

# ELISA 法筛选抗新孢子虫中药的研究

孔琳 鞠玉琳\* (延边大学农学院, 吉林龙井 133400)

**摘要** [目的] 筛选抗新孢子虫效果较好的中药。[方法] 取健康昆明种小鼠, 投服甲基氢化泼尼松, 使其免疫力下降, 然后随机分组, 每只小鼠腹腔接种  $1.0 \times 10^4$  个新孢子虫虫体, 接种 4 h 后, 各组小鼠灌服不同中药。给药 7 d 后, 小白鼠眼球采血, 收集血清, 应用 ELISA 法检测其抗体水平。[结果] 15 个中药组中有 4 个中药组抗体阳性率较低。[结论] 黄芩、百部、天麻、黄连可以提高感染新孢子虫小白鼠的免疫水平。

**关键词** ELISA 法; 中药; 新孢子虫; 抗体水平

中图分类号 S859.8 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-00150-01

**Screening of Chinese Medicine Resisting** *Neospora caninum*

**KONG Lin et al** (College of Agronomy, Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

**Abstract** [Objective] The study aimed to screen Chinese medicines with good resistances to *Neospora caninum*. [Method] Healthy Kunming mice pretreated with methylprednisolone for the purpose of immunity decrease were randomly divided into 15 groups, and each mouse was intraperitoneally inoculated with  $1.0 \times 10^4$  *N. caninum*. Four hours later, the mice were gavaged with various Chinese medicines. Seven days post-administration, eyeball blood sampling was conducted and the serum was used for antibody level detection with ELISA method. [Result] There were 4 among the 15 Chinese medicine groups showed low antibody positive rates. [Conclusion] *Scutellaria baicalensis*, *Stemona sessilifolia*, *Gastrodia elata* and *Coptis chinensis* could enhance the immunity level of mice infected by *N. caninum*.

**Key words** ELISA method; Chinese medicine; *Neospora caninum*; Antibody level

新孢子虫病是由犬新孢子虫或类新孢子虫寄生于宿主动物所引起的一种原虫病, 给畜牧业造成相当严重的危害<sup>[1]</sup>。该试验选用具有抗寄生虫作用的 15 种中药, 通过 ELISA 法, 对感染新孢子虫的小白鼠进行抗体水平检测, 以筛选出效果较好的中药。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 供试虫株、GST-NeSAGIt 和阴、阳性标准血清均由日本带广畜产大学原虫病研究中心惠赠; 黄芩、甘草等 15 种中药购自吉林省龙井市中成药店。

**1.2 中药的提取** 用索式提取器采用醇提法提取中药, 将提取液离心、过滤、浓缩至相当于生药 2 g/ml, 灭菌分装, 置于 4℃ 保存备用。

**1.3 小白鼠染虫试验** 取健康昆明种小鼠 150 只, 提前投服甲基氢化泼尼松, 使其免疫力下降, 然后随机分为 15 组, 每组 10 只, 每只小鼠腹腔接种  $1.0 \times 10^4$  个新孢子虫虫体, 接种 4 h 后, 各组小鼠按 15 mg/g 体重的剂量灌服不同中药。

**1.4 被检血清的制备** 参考马利青的方法<sup>[2]</sup>。各组小鼠给药 7 d 后, 眼球采血, 收集血清, 冷冻保存。

**1.5 血清抗体水平检测及判定标准** 血清抗体水平检测采用 ELISA 法<sup>[3]</sup>。阴性血清对照孔的抗体滴度平均值必须低于 0.1; 样品 ELISA 抗体滴度值等于或大于 0.1 为阳性, 低于 0.1 为阴性。

## 2 结果与分析

由表 1 可知, 小白鼠灌胃给药后, 黄芩、百部、天麻、黄连 4 个组的抗体阳性率较低, 说明这 4 种中药可以抑制小白鼠体内新孢子虫的生长繁殖。

## 3 讨论与结论

(1) 新孢子虫不同于其他原虫, 腹腔接种虫体之后, 不出现临床症状, 不利于试验的开展<sup>[4]</sup>。为使小白鼠迅速感染, 必须先抑制其自身免疫力, 以加快试验的进度。为此, 给小

白鼠注射新孢子虫虫体之前, 先对其投服免疫抑制剂甲基氢化泼尼松, 此药能选择性地作用于增殖中的细胞, 阻止免疫母细胞的进一步分裂增殖, 使小白鼠的免疫力下降, 当腹腔接种新孢子虫虫体之后便表现出相应的临床症状。该试验中, 投服免疫抑制剂后, 小白鼠出现食欲减退, 精神沉郁, 被毛耸立、无光泽, 全身缩为一团、颤抖, 腹泻, 腹部明显膨大等临床症状, 此时再腹腔接种新孢子虫虫体, 可使试验顺利进行。

表 1 15 个中药组小白鼠血清抗体水平 ELISA 检测结果

Table 1 ELISA detection results of serum antibody level in rats of 15 Chinese medicine groups

中药组	样品数	阳性数	阳性率 %
Chinese medicine group	Number of samples	Positive number	Positive rate
黄芩 <i>Scutellaria baicalensis</i>	10	2	20
甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	10	8	80
百部 <i>Stemona sessilifolia</i>	10	3	30
贯众 <i>Dryopteris setosa</i>	10	9	90
草果 <i>Msona chinensis</i>	10	8	80
草薢 <i>Caohie</i>	10	7	70
天麻 <i>Gastrodia elata</i>	10	2	20
黄连 <i>Coptis chinensis</i>	10	3	30
白头翁 <i>Pulsatilla chinensis</i>	10	7	70
柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>	10	8	80
鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	10	7	70
槟榔 <i>Areca catechu L.</i>	10	6	60
苦参 <i>Sophora flavescens</i>	10	9	90
鸦胆子 <i>Brucea javanica</i>	10	7	70
黄芪 <i>Scutellaria baicalensis</i>	10	7	70

(2) 中药具有提高非特异性免疫力、抗感染作用明显、减少抗药性、减少毒副作用等诸多优点<sup>[5]</sup>, 符合开发研制抗新孢子虫替代药物的要求。该试验选定据报道有抗寄生虫作用的 15 种中药, 应用 ELISA 法对感染新孢子虫的小白鼠进行抗体水平检测, 筛选出了抑制新孢子虫效果较好的 4 种中药。

作者简介 孔琳(1983-), 女, 吉林龙井人, 硕士研究生, 研究方向: 抗新孢子虫中药的筛选。\* 通讯作者。

收稿日期 2008-11-06

(下转第 258 页)

相对于80年代减少了52%。盆地3站扬沙年平均日数从60~90年代的变化情况,塔城80年代最多,60年代最少;额敏60和80年代较多,70和90年代较少;裕民60年代最多,90年代最少。

表2 1961~2000年塔额盆地扬沙年平均日数

Table 2 The annual number of days with blowing sand in four decades in Tar Basin

年代 Year	塔城 Tacheng	额敏 Emin	裕民 Yumin	平均 Mean
1961~1970	4.6	20.5	17.7	14.3
1971~1980	8.9	15.3	8.9	11.0
1981~1990	15.5	24.4	11.8	17.2
1991~2000	5.1	15.5	3.9	8.2

#### 4 扬沙日数的长期变化趋势、周期以及突变

研究了扬沙日数的长期变化趋势并进行统计检验,计算了气候趋势系数 $r_{xt}$ ,当 $r_{xt}$ 为正(负)时,表示要素在计算的时段内线性增加(减弱)。可以用t分布检验 $r_{xt}$ 是否显著,从而确定长期变化存在明显趋势还是一种随机震动。由于盆地扬沙主要出现在4~10月,故表3给出塔额盆地3站1961~2000年4~10月的 $r_{xt}$ 。当信度 $\alpha=0.20$ 时,趋势系数的临界值 $r_0=0.207$ 。从表3可看出,塔城5月扬沙日数40年来增多;额敏4和5月40年来扬沙日数增多,6和9月减少;裕民5~10月各月扬沙日数40年来减少,且年扬沙日数减少。

表3 塔额盆地扬沙日数的趋势系数

Table 3 Trend coefficients of monthly characteristics of 1961-2000 blowing sand days in Tar Basin

月份 Month	塔城 Tacheng	额敏 Emin	裕民 Yumin
4	0.050	0.244	-0.195
5	0.262	0.249	-0.343
6	-0.123	-0.314	-0.550
7	0.137	-0.119	-0.435
8	-0.038	-0.100	-0.439
9	0.148	-0.237	-0.527
10	0.026	-0.100	-0.444
年	0.087	-0.099	-0.558

子波分析方法具有多分辨特性,对扬沙日数标准化年

(上接第150页)

(3) 不同药物对染虫小白鼠体内新孢子虫虫体生长繁殖的抑制效果不同。效果较好的药物能够抑制小白鼠体内新孢子虫虫体的生长繁殖,从而减少小白鼠体内新孢子虫抗体的产生<sup>[6]</sup>,所以,检测结果中阳性率较低。从ELISA检测结果中可以看出,黄芩、百部、天麻、黄连4个组的血清抗体阳性率为20%~30%,而其他各组均在60%以上,说明黄芩、百部、天麻、黄连这4种中药在小白鼠体内具有较好的抑制新孢子虫生长繁殖的作用。

#### 参考文献

[1] 刘群,李博,齐长明,等.奶牛新孢子虫病血清学检测初探[J].中国兽

序列进行Mexico子波变换,分析扬沙日数的周期变化。从塔额盆地扬沙日数标准化年序列Mexico子波变换系数可知(图略),盆地扬沙日数年际变化具有6~9年的震荡周期。该周期塔城在1980~1995年强盛,额敏在1961~1975年、1990~2000年强盛,裕民在1986~1992年强盛。

在气象要素的长期变化中存在着不连续现象,它通常表现为两个时段平均值之间的显著差异,相邻两时段时间尺度通常在10年以上,称为气候突变。笔者采用常用的累计距平曲线,分析年扬沙日数的突变情况。累计距平曲线定义为在样本中某时刻t的累计距平 $I(t) = \sum_{i=1}^t (x_i - \bar{x})$ ,将I(t)绘成随时间t变化的曲线称为累计距平曲线。从累计距平曲线及标准化时间演变曲线和高斯5点滑动曲线(图略)可以看出,盆地3站中仅塔城年扬沙日数在1975、1992年发生2次突变。1975年突变前年平均扬沙日数4.4d(1961~1974年),突变后增加为14.5d(1975~1991年),1992年突变后减少为3.6d(1992~2000年)。

#### 5 结论

塔额盆地扬沙的年平均日数2.0~19.0d,其中托里最少为1.8d,额敏最多为18.9d;11月至次年3月扬沙日数最少,4~10月扬沙日数较多,月平均日数为1.0~2.0d。

40年来盆地扬沙年日数,塔城经历了“少-多-少”3个阶段的变化,额敏和裕民经历了“多-少-多-少”4个阶段的变化。盆地扬沙日数20世纪60年代较多,年平均扬沙日数为14.3d,70年代较少为11.0d,80年代最多为17.2d,90年代最少为8.2d。40年来裕民年扬沙日数减少。

盆地扬沙日数标准化年序列Mexico子波变换表明,盆地扬沙日数年际变化具有6~9年的震荡周期。突变分析表明,塔城年扬沙日数在1975和1992年发生2次突变。

#### 参考文献

- [1] 沙拉买提,巴哈尔古丽,何清.塔里木盆地扬沙分布特征[J].新疆气象,1999,22(1):17-19.
- [2] 周自江.近45年中国扬沙和沙尘暴天气[J].第四纪研究,2001,21(3):9-17.
- [3] 丁瑞强,王式功,尚可政,等.近45a我国沙尘暴和扬沙天气变化趋势和突变分析[J].中国沙漠,2003,23(3):306-310.
- [4] 道然,阿依夏木.哈密地区风沙天气特征分析[J].气象,2004,30(12):61-64.
- [5] 医杂志,2003,39(2):8-9.
- [6] 马利青.小尾寒羊犬新孢子虫病血清学诊断[J].青海畜牧兽医杂志,2006,36(1):14.
- [7] 马利青.奶牛新孢子虫病的血清学诊断[J].黑龙江畜牧兽医,2006,28(3):61.
- [8] 罗洪林,黄维义.新孢子虫病的研究进展[J].广东畜牧兽医科技,2004,29(1):14-15.
- [9] 谢明权,李国清.现代寄生虫学[M].广州:广东科学技术出版社,2003:500-511.
- [10] 张常印.动物新孢子虫病[J].中国兽医科技,1998,28(3):43-45.
- [11] ZHANG HT,JIANG J Q,DENG R G,et al. Development and performance measurement of rapid detection ELISA kit for ratoparvine[J]. Agricultural Science & Technology,2008,9(5):124-129.
- [12] 何宏轩,张西臣,尹继刚,等.应用间接ELISA检测微小隐孢子虫抗体的研究[J].中国兽医科技,2003,33(6):23-26.