senticosus*[J]. Antiviral Reseach, 2001, 50: 223-228
- [4] 刘福强, 王卫东, 汤真. 抗病毒中药的研究进展[J]. 医药导报, 2004, 23(8): 536-528
- [5] Bandmacv V, Nowakowski M. Protection of epithelial cells against influenza A virus by a planed derived biological response modifier Ledretan [J]. Phytotherapy Res, 2000, 14(4): 245-249
- [6] 杨玉成, 胡满, 赵占民, 等. 中药病毒克防治病毒性疾病的试验[J]. 中兽医学杂志, 1996, 82(1): 1-4
- [7] 赵香汝, 赵彦雪, 杨玉成. 中药病毒克颗粒剂对鸡新城疫的预防与治疗效果的观察[J]. 中兽医学杂志, 2005, 127(6): 6-7
- [8] 尹秀玲, 牛发良, 杨玉成, 等. 中药病毒克颗粒剂对人工感染鸡新城疫病的生化指标的影响[J]. 中兽医学杂志, 2004, 9: 80-81
- [9] 赵香汝, 赵彦雪, 杨玉成, 等. 病毒克颗粒剂对鸡免疫功能的影响[J]. 中兽医学杂志, 2004, 116(1): 6-8
- [10] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997: 204-206
- [11] Kruse P F, Paterson M K. Tissue culture: methods and applications [M]. New York and London: Academic Press, 1973: 527-530
- [12] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Meth, 1983, 65: 55-61
- [13] 刘钊, 杨占秋, 肖红, 等. MTT法在抗病毒药物筛选中的应用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2004, 25(3): 332-334
- [14] Li D H, Tian Z C, Zhang J, et al. The use of MTT assay for the rapid testing of cytotoxicity of drugs against non-solid tumor cells [J]. Cancer, 1991, 10(3): 226

科研简讯 ·

我校赵要风教授等的研究论文在《美国科学院院报》上发表

我校农业生物技术国家重点实验室赵要风教授和李宁教授通过与瑞典有关科研单位及北京大学的合作研究,最近在两栖类动物中发现并命名了一种新的抗体类型 IgF。研究结果显示, IgF 只具有 2 个固定区结构域,但是包含 1 个独立外显子编码的铰链区结构。IgF 是迄今在低等脊椎动物中发现的第一个具有明确铰链区的抗体类型,在结构上类似于 IgG, 在序列上又与 IgY 呈现较大的同源性。研究结果还揭示了 IgD 在两栖类动物中的存在。IgD 以前只发现于鱼类和哺乳类动物中,呈现出一种进化不连续性。IgD 在两栖类中的发现,部分解决了这种进化矛盾问题,为理解免疫球蛋白在脊椎动物中的进化提供了极为有意义的线索。研究论文发表在 2006 年 8 月《美国科学院院报》(PNAS)上。该项研究得到了国家自然科学基金创新研究群体项目的资助。

(科学技术处供稿)