

三仁汤复方中药制剂对 PRRSV 体外抑制作用的研究

邱 骏¹, 唐 娜², 沈志强², 肖跃强², 丁 壮^{1*}

(1. 吉林大学 动物医学学院, 吉林 长春 130062; 2. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600)

摘要: 为了寻找有效预防和治疗猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 的中草药, 以 Marc-145 细胞为模型, 采用细胞病变 (CPE) 抑制试验和 MTT 法测定细胞活力, 评价三仁汤复方中药制剂的活性成分在体外抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 的作用, 并通过改变药物作用方式, 初步探讨复方中药制剂的抗病毒机制。结果显示, 三仁汤复方中药制剂对 Marc-145 细胞的最大安全质量浓度为 125 g/L, 在体外对 PRRSV 直接灭活的最小质量浓度为 15.625 g/L, 抑制作用的最小质量浓度为 31.25 g/L, 吸附阻断作用的最小质量浓度为 125 g/L, 其对 PRRSV 的灭活作用明显优于抑制作用和吸附阻断作用, 吸附阻断作用最弱。表明, 在安全质量浓度范围内, 三仁汤中药复方制剂在体外有显著的抗 PRRSV 作用, 可以作为预防及治疗 PRRS 的药物。

关键词: 三仁汤复方中药制剂; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; Marc-145 细胞; 细胞病变

中图分类号: S859.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)11-0141-06

Research of the Inhibitory Function of Three Kernel Soup Compound Preparation Against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus *in vitro*

QIU Jun¹, TANG Na², SHEN Zhi-qiang², XIAO Yue-qiang², DING Zhuang^{1*}

(1. College of Animal Science and Veterinary, Jilin University, Changchun 130062, China;

2. Shandong Binzhou Animal Science and Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600, China)

Abstract: In order to search for Chinese medicinal herb that could be effective in preventing and treating PRRS, this research used Marc-145 cells as testing models, through cytopathic effect inhibition assay (CPE) and cell vitality determined by MTT method to evaluate the active ingredient of three kernel soup compound preparation that showed inhibitory effect on cells infected by PRRSV *in vitro*. Additionally, in order to discuss preliminarily the antiviral mechanism of Chinese medicinal herbal, the measures to change the dosing way were took. The results showed that the maximum non-toxic concentration of three kernel soup compound preparation effected on Marc-145 cells was 125 g/L, the minimum concentration that it could inactivate PRRSV directly *in vitro* was 15.625 g/L, the minimal inhibitory concentration was 31.25 g/L and the minimal blocking concentration was 125 g/L. Therefore, three kernel soup compound preparation inactivated PRRSV significantly better than inhibitory and blocking effect, the weakest effect was blocking. It demonstrated that three kernel soup compound preparation had significant antiviral effect in the safety concentration range *in vitro*, and it could be used as a drug in prevention and treatment of PRRS.

Key words: three kernel soup compound preparation; PRRSV; Marc-145; CPE

收稿日期: 2014-06-16

作者简介: 邱 骏 (1969-), 男, 河南信阳人, 在读博士研究生, 研究方向: 动物传染病的诊断与防治。

E-mail: puaizhuye@163.com

* 通讯作者: 丁 壮 (1960-), 男, 吉林长春人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事病毒病的研究与教学工作。

E-mail: Ding_zhuang@yahoo.com.cn

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)又称猪“蓝耳病”,是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的一种高度传染性疾病,主要引起妊娠母猪流产、死胎、繁殖障碍和各种年龄猪(特别是仔猪)的呼吸道疾病^[1-3]。1996年郭宝清等首次从流产胎儿中分离到 PRRSV,从而证实我国也存在该病。PRRS 在我国广泛流行并不断发生变异^[4-5],特别是 2006 年以来,我国爆发了以高发病率和死亡率为特征的猪高致病性蓝耳病疫情,一度造成全国生猪存栏量大幅度减少,给我国养猪业造成了巨大的经济损失。

由于 PRRSV 不仅有高变异性,而且具有免疫逃避和免疫抑制能力等特性,目前尚未研究出防制 PRRSV 感染的特效疫苗和药物^[6-7]。近年来,人们发现有些中药具有良好的抗病毒、增强免疫机能、调节机体非特异性免疫机能和全方位的灭活病原微生物的特点,是防治许多病毒病的重要药物^[8-10]。清代医学家吴瑭撰写的《温病条辨》三仁汤对多种病的治疗具有良好作用,应用广泛。但目前尚未见三仁汤抗 PRRSV 感染的报道。本试验选择经《温病条辨》三仁汤配方改良而成的三仁汤中药复方粗提取物,研究了其体外抗 PRRSV 的效果,为研发高效、安全、不良反应少的抗 PRRSV 的复方中药提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、毒株 病毒毒株来自河南某发病猪场的仔猪血液样品,经 Marc-145 细胞传代分离鉴定后命名为 HeN2010-1 株,连续传代 15 代以上,毒力较为稳定。

Marc-145 细胞由山东省滨州畜牧兽医研究院兽医生物技术重点实验室提供。

1.1.2 试剂 MTT、DMSO 等试剂购自 Sigma 公司,DMEM 培养基、犊牛血清等细胞培养试剂购自 Gibco 公司,其他试剂均为分析纯。

1.1.3 药材 三仁汤复方中药按清代医家吴瑭撰写的《温病条辨》三仁汤配方改良而成,改良方由杏仁、白蔻仁、薏苡仁、甘草、通草、厚朴、滑石、麻黄等 11 味中药材构成,药材购自河南中药材市场。按照常规水煎煮法提取,使用前配成 1 mL 含 1 g 生药高压灭菌,4℃冰箱保存备用。

1.1.4 仪器 二氧化碳培养箱(WUAIR/UN-

4500E)购自日本三洋公司,倒置显微镜(XDS1-B)购自重庆光电公司,细胞培养瓶、96 孔细胞培养板购自 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 中药提取 取三仁汤复方中药 100 g 水提,水煎煮 2 次,每次加水 200 mL 煮沸 30 min,合并 2 次煎煮液浓缩至 1 g/mL,定容至 100 mL(1:1 水煎液),4 000 r/min 离心 15 min,取上清液用 7%NaHCO₃ 溶液调 pH 值至 7.0,分装后 4℃保存备用。

1.2.2 病毒 TCID₅₀ 的测定 Marc-145 细胞按照常规方法传代至 96 孔板制备细胞单层,培养 1 d 后,将 HeN2010-1 病毒按照 10⁻¹、10⁻²、……、10⁻⁸ 进行梯度稀释,分别接种 96 孔细胞培养板中,每个稀释度重复 5 孔,每孔接种 100 μL 病毒液,同时设 2 孔阴性对照,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱静置培养 7 d,逐日检查细胞病变(CPE),记录出现 CPE 的孔数,停止出现 CPE 时结束观察,按 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID₅₀,计算方法如下:

距离比=(高于 50%病变率的百分数-50%)/(高于 50%病变率的百分数-低于 50%病变率的百分数);lg TCID₅₀=距离比×稀释度对数之间的差+高于 50%病变率的稀释度的对数。

1.2.3 三仁汤中药复方制剂对 Marc-145 细胞毒性的测定 制备长满 Marc-145 细胞单层的 96 孔细胞培养板,将三仁汤中药复方制剂用 DMEM 培养基按照 2⁻¹、2⁻²、……、2⁻⁸ 进行稀释后,分别加入细胞孔中,每孔 100 μL,每个药物质量浓度设 5 孔重复,5%CO₂、37℃孵育,并于倒置显微镜下观察。48 h 后取出 96 孔板,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h 后取出培养板,小心吸去孔内培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光值,以 CPE 程度和所测得 OD₅₇₀ 为依据,按以下公式计算药物致 CPE 率,最大安全浓度(MNTC)是能够使 90%以上的细胞存活的药物质量浓度^[4]。

$$\text{CPE 率} = \frac{\text{细胞对照 OD 值} - \text{试验组 OD 值}}{\text{细胞对照 OD 值}} \times 100\%。$$

1.2.4 三仁汤复方中药制剂对 PRRSV 的吸附阻断作用 根据 MTT 试验结果,将药物按照 2⁻³、……、2⁻¹⁰ 进行稀释(药物质量浓度分别为 125 g/L、……、0.976 g/L),分别加到长成单层 Marc-145 细胞的 96 孔板,每孔 100 μL,每稀释度重复 5 孔,

37 ℃作用 1 h 后,弃去药液,每孔加入 100×TCID₅₀ 病毒液 100 μL,37 ℃吸附 1 h,弃去病毒液,加入维持液进行培养,另设细胞对照和病毒对照。5%CO₂、37 ℃静置培养,培养 5 d 后观察 CPE。本研究中,细胞无 CPE 记“—”,出现 0~25% CPE 记“+”,25%~50% CPE 记“++”,50%~75% CPE 记“+++”,75%~100% CPE 记“++++”。

1.2.5 三仁汤复方中药制剂对 PRRSV 的抑制作用 将 100×TCID₅₀ 浓度的病毒液接种到长成单层 Marc-145 细胞的 96 孔板,每孔 100 μL,37 ℃作用 1 h 后,弃去病毒液,用 PBS 液洗 2 次,加入倍比稀释的中药液,每孔 100 μL,每稀释度重复 5 孔,同时设置病毒对照孔、药物对照孔和空白细胞对照,5%CO₂、37 ℃静置培养,培养 5 d 后观察 CPE,按照 1.2.4 所述进行记录。

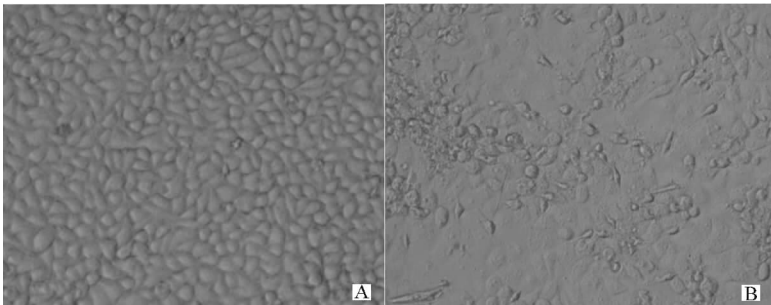
1.2.6 三仁汤复方中药制剂对 PRRSV 的直接灭活作用 将药物按照 2⁻³、……2⁻¹⁰ 进行稀释后

(质量浓度分别为 125 g/L、……、0.976 g/L),分别与 100×TCID₅₀ 浓度的病毒液等体积混合,37 ℃作用 1 h 后,分别接种到长满单层细胞的 96 孔板,每孔 100 μL,每稀释度重复 5 孔,同时设置病毒对照孔、药物对照孔和空白细胞对照,培养 5 d 后观察 CPE 情况,按照 1.2.4 所述记录 CPE 情况。

2 结果与分析

2.1 病毒 TCID₅₀ 浓度测定

Marc-145 传代细胞加入 96 孔板,24~36 h 后可长成致密的单层,正常细胞呈多角形形态,细胞排列紧密而均匀,细胞间隙清晰,呈现典型的“铺路石”状(图 1A)。细胞接种病毒培养 3 d 后,病毒稀释度为 10⁻³ 以上时,细胞孔开始出现细胞聚缩、变圆、脱落等病变现象(图 1B);7 d 后,计数发生 CPE 的孔(表 1),按 Reed-Muench 法计算病毒 TCID₅₀ 为 10^{-5.69}/0.1 mL。



A. 细胞对照; B. PRRSV 按 10⁻³ 稀释感染细胞 72 h

图 1 PRRSV 接种 Marc-145 细胞的 CPE 情况

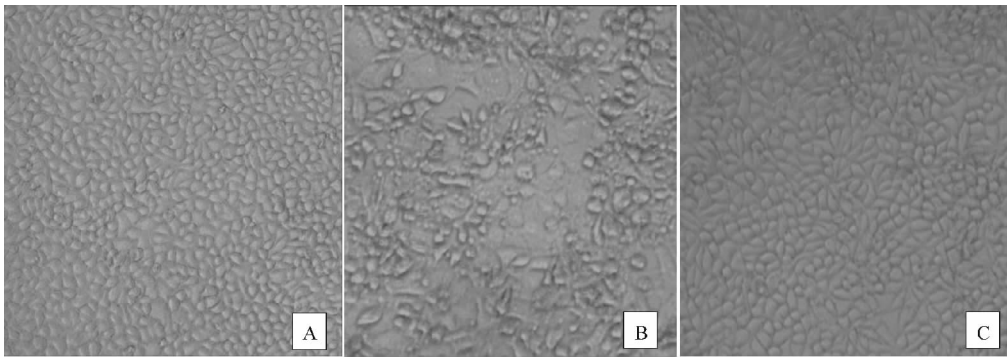
表 1 PRRSV HeN2010-1 病毒 TCID₅₀ CPE 计数

病毒稀释度	接种孔数	细胞孔 CPE 结果		累计 CPE 细胞孔结果		胞孔总数	CPE 细胞阳性孔比例/%
		阳性孔数	阴性孔数	阳性孔数	阴性孔数		
10 ⁻¹	5	5	0	26	0	26	100(26/26)
10 ⁻²	5	5	0	21	0	21	100(21/21)
10 ⁻³	5	5	0	16	0	16	100(16/16)
10 ⁻⁴	5	4	1	11	1	12	91.6(11/12)
10 ⁻⁵	5	4	1	7	2	9	77.8(7/9)
10 ⁻⁶	5	2	3	3	5	8	37.5(3/8)
10 ⁻⁷	5	1	4	1	9	10	10(1/10)
10 ⁻⁸	5	0	5	0	9	9	0(0/9)

2.2 三仁汤复方中药制剂对 Marc-145 细胞的安全浓度

由图 2 可以看出,三仁汤复方中药制剂按照 1:2 稀释后加入细胞培养板上,52 h 后 Marc-145 细胞出现明显膨胀、变圆、胞浆中颗粒增多等现象,

CPE 明显(图 2B);三仁汤复方中药制剂按照 1:4 稀释加入细胞培养板上,52 h 后细胞变化不明显(图 2C);三仁汤复方中药制剂按照 1:8 稀释加入细胞培养板上,52 h 后细胞无变化。



A. 未接种中药制剂的 Marc-145 细胞; B. 1 : 2 稀释的中药制剂作用 Marc-145 细胞 52 h;
C. 1 : 4 稀释的中药制剂作用 Marc-145 细胞 52 h

图 2 三仁汤制剂对 Marc-145 细胞的毒性作用

由表 2 可知,中药组细胞 OD 值小于细胞对照 OD 值,随着药物质量浓度的逐渐增加,OD 值逐渐减小,药物稀释倍数越大,对细胞毒性越不明显。将三仁汤复方中药制剂稀释到 8 倍时(1 L 稀释液含药液 125 g), Marc-145 细胞病变率为 6.67%。试验证明,三仁汤复方中药制剂按照 8 倍以上稀释加入细胞培养板,CPE 率均在 10% 以下。因此,三仁汤复方中药制剂对 Marc-145 细胞的最大安全质量浓度为 125 g/L。

表 2 三仁汤复方中药制剂不同稀释倍数对 Marc-145 细胞的影响

项目	稀释倍数							
	2	4	8	16	32	64	128	256
中药组 OD 值	0.62	0.80	0.98	0.95	0.95	0.95	0.95	0.98
细胞对照 OD 值	1.00	1.05	1.05	1.05	1.00	1.05	1.05	1.00
COE 率/%	38.00	23.81	6.67	9.52	5.00	9.52	9.52	2.00

2.3 三仁汤复方中药制剂对 PRRSV 的吸附阻断作用

由表 3 可以看出,三仁汤复方中药制剂按 125 g/L 作用于 Marc-145 细胞时,CPE 率为 0; 62.5 g/L 时 CPE 率为 0~25%,对 PRRSV 的吸

附阻断作用不明显;低于 62.5 g/L 时出现明显的 CPE,且随着药物质量浓度的减小 CPE 率为 25%~100%。表明三仁汤复方中药制剂完全阻断 Marc-145 细胞发生 CPE 的最小质量浓度为 125 g/L。

表 3 三仁汤中药复方制剂对 PRRSV 的吸附阻断作用

细胞孔 编号	药物质量浓度/(g/L)								病毒对照	细胞对照
	125	62.5	31.25	15.625	7.812	3.906	1.953	0.976		
1	—	+	+	+	++++	++++	++++	++++	++++	—
2	—	—	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	—
3	—	—	++	+++	++	++++	++++	++++	++++	—
4	—	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	—
5	—	—	+	+++	+++	++++	++++	++++	++++	—

2.4 三仁汤复方中药制剂对 PRRSV 的抑制作用

由表 4 可以看出,31.25 g/L 的三仁汤复方中药制剂作用于 Marc-145 细胞,CPE 率为 0; 15.625 g/L 时的 CPE 率为 0~25%,低于 31.25 g/L

的药液质量浓度时细胞开始发生病变,CPE 率 25%~75%。三仁汤复方中药制剂药液质量浓度为 31.25 g/L 时能够抑制 PRRSV 导致 Marc-145 细胞发生 CPE,因此,其完全抑制 Marc-145 细胞发生 CPE 的最小质量浓度为 31.25 g/L。

表 4 三仁汤中药复方制剂对 PRRSV 的抑制作用

细胞孔	药物质量浓度/(g/L)								病毒对照	细胞对照
	125	62.5	31.25	15.625	7.812	3.906	1.953	0.976		
1	—	—	—	—	+	+	+++	++	++++	—
2	—	—	—	—	+	++	+	+++	++++	—
3	—	—	—	—	—	++	++	+++	++++	—
4	—	—	—	+	+	+	++	+++	++++	—
5	—	—	—	+	+	++	++	++	++++	—

2.5 三仁汤复方中药制剂对 PRRSV 的直接灭活作用

由表 5 可以看出,药物质量浓度为 15.625 g/L 时无 CPE,细胞状态良好;药物质量浓度为 7.812 g/L 时,发生 0~25% 的 CPE;低于 7.812 g/L 时,随着药物质量浓度的减小,病变率介于 25%~

75%。可见,三仁汤复方中药制剂质量浓度为 15.625 g/L 时,对 PRRSV 有明显的灭活作用,使 PRRSV 不能导致 Marc-145 细胞发生 CPE,因此,其完全灭活 PRRSV 使 Marc-145 细胞不发生 CPE 的最小质量浓度为 15.625 g/L。

表 5 三仁汤复方中药制剂对 PRRSV 的直接灭活作用

细胞孔	药物质量浓度/(g/L)								病毒对照	细胞对照
	125	62.5	31.25	15.625	7.812	3.906	1.953	0.976		
1	—	—	—	—	—	—	++	++	++++	—
2	—	—	—	—	—	+	+	++	++++	—
3	—	—	—	—	—	+	++	+++	++++	—
4	—	—	—	—	—	+	+	++	++++	—
5	—	—	—	—	+	+	++	++	++++	—

3 讨论

PRRS 是由 PRRSV 导致的猪高度接触性传染病,目前还未出现有效的防治措施,迫切需要一种能有效预防和治疗 PRRS 的药物。本研究结果表明,三仁汤复方中药制剂对 Marc-145 细胞的最大安全质量浓度为 125 g/L,即小于此质量浓度的三仁汤复方中药制剂在 Marc-145 细胞上抗病毒作用才有效,否则视为药物毒性;三仁汤复方中药制剂在体外对 PRRSV 直接灭活最小质量浓度为 15.625 g/L,抑制作用的最小质量浓度为 31.25 g/L,吸附阻断作用的最小质量浓度为 125 g/L。可见,三仁汤复方中药制剂对 PRRSV 有明显的抑制和直接灭活作用,阻断作用最弱,且直接灭活作用明显优于抑制作用和阻断作用,这为三仁汤在兽医临床上对 PRRS 的预防和治疗提供了理论依据。

本研究发现,三仁汤中药复方制剂对 PRRSV 感染有显著的灭活和抗吸附作用,可以应用于病毒性疾病的防治。其作用机制可能是中药的一些活性物质直接灭活细胞内病毒,另一些活性成分增强了细胞膜的稳定性,通过阻止病毒颗粒吸附靶细胞使

细胞受到保护,同时中药通过机体调节作用,增强机体的细胞免疫、体液免疫,激活免疫细胞诱导干扰素的产生,促使病毒不能在猪体细胞中生存、繁殖而发挥抗 PRRSV 的作用,从而提高了抗病力^[11]。中药复方是在辩证施治、确定治疗方法之后选择合适的药物,酌定用量,按组成原则妥善配伍而成的一组药物。但是中药复方粗提取物成分复杂,且有效成分不明确,在阐明其作用机制和新药的研发方面还有很多的缺陷,尚待进一步研究^[12]。本试验仅对三仁汤复方制剂体外抗 PRRSV 进行了初步研究,证明其在体外对 PRRSV 有明显的抑制和灭活作用。

本研究确定了三仁汤复方中药制剂具有直接灭活 PRRSV、抑制 PRRSV 复制的作用,起到抗 PRRSV 感染 Marc-145 细胞的作用,三仁汤复方中药制剂可以作为研发预防和治疗 PRRSV 的药物。

参考文献:

[1] 邱骏,张学东,沈志强,等. 2006 年—2008 年河南省 PRRSV 分子流行病学调查[J]. 内蒙古农业大学学报, 2011,32(1):34-39.

[2] 赵绪永,宁豫昌,赵丽,等. 多重实时定量 PCR 快速检

