

文章编号:1673-9469(2011)02-0087-04

## 冬虫夏草菌丝体水提物的抗新城疫病毒作用

刘彦威,王斌,刘娜,刘利强,林燕  
(河北工程大学农学院,河北邯郸 056021)

**摘要:**通过低温水浸提取方法,获取冬虫夏草菌丝体水提物。采用 MTT 的方法和观察细胞病变 (CPE) 的方法分别研究了水提物毒性和抗病毒作用。结果显示水提物浓度  $\leq 0.5\text{mg/mL}$  时,对 Vero 细胞无毒性,  $0.5\text{mg/mL}$  水提物与新城疫病毒作用,或预处理 Vero 细胞,均能抑制新城疫病毒在细胞上病变的形成。提示水提物具有直接抗新城疫病毒和预防新城疫病毒感染的作用。

**关键词:**冬虫夏草菌丝体;水提物;新城疫病毒

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

## Effects of water extract from *Cordyceps sinensis* mycelium on anti - newcastle disease virus

LIU Yan-wei, WANG Bin, LIU Na, LIU Li-qiang, LIN Yan  
(College of Agriculture, Hebei University of Engineering, Hebei Handan 056021, China)

**Abstract:** The water extract was obtained by aqueous leaching in low - temperature from *Cordyceps sinensis* mycelium. The toxicity and antiviral activity of water extract were investigated by using MTT method and observing cytopathic (CPE), respectively. The results showed that the concentration of water extract  $\leq 0.5\text{mg/ml}$  was no toxicity on Vero cells. Either pre - mixed the water extract with newcastle disease virus or with Vero cells for 1 hour before cell cultivation assay was able to inhibit cytopathic effect of newcastle disease virus significantly. The research indicates that the water extract has direct and preventive effect against newcastle disease virus infection.

**Key words:** *Cordyceps sinensis* mycelium; water extract; newcastle disease virus

新城疫 (Newcastle disease, ND), 又称为亚洲鸡瘟, 是由新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 引起的一种高度接触性传染病, 本病自 1926 年首次发生以来, 已成危害养禽业发展的最严重的禽病之一。尽管对该病在诊断与防制方面进行了大量的研究, 并取得了较大的成就, 但目前尚无有效的治疗方法<sup>[1-2]</sup>。

冬虫夏草是一种名贵的中草药材, 含有多种药理活性成份, 比如核苷、多糖、甘露糖等。冬虫夏草具有多种生物活性: 抗氧化、免疫调节、抗肿瘤, 抗菌, 调节血脂等<sup>[3-4]</sup>。目前, 冬虫夏草的抗病毒活性报道较少。Ohta 等<sup>[5]</sup>从北冬虫夏草中分离出一种酸性多糖, 发现该多糖可以降低甲型流感病毒 (influenza A virus) 感染小鼠肺泡灌洗液中流感

病毒滴度, 升高血清中 TNF - alpha 和 IFN - gamma 等细胞因子的水平, 具有较强的抗流感病毒的活性。最近, 实验证明冬虫夏草提取物具有抗人巨细胞病毒活性和抗甲型流感病毒的活性<sup>[6]</sup>。鉴于此, 本课题拟研究冬虫夏草是否具有抗鸡 NDV 活性。由于野生冬虫夏草的昂贵, 本研究选用市面上可以买到的人工冬虫夏草菌丝体为研究对象, 采用低温下水浸提的方法, 获取冬虫夏草菌丝体粗提物, 检测其抗鸡 NDV 活性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 仪器和试剂

DMEM 培养基 (Gibco); MTT (Sigma); Vero 细

收稿日期: 2011-01-14

作者简介: 刘彦威 (1963-), 男, 河北辛集市人, 教授, 博士, 从事动物病理方面的研究。

胞和新城疫病毒由中国农业大学传染病室惠赠。酶标仪(MB-IV):北京艾普生物设备有限公司,CO<sub>2</sub>培养箱(BC-J80S):上海博迅实业有限公司医疗设备厂,倒置显微镜。

## 1.2 方法

### 1.2.1 冬虫夏草菌丝体水提物的配制

(1)在超净工作台中,取干燥菌丝体,放高速组织捣碎机,加入100mL水。温度控制在4℃,置摇床上浸提105rpm,每次浸提24h,8000rpm离心留取上清,共浸提3次,每次均加入100mL水,合并上清后,250mL试剂瓶分装。

(2)放入-40℃冰箱,冷冻,真空冷冻干燥机冷冻干燥。得到浸膏后放-40℃冰箱保存,备用。

(3)取冻干菌丝体水提物,加入水,混匀,溶解后,用0.22μm微孔滤膜过滤,放4℃冰箱备用,用细胞培养液(DMEM)稀释成使用液。

### 1.2.2 MTT 检测

(1)待培养的Vero细胞铺满后,吸掉培养液上清,清洗两次,加入配制好的0.05%胰酶消化贴壁细胞,待细胞变圆脱落后,加入含10%FBS的培养液终止反应。

(2)将细胞吹匀后,计数,转入96孔板(104细胞/孔),其中第1列与第12列,加入不含细胞的培养液,放入CO<sub>2</sub>培养箱,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养。

(3)24h后,观察细胞,如呈较好分布,则加入等量梯度稀释药物,其中第11列不加药物,作为对照。

(4)72h后,每孔分别加入含5mg/ml MTT的培养液30μl,孵育6h。

(5)吸干上清后,加入DMSO 150μl,在振荡器上混匀5min。

(6)用酶标仪读板,记录OD570nm值。

### 1.2.3 病毒液TCID<sub>50</sub>(半数感染量)的测定

吸取已培养好Vero细胞的96孔培养板(Costar)的培养液,将新城疫病毒(F48株)用维持液分别配成原液的10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-10</sup>悬液10管,接种在Vero细胞板中1h,吸弃病毒悬液,加维持液,每浓度梯度重复6孔,设空白对照和细胞对照。放于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,72h后观察结果。CPE法判断细胞病变程度见表1。按Reed-Muench公式计算TCID<sub>50</sub>。新城疫病毒的TCID<sub>50</sub>为10<sup>-5</sup>。

表1 细胞病变程度判定标准

Tab.1 Standards for determining of cytopathic effect

病变程度	病变
-	无CPE
+	25%的细胞出现CPE
++	50%的细胞出现CPE
+++	75%的细胞出现CPE
++++	100%的细胞出现CPE

### 1.2.4 水提物对新城疫病毒的直接作用

将TCID<sub>50</sub>(10<sup>-5</sup>)、10TCID<sub>50</sub>(10<sup>-4</sup>)、100TCID<sub>50</sub>(10<sup>-3</sup>)的新城疫病毒悬液分别与水提物混合,37℃水浴1h,加入培养Vero细胞的96孔细胞板中作用1h,吸弃液体,加维持液,每组重复6孔,并设无毒浓度药品对照(仅加水提物)、细胞对照(病毒和水提物均不加)、病毒对照(仅接种病毒)。放于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,72h用CPE法观察结果。

### 1.2.5 水提物对新城疫病毒的预防作用

将培养好Vero细胞的96孔板中的液体吸出,加入水提物100μL37℃作用1h,吸弃液体,加TCID<sub>50</sub>、10TCID<sub>50</sub>、100TCID<sub>50</sub>的新城疫病毒悬液100μL37℃作用1h,吸弃液体,并设无毒浓度药品对照、细胞对照、病毒对照。放于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中作用48h,用CPE法观察结果。

### 1.2.6 水提物对新城疫病毒的治疗作用

将培养Vero细胞的96孔板中的液体吸出,加TCID<sub>50</sub>、10TCID<sub>50</sub>、100TCID<sub>50</sub>的新城疫病毒悬液100μL37℃作用1h,吸弃液体,加入水提物100μL37℃作用1h,吸弃液体,并设无毒浓度药品对照、细胞对照、病毒对照。放于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中作用48h,用CPE法观察结果。所得结果进行秩和检验中的Ridit检验。

## 2 结果

### 2.1 浸膏的特征

菌丝体经过粉碎、浸提、真空冷冻干燥后,形成浸膏,为褐色,较粘稠,但用水很容易将其融解,得到褐色的储备液(100mg/mL),最后用培养液稀释。

### 2.2 水提物的浓度与毒性

在选择冬虫夏草水提物的测试浓度时,当冬虫夏草水提物浓度为1mg/mL时,对细胞具有代

谢毒性,而为 0.1mg/mL 时,无代谢毒性。所以我们选择 2mg/mL,进行 4 倍系列稀释,这样可以保证有产生细胞毒性的浓度,也可保证较小的组间差别,而且梯度差别较大,OD 值上可以表现出一定的差距。

当冬虫夏草水提物浓度为 2mg/mL 时,在镜下观察细胞形态,细胞边界清晰,但是有些细胞已经悬浮,细胞形态严重改变,胞质中有异物感,细胞发生严重的细胞病变。而在 0.5mg/mL 的浓度下。与未添加药物的细胞相比,镜下观察,没有变化。同时采用 MTT 法,当冬虫夏草水提物浓度  $\leq$  0.5mg/ml,发现细胞的活性基本没有变化(表 2)。

表 2 菌丝体水提物的细胞毒性试验

Tab.2 Cytotoxicity assay of water extract from mycelium of *Cordyceps sinensis*

水提物浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	OD ± SD
0	0.4512 ± 0.0293
2	0.2034 ± 0.0302
0.5	0.4361 ± 0.0283
0.125	0.4856 ± 0.0245
0.031	0.5210 ± 0.3124
7.812 × 10 <sup>3</sup>	0.4912 ± 0.0218
1.953 × 10 <sup>3</sup>	0.4875 ± 0.0195
4.882 × 10 <sup>4</sup>	0.4784 ± 0.0190

2.3 对病毒的作用

(1)直接杀灭作用。水提物在 100TCID<sub>50</sub> 病毒(10<sup>-3</sup>)时,对病毒抑制作用不明显(表 3),在 10TCID<sub>50</sub> 病毒(病毒量为 10<sup>-4</sup>)时,明显抑制 Vero 细胞 CPE 形成,与病毒对照组统计学有显著性差异(P < 0.05),在 1TCID<sub>50</sub> 病毒(毒量为 10<sup>-5</sup>)时,基本可抑制 Vero 细胞 CPE 形成。病毒对照有明显的细胞病变出现,而药物对照未见细胞病变,提示药物对细胞没有毒性作用。细胞对照也未出现病变。

表 3 水提物抗病毒的直接杀灭作用

Tab.3 Direct antiviral effect of Bran lectin on virus infection

病变 CPE	水提物			病毒对照			细胞 对照	药物 对照
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>		
++++	6	0	0	6	4	1	0	0
+++	0	0	0	0	2	4	0	0
++	0	6	0	0	0	1	0	0
+	0	0	1	0	0	0	0	0
—	0	0	5	0	0	0	6	6

(2)预防作用。水提物在 100TCID<sub>50</sub> 病毒(10<sup>-3</sup>)和 10TCID<sub>50</sub> 病毒(10<sup>-4</sup>)时,对病毒抑制作用不明显(表 4),在 1TCID<sub>50</sub> 病毒(10<sup>-5</sup>)时,明显抑制 Vero 细胞 CPE 形成,与病毒对照组统计学有显著性差异(P < 0.05)。病毒对照有明显的细胞病变出现,而药物对照未见细胞病变,提示药物对细胞没有毒性作用。细胞对照也未出现病变。

表 4 水提物对病毒的预防作用

Tab.4 Preventive effect of Bran lectin on virus infection

病变 CPE	水提物			病毒对照			细胞 对照	药物 对照
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>		
++++	6	0	0	6	4	2	0	0
+++	0	5	0	0	2	3	0	0
++	0	1	0	0	0	1	0	0
+	0	0	2	0	0	0	0	0
—	0	0	4	0	0	0	6	6

(3)治疗作用。水提物对不同浓度的病毒均没有治疗作用(表 5)。病毒对照有明显的细胞病变出现,而药物对照未见细胞病变,提示药物对细胞没有毒性作用。细胞对照也未出现病变。

表 5 水提物对病毒的治疗作用

Tab.5 Therapeutic effect of Bran lectin on virus infection

病变 CPE	水提物			病毒对照			细胞 对照	药物 对照
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>		
++++	6	0	0	6	4	1	0	0
+++	0	6	2	0	2	4	0	0
++	0	0	4	0	0	1	0	0
+	0	0	0	0	0	0	0	0
—	0	0	0	0	0	0	6	6

3 结论

1)大体积溶剂低温浸提,可以充分溶解成份,从而减小了低温下某些成份溶解速度慢,溶解度低的弊端。

2)0.5mg/ml 冬虫夏草水提物对细胞的代谢无影响。

3)体外实验发现水提物对病毒具有预防和抑制作用,而对细胞没有毒性,是一种低毒的体外抗新城疫病毒物质,具有潜在的抗鸡新城疫病毒临床应用价值。

参考文献:

[1] DOUGLAS KO, LAVOIE MC, KIM LM, et al. Isolation and

- genetic characterization of avian influenza viruses and a Newcastle disease virus from wild birds in Barbados: 2003 - 2004 [J]. *Avian Dis*, 2008, 51(3): 781 - 787.
- [2] QIN Z M, TAN L T, XU H Y, et al. Pathotypical characterization and molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005 [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 46(2): 601 - 11
- [3] CHIH F K, CHENG C C, CHIOU F L, et al. Abrogation of streptococcal pyrogenic exotoxin B - mediated suppression of phagocytosis in U937 cells by *Cordyceps sinensis* mycelium via production of cytokines [J]. *Food and Chemical Toxicology*. 2007(45): 278 - 285.
- [4] CHIH F K, CHENG C C, Yueh H L, et al. *Cordyceps sinensis* mycelium protects mice from group A streptococcal infection [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2005(54): 795 - 802.
- [5] OHTA Y, LEE J B, HAYASHI K, et al. In vivo anti - influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans [J]. *J Agric Food*, 2007, 55 (25): 10194 - 10199.
- [6] 秦雪. 冬虫夏草水提物抗人巨细胞病毒研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2009.

(责任编辑 马立)

(上接第 70 页)

#### 4 结论

1) 利用模糊线性规划模型求解模糊时差, 计算量较小, 得到的模糊时差始终为正值并且是凸模糊数, 具有理论意义。

2) 模糊时差的中的模值与阈值均不影响后续工作, 为求解模糊时间参数开辟了一条新的途径。

#### 参考文献:

- [1] 李万庆, 孟文清. 工程网络计划技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [2] MCMAHON C S. Using PERT as an approximation of fuzzy projection network analysis [J]. *IEEE Transaction on Engineering Management*, 1993, 40(2): 146 - 153.
- [3] 李若刚, 王国祥, 李跃. 基于网络计划模型中的时间不确定性的讨论 [J]. *系统工程与电子技术*, 1997, 19(8): 40 - 45.
- [4] KANMOHAMMADI S, RABIMI F, SHARIFIAN M B. Analysis of different fuzzy CPM network planning procedures [C]. *Proceedings of the 2003 10th IEEE international Conference on Electronics, Circuits, and Systems. Sharjah, United Arab Emirates*, 2003: 1074 - 1077.
- [5] 褚春超, 郑丕谔, 王德东. 复杂工序关系的模糊网络计划分析与建模 [J]. *天津大学学报*, 2006, 39(5): 631 - 636.
- [6] 张海涛, 何亚伯. 一种新的模糊网络计算方法 [J]. *四川建筑科学研究*, 2007, 33(2): 204 - 206.
- [7] 胡劲松. 模糊环境下大型工程项目网络计划方法研究 [J]. *工程学报*, 2002, 16(1): 15 - 17.
- [8] 胡宝清. 模糊理论基础 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2004.
- [9] DUBOIS D, PARADE H. Possibility theory: An approach to computerized processing of uncertainty [M]. New York: Plenum, 1988.
- [10] ROMMELANGER H J. Network Analysis and information flows in fuzzy environment [J]. *Fuzzy Sets and Systems*, 1994, 67(1): 119 - 128.
- [11] 刘新旺, 达庆利. 模糊关键线路的近似算法 [J]. *东南大学学报*, 1997, 27(5): 119 - 122.

(责任编辑 马立)