

抗禽流感病毒药物的活性筛选研究

廖金¹ 范泉水^{2*} 李作生² 邱薇² 赵勤实³ 于福先¹ 宋贵强¹

聂福平¹ 龙贵伟¹ 任玉莹¹ 谢红良¹ 余方芳¹ 张泉鹏¹

(1 云南农业大学动物科技学院 云南昆明 650201 2 成都军区联勤部军事医学研究所 云南昆明 650032 3 中国科学院昆明植物研究所 云南昆明 650201)

【摘要】目的:观察药物对禽流感病毒抑制作用。方法:固定病毒稀释药物的微量中和实验法,采用体外细胞培养技术,将系列稀释的药物与固定量病毒在细胞上感作后,置适宜条件培养5~7 d,同时设相应对照,以病毒所致的特异性细胞病变(CPE)作为观察指标,用Reed-Muench法计算中和结果,凡药物能保护细胞不出现特异性病变的定为该药对病毒有抑制作用,测定治疗指数TI值。结果:药物能减少H5N1型的禽流感病毒引起的CPE,药物对照实验也出现同样结果。结论:药物对H5N1型的禽流感病毒有抑制作用。

关键词:禽流感;细胞病变CPE;病毒毒力

流行性感胃是由甲(A)、乙(B)、丙(C)三型病毒分别引起的急性呼吸道传染病。禽流感病毒具有A型抗原,属于A型流感病毒。禽流感病毒基因具有严格的宿主特异性,即在一般情况下,禽与人流感病毒不能直接相互传播。禽流感病毒的特点是其抗原性容易发生变异,常造成流行和暴发流行。我国是禽流感的多发地,禽流感的流行给我国带来了巨大的经济损失^[1,2]。目前禽流感疫苗接种是好的预防办法,没有理想特效的抗病毒药物。本试验根据在药物检测中常用的中和试验法(动物中和试验,鸡胚中和试验和细胞中和试验法),依据禽流感病毒特性,选择了组织细胞进行试验,因为它较实验动物和鸡胚方便,试验重复性好,不存在个体差异问题。近年来应用微量培养板上培养的单层细胞进行中和试验,比一般的试管法简便,且易于判定结果^[3]。本试

验所研究的待测药物是中国科学院昆明植物研究所生产的一种抗流感病毒制剂,我们应用这些药物对禽流感病毒抑制作用进行了如下研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 待测药物:试验前编号登记、标明药名、来源、批号、重量、溶解度和保存条件等。见表1。

1.1.2 细胞株:选用对禽流感病毒敏感的传代细胞株,MD-CK细胞。

1.1.3 病毒株:禽流感病毒,由在实验室分离的禽流感H5N1亚型毒株(2003年)。

1.1.4 仪器:37℃ 5% CO₂ 培养箱,倒置显微镜等,本试验研究必须在生物安全3级试验室进行,毒种的管理使用必须符合国家的有关规定。

* 为通讯作者。

定营养为分娩后泌乳做准备。妊娠期如营养不足,常可造成胚胎被吸收或流产,或造成胎儿某些部位的发育受阻,即使以后改善饲养也很难纠正。但是,如果营养水平过高,不仅会造成生产上的浪费,且容易导致母羊流产。因此,在山羊妊娠期补饲的营养水平应当适宜。

从试验来看,云岭黑山羊母羊补饲不同能量水平的营养物质,对母羊的增重有不同的效果,对母羊的生产性能的影响也不相同。补饲能量水平最高的母羊,增重没有第二组大,且流产率大,不能合理利用饲料,造成了浪费;母羊补饲能量水平不同的日粮对羔羊的初生重也有影响。经统计分析,随着母羊补饲能量水平的降低,羔羊的初生重有下降的趋势,但羔羊初生重在各组之间差异不显著($P>0.05$)。其原因可能是母体内胚胎发育获得养分分配有优先权(及维持生存进行的一种自我调节作用),母羊优先供应营养物质保证胚胎的正常发育,其次则为积存营养物质,增加体重为泌乳作准备,所以羔羊初生重受日粮水平影响小。

在本试验中,在母羊补饲不同能量水平的情况下,虽然云岭黑山羊羔羊的初生重差异不显著,但可看出,随着补饲能量水平的降低,羔羊的初生重亦有下降,但下降的幅度低于母羊的增重幅度。这表明妊娠母羊对营养变化较敏感,但对胎儿的生长发育具有较强的缓冲作用。因此,补饲不同能量水平饲料对母羊妊娠期本身增重的影响要比对羔羊初生重的影响更为强烈和明显。

4 结论

4.1 在本次试验条件下,对母羊补饲饲料中能量水平为110%NRC推荐量,平均月增重为2.342 kg,而且增长幅度稳定,效果最好。

4.2 对母羊补饲饲料中能量水平为110%NRC推荐量,母羊流产率低,羔羊初生重大,体重均一,综合效果最好。

参考文献

- [1]刘振武,肖亚,余一心,等.农养本地山羊补饲育肥试验[J].中国畜牧杂志,2003,(2):26~28
- [2]夏桂林,陆晓平,杨育才,等.云岭黑山羊补饲育肥试验[J].中国畜牧杂志,2004,11(40):10~53
- [3]Langlands JP. The intake and production of lactating, Merino ewes and their lambs grazed at different stocking rates[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1977, 28: 133~142
- [4]候广田,热西旦,车新辉,等.不同营养水平对当年羔羊育肥效果的影响[J].草食家畜,2001,6(2):30~33
- [5]Maxwell TJ., Doney TP., Milne JA., et al. The effect of rearing type and prepartum nutrition on the intake and performance of lactating Greyface ewes at pasture [J]. Journal of Agricultural Science Cambridge, 1979, (92): 165~174
- [6]Agculture and Food Research Council (AFRC). Technical Committee Responses to Nutrients. Report No5. Nutritive requirements of ruminant animals: energy [J]. Nutrition Abstracts & Reviews, 1990, Series B 60: 729~804
- [7]杨胜. 家畜饲养试验指导 [M]. 北京: 农业出版社, 1979
- [8]魏时来,淡瑞芳,李发弟,等.不同营养水平全饲粮颗粒饲料肥育羔羊的效果[J].中国草食动物,2002,(1)3~6
- [9]彭玉麟,贾志海,卢德勋,等.不同蛋白质水平的日粮对内蒙古白绒山羊消化代谢的影响[J].畜牧兽医学报,2002,33(4):321~326
- [10]Zinn RA., PN Owens. Measurement of feed protein degradability by in sacco and other methods [J]. Journal of Animal Science, 1986, 42: 499~503
- [11]Bach AM., SD. Stern, NR. Merchen, et al. Evaluation of selected mathematical approach to the kinetics of protein degradation in situ [J]. Journal of Animal Science, 1998, 76: 2885~2893

表1 待测样品记录

待测药物代号	重量 (mg)	样品名及提取方法	稀释度 (ml)	颜色	性状
ZHI-001	500	铁芒萁丙酮浸液, 乙醇水(1:1) MCl 脱色, 乙醇水(1:1)	10	棕色	粉末
ZHI-002	500	铁芒萁丙酮浸液, 乙醇水(1:1)	10	黄褐色	小颗粒状
ZHI-003	500	乌毛蕨根 70% 丙酮浸液, 乙醇水(1:1)	10	橙黄色	粉末
ZHI-004	500	乌毛蕨叶 70% 丙酮浸液, 乙醇水(1:1)	10	黄绿色	粉末
ZHI-005	500	早和树 70% 丙酮浸液, 乙醇水(1:1)	10	黄绿色	粉末
ZHI-006	500	贯众 70% 丙酮浸液, 乙醇水(1:1)	10	棕色	粉末
ZHI-007	100	3,5-二咖啡酰基奎宁酸, 乙醇	1	米黄色	粉末
ZHI-008	100	灯盏乙素, DMSO	1	米黄色	粉末
ZHI-009	100	N-甲基团石杉碱乙, 乙醇	5	乳白色	粉末
盐酸吗啡	2 ml			无色	液体

备注:根据样品溶解情况,严格遵守无菌操作,并经过严格的无菌过滤器过滤(过滤器孔径为 0.22 nm),过滤除菌后,接种 25 μ l 样品于装有 LB 细菌生长液的试管中,37 $^{\circ}$ C 水浴摇动 48 h,检验样品无菌时,放 4 $^{\circ}$ C 保存备用。所有溶解了的药物在进行试验时,均配成 1% 的浓度,再从此浓度起依次 10 倍稀释。盐酸吗啡为试验对照药。

1.2 方法

1.2.1 病毒毒力测定:用细胞维持液稀释病毒,连续 10 倍系列稀释,设 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 7 个滴度,分别接种于每孔含 100 μ l MDCK 细胞液的 96 孔塑料板的 4 个孔内。同时设不接种的细胞孔对照。放 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱,培养 5~7 d,观察细胞病变(CPE)出现孔数,计算毒价,用 Reed - Muench 法计算 TCID₅₀。100 TCID₅₀/ml 用于实验^[3]。

1.2.2 药物对细胞毒性实验:以细胞病变为观察指标,观察 5~7 d,药物设 10、1、0.1、0.01、0.001 五个浓度进行测定,将培养板已长成细胞单层的孔内培养液倒掉,加入不同稀释度的药液 100 μ l,每个稀释度药液各做 4 孔,同时设正常细胞对照、病毒对照及阳性药物对照。将培养板置 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱中培养 5~7 d,每日用倒置显微镜观察药液对细胞的影响,以细胞不出现病变的最小稀释度作为判定该药对细胞的无毒界限,然后用 Reed - Muench 法求出药物对细胞无毒的最大浓度(TD₀)和半数中毒浓度(TD₅₀)。试验重复 3 次。选对细胞无毒性的药物最大浓度供进一步实验用^[3,4]。

1.2.3 待测药物抑制流感病毒实验:经预试验求出病毒的 TCID₅₀和药物的 TD₀后,在禽流感病毒的敏感细胞模型上进行抗病毒活性筛选,适宜的培养液及培养条件下,在 96 孔板培养 MDCK 细胞,细胞长成单层后,倒掉培养液,加入待测药物,只做一个最大无毒浓度(TD₀),4 个孔。37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱作用 2 h 后,倾出药物,然后每孔加 100 μ l (100 TCID₅₀左右)禽流感病毒感染,吸附 2 h 后,观察。试验设病毒对照、细胞对照、阳性药物对照。置 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱中培养 5~7 d,每日在倒置显微镜下镜检一次,观察细胞病变。细胞病变程度的判断,以病毒对照孔出现病变达 75%,显微镜观察对细胞的致病作用,将给药孔与病毒对照孔进行比较,如最大无毒浓度药物无抑制病毒 CPE 作用则不继续做,如有抑制作用须进行补充试验。最大无毒浓度(TD₀)的药物如有抗病毒作用,应进行补充筛选试验。模型和培养条件同上,试验设阳性药物对照组、病毒对照组及正常细胞对照组。选用最大无毒浓度(TD₀)药液,10 倍系列稀释的 4 个浓度,每浓度 4 孔,每孔 100 μ l,分别加入未感染或感染的细胞培养孔内,37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱吸附 2 h,倾出药物,然后每孔加入 100 TCID₅₀左右病毒感染,再吸附 2 h,用倒置显微镜观察,记录细胞病变程度。当病毒对照组孔病变达 4+ 时可终止试验,判定药物的效果。试验重复 3 次^[3,5]。用 CPE 法,对各组进行比较并计算产生 50% 病变抑制的药物

浓度,即药物的半数有效量(IC₅₀),并计算治疗指数(TI)。TI = 半数中毒浓度(TD₅₀)/半数有效浓度(IC₅₀)。

2 结果

2.1 病毒毒力测定结果为 H5N1 病毒稀释 10^{-5} 时有 50% 细胞产生病变,100 个 TCID₅₀为 10^{-3} 。结果见表 2。

表2 病毒毒力测定结果

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	正常细胞对照
+	+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	-	-

备注:测病毒毒价共 7 个浓度,每一列代表一个浓度,其中第 8 列为正常细胞对照。记录中“+”代表有细胞病变;“-”代表无细胞病变。

2.2 药物毒性试验结果以及待测药物对禽流感病毒抑制作用的试验结果见表 3。

表3 样品对禽流感病毒抑制作用

待测药物代号	药物最大无毒浓度(TD ₀)	药物半数中毒浓度(TD ₅₀)	药物的半数有效量(IC ₅₀)	药物治疗指数(TI)
ZHI-001	1:10000	1:3162	1:3162777	1
ZHI-002	1:10000	1:3162	1:4677351	1.48
ZHI-003	1:10000	1:3162	1:31623	1
ZHI-004	1:10000	1:3162	1:4677351	1.48
ZHI-005	1:10000	1:3162	1:5128613	1.62
ZHI-006	1:10000	1:3162	1:158489	0.50
ZHI-007	1:100000	1:31623	1:57543993	1.82
ZHI-008	1:100000	1:31623	1:51286183	1.62
ZHI-009	1:100	1:31.6	1:36308	0.01
盐酸吗啡	1:1000	1:316.2	1:31623	9.99

备注:用 Reed - Muench 法求出 TD₅₀及 IC₅₀,TI = 半数中毒浓度(TD₅₀)/半数有效浓度(IC₅₀)。TI 值越高的药物对病毒的抑制作用越好。

3 讨论

由病毒引起的传染病,约占甲、乙、丙类传染病的 1/4,如病毒性肝炎、艾滋病、流行性出血热、流行性感冒以及由疱疹病毒引起的各种疾病,这些病毒传染性强,分布广泛,但缺少有效的治疗药物。组织培养技术已成为研究抗病毒药物重要手段,其特点是操作方便,受非特异因素影响较小,能适应大量药物的初筛及抗病毒机制的研究。抗病毒药物的效果用抑制细胞病变、抑制病毒感染的滴度来测定。本研究采用体外细胞培养技术,模拟临床应用管外给药法,对待测药物抑制流感病毒活性进行的鉴定,结果可靠。证明待测药物对 H5N1 型禽流感病毒均有抑制作用,但治疗指数偏低。在临床使用的抗禽流感病毒有效药品并不多,故迫切需要加紧研究高效、低毒、选择性强的抗病毒药物,以适应临床需要^[1,2,6]。

参考文献

- [1]刁有祥,张万福.禽病学[M].中国农业出版社,1996
- [2]肖传发.浅谈禽流感的防治[J].山东家禽,2002,(2):10~12
- [3]殷霞,刘景华.动物病毒学[M].科学出版社(第二版)
- [4]黄劲,邓永荣,等.中药制剂对禽流感病毒 H9N2、新城疫病毒,传染性支气管炎病毒和鸡支原体的攻毒保护试验[J].动物医学进展,2005,26(12):83~86
- [5]杨立波,李振慧,王保群.莲花清瘟胶囊治疗流行性感冒 280 例疗效观察[J].疑难病杂志,2005,4(5):276~278
- [6]杨松涛,等.虎源 H5N1 亚型禽流感病毒感染小鼠模型的建立[J].中国病毒学,2006,7~27(4):353~357
- [7]缪小群,陈志华,陈云,等.呼感清对鸡实验性禽流感的防治效果实验[J].畜禽业,2006,7~202
- [8]廖明,等.H5N1 亚型禽流感病毒对鸡的致病性研究进展[J].华南农业大学学报,2006,27(3)