

# 中草药组合物抗鸡新城疫病毒的效果研究

张慧茹<sup>1</sup>, 焦志强<sup>1</sup>, 崔灿灿<sup>2</sup>, 赵殿齐<sup>3</sup>

(1. 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 河南中亚神鹏动物药业公司, 河南 郑州 450061;

3. 郑州华佳生物科技有限公司, 河南 郑州 450003)

**摘要:** 为研究自拟中草药组合物防控鸡新城疫病毒的效果, 提取组方的可溶性成分制成 1.0 g/mL 的组合物, 采用体外、体内 2 种方式研究其抗病毒作用。以预防、直接、治疗 3 种方式将组合物(以生理盐水作为对照)与病毒注入鸡胚, 检测病毒效价, 并计算保护率; 制备新城疫病理模型, 将 SPF 鸡分为预防+治疗组、治疗组灌服组合物, 测定发病率、发病保护率、死亡率、死亡保护率。结果显示, 与对照组相比, 组合物 3 种作用方式均有抑制鸡胚新城疫病毒的作用, 以预防方式抑制作用最强, 能有效降低病毒 4.35 个滴度、减少病毒量 62.23%, 对鸡胚的保护率达 100%; 预防+治疗组发病保护率提高 92.5 个百分点、死亡率降低 30.0 个百分点。可见, 自拟中草药组合物对新城疫病毒具有较强的抑制作用。

**关键词:** 中草药组合物; 新城疫病毒; 鸡胚; 病理模型

**中图分类号:** S853.91      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2014)05-0156-04

## Antiviral Effect of Chinese Medicine Herbs Mixture on Newcastle Virus

ZHANG Hui-ru<sup>1</sup>, JIAO Zhi-qiang<sup>1</sup>, CUI Lan-lan<sup>2</sup>, ZHAO Dian-qi<sup>3</sup>

(1. College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. Henan Zhongyashenpeng Animal Medicine Co., Ltd, Zhengzhou 450061, China;

3. Zhengzhou Huajia Bio-technology Co., Ltd, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract:** Provention and control effects of the self-made Chinese herbal medicine composition on newcastle virus were examined. The soluble components of composition were extracted and concentrated to 1 g/mL. The antiviral effect was tested by two ways, *in vitro* and *in vivo*. In order to confirm antiviral titer and protective rate, the mixture of extract and newcastle virus was injected into the egg with three ways of prevention, interreaction and treatment, compared with the control of physiological saline. The pathological model of newcastle disease was prepared. The pathological models were drenched the extract of 1 g/mL concentration with two groups of prevention+ treatment group and treatment group to evaluate the antiviral effects by mortality ratio, death-protection ratio and incidence ratio, onset-protection ratio compared with the control. The results showed that prevention+ treatment group had the best role than those which were three ways of prevention, interreaction and treatment, reduced 4.35 titles and 62.23% the amount of virus, the protective rate reached 100%. The way of prevention+ treatment group had high protect affects compared with the control group, mortality rate decreased 30.0 percentage points and protection rate increased 92.5 percentage points. The extraction of Chinese herbal medicine by self-made has powerful inhibition effect on newcastle virus.

**Key words:** Chinese medicine herbs mixture; newcastle virus; chicken egg; pathologic model

收稿日期: 2013-11-11

基金项目: 郑州市科技发展计划项目(2001NYXM229)

作者简介: 张慧茹(1967-), 女, 河北鹿泉人, 副教授, 博士, 主要从事中草药的抗病毒作用研究。E-mail: zhr67@163.com

新城疫(newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)感染禽类引起的一种急性、高度接触性、烈性传染病,在全球范围内传播,对养禽业造成了巨大的损失。尽管通过严格的免疫程序基本控制了ND的大规模发生和流行,但隐型或非典型性新城疫的流行仍然很难控制。目前,尚缺乏有效的药物来治疗NDV感染。

中草药是中华传统医学的瑰宝,许多中草药具有极强的抗病毒作用<sup>[1-3]</sup>。大量的研究表明,中草药中含有多种抑制病毒的有效成分<sup>[4]</sup>,不仅能够在体外发挥直接抑制病毒的作用,还能通过提高机体的非特异性免疫水平发挥抗病毒、防治疾病的功效<sup>[5]</sup>。顾文松等<sup>[6]</sup>将不同浓度的中药复方提取物以3种不同的方式加入鸡胚成纤维细胞培养液中,采用MTT方法检测鸡胚成纤维细胞数量时发现,该提取物对NDV感染的细胞有较强的保护作用。范云鹏等<sup>[7]</sup>将由黄芪、诃子和郁金等药物组成的中药复方制成煎剂连续灌服健康鸡后攻毒,检测血液生理、生化和ND抗体效价等指标时发现,该复方能有效减轻鸡体NDV感染所引起的生理生化方面的损伤。赵彪等<sup>[8]</sup>筛选抗鸡NDV中药复方,通过检测多种免疫指标发现,中药组方在延缓鸡ND发病、促进病鸡康复、降低鸡死亡率方面的功效最佳。

鉴于中草药复方的抗病毒效果,笔者所在课题组优选具有抑制病毒、提高免疫力的多种中草药,在中药组方理论指导下,辩证施治地自拟抗病毒的中草药组方,以水煎、醇提提取组方中的成分,以提高药效、减少药量,同时制成浓缩液体剂型以便于饮水方式应用,研究其对NDV的抑制作用,以期中草药组合物的推广应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试中草药 板蓝根、金银花、柴胡、贯众、白茅根、黄芩、丹皮、藿香、茯苓、苦参10味中药,购自河南张仲景大药房股份有限公司。

1.1.2 病毒 采用鸡新城疫中等毒力活疫苗(I系),购自青岛易邦生物工程有限公司。

1.1.3 SPF鸡胚 9日龄SPF鸡胚购自乾元浩生物股份有限公司。

1.1.4 SPF鸡 30日龄SPF新城疫阴性鸡,由青岛易邦生物工程有限公司提供。

### 1.2 方法

1.2.1 中草药组合物的制备 根据张慧茹等<sup>[9]</sup>的方法,将中草药组方水煎、醇提,合并溶液浓缩成

1.0 g/mL, 4℃保存备用。

1.2.2 中草药组合物对鸡胚的安全性测定 采用鸡胚尿囊腔接种组合物的方法测定。将组合物用生理盐水分别进行1、5、10、50、100倍稀释,按0.2 mL/只的剂量分别注入9日龄的SPF鸡胚尿囊腔内,放于37℃恒温培养箱孵育,间隔12 h再注射1次,每组10枚鸡胚。继续孵育,每天观察鸡胚的状态。将24 h内死亡的鸡胚弃去,25~72 h死亡的鸡胚,及时取出,放入4℃冰箱冷冻6 h后,解剖观察鸡胚发育及死亡状况。活胚继续孵化直至出雏。以对鸡胚安全不致死的最小浓度为最小致死浓度,根据最小致死浓度确定该组合物对鸡胚的安全性。

1.2.3 NDV病毒血凝效价的测定 按照GB/T 16550—2008国家标准<sup>[10]</sup>检测鸡胚尿囊液中NDV的血凝效价。

1.2.4 中草药组合物对鸡胚的保护作用测定 将中药组合物与病毒采用以下3种方式进行作用,计算鸡胚的成活率和鸡胚尿囊液病毒效价。

预防:将制备的组合物以0.2 mL/枚接种于鸡胚,37℃恒温培养2~4 h,再接种0.2 mL/枚NDV I系病毒。直接:将制备的0.2 mL组合物、0.2 mL病毒液混合后于37℃作用2~4 h,再将混合液接种于鸡胚内,共0.4 mL/枚。治疗:将病毒液按0.2 mL/枚的量接种,37℃恒温培养2~4 h,再将制备的组合物0.2 mL/枚接种于鸡胚。同时,以生理盐水替代中草药组合物以上述3种形式与NDV作用,注入鸡胚,作为阴性对照。

每组20枚鸡胚,37℃恒温培养,观察鸡胚的成活情况,弃去24 h内死亡的鸡胚,收集24~72 h鸡胚的尿囊液,采用血凝试验测定各组鸡胚尿囊液病毒的滴度,并计算组合物对鸡胚的保护率。

保护率=(总鸡胚数-死亡鸡胚数)/总鸡胚数×100%。

1.2.5 鸡ND病理模型的制备 选取50只SPF试验鸡,在隔离器中饲养3~4 d以适应环境。随机分为5组,采用静脉致病指数(IVPI)为1.04的NDV I系,依次进行5、10、20、50倍稀释,分别以0.1 mL/只的剂量翅静脉注射。攻毒后第2天开始观察鸡群临床症状,确定适宜的病毒剂量。

1.2.6 中草药组合物对ND病理模型鸡的防治作用测定 取SPF鸡120只,随机分成3组即预防+治疗组、治疗组、对照组(病理模型,灌服生理盐水),每组40只。

预防+治疗:间隔12 h灌服0.2 mL组合物,喂药3 d作为预防,然后按照上述方法制备新城疫病

理模型;按预防剂量持续喂药 13 d 进行治疗,第 2 天开始观察临床症状,测定发病率、死亡率、发病保护率、死亡保护率。

治疗:按照上述方法制作新城疫病理模型,注射病毒 4 h 后,每间隔 12 h 灌服 0.2 mL 的组合物,持续喂药 13 d 进行治疗。第 2 天开始观察临床症状,测定发病率、死亡率、发病保护率、死亡保护率。

发病率=发病鸡数/总鸡数 $\times$ 100%;死亡率=死亡鸡数/总鸡数 $\times$ 100%;发病保护率=(总鸡数-发病鸡数)/总鸡数 $\times$ 100%;死亡保护率=(总鸡数-死亡鸡数)/总鸡数 $\times$ 100%。

试验结束后,解剖所有鸡,观察组织病变。

## 2 结果与分析

### 2.1 中草药组合物对鸡胚的安全性

将 1.0 g/mL 组合物分别稀释 1、5、10、50、100 倍,注入 9 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔内,继续孵育鸡胚至出雏,结果发现,接种鸡胚零死亡。因此,组合物对鸡胚的最小致死浓度大于 1.0 g/mL。

### 2.2 中草药组合物对鸡胚的保护作用

将组合物与病毒采用 3 种方式作用,以鸡胚为反应器,以鸡胚尿囊液的病毒效价检测组合物对病毒的抑制作用。从表 1 可以看出:与对照组相比,组合物的 3 种作用形式均有较强的抑制病毒作用( $P<0.01$ )。其中,以预防方式抑制作用最强,降低病毒 4.35 个滴度,病毒存活量减少 62.23%;直接作用方式能降低病毒 4.55 个滴度、减少存活量 60.91%;治疗作用方式有效降低病毒 3.00 个滴度,减少病毒存活量 37.5%。

表 1 鸡胚尿囊液 NDV 的血凝效价(log<sub>2</sub>)

处理	预防	直接	治疗
对照	6.99 $\pm$ 0.18	7.47 $\pm$ 0.08	8.00 $\pm$ 0.26
组合物	2.64 $\pm$ 0.12	2.92 $\pm$ 0.11	5.00 $\pm$ 0.21

试验过程中,24 h 内试验组和对照组均无鸡胚死亡;48~60 h,3 种作用方式的对照组均有 8 枚鸡胚死亡,鸡胚存活率为 60%;72 h 以后,对照组鸡胚全部死亡,而试验组在 60 h 之前,鸡胚全部成活,保护率为 100%;当孵育至 84 h 时,组合物预防组鸡胚全部成活,保护率为 100%,直接、治疗组各出现 1 枚鸡胚死亡,保护率下降为 95%。由此可以看出,与对照组相比,组合物对鸡胚均有明显的保护作用( $P<0.01$ ),以预防方式对鸡胚的保护率(100%)最高。

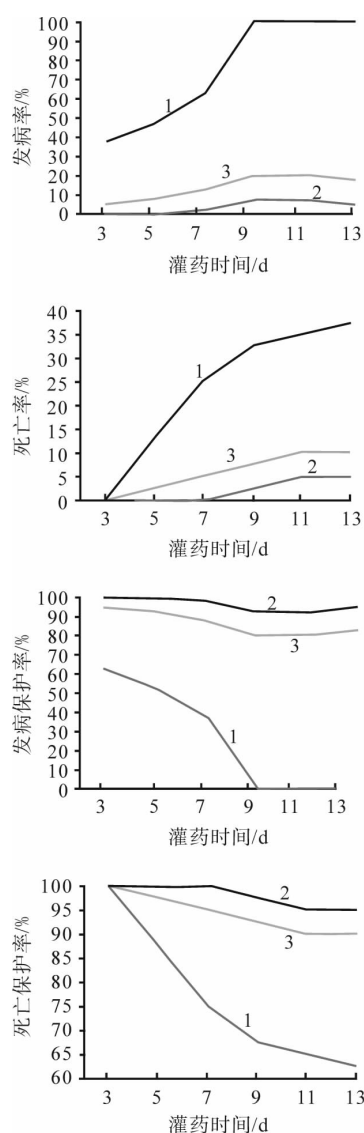
### 2.3 鸡 ND 病理模型的制备结果

经试验,采用 IVPI 为 1.04 的 NDV I 系病毒,

10 倍稀释后按 0.1 mL/只的剂量翅静脉注射,试验鸡第 3 天开始出现呼吸症状,精神沉郁,腹泻,鸡冠或肉髯发绀,脸或头部肿胀。第 10 天时死亡率达 30%,发病率为 100%,表明制作的病理模型适宜。

### 2.4 中草药组合物对 ND 病理模型鸡的防效

由图 1 可知,在试验第 9 天,对照组发病率高达 100%、死亡率为 32.50%;预防+治疗组发病率为 7.50%、死亡率为 2.50%;治疗组发病率为 20.00%、死亡率为 7.50%。未经组合物防治的对照组雏鸡 ND 发病率、死亡率较高,而发病、死亡保护率均较低;预防+治疗组的发病、死亡保护率较高,发病率和死亡率均较低;至试验第 13 天,试验组发病鸡只减少,发病、死亡保护率升高,有少量病鸡治愈、恢复正常。可见,中草药组合物对 ND 具有一定的防治作用。



1. 对照组; 2. 预防+治疗组; 3. 治疗组

图 1 中草药组合物对 ND 病理模型鸡的防效

## 2.5 中草药组合物对 ND 病理模型鸡组织学变化的影响

对照组鸡只气管内有明显的出血点及大量的分泌物,而试验组气管内病理变化较轻,预防+治疗组接近正常。对照组的十二指肠黏膜增厚、外翻,黏膜表面呈现弥漫性出血点,肠道黏膜呈红棕色,试验组黏膜病理变化相对较轻,预防+治疗组小肠黏膜病理变化最轻,无明显出血点,肠道颜色淡黄色。

## 3 结论与讨论

通过体外的鸡胚试验、体内的病理模型防治试验发现,自拟组方提取物对 NDV 具有较强的抑制作用。

研究<sup>[4,11]</sup>证实,中草药中黄酮、多糖、皂苷等有效成分对 NDV 具有明显抑制作用。王志玉等<sup>[12]</sup>用乙醇提取大黄中的有效成分进行抗病毒试验,结果表明,大黄醇提液有明显的抗 NDV 效果,剂量越大作用越明显。崔灿灿等<sup>[13-14]</sup>检测升降散、麻杏石甘汤的提取液对 NDV 的抑制作用,发现组方的抑制作用优于单味中草药,认为组方中多种中草药的多种有效成分相互作用,能够阻止病毒侵入、定植和繁殖,同时增强机体的非特异性免疫作用,从而达到内外双制的作用。本研究采用水煎、醇提提取中草药中黄酮、多糖和皂苷等多种可溶性有效成分,进行浓缩制成液体剂型,用于 ND 的防治,效果明显,与前人<sup>[15-18]</sup>的研究结果一致。

为研究抗 NDV 药物的作用,制备 ND 病理模型至关重要。鉴于静脉注射接种病毒易于将病毒随血液运输至全身,利于病毒定植和繁殖,易于快速产生典型的 ND 临床感染症状,故选择翅静脉注射 I 系强毒疫苗的方式接种病毒;其次,由于疫苗毒株易于获得,且引起的发病率和致死率相对温和,经不同倍数稀释后静脉注射,通过观察每天的发病、死亡情况,易于确定制备病理模型的最佳剂量和方式。本研究发现,采用 IVPI 为 1.04 的 ND I 系,10 倍稀释后按 0.1 mL/只的剂量翅静脉注射 30 日龄的 SPF 鸡,注射后 3 d 开始发病,出现临床症状,10 d 时发病率达 100%,死亡率为 30%。所制备的病理模型符合试验要求。

自拟抗病毒中草药组方,通过水煎、醇提制备可溶性有效成分组合物,通过研究其对 NDV 感染鸡胚的保护作用和 ND 病理模型鸡的防效,证实其对 NDV 具有较强的抑制作用。

参考文献:

- [1] 郑成江,吕世玺,张连洪,等. 中草药饲料添加剂的研究

进展与展望[J]. 天津农业科学,2010(5):51-54.

- [2] 郭巧萍. 抗生素替代物对畜禽生产的影响研究进展[J]. 山西农业科学,2012,40(5):553-554.
- [3] 陈国花. 微生物发酵中草药研究进展[J]. 现代农业科技,2013(23):284.
- [4] Wang J M, Hu Y L, Wang D Y, *et al.* Lycium barbarum polysaccharide inhibits the infectivity of Newcastle disease virus to chicken embryo fibroblast[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(2):212-216.
- [5] Fan Y P, Liu J G, Wang D Y, *et al.* Epimedium polysaccharide and propolis flavone can synergistically inhibit the cellular infectivity of NDV and improve the curative effect of ND in chicken[J]. Int J Biol Macromol, 2011, 48(3):439-444.
- [6] 顾文松,葛洪伟,陈文峰,等. 中药复方提取物对新城疫病毒感染细胞能力的影响[J]. 中国家禽,2009,31(12):64-65.
- [7] 范云鹏,徐玉凤,王兴祥,等. 中药复方对鸡人工感染新城疫病毒后血液生化指标及抗体效价的影响[J]. 畜牧与兽医,2009,41(10):81-84.
- [8] 赵彪,张清,张玲,等. 中药复方抗鸡新城疫作用及其对雏鸡免疫内分泌调节的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2012,47(4):21-27.
- [9] 张慧茹,崔灿灿,刘来亭,等. 预防和治疗禽类病毒性疾病的中药组合物及制备方法:中国,201010149022.6[P]. 2010-08-11.
- [10] 中华人民共和国农业部. GB/T 16550-2008 新城疫诊断技术[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [11] Fan Y P, Hu Y L, Wang D Y, *et al.* Epimedium polysaccharide and propolis flavone can synergistically stimulate lymphocyte proliferation *in vitro* and enhance the immune responses to ND vaccine in chickens[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47(2):87-92.
- [12] 王志玉,许斌,宋艳艳,等. 大黄乙醇提取物的体外抗新城疫病毒作用[J]. 山东医科大学学报,2002,40(1):26-28.
- [13] 崔灿灿,李吉轩,齐仁立,等. 人用升降散抗新城疫病毒的效果研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2008(11):93-94.
- [14] 崔灿灿,李吉轩,齐仁立,等. 麻杏石甘汤中抗新城疫病毒有效成分的研究[J]. 中国农学通报,2008,24(10):35-38.
- [15] 李龙. 黄芪多糖、淫羊藿多糖免疫增强作用研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2013.
- [16] 赵素君,谢晶,林毅,等. 元宝枫黄酮对肉鸡免疫机能的影响[J]. 饲料工业,2012,33(2):5-7.
- [17] 刘微. 金银花复方制剂对人工感染 NDV 雏鸡免疫器官免疫功能的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2011.
- [18] 戈胜,姜晓文,王志新,等. 绞股蓝对雏鸡免疫功能的影响[J]. 中兽医医药杂志,2010(3):32-34.