



## 兽医临床科学

## 复方中药制剂对猪传染性胃肠炎病毒的体外作用研究

李元新, 容维中, 成伟伟, 杨明, 赵子惠, 周瑶, 王佳

(甘肃省畜牧兽医研究所, 甘肃平凉 744000)

**摘要:** 为了探讨中药复方制剂对猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)在PK-15细胞上增殖的体外抑制作用。试验选择由白头翁、黄柏、青皮、炒白术、焦三仙、仙鹤草、木香7味中药提取物组成4个配方的复方中药制剂, 采用同时给药、预防给药、治疗给药三种作用方式, 观察药物对病毒的抑制吸附穿入、直接杀灭和抑制复制作用。结果显示: 以1 mg/mL剂量的复方中药制剂在体外对TGEV在PK-15细胞上增殖影响, 配方2优于其他3个配方, 对TGEV有较好抑制作用, 且直接杀灭作用对细胞的保护效果最好, 细胞存活率达75% ( $P < 0.01$ ), 并筛选出了同时具有3种方式抗病毒的有效复方中药制剂。该研究结果可为后续抗TGEV药物的筛选提供科学依据。

**关键词:** 复方中药制剂; 猪传染性胃肠炎病毒; 体外作用

[中图分类号] S855.3 [文献标志码] A [文章编号] 1004-6704(2024)-06-0058-05

## Study on the Effect of Compound Chinese Medicine Preparation on Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus in Vitro

LI Yuanxin, RONG Weizhong, CHENG Weiwei, YANG Ming, ZHAO Zihui, ZHOU Yao, WANG Jia

(Gansu Institute of Animal and Veterinary Science, Pingliang, Gansu 744000, China)

**Abstract:** In order to investigate the inhibitory effect of traditional Chinese medicine compound preparation on the proliferation of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) on PK-15 cells in vitro. In the experiment, four formulas of compound Chinese medicine preparations were selected, which were composed of seven traditional Chinese medicine extracts of *Pulsatilla chinensis*, *Phellodendron chinense*, Green husk, fried *Atractylodes*, jiao Sanxian, *Herba agrimoniae*, woody fragrance. Three modes of action were adopted: adding drugs first and then adding viruses, adding drugs and viruses after a period of time, adding viruses first and then adding drugs. The inhibitory adsorption and penetration of drugs on viruses, direct killing and inhibition of replication were observed. The results showed that the compound Chinese medicine preparation at a dose of 1 mg/mL had an effect on the proliferation of TGEV on PK-15 cells in vitro. The formula 2 was superior to the other three formulas, which had a good inhibitory effect on TGEV, and the direct killing effect had the best protective effect on cells. The cell survival rate was 75% ( $P < 0.01$ ), and an effective compound Chinese medicine preparation with three ways of anti-virus was screened. The results can provide a scientific basis for the subsequent screening of anti-TGEV drugs.

**Key words:** compound Chinese medicine preparation; porcine transmissible gastroenteritis virus; action in vitro

[收稿日期] 2023-05-17

[基金项目] 甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2011-24); 甘肃省青年科技基金计划(21JR7RA718)

[第一作者] 李元新(1971-), 男, 研究员, 主要从事动物传染病的防治及疫苗的研究与开发工作。E-mail: lyx-lyx4033@sina.com

猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis of swine, TGE)是由冠状病毒科冠状病毒属的猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)引起的一种急性、高度接触性肠道传染病, 以呕吐、严重腹泻、脱水、2周龄内仔猪高死亡率为特征, 通常死于脱水和电解质代谢

紊乱<sup>[1]</sup>,给养猪业造成了严重的经济损失。

目前,国内外有关抗病毒中药的研究日益增多,从中筛选出有效成分已成为抗病毒新药研发的一个热点。中草药作为我国优势特色资源,因其活性强、安全、不会产生耐药性的特点,已日益成为治疗病毒性疾病药物研发的热点。本研究选择白头翁、黄柏、青皮、炒白术、焦三仙、仙鹤草、木香进行配伍,组成不同配方的复方中药提取物制剂。通过对猪传染性胃肠炎病毒的体外试验研究,为筛选出具有良好抗病毒作用的新型中药制剂提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 药物及试剂 白头翁提取物(10:1)、黄柏提取物(10:1)、青皮提取物(10:1)、炒白术提取物(50:1)、焦三仙提取物(10:1)、仙鹤草提取物(10:1)、木香提取物(10:1),均购自陕西省西安优硕生物科技有限公司。DMEM培养基、胰酶、犊牛血清均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2 病毒与细胞 猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)毒种由甘肃省畜牧兽医研究所病毒室提供,PK-15细胞为猪肾细胞,由甘肃省畜牧兽医研究所细胞室自行培养繁殖并保存。

1.1.3 试验动物 昆明小鼠,购于中国农科院兰州兽医研究所;家兔,购自平凉市崆峒区某兔场。

1.1.4 主要仪器 纯水仪(Millipore milli-Q II);医用净化工作台(苏州净化设备厂);二氧化碳培养箱(新加坡 ESCO)和倒置显微镜(上海光学仪器六厂)等。

### 1.2 试验方法

1.2.1 中药复方制剂的组方 针对猪传染性胃肠炎腹泻、呕吐、严重者脱水等临床症状及解剖十二指肠至空肠段肠管充气的特征,中兽医认为是气虚、热毒侵袭肠管所致,常选用补气、清热解毒、水肿收敛药物来治疗,因此选用了中草药白头翁、黄柏、青皮、炒白术、焦三仙、仙鹤草、木香进行配伍,组成不同的配方。配伍方案见表1。

表1 中药提取物制剂的组方

Table 1 Formulation of traditional Chinese medicine extract preparations

组别	中药提取物在组方中所占的含量/(g/100 mL)						
	白头翁	黄柏	青皮	炒白术	焦三仙	仙鹤草	木香
组方1	0.6	0.2	0.2	0.2	0	0.6	0.2
组方2	0.6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.6	0
组方3	0.6	0.2	0.2	0	0.2	0.6	0.2
组方4	0.6	0.2	0.2	0.4	0.4	0	0.2

按以上组方分别配制,加入注射用水到100 mL,110 °C灭菌20 min,备用。

1.2.2 病毒感染力的测定 将TGEV接种在PK-15细胞上进行培养,细胞病变(CPE)达到85%收集细胞培养物,反复冻融3次,-20 °C保存备用。将TGEV病毒液按10倍梯度稀释,分别接种在长满PK-15细胞的24孔细胞培养板上,37 °C培养,每天观察每孔细胞的细胞病变及病变程度,并记录不同梯度细胞病变孔数,按Reed-Muench法计算半数细胞感染量,并计算出TCID<sub>50</sub>来评定病毒毒力的大小。

1.2.3 复方中药制剂对细胞的最大安全浓度 将复方中药制剂溶解至DMSO中,使其终浓度为100 mg/mL,用细胞维持液稀释复方中药制剂使其终浓度为1 mg/mL(含1% DMSO),在此基础上进行倍比稀释。待96孔板铺满单层细胞,弃去培养基,按

100 μL/孔向其加入稀释好的药液,每个浓度设置4个重复,另设正常细胞对照及含有1% DMSO对照,置于37 °C体积分数为5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱培养96 h,用CCK-8法检测细胞存活率,细胞存活率大于90%的药物浓度即为该药物最大安全剂量。中药提取物注射液接种PK-15细胞,96 h观察细胞是否出现病变。

1.2.4 中药制剂在不同给药途径和作用时间对病毒抑制、杀灭作用的研究 安全给药剂量范围内,在病毒敏感细胞上采用同时给药(药物和病毒同时37 °C作用2 h);预防给药(先给药,在37 °C、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中孵育2 h后再加入病毒);治疗给药(先加入病毒,间隔2 h后再给药)3种不同的作用方式,研究药物对病毒的直接灭活作用、药物对病毒的阻断作用、药物对病毒复制的作用、药物对病毒的综合抑制作用。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒感染力测定结果

Reed-Muench 法计算得 TGEV 对细胞的 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>-4.6</sup>, 故实验采 100 TCID<sub>50</sub> 病毒攻击量。

### 2.2 复方中药制剂对 PK-15 细胞最大安全浓度

加入不同浓度药物培养 96 h 后, 按照 CCK-8 法检测细胞 OD<sub>450 nm</sub> 值, 并根据公式计算细胞存活率, 当细胞存活率大于 90% 时, 该浓度为药物最大安全剂量。

由表 2 可见, 组方 1 的最大安全浓度为 15.625

mg/mL, 组方 2、组方 3、组方 4 的最大安全浓度均为 31.25 mg/mL。

### 2.3 不同组方的中药制剂对 TGEV 感染 PK-15 细胞存活率的影响

从表 3~5 可知, 与正常对照组比较, 病毒对照组细胞均出现病变, 细胞的病变率 100%; 在安全浓度范围内, 中药复方注射剂对细胞均有保护作用, 3 种给药方式的中药复方注射剂细胞存活率均达 75% 以上, 其中配方 2 组的 3 种给药方式细胞存活率达到 100%, 说明配方 2 组具有更好的抑制病毒吸附、生物合成和阻断杀灭作用。

表 2 复方中药制剂对 PK-15 细胞的最大安全浓度

Table 2 The maximum safe concentration of compound Chinese medicine preparation on PK-15 cells

复方中药制剂	组方 1	组方 2	组方 3	组方 4
细胞最大安全浓度/(mg/mL)	15.625	31.25	31.25	31.25

表 3 复方中药注射剂在预防给药方式下对细胞的保护作用

Table 3 Protective effect of compound Chinese medicine injection on cells under preventive administration

组别	药物浓度/(mg/mL)	细胞/孔	细胞存活/孔	细胞存活率/%
正常对照组	—	8	8	100.0
病毒对照组	—	8	0	0
配方 1 组	1.0	8	6	75.0
配方 2 组	1.0	8	8	100.0
配方 3 组	1.0	8	7	87.5
配方 4 组	1.0	8	7	87.5

表 4 复方中药注射剂在同时给药下对细胞的保护作用

Table 4 Protective effect of compound Chinese medicine injection on cells under simultaneous administration

组别	药物浓度/(mg/mL)	细胞/孔	细胞存活/孔	细胞存活率/%
正常对照组	—	8	8	100.0
病毒对照组	—	8	0	0
配方 1 组	1.0	8	7	87.5
配方 2 组	1.0	8	8	100
配方 3 组	1.0	8	8	100
配方 4 组	1.0	8	8	100

表 5 中药复方注射剂在治疗给药方式下对细胞的保护作用

Table 5 Protective effect of Chinese medicine compound injection on cells under therapeutic administration method

组别	药物浓度/(mg/ml)	细胞/孔	细胞存活/孔	细胞存活率/%
正常对照组	—	8	8	100
病毒对照组	—	8	0	0
配方 1 组	1.0	8	7	87.5
配方 2 组	1.0	8	8	100
配方 3 组	1.0	8	7	87.5
配方 4 组	1.0	8	7	87.5

### 3 讨 论

中药抗病毒的活性成分一般为黄酮类、多糖类、三萜类、生物碱类等<sup>[2-5]</sup>。复方注射液的药物筛选以临床症状和病原为依据,选用清热解毒、抗菌抗病毒的中药提取物和增强机体抗病力的补气中药提取物组成,其各药物的功效如下:白头翁提取物具有清热解毒、凉血止痢的功效,可消痈散结,主治热毒血痢、疮痈肿毒<sup>[6]</sup>;黄柏提取物具有抗炎、抗氧化、抗菌、促进肠道健康、缓解应激和提高动物生产性能等功能<sup>[7]</sup>;青皮提取物富含胡桃醌、多糖、多酚等活性物质,具有抗氧化、抑菌、抗病毒、提高免疫力等活性作用。炒白术提取物具有健脾益气、燥湿利水的功效,主要用于治疗水肿、腹胀泄泻、脾虚食少等症状;另外还具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、提高免疫力和改善胃肠道健康等生物学功能;焦三仙提取物具有健脾开胃、消食导滞、行气散瘀的功效;仙鹤草具有收敛止血、止泻截疟的功效,其在临床上常被用于治疗肠炎、肠痈等消化道疾病,研究发现仙鹤草提取物能通过调节机体免疫治疗炎症性疾病,并能调控细胞凋亡、抑制癌细胞增殖;木香具有行气健脾之功效,主要用于治疗脘腹胀痛、腹泻、痢疾等,其主要化学成份有挥发油、萜类、糖苷类等多种成分,通过调节胃肠功能、抗肿瘤、抗菌、抗炎作用发挥生物学功能<sup>[8-10]</sup>。本项研究对以上 7 味中药提取物组方,共计组成 4 个配方,按照兽药典的制剂通则中注射剂规定及中药研究指导原则进行 4 个组方的中药提取物复方注射剂的制备,经对猪传染性胃肠炎毒株在细胞上的影响试验证明,组方 2 对猪传染性胃肠炎毒株有很好的抑制作用。

本试验旨在研究中草药在体外对病毒的直接作用效果。通过 3 种作用方式探讨其作用机理。第一种方式为先加药物后加病毒目的是观察药物能否与细胞膜表面受体结合而阻止病毒的吸附和进入;第二种作用方式为药物和病毒作用一段时间后再加入,目的是观察药物是否具有对病毒的直接灭活作用;第三种作用方式为先加病毒后加药物,目的是观察药物是否能进入细胞对细胞内的病毒起作用。在临床看来,第一种作用方式是药物对病毒性疾病的预防作用,而后两种作用方式是药物对病毒性疾病的治疗作用。本研究发现中药的直接杀灭作用效果

好于吸附阻断作用与复制阻断作用,与张伟民等<sup>[11]</sup>研究的黄芩苷,金修哲等<sup>[12]</sup>研究的咖啡酸对 TGEV 直接杀灭作用优于其他两种作用方式的结果相一致。黄仕千等<sup>[13]</sup>研制的复方金连菊中药制剂溶液浓度在 62.5~500 mg/mL 范围对 TGEV 具有极显著的直接杀灭作用( $P < 0.01$ ),均与本研究结果相一致。

在兽医科研方面,应用体外细胞培养技术研究中草药的药效在国内外报道相对很少,而用于研究复方中药制剂抗 TGEV 活性及作用机理的相关报道更少。本试验研究以 3 种作用方式在细胞水平对抗 TGEV 的复方中药制剂配方进行筛选,并首次证明白头翁、黄柏、青皮、炒白术、焦三仙、仙鹤草、木香复方制剂具有体外抗 TGEV 的效果。但是体外试验的结果不能完全等同于体内的治疗效果,关于其体内抗病毒效果及其复方制剂的安全性试验等,均需进一步试验加以验证。

### 4 小 结

本研究由白头翁、黄柏、青皮、炒白术、焦三仙、仙鹤草、木香 7 味中药提取物组成 4 个配方的中药提取物复方注射剂,采用体外抗病毒药效试验以 3 种给药方式,以 1 mg/mL 剂量对 TGEV 影响研究,结果显示配方 2 优于其它 3 个配方,且对 TGEV 有较好的抑制作用。

#### 参考文献:

- [1] ZHAO S S,GAO J K,ZHU L Q,et al. Transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus infection induces dramatic changes in the tight junctions and microfilaments of polarized IPEC-J2 cells [J]. *Virus Research*,2014,192:34-45.
- [2] 曹柏营,姜秀娟,戚颖欣,等. 藤本豆豆荚总黄酮对小鼠免疫功能的影响 [J]. *食品与机械*,2017,33(1):158-162.  
CAO B Y,JIANG X J,QI Y X,et al. Effect of total flavonoids from perennial Lablab sp. Hull on immune function in mice [J]. *Food & Machinery*,2017,33(1):158-162.
- [3] CAO Y G,HAO Y,LI Z H,et al. Antiviral activity of polysaccharide extract from Laminaria japonica against respiratory syncytial virus [J]. *Biomedicine & Pharma-*

- cotherapy, 2016, 84; 1 705-1 710.
- [4] REGUEIRO-REN A, LIU Z, CHEN Y, et al. Discovery of BMS-955176, a second generation HIV-1 maturation inhibitor with broad spectrum antiviral activity [J]. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2016, 7 (6): 568-572.
- [5] LU Z, CHANG L L, DU Q, et al. Arctigenin induces an activation response in porcine alveolar macrophage through TLR6-NOX2-MAPKs signaling pathway [J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 475.
- [6] 宋 晓, 令狐庆. 白头翁汤加减治疗轻度溃疡性结肠炎的临床疗效及对血清炎症因子、免疫指标的影响分析 [J]. 中国实用医药, 2023, 18(24): 123-126.
- SONG X, LINGHU Q. Clinical efficacy of modified Baitouweng Decoction in the treatment of mild ulcerative colitis and its influence on serum inflammatory factors and immune indexes [J]. China Practical Medicine, 2023, 18(24): 123-126.
- [7] 高 阳, 马 雪, 杜 鑫. 黄柏提取物的生物学功能及其在动物生产中的应用 [J]. 饲料工业, 2024, 45(1): 61-66.
- GAO Y, MA X, DU X. Biological functions of phellodendri extract and its application prospects in animal productions [J]. Feed Industry, 2024, 45(1): 61-66.
- [8] 王 磊, 王 彬, 王若晨. 白术提取物生物学功能及其在动物生产中的应用研究进展 [J]. 饲料研究, 2023, 46(1): 160-163.
- WANG L, WANG B, WANG R CH. Research progress on biological function and application of extracts of *Atractylodes atractylodes* in animal production [J]. Feed Research, 2023, 46(1): 160-163.
- [9] 张慧兰, 郭文晖, 王 旭, 等. 仙鹤草化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析 [J]. 中草药, 2023, 54(16): 5 399-5 409.
- ZHANG H L, GUO W H, WANG X, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological action of *Agrimoniae Herba* and predictive analysis on quality marker [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(16): 5 399-5 409.
- [10] 郑加梅, 尚明越, 王嘉乐, 等. 木香的化学成分、药理作用、临床应用研究进展及质量标志物预测 [J]. 中草药, 2022, 53(13): 4 198-4 213.
- ZHENG J M, SHANG M Y, WANG J L, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of *Aucklandia Radix* and prediction analysis on Q-Marker [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(13): 4 198-4 213.
- [11] 张为民, 胡 蓉, 郭抗抗, 等. 9 种中药成分对猪传染性胃肠炎病毒体外增殖的抑制作用 [J]. 中国兽医学报, 2015, 35(5): 799-803.
- ZHANG W M, HU R, GUO K K, et al. Nine kinds of Chinese traditional medicine components inhibit proliferation of swine transmissible gastroenteritis virus in vitro [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(5): 799-803.
- [12] 金修哲, 何 雷, 程相朝, 等. 6 种中药成分对猪传染性胃肠炎病毒的体外抑制作用 [J]. 中国农业科学, 2016, 49(11): 2 234-2 244.
- JIN X ZH, HE L, CHENG X CH, et al. Effect of six Chinese traditional medicine components on inhibiting swine transmissible gastroenteritis virus in vitro [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(11): 2 234-2 244.
- [13] 黄仕千, 农 扬, 杨昭远, 等. 复方金莲菊制剂对 PRRSV、TGEV 体外作用的研究 [J]. 中国畜禽种业, 2020, 16(6): 80-83.
- HUANG SH Q, NONG Y, YANG ZH Y, et al. Study on the effect of compound Jinlianju preparation on PRRSV and TGEV in vitro [J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2020, 16(6): 80-83.

欢迎订阅 2025 年《畜牧兽医杂志》

网址: <http://xmsyzz.ijournals.cn>