

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/122 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610156354.0

[43] 公开日 2007 年 8 月 22 日

[11] 公开号 CN 101019843A

[22] 申请日 2006.12.31

[21] 申请号 200610156354.0

[71] 申请人 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所

地址 750000 甘肃省兰州市七里河区小西湖
硷沟沿 335 号

[72] 发明人 梁剑平 王曙阳 何荣智 浦秀瑛
邵伍军 王学红 尚若锋 崔 颖
华兰英

[74] 专利代理机构 北京中恒高博知识产权代理有限公司

代理人 夏晏平

权利要求书 1 页 说明书 18 页

[54] 发明名称

金丝桃素在防治猪的 PC 和 PRRS 中的应用

[57] 摘要

本发明为金丝桃素在防治猪的 PC 和 PRRS 中的应用, 涉及兽医药领域, 近年来猪的 PC 和 PRRS 的发病率越来越高, 严重的影响了畜牧业发展, 目前还没有商品疫苗, 也没有有效的药物进行防治, 本发明对金丝桃素进行了研究, 直接杀灭 PCV 和 PRRSV 毒样的有效用量为 $10 - 40 \mu g/ml$, 在防治 PC 和 PRRS 的体内试验时金丝桃素的有效量为 $0.005 - 0.009g/kg$ (体重), 本发明为防治 PC 和 PRRS 提供了药物, 具有作用显著, 方法简单, 便于推广, 经济效益巨大的有益效果。

1. 金丝桃素在防治猪的 PCV 和 PRRSV 中的应用，其特征为在直接杀灭 PVC 和 PRRSV 时金丝桃素的有效用量为 $10\text{--}40\ \mu\text{g/ml}$ ，在防治猪 PCV 体内实验时，金丝桃素的有效用量为 $0.003\text{--}0.009\text{g/kg}$ (体重)，在防治猪 PRRSV 体内实验时，金丝桃素的有效用量为 $0.005\text{--}0.015\text{g/kg}$ (体重)。

2. 根据权利要求 1 所述的金丝桃素在防治猪的 PCV 和 PRRSV 中的应用，其特征为防治猪 PCV 和 PRRSV 的体内试验时的优选的金丝桃素的有效用量为 $0.005\text{--}0.009\text{g/kg}$ (体重)。

金丝桃素在防治猪的 PC 和 PRRS 中的应用

技术领域

本发明涉及兽医药领域。

背景技术

近年来猪由病毒引起的疾病，如猪繁殖与呼吸系统综合症（PRRS），猪圆环病（PC）的不断发生已经严重地影响了我国畜牧业的发展，造成严重的经济损失。

金丝桃素(*hypericins*)是贯叶连翘中最具有生物活性的物质，具有抗病毒、抗抑郁及抗肿瘤等作用，兰州牧药所梁剑平课题组已成功用于禽流感的预防，特别是在野禽的防治发挥了重要作用；对O型或亚1型口蹄疫也具有良好预防效果。圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)为圆环病毒科圆环病毒属成员，单股环状DNA病毒，可引起猪的传染性、先天性颤抖和断奶仔猪多系统衰弱综合症(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)等多种疾病。PCV存在两种血清型，即PCV—1(猪圆环病毒1型)和PCV -2(猪圆环病毒2型)。PCV-2感染仔猪或青年猪后，可引起PMWS，PMWS的发病率为4%—25%，病死率高达90%。以上患猪主要表现为渐进性消瘦，生长发育受阻，体重减轻，皮肤苍白或有黄疸，免疫系统功能低下，有呼吸道症状，有时还有腹泄。该病毒已近年来新发现的畜禽病毒之一，疑为一种潜在人兽共患病病原，引起许多国家兽医工作者的高度重视。目前还没有商品疫苗用于PCV—2的免疫接种，也没有有效的药物对付PCV -2。猪繁殖与呼吸系统综合症（PRRS）又称为兰耳病，和猪圆环病（PC）一样也可引起猪的繁殖障碍病。如母猪流产、死胎、发病后母猪产仔率下降、

流产。其结果均引起猪的免疫系统功能低下甚至缺陷，产生激发感染，最终导致死亡。鉴于猪繁殖与呼吸系统综合症（PRRS）、猪圆环病（PMWS）有共同的发病症状情况，尚且目前国内外还没有商品疫苗用于此类病的免疫接种，也没有有效的药物对付该病。

发明内容

本发明的目的为研究金丝桃素对 PCV，PRRSV 的体内外试验，不仅为治疗猪 PRRS, PC 提供药物，而且为研究药物对该病的作用机理，为有效预防和控制 PRRS，PC 提供依据。

实现上述发明目的的技术方案为：用金丝桃素防治猪的 PC 和 PRRS 中的应用，在体外试验直接杀灭 PCV 和 PRRSV 时金丝桃素的用量为 10-40 μ g/ml，在防治猪 PC 体内实验时，金丝桃素的有效用量为 0.003-0.009g/kg（体重），在防治猪 PRRS 体内实验时，金丝桃素的有效用量为 0.005-0.015g/kg（体重）。防治猪 PC 和 PRRS 的体内实验时的优选的金丝桃素的有效用量为 0.005-0.009g/kg（体重）。

金丝桃素按 0.005-0.009g/kg（体重）剂量给感染 PRRSV 或给感染 PCV 的实验猪灌服，对实验猪均有很好的保护作用。从而为金丝桃素在临床上用于防治猪呼吸繁殖综合症及猪的传染性、先天性颤抖和断奶仔猪多系统衰弱综合症的剂量提供了理论依据。

本发明用金丝桃素防治 PC、PRRS 具有作用显著，方法简单，便于推广，经济效益巨大的有益效果。

具体实施方式

一、金丝桃素对圆环病病毒的体外实验。

1 材料

1.1 药物 金丝桃素, 由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药工程实验室研制, 经HPLC测定其含量已达到药物的相关规定。

1.2 病毒和细胞 PK-15细胞 (购自由中国兽药监察所), 病毒株 (购自华中农业大学动物学院动物病毒室)。

1.3 细胞培养液 细胞培养液为60%L-H (0.5%水解乳蛋白-Hanks液), 30%MEM, 10%犊牛血清, 双抗(青霉素和链霉素)浓度为100IU/ml, 谷氨酰胺为0.03g/ml, 用7.5%NaHCO₃调PH至6.8-7.0。维持液为49%L-H, 49%MEM, 2%犊牛血清, 双抗、谷氨酰胺与培养液相同, PH用7.5%NaHCO₃调PH至7.2-7.4。

2 方法

2.1 金丝桃素对PK-15细胞毒性试验

用培养液将金丝桃素分别稀释成10、20、40、80 μ g/ml, 各加入100 ml长成单层细胞的PK-15细胞培养瓶中, 每一浓度3瓶, 每瓶加入以上各浓度溶液10ml, 同时设立不含药物的维持液对照, 细胞在培养箱内培养, 96 h 后, 进行台盼蓝 (Trypan blue solution, Sigma) 排斥试验, 测定各孔细胞的死亡率: 用0.1%胰蛋白酶溶液消化细胞单层, 消化后, 加入不含酚红的MEM 培养基 (Gibco), 用移液管轻轻吹打几次, 制得单个细胞悬液, 取9 滴细胞悬液滴入小离心管中, 加入1 滴0.4%台盼蓝溶液, 3 min 内, 用血球计数板分别计数活细胞(未被染色) 和死细胞(淡蓝色), 计算细胞的死亡率。

2.2 体外抗PCV分组试验

研究分成3部分: ① 病毒先感染细胞后, 加入各浓度的金丝桃素后培养, 即治疗作用; ② 各浓度的金丝桃素和PK-15细胞作用后, 再感染PCV病毒, 即对PCV预防作用; ③ 各浓度的金丝桃素先加入PCV后, 再感染PK-15细胞, 即对

PCV直接作用。培养48h后,收集各组的PK15细胞,作用30min,用0.01mol/L PBS(pH7.2)清洗3次;用猪PCV-2抗血清作为一抗,在PBS中稀释500倍,在37℃下,细胞在此稀释液中孵育60min,用PBS清洗3次;加适当稀释的FITC标记的羊抗猪IgG,37℃下温育30min;PBS清洗后,在荧光倒置显微镜下观察结果。同时取正常的PK-15细胞作阴性对照。

2.3 竞争性酶联免疫吸附试验 (C - E L I S A)

实验以如下方式进行: 1 组 药物对 PCV 的预防作用。将不同浓度药物与 PK-15 细胞, 在 37℃ 5%CO₂ 恒温箱培养 1h 后, 感染 PCV, 吸附 1h; 2 组 药物对 PCV 的直接作用。不同浓度药物与 PCV 37℃ 作用 1h, 作用于 PK-15 细胞, 吸附 1h; 3 组 药物和 PCV 同时作用于 PK-15 细胞 1h。用维持液洗涤三次。 -20℃ 冰箱反复冻融两次, 3000r/min 离心 10min, 取上清液, 用竞争性酶联免疫吸附试验测 PCV 抗原量。实验同时设病毒对照组。

3 结 果

3.1 金丝桃素对PK-15细胞毒性作用

结果发现金丝桃素在10、20、40、80μg / ml时, 对PK-15细胞均无不良影响, 与含10%犊牛血清MEM培养液对照组细胞生长无明显区别, 表明金丝桃素在上述浓度下对PK-15细胞无明显细胞毒作用。

3.2 金丝桃素对感染PCV的PK-15细胞治疗作用

PCV对PK-15吸附病毒1 h后, 再加入金丝桃素10、20、40μg / ml, 37℃ 培养72h后, 在荧光显微镜下进行镜检。金丝桃素组荧光细胞明显减少, 结果显示明显的抗PCV作用, 见表1。

表1 金丝桃素对感染PCV后PK-15细胞的治疗作用

组别	药物浓度 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	单位面积荧光细胞百分比 (%)
金丝桃素+PCV	10	25
金丝桃素+PCV	20	18
金丝桃素+PCV	40	0
PCV对照	-	100
培养液对照	-	0

3.3 金丝桃素与PCV同时作用时抗PCV作用

金丝桃素和PCV 同时按上述要求接入PK-15细胞中, 结果发现药物也有明显抑制病毒作用, 而且随浓度增加, 单位面积镜检到荧光细胞数目减少。结果见表2。

表2 金丝桃素对细胞感染PCV的保护作用

组别	药物浓度 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	单位面积荧光细胞百分比 (%)
金丝桃素+PCV	10	24
金丝桃素+PCV	20	16
金丝桃素+PCV	40	0
PCV对照	-	100
培养液对照	-	0

3.4 金丝桃素对PCV直接杀灭作用

各浓度的金丝桃素先加入PCV后, 再分别接种病毒后培养, 即直接作用。见表3。

表3 金丝桃素对PCV直接杀灭作用

组别	药物浓度 (μ g / ml)	单位面积荧光细胞百分比 (%)
金丝桃素+PCV	10	2.5
金丝桃素+PCV	20	1.6
金丝桃素+PCV	40	0
PCV对照	-	100
培养液对照	-	0

3.5 通过对 PCV 抗原定量检测，进一步阐明金丝桃素抗 PCV 作用机理

金丝桃素和 PCV 37℃作用 1h 后，吸附 PK-15 细胞 1h；或 PK-15 细胞和金丝桃素 37℃培养 1h 后，吸附 PCV1h，均检测到 PCV 的 OD 值明显减少，与病毒对照组有显著差异 (P<0.01)。在一定浓度，金丝桃素对病毒吸附抑制作用有浓度递增现象，抑制作用达最大值后，随药物浓度的增加对 PCV 吸附抑制减弱。金丝桃素对 PCV 抑制的最低率，高于左旋咪唑最高抑制率。有力证明金丝桃素在病毒与宿主细胞吸附、融合环节，具有较强抗病毒作用

表 4: 金丝桃素对 PCV 感染 PK-15 细胞吸附能力的影响

组 别		药物浓度 (mg · ml ⁻¹)	n	PCV 值 (OD) $\bar{x} \pm s$	抑制率 (%)
I 组	左旋咪唑	0.01	3	0.210±1.1790E-02**	26.28
		0.02	3	0.1845±1.1373E-02**	35.23
		0.04	3	0.1696±4.5826E-03**	40.48
	金丝桃素	0.01	3	0.1365±3.5119E-03**	48.02
		0.02	3	0.1427±1.1533E-02**	49.92
		0.04	3	0.1365±1.0599E-02**	52.08
II 组	左旋咪唑	0.01	3	0.1972±9.815E-02**	30.8
		0.02	3	0.1643±6.928E-03**	42.32
		0.04	3	0.1453±1.777E-03	49.00
	金丝桃素	0.01	3	0.124±2.000E-03**	56.39
		0.02	3	5.49E0.2±1.411E03**	80.72
		0.04	3	2.85E0.2±1.015E02**	89.98
III 组	左旋咪唑	0.01	3	0.272±9.609E-03**	1.80
		0.02	3	0.218±2.884E-02	4.27
		0.04	3	0.225±6.557E-03	20.900
	金丝桃素	0.01	3	0.124±2.000E-03**	47.39
		0.02	3	0.147±1.411E03**	56.72
		0.04	3	8.09E0.2±1.015E02**	70.98
病毒对照组		0	3	0.279±8.66E-03	0.00

注：与病毒对照组比较，^{***}P<0.01

4 讨论

4.1 近年来,圆环病毒2型(PCV-2)在许多猪场中的隐性感染率越来越高(据报道感染率达47.14%以上)。PCV-2本身是一种免疫抑制性疾病,对猪的影响就像一把双刃剑",一方面它可以降低猪的免疫力,使猪易继发传染性胸膜肺炎、副嗜血杆菌、附红细胞体等各种疾病";另一方面饲养管理条件较好时,PCV-2往往是处于隐性感染状态,不发病或不表现明显的临床症状,当猪群进行猪瘟疫苗接种时,猪瘟疫苗可激活PCV-2的毒力,使之毒力增强,从而大大降低猪体免疫力,容易继发感染有关细菌或其它病原,引发呼吸道、消化道的疾病。造成养殖业巨大经济损失。

4.2从我们的实验结果看到：不同浓度的金丝桃素(10—40μg / ml)在体外细胞培养中，对PCV直接杀灭、及PCV所致疾病预防和治疗有明显作用。根据作用于病毒先后的不同时间结果，发现金丝桃素作为预防用药，对PCV效果最好，病毒感染细胞后，再使用金丝桃素的治疗作用相对要差些。

二、金丝桃素对圆环病毒PCV毒株的体内试验

5. 试验材料

5.1 受试药物：金丝桃素

5.2 实验动物：仔猪

5.3 PCV-2毒株，感染剂量为最小感染量

6.1实验猪分组：

28日龄断乳仔猪只，随机分为6组。具体分组与处理情况见表5。

表5 实验猪的分组与处理				
组 别	数量（只）	给药方式	剂量（g. kg ⁻¹ . d ⁻¹ ）	处理
金丝桃素高剂量组	20	灌服	0.009	攻毒给药
金丝桃素中剂量组	20	灌服	0.006	攻毒给药
金丝桃素低剂量组	20	灌服	0.003	攻毒给药

阳性对照组	20	—	—	攻毒不给药
阴性对照组	20	—	—	不攻毒不给药

（注：鉴于临床还没有对“断奶仔猪多系统衰竭综合征”有效的药物，本实验不设药物对照组）

6.2实验前测定圆环病毒抗体

用猪圆环病毒酶联免疫诊断试剂盒测定圆环病毒抗体（诊断试剂盒购自华中农业大学动物学院动物病毒室，批号分别为20031015、20040517）。用抗体阴性者进行实验；对实验全程采集的血清全部进行PCV抗体检测。

6.3攻毒与给药

在仔猪28日龄时，按表1-1对各实验组仔猪(阴性对照组除外) 前腔静脉注射、滴鼻感染PCV,每头按最低感染量接种；对照组仔猪接种正常生理盐水，并于病毒接种12h后（或根据实际发病情况）对各实验组猪按表1-1给药，连用5-7d。

6.4病料的采集与处理

该实验共持续21d，每天2次观察仔猪的采食、饮水、体温变化、精神状态等临床表现，按照死亡、有效、治愈进行药效评价。

对各实验组仔猪每天耳缘静脉采血或前腔静脉采血收集血清，并用棉拭子采集仔猪的咽喉的黏液，将蘸取黏液的棉拭子立即放入Hanks中，充分振荡，使黏液分散，3000rpm离心15min，取上清，用于病毒RNA的抽提，进行PCR鉴定。在试验过程中若各组有病死猪以及试验结束后所有存活猪扑杀后无菌采集气管、肺、肝、淋巴结，常规保存，用于病毒分离、滴度和检测。

6.5将采集的器官三等份，一份用于病毒的检测（ELISA或RT-PCR进行病毒的定量检测）。一份用于病毒的分离、滴定，并将分离的病毒对再次对仔猪感染，简单地观察仔猪能否被感染。另一份用于组织病理学检查。

7. 结果

7.1 实验仔猪的临床表现

阳性对照组的发病仔猪主要表现：从第4 d起，试验猪开始出现精神沉郁、被毛粗乱、食欲减退、生长缓慢、衰弱、苍白、消瘦、黄疸、呼吸急促、或咳嗽，有的出现腹泻。金丝桃素新制剂组仔猪无明显的临床表现。

7.2 RT-PCR 结果

给药后第1d 金丝桃素制剂低剂量组、阳性对照组能检测到病毒，其它实验组未检测到病毒；第2~11d 仅阳性对照组检测到病毒；第12~21d 各实验组均未检测到病毒；实验结束后所采集的各实验组活猪的脏器处理后经 RT-PCR 检测均成阴性。

7.3 PCV 抗体检测

阳性对照组仔猪第7d、14d、21d 采集的血清 PCV 抗体均呈阳性；金丝桃素低剂量组仔猪 PCV 抗体在第7d、14d 呈阳性，第21d 呈阴性；其它实验组仔猪 PCV 抗体均成阴性。

7.4 剖检变化

攻毒后阳性对照组仔猪分别于第9d死2头、10 d死4头和第12d5头，对死亡进行剖检，剖检变化基本相同。病猪全身淋巴结（主要是腹股沟淋巴结、肠系膜淋巴结、支气管淋巴结）肿胀。肺表面呈棕黄色或棕红色斑驳状。脾脏肿大。胃肠道出现胃溃疡、肠粘膜充血、出血、结肠水肿等病变。

7.5 病理组织学变化

7.5.1 肺脏 阴性对照组：结构清晰，无异常变化；阳性对照组：肺脏呈广泛性肉变，失去弹性，肺脏呈弥散性间质性肺炎，质地坚硬似橡皮。金丝桃素新制剂低剂量组：肺脏出血，气管内分泌物增多，肺泡毛细血管淤血严重，肺泡上皮有轻度的炎症，质地较硬；金丝桃素新制剂中剂量组：肺泡上皮增生，同时间质

淋巴细胞、巨噬细胞增生；金丝桃素新制剂高剂量组：肺脏病变不明显，但可在肺脏边缘看到一些粉红色的小结节及部分肺脏的代偿性增生，肾脏可见针尖状的出血点，肝脏、脾脏没有明显变化。

7.5. 2淋巴结 阴性对照组：结构清晰，无异常变化；阳性对照组：病猪肺脏与胸壁发生粘淋巴结肿胀，切面呈白色，有时淋巴结水肿，切面湿润，呈土黄色；金丝桃素新制剂低剂量组：组织完整，皮髓质界限清楚，细胞排列松散，以网状细胞增生为主；有轻微出血，有中性粒细胞渗出，有淋巴细胞、浆细胞、白细胞，水肿网状细胞数量增加，淋巴细胞数量较少；金丝桃素新制剂中剂量组：组织完整，皮髓质界限清楚，细胞排列整齐，淋巴细胞数量较多；金丝桃素新制剂高剂量组：组织完整，皮髓质界限清楚，腹股沟淋巴结、肠系膜淋巴结、支气管淋巴结没有明显变化。

本研究通过攻毒保护试验、RT-PCR 检测、PCV 抗体检测以及微观观察，有效的证明了金丝桃素按每千克体重 0.006-0.009g 灌服，在体内对 PCV 有很好的抑制作用。特别是通过病理组织学的观察，金丝桃素组实验猪的肺脏、淋巴结都有不同程度的淋巴细胞及网状细胞增生，且与药物剂量呈正相关，所以可以初步判定，该制剂能调动机体的免疫系统而更好的在体内发挥抵抗 PCV 病毒的作用。通过以上实验我们可以得出，金丝桃素按 0.006-0.009g/kg(体重)剂量给感染 PCV 的实验猪灌服，对实验猪均有很好的保护作用。从而为金丝桃素在临床上用于预防猪呼吸繁殖综合征的剂量提供了理论依据。

三、金丝桃素对 PRRSV 毒株的体外试验

8 材料

8. 1 药物 金丝桃素，由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药工程实验室研制，经 HPLC 测定其含量已达到药物的相关规定。

8. 2 病毒和细胞 PRRSV、 Marc145细胞(均购自由中国兽药监察所),

8. 3 细胞培养液 细胞培养与维持液是DMEM(Hyclone),加入10 %胎牛血清 (Fetal Bo2vine Serum , Hyclone) , 0.001 mol/ L 丙酮酸钠(Sodium Pyru2vate , Hyclone) 和10 %的Antibioticantimycotic (10 000 μ g/ ml 青霉素G,10 000 μ g/ ml 链霉素) 。

9 方法

9.1 金丝桃素对Marc-145细胞毒性试验

用培养液将金丝桃素分别稀释成10、20、40、80 μ g/ ml, 各加入100 ml长成单层细胞的Marc-145细胞培养瓶中, 每一浓度3瓶, 每瓶加入以上各浓度溶液10ml, 同时设立不含药物的维持液对照, 细胞在培养箱内培养,120 h 后,进行台盼蓝(Trypan blue solution , Sigma) 排斥试验,测定各孔细胞的死亡率:用0.1%胰蛋白酶溶液消化细胞单层,消化后,加入不含酚红的MEM 培养基(Gibco) ,用移液管轻轻吹打几次,制得单个细胞悬液,取9 滴细胞悬液滴入小离心管中,加入1 滴0.4%台盼蓝溶液,3 min 内,用血球计数板分别计数活细胞(未被染色) 和死细胞(淡蓝色) , 计算细胞的死亡率。

9.2 PRRSV毒力滴度半数感染量(TCID₅₀)测定

用细胞培养液将PRRSV按10倍递增稀释, 从10⁻¹到10⁻¹⁰ , 然后分别加入长满单层96孔培养板孔中, 放入37℃ CO₂培养箱, 观察记录120h, 计算出该PRRSV滴度TCID₅₀ , 接种量为100 TCID₅₀ / ml。

9.3 体外抗PRRSV分组试验

研究分成3部分: ① 病毒先感染细胞后, 加入各浓度的金丝桃素后培养, 即治疗作用; ② 病毒和各浓度的金丝桃素同时加入Marc-145细胞中培养, 即直接

作用；③ 各浓度的金丝桃素先加入Marc-145后，再分别接种病毒后培养，即预防作用。

9.4观察指标

观察接种病毒各组的细胞病变情况，即CPE(Marc-145细胞收缩变圆，并出现脱落)。接种PRRSV后120h，CPE无病变为“—”，CPE<25% 病变为“+”，25%—50% 病变为“++”，50%—75% 病变为“+++”，CPE>75% 细胞病变为“++++”。

9.5分析处理

通过观察记录各浓度的金丝桃素抑制PRRSV对Marc-145细胞的致病作用，即CPE的变化，分析其抑制病毒效果。

10 结果

10.1 金丝桃素对Marc-145细胞毒作用

结果发现金丝桃素在10、20、40、80 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 时，对Marc-145细胞均无不良影响，与含10%通胎牛血清DMEM培养液对照组细胞生长无明显区别，表明金丝桃素在上述浓度下对Marc-145细胞无明显细胞毒作用。

10.2 PRRSV TCID₅₀测定

通过测定PRRSV对Marc-145细胞的TCID₅₀为 10^{-6} ，病毒接种量为100 TCID₅₀ / ml。

10.3 金丝桃素对感染PRRSV的Marc-145细胞治疗作用

PRRSV对Marc-145吸附病毒1 h后，再加入金丝桃素10、20、40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ，37℃ 培养120h后，能明显减少Marc-145的CPE，结果显示明显的抗PRRSV作用，见表6。

10. 4 金丝桃素与PRRSV同时作用时对细胞的保护作用

金丝桃素和PRRSV 同时按上述要求接入Marc-145细胞中, 结果发现药物也有明显抑制病毒对细胞的作用, 而且随浓度增加, 其CPE减轻, 结果见表7。

表6 金丝桃素对感染PRRSV后Marc-145细胞的保护作用

组别	药物浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CPE
金丝桃素+PRRSV	10	++
金丝桃素+PRRSV	20	+
金丝桃素+PRRSV	40	-
PRRSV对照	-	++++
培养液对照	-	-

表7 金丝桃素对同时感染PRRSV细胞的保护作用

组别	药物浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CPE
金丝桃素+PRRSV	10	+
金丝桃素+PRRSV	20	-
金丝桃素+PRRSV	40	-
PRRSV对照	-	++++
培养液对照	-	-

10. 5 金丝桃素预防保护Marc-145细胞受PRRSV感染作用

将各浓度的金丝桃素先与Marc-145细胞37℃作用1 h后, 再接种PRRSV, 120h后观察各细胞的CPE情况, 结果发现药物全部抑制PRRSV产生CPE, 见表8。

表8 金丝桃素对PRRSV感染Marc145细胞的预防作用

组别	药物浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CPE
金丝桃素+PRRSV	10	-
金丝桃素+PRRSV	20	-
金丝桃素+PRRSV	40	-

PRRSV对照	-	++++
培养液对照	-	-

11 讨论

11.1 1987 年美国首先报道了该病的发生,1996 年我国首次从国内猪群中分离到PRRSV ,从而证实了本病在我国存在与流行。到目前为止,在我国所分离的毒株均为美洲型PRRSV ,尚无欧洲型PRRSV 在我国流行的报道。近年来的资料表明,我国正面临PRRS 不断蔓延和流行区域逐步扩大的严峻形势。虽然国外已有商品化的PRRS活疫苗和灭活疫苗,但在实际生产中疫苗的免疫效力是很不确定的。活疫苗的安全性令人担忧,国际上已有应用活疫苗引起发病的证据。由于PRRS 病毒序列的多样性, 因此很难有一种对所有PRRS 都有效的疫苗,因此不能指望依靠疫苗来控制PRRS,研发具有抗PRRSV的药物是预防和控制PRRS 的有效路径。

4.2从我们的实验结果看到该病毒在Marc145细胞上生长良好,产生明显的细胞病变。上述试验表明,不同浓度的金丝桃素(10 —40 μ g / ml)在体外细胞培养中,均能明显抑制PRRSV对Marc145的CPE,表明其具有较好的抑制PRRSV增殖作用。根据作用于病毒先后的不同时间结果,发现金丝桃素作为预防用药,对PRRSV效果最好,病毒感染细胞后,再使用金丝桃素的治疗作用相对要差些,提示金丝桃素对宿主细胞是否有保护作用,或者存在多方面的作用机理,值得进一步研究。

四、金丝桃素对 PRRSV 毒株的体内试验

12. 试验材料

12.1 受试药物：金丝桃素

12.2 实验动物：仔猪

12.3 变异 PRRSV 毒株，感染剂量为最小感染量

13.方法

13.1 实验猪分组：

28 日龄断乳仔猪只，随机分为 6 组。具体分组与处理情况见表 9。

表 9 实验猪的分组与处理

组 别	数 量 (只)	给 药 方 式	剂 量 (g. kg ⁻¹ . d ⁻¹)	处 理
金丝桃素高剂量组	20	灌服	0.02	攻毒给药
金丝桃素中剂量组	20	灌服	0.01	攻毒给药
金丝桃素低剂量组	20	灌服	0.005	攻毒给药
阳性对照组	20	—	—	攻毒不给药
阴性对照组	20	—	—	不攻毒不给药

(注：鉴于临床还没有对“蓝耳病”有效的药物，本实验不设药物对照组)

13.2 ELISA 诊断试剂盒,购置于美国 Herdchek IDEXX 公司 判定标准：S/P<0.4 为阴性，S/P>0.4 为阳性。实验前对受试仔猪进蓝耳抗体测定,用抗体阴性者进行实验；对实验仔猪于第 7d、14d、21d 采集血清进行 PRRS 抗体检测。

13.3 攻毒与给药

在仔猪 28 日龄时，按表 1-1 对各实验组仔猪(阴性对照组除外) 前腔静脉注射、滴鼻感染 PRRSV,每头按 3ml 感染量接种；对照组仔猪接种正常生理盐水，并于病毒接种 12h 后（或根据实际发病情况）对各实验组猪按表 1-1 给药，连用 5d。

13.4 病料的采集与处理

该实验共持续 21d，每天 2 次观察仔猪的采食、饮水、体温变化、精神状态等临床表现，按照死亡、有效、治愈进行药效评价。

对各实验组仔猪每天耳缘静脉采血或前腔静脉采血收集血清，并用棉拭子采集仔猪的咽喉的黏液，将蘸取黏液的棉拭子立即放入 Hanks 中，充分振荡，使黏液分散，3000rpm 离心 15min，取上清，用于病毒 RNA 的抽提，进行 PCR 鉴定。在试验过程中若各组有病死猪以及试验结束后所有存活猪扑杀后无菌采集气管、肺、淋巴结，常规保存，用于病毒分离、滴度和检测。

13.5 将采集的器官三等份，一份用于病毒的检测(RT-PCR 进行病毒的定量检测)。一份用于病毒的分离、滴定，并将分离的病毒对再次对仔猪感染，简单地观察仔猪能否被感染。另一份用于组织病理学检查。

14. 结果

14.1 实验仔猪的临床表现

阳性对照组的发病仔猪主要表现：从第 4 d 起，试验猪体温升高、抑郁、食欲下降、饮水增加、只见轻微的呼吸道症状采食量减少，第 10d 以后呈明显的腹式呼吸，耳朵开始发绀。金丝桃素新制剂组仔猪无明显的临床表现。

14.2 RT-PCR 结果

给药后第 1d 金丝桃素制剂低剂量组、阳性对照组能检测到病毒，其它实验组未检测到病毒；第 2~11d 仅阳性对照组检测到病毒；第 12~21d 各实验组均未检测到病毒；实验结束后所采集的各实验组活猪的脏器处理后经 RT-PCR 检测均成阴性。

14.3 PRRS 抗体检测

阳性对照对仔第 7d、14d、21d 采集的血清 PRRS 抗体匀呈阳性；金丝桃素低剂量组仔猪 PRRS 抗体在第 7d、14d 呈阳性，第 21d 呈阴性；其它实验组仔猪 PRRS 抗体匀成阴性。

14.4 动物接种试验

对阳性对照组病料进行病毒分离,接种健康仔猪可见体温升高、抑郁、食欲下降、饮水增加、只见轻微的呼吸道症状采食量减少,第10d以后呈明显的腹式呼吸,耳朵开始发绀。3头猪分别于第9d、10d、11d死亡。

14.5 剖检变化

攻毒后阳性对照组仔猪分别于第9d死2头、10d死4头和第12d5头,对死亡进行剖检,剖检变化基本相同。剖检可见肺部点状出血;腹股沟淋巴结轻微肿大。

14.6 病理组织学变化

14.6.1 肺脏 阴性对照组:结构清晰,无异常变化;阳性对照组:副支气管扩张、间质水肿增宽且有大量的嗜中性白细胞浸润,肺泡壁毛细血管扩张、淤血;金丝桃素新制剂低剂量组:肺泡毛细血管淤血严重,肺泡上皮有轻度的增生;金丝桃素新制剂中剂量组:肺泡上皮增生,同时间质淋巴细胞、巨噬细胞增生;金丝桃素新制剂高剂量组:间质及肺泡间隔大量淋巴细胞浸润,间质血管周围网状细胞增生,甚至形成淋巴-网状细胞滤泡。

14.6.2 淋巴结 阴性对照组:结构清晰,无异常变化;阳性对照组:组织不完整,皮髓质界限不清楚,细胞排列松散,以网状细胞增生为主;出血严重,有中性粒细胞渗出,有淋巴细胞、浆细胞、白细胞,水肿网状细胞数量增加,淋巴细胞数量较少,单核巨噬细胞数量显著增加,出现较多的大淋巴细胞;巨噬细胞有核内包涵体出现,部分组织细胞核枯缩;金丝桃素新制剂低剂量组:组织完整,皮髓质界限清楚,细胞排列松散,以网状细胞增生为主;有轻微出血,有中性粒细胞渗出,有淋巴细胞、浆细胞、白细胞,水肿网状细胞数量增加,淋巴细胞数量较少;金丝桃素新制

剂中剂量组：组织完整,皮髓质界限清楚,细胞排列整齐,淋巴细胞数量较多；金丝桃素新制剂高剂量组：组织完整,皮髓质界限清楚,细胞排列整齐,淋巴细胞数量正常。

本研究通过上述攻毒保护试验、RT-PCR 检测以及微观观察，有效的证明了金丝桃素按每千克体重 0.005-0.015g 灌服，在体内对 PRRSV 有很好的抑制作用。特别是通过病理组织学的观察，金丝桃素组实验猪的肺脏、淋巴结都有不同程度的淋巴细胞及网状细胞增生，且与药物剂量呈正相关，所以可以初步判定，该制剂能调动机体的免疫系统而更好的在体内发挥抵抗 PRRS 病毒的作用。