

山柰提取物的制备及其体外抗 伪狂犬病毒活性研究^{*}

黎文培, 陈旭, 胡伟, 殷中琼, 贾仁勇, 宋旭^{**}
(四川农业大学 动物医学院, 成都 611130)

摘要:【目的】研究山柰提取物在体外抑制伪狂犬病毒活性。【方法】通过响应面法优化山柰的超声提取工艺, 并用荧光定量 PCR 法检测山柰提取物抗病毒的作用方式及其作用时间点。【结果】以黄酮含量作为响应值, 优化得到最佳制备工艺: 溶剂为 80% 乙醇, 功率 208 W, 提取 98 min; 抗伪狂犬病毒活性研究表明: 山柰提取物对伪狂犬病毒的半数抑制质量浓度 (IC_{50}) 为 55.85 μ g/mL, 作用方式为抑制病毒的穿入和复制阶段, 在病毒感染 24 h 内加入山柰提取物均表现出显著的抗病毒活性。【结论】山柰提取物具有显著的体外抗伪狂犬病毒活性。

关键词: 山柰提取物; 抗病毒活性; 伪狂犬病毒; 响应面法

中图分类号: S 855.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2020) 02-0295-07

Preparation and Antiviral Activity of *Kaempferia galanga* L. Extract against Pseudorabies Virus *in vitro*

LI Wenpei, CHEN Xu, HU Wei, YIN Zhongqiong, JIA Renyong, SONG Xu
(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: [Purpose] To study the antiviral activity of extract of *Kaempferia galanga* L. against pseudorabies virus (PRV) *in vitro*. [Methods] Response surface methodology was applied to optimize the ultrasonic extraction process of *K. galanga*; the mode of action and time of addition were determined by fluorescent quantitative polymerase chain reaction. [Results] The yield of total flavonoids was used as the response value of response surface methodology; the optimized extraction process was as follows: 80% ethanol, 208 W, and 98 min; the results of anti-PRV activity of the extract assay showed that 50% inhibition mass concentration of the extract was 55.85 μ g/mL and the mode of action was through inhibition of viral penetration and replication; the addition of the extract within 24 h post PRV-infection could show potent inhibitory effects. [Conclusion] The *K. galanga* extract exhibits significantly anti-PRV activity *in vitro*.

Keywords: *Kaempferia galanga* L. extract; antiviral activity; pseudorabies virus; response surface methodology

收稿日期: 2019-01-19 修回日期: 2020-02-21 网络首发时间: 2020-06-01 12:47:32

*基金项目: 国家现代农业产业技术体系四川兽药创新团队 (SCCXTD-2020-18)。

作者简介: 黎文培 (1997—), 男, 浙江杭州人, 在读本科生, 主要从事药学研究。

E-mail: 2945291932@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 宋旭 (1987—), 男, 四川成都人, 博士, 讲师, 主要从事天然药物抗病毒研究。E-mail: songx@sicau.edu.cn

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200529.1955.004.html>



中药山柰 (*Kaempferia galanga* L.) 为姜科山柰属植物山柰(又名沙姜、三蘋、三柰和三柰等)的根茎, 广泛分布于广东、广西、云南和台湾等省区。山柰气香特异, 味辛辣, 具有行气温中、消食和止痛等功效^[1]。研究表明: 山柰提取物具有抗炎^[2]、抗氧化^[3]等多种活性。伪狂犬病毒 (*pseudorabies virus*, PRV) 属于疱疹病毒科 (*Herpesviridae*) α 疱疹病毒亚科 (*Alphaherpesvirinae*) 的双链 DNA 病毒, 大多数哺乳动物对 PRV 高度易感并导致发热、奇痒和急性脑脊髓炎等临床症状^[4]。PRV 感染可致 15 日龄仔猪 100% 的死亡率, 以及母猪流产、产木乃伊胎和死胎等现象^[4]。美国等一些欧美国家已根除伪狂犬病, 在中国等发展中国家依旧是严重危害养猪业发展的传染病之一^[5]。当前伪狂犬病的防控主要通过疫苗免疫。近年来伪狂犬病在中国不断暴发, 传统疫苗免疫的猪场出现大规模感染, 说明现有的疫苗保护力下降, 急需研究新的防控方式。响应面法是一种综合试验设计和数学建模的优化方法, 其具有合理的试验设计、经济的试验方式、快速有效地确定多因素系统最佳条件等优势, 被广泛应用于中药提取过程的优化控制^[6]。目前尚无山柰提取物对伪狂犬病毒抑制作用的报道。因此, 本研究以山柰提取物中黄酮含量为响应值优化其超声提取工艺, 并在体外研究山柰提取物对 PRV 的抑制作用, 为进一步寻求新的伪狂犬病防控方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 山柰提取物的制备

将山柰粉末和不同体积分数乙醇以 1:10 (g/mL) 的比例混合, 根据具体的试验条件采用超声法(细胞超声破碎仪, 购于昆山禾创超声仪器有限公司)提取山柰, 提取液过滤后在避光条件下减压浓缩(50 °C), 最后通过冻干法制得山柰提取物。

1.2 山柰提取物中总黄酮含量测定

根据陈克克等^[7]和李艳杰等^[8]建立的亚硝酸钠—硝酸铝显色法, 以芦丁为对照品绘制标准曲线并测定山柰提取物中总黄酮的含量。将干燥的山柰粉末约 10 g 溶解于乙醇中超声提取, 减压抽滤山柰提取液, 将其定容至 50 mL。精确吸取上述溶液 2 mL 至 25 mL 容量瓶中, 加入 8 mL 70% 乙醇, 再加入 1 mL 5% 的 NaNO_2 溶液, 摆匀后静置 6 min, 添加 1 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 摆匀

后静置 6 min, 然后加入 10 mL 4% NaOH 溶液并摇匀, 加入 70% 乙醇定容至刻度, 在 15 min 后于 510 nm 处测量吸光度, 溶剂作为空白对照, 重复 3 次。

1.3 单因素及响应面法试验设计

以乙醇体积分数(30%、50%、70%、90%)、超声功率(100、200、300、400 W)和超声时间(20、40、60、80 min)3 个变量为考察指标, 以黄酮含量为评价指标进行单因素试验。以单因素试验的结果为依据, 设定响应面试验中各因素的水平, 以提取物中黄酮的含量为响应值, 对提取过程进行优化。使用 Design-Expert 8.0.6 处理数据。

1.4 山柰提取物中总糖、总多酚和总皂苷的含量测定

分别以葡萄糖、没食子酸和人参皂苷 Rb_1 为对照品, 通过分光光度法测定山柰提取物中总糖、总多酚和总皂苷的含量^[9-12]。

1.5 山柰提取物对细胞毒性试验

将山柰提取物溶于 95% 乙醇后经微孔滤膜过滤, 用含有 2% 胎牛血清的 DMEM 维持液将供试药物以 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为起始质量浓度作连续 2 倍稀释至 31.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其中最大药物质量浓度组的乙醇含量不高于 1% (以下均采用此法稀释药液)。将药物加入长满单层 PK-15 细胞(由四川农业大学天然药物研究中心提供)的 96 孔板上, 每孔 100 μL , 做 8 个复孔, 同时设置细胞空白对照。将改 96 孔板放入 CO_2 培养箱(美国 Thermo fisher 公司)培养 48 h, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液(5 mg/mL, 购于北京索莱宝科技有限公司), 置于 CO_2 培养箱中培养 1 h, 全程避光。用酶标仪测定其在 450 nm 的吸光度值, 并计算细胞的存活率和死亡率。

细胞存活率=药物组平均吸光度值/细胞对照平均吸光度值×100%;

细胞死亡率=100% - 细胞存活率。

用 Reed-Muench 计算药物半数有毒浓度(50% cytotoxic concentration, CC_{50}), 计算公式如下:

$$S = N - 1 + (H - R) / (H - L); \\ \text{CC}_{50} = C \times 2^{-s}.$$

式中, S 为距离比例; N 为高于 50% 抑制率的药物质量浓度序号; H 为高于 50% 的抑制率; L 为低于 50% 的抑制率; R 为 50%; C 代表序号为 1 的药物试验组药物质量浓度。试验重复 3 次, CC_{50} 取平均值。

1.6 山柰提取物对 PRV 的半数抑制质量浓度

将 1 mL 100TCID₅₀ PRV (容 A 株, 由四川农业大学天然药物研究中心提供) 接入长满单层 PK-15 细胞的 96 孔板中, 37 °C 吸附 1 h 后移除上层病毒液, 用 PBS 清洗 3 次。将供试药物以 200 μg/mL 为起始质量浓度连续 2 倍稀释至 12.5 μg/mL 后加入上述细胞中, 每孔 100 μL, 共 8 个复孔。设置空白组、正常组和溶剂对照组。将 96 孔板置于 CO₂ 培养箱中培养。在倒置显微镜 (日本 Nikon 公司) 下观察并记录细胞病变 (cytopathic effect, CPE) 情况。当病毒对照组 CPE 达到约 80% 时加入 10 μL/孔的 CCK-8 溶液, 置于 37 °C 培养箱中培养 1 h, 全程避光。用酶标仪测定其在 450 nm 的吸光度值, 并计算各质量浓度药物对病毒引起的细胞病变的抑制率, 用 Reed-Muench 计算药物半数抑制质量浓度 (50% inhibition concentration, IC₅₀), 计算方法同 CC₅₀。

治疗指数 (therapeutic index, TI) 作为评价山柰提取物抑制 PRV 感染的安全性指标, 其值越大, 药物越安全, TI>2 为有效低毒, 1<TI<2 为低效有毒, TI<1 无临床使用价值^[13]。TI 的计算公式为: TI=CC₅₀/IC₅₀。

1.7 山柰提取物抗 PRV 作用方式研究

1.7.1 山柰提取物对细胞的保护作用

在长满单层 PK-15 细胞的 6 孔板上, 药物组依次加入 1 mL 质量浓度为 200、100 和 50 μg/mL 的药液, 同时设置空白组, 病毒组和溶剂对照组。37 °C 吸附 1 h, 用 PBS 清洗细胞 3 次后加入 1 mL 100TCID₅₀ 的 PRV 稀释液。37 °C 吸附 1 h 后移除上清液, PBS 清洗 3 次, 加入维持液 2 mL。将 6 孔板置于 CO₂ 培养箱中, 培养 48 h。按照 EasyPure Genomic DNA Kit 试剂盒所示方法提取每孔 DNA。利用实验室建立的荧光定量 PCR 法检测各样品的 C_t 值^[14], 并计算病毒 DNA 拷贝数。

1.7.2 山柰提取物对 PRV 吸附阶段作用

将 1 mL 100TCID₅₀ 的 PRV 稀释液分别和 1 mL 不同质量浓度的山柰提取物溶液 (200、100 和 50 μg/mL) 混合, 加入长满单层 PK-15 细胞的 6 孔板上, 同时设置空白组、病毒组和溶剂对照组。4 °C 吸附 1 h 后, 将上清液移除, 用预冷 PBS 清洗细胞 3 次后, 加入细胞维持液 2 mL。

$$Y = 2.55 + 0.14X_1 + 0.15X_2 + 0.603X_3 - 0.23X_1X_2 - 0.14X_1X_3 - 0.062X_2X_3 - 0.18X_1^2 - 0.10X_2^2 - 0.24X_3^2$$

将 6 孔板置于 CO₂ 培养箱中, 培养 48 h, 检测各样品中病毒 DNA 拷贝数。

1.7.3 山柰提取物对 PRV 穿入阶段作用

将 1 mL 100TCID₅₀ 的 PRV 稀释液加在长满单层 PK-15 细胞的 6 孔板上, 4 °C 吸附 1 h 后, 移除病毒液, 用预冷 PBS 清洗 3 次后, 加入 1 mL 不同质量浓度的山柰提取物溶液 (200、100 和 50 μg/mL), 37 °C 培养 1 h, 用 PBS 清洗 3 次后加入细胞维持液 2 mL, 同时设置空白组、病毒组和溶剂对照组。将 6 孔板置于 CO₂ 培养箱中, 37 °C 培养 48 h, 检测病毒 DNA 拷贝数。

1.7.4 山柰提取物对 PRV 胞内复制阶段作用

在长满单层 PK-15 细胞的 6 孔板上, 加入 1 mL 100TCID₅₀ 的 PRV 稀释液, 37 °C 吸附 1 h, 吸附后移除上清液, PBS 清洗 3 次后分别加入 2 mL 细胞维持液, 其中含有不同质量浓度山柰提取物溶液 (200、100 和 50 μg/mL)、1% 乙醇。同时设置空白组、病毒组和溶剂对照组。将 6 孔板置于 CO₂ 培养箱中培养 48 h, 检测各样品病毒 DNA 拷贝数。

1.8 不同给药时间抗病毒活性研究

将 1 mL 100 TCID₅₀ 的 PRV 稀释液加入长满单层 PK-15 细胞的 24 孔板中, 37 °C 吸附 1 h 后, 用 PBS 清洗细胞 3 次。将 100 μg/mL 山柰提取物溶液分别于 0、2、4、8、16 和 24 h 加入到 24 孔板中, 同时设置病毒对照组。将 24 孔板置于 CO₂ 培养箱中, 培养 48 h, 检测病毒 DNA 拷贝数。

2 结果与分析

2.1 单因素试验对山柰总黄酮提取工艺的筛选结果

由表 1 可知: 随着乙醇体积分数、超声时间和超声功率的增加, 总黄酮的提取率均呈先升高后降低的趋势, 并分别在乙醇体积分数为 70%、超声时间为 100 min 和超声功率为 200 W 时达最大值, 故选择该 3 个水平进行响应面试验。

2.2 响应面法对山柰总黄酮提取工艺的优化分析

在单因素试验分析的基础上, 依据响应面试验 Box-Behnken 中心组合试验设计三因素三水平试验, 响应面试验结果见表 2。根据表 2 试验值的二次多元回归拟合, 得到二次回归方程:

表1 乙醇体积分数、超声时间和超声功率对山柰总黄酮提取率的影响

Tab. 1 Effects of different volume fraction of ethanol, ultrasonic time and ultrasonic power on the extraction rate of total flavonoids

指标 index	提取率/% extraction rate	指标 index	提取率/% extraction rate	指标 index	提取率/% extraction rate
乙醇体积分数/% volume fraction of ethanol	30	0.541	超声时间/min ultrasonic time	80	1.080
	50	0.950		100	2.230
	70	1.533		120	1.550
	90	1.140		140	1.090
					50 1.062 100 1.369 200 1.579 300 1.508

表2 响应面试验因素水平设计及结果

Tab. 2 Response surface test design and result

试验 test	超声时间/min ultrasonic time (X_1)	超声功率/W ultrasonic power (X_2)	乙醇体积分数/% volume fraction of (X_3)	总黄酮提取率/% extraction rate of total flavonoids (Y)	总黄酮提取率/% extraction rate of total flavonoids (Y)				
					试验 test	超声时间/min ultrasonic time (X_1)	超声功率/W ultrasonic power (X_2)	乙醇体积分数/% volume fraction of (X_3)	
1	80	100	70	1.713	10	100	300	50	1.784
2	120	100	70	2.458	11	100	100	90	2.745
3	80	300	70	2.540	12	100	300	90	2.876
4	120	300	70	2.353	13	100	200	70	2.480
5	80	200	50	1.254	14	100	200	70	2.544
6	120	200	50	1.805	15	100	200	70	2.580
7	80	200	90	2.741	16	100	200	70	2.544
8	120	200	90	2.714	17	100	200	70	2.580
9	100	100	50	1.407					

对此二次回归方程进行方差分析, 结果(表3)显示: 回归方程极显著且失拟项为不显著, 说明此回归模型理想, 利用方程拟合超声时间、乙醇体积分数和超声功率3个因素与总黄酮提取率的关系是可行的。因变量和全体自变量之

间的线性关系表现为极显著($R^2=0.9969$), 显著性检验表明 X_1^2 、 X_3^2 、 X_1X_2 、超声时间(X_1)、超声功率(X_2)和乙醇体积分数(X_3)对总黄酮提取率有极显著的影响; X_2^2 、 X_1X_3 和 X_2X_3 对总黄酮提取率有显著的影响。

表3 响应面设计二阶回归模型方差分析

Tab. 3 Response surface design second-order regression model analysis of variance

方差来源 sources of variation	平方和 sum of squares	自由度 degree of freedom	均方 mean square	F值 F value	P值 P value
模型 model	4.020	9	0.450	246.66	0.000 1
X_1	0.150	1	0.150	80.733 3	0.000 1
X_2	0.190	1	0.190	104.33	0.000 1
X_3	2.910	1	2.910	1 606.07	0.000 1
X_1X_2	0.220	1	0.220	119.80	0.000 1
X_1X_3	0.084	1	0.084	46.08	0.000 3
X_2X_3	0.015	1	0.015	8.35	0.023 3
X_1^2	0.130	1	0.130	72.81	0.000 1
X_2^2	0.044	1	0.044	24.43	0.001 7
X_3^2	0.240	1	0.240	133.85	0.000 1
残差 residual	0.013	7	1.813E-003		
失拟项 lack of fit	6.014E-003	3	2.005E-003	1.20	0.416 3
纯误差 pure error	6.675E-003	4	1.669E-003		
所有项 all items	4.04	16			

由图1可知: 超声功率和乙醇体积分数交互作用的等高线呈马鞍形, 表示两者的交互作用显著, 当超声功率不变时, 增大乙醇体积分数可以有效的提高山柰总黄酮提取率。超声时间和超声功率交互作用的等高线呈椭圆形, 表示两者的交互作用显著, 当超声功率较低时, 增大超声时间

可以有效的提高山柰总黄酮提取率; 当超声功率较高时, 会使温度升高导致总黄酮结构遭到破坏。超声时间和乙醇体积分数交互作用的等高线呈类似马鞍的形状, 表明了两者间存在明显的交互作用, 且超声时间固定时, 提高乙醇体积分数可以有效的提高山柰总黄酮提取率。

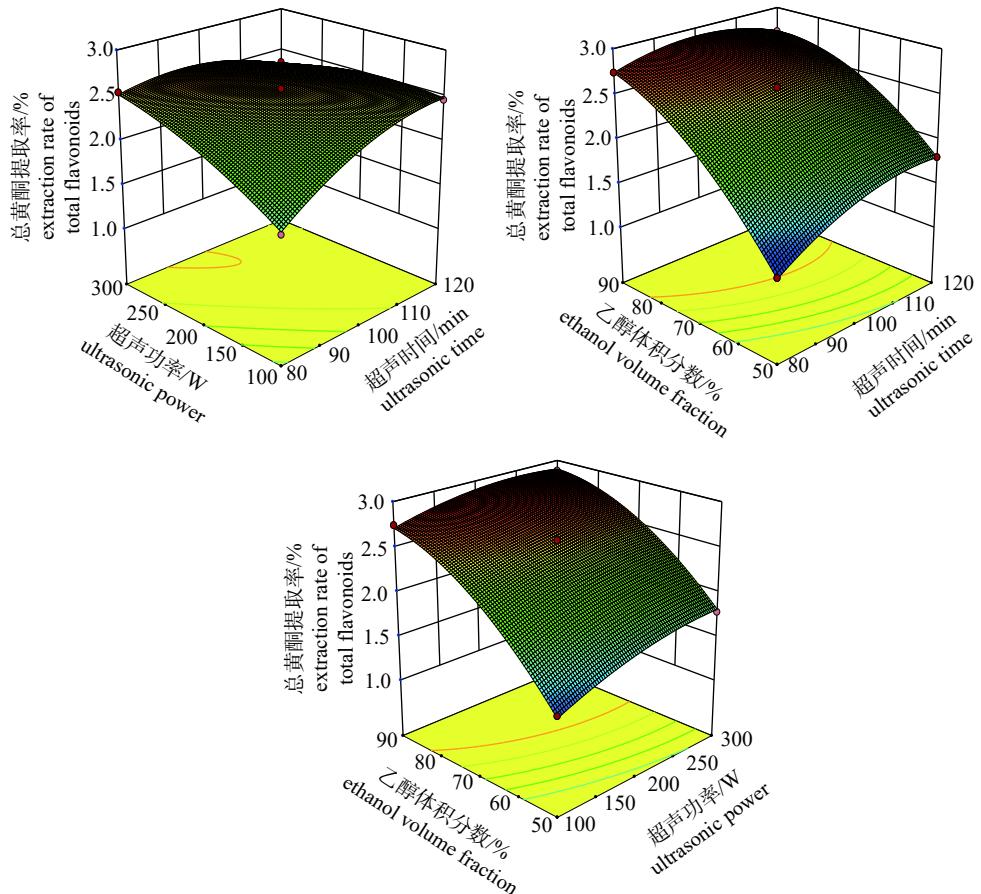


图1 3个因素与总黄酮提取率的关系

Fig. 1 The connection of three variables with extraction rate of total flavonoids

2.3 验证试验

根据山柰总黄酮提取的实际操作, 把试验条件调整成乙醇体积分数80%、超声时间98 min、超声提取功率208 W, 以此条件平行重复3次, 实际的总黄酮提取率是2.82%, 和理论预测值大体相同。说明此模型较好的模拟及预测了总黄酮提取效果。

2.4 山柰提取物中总糖、总多酚和总皂苷的含量

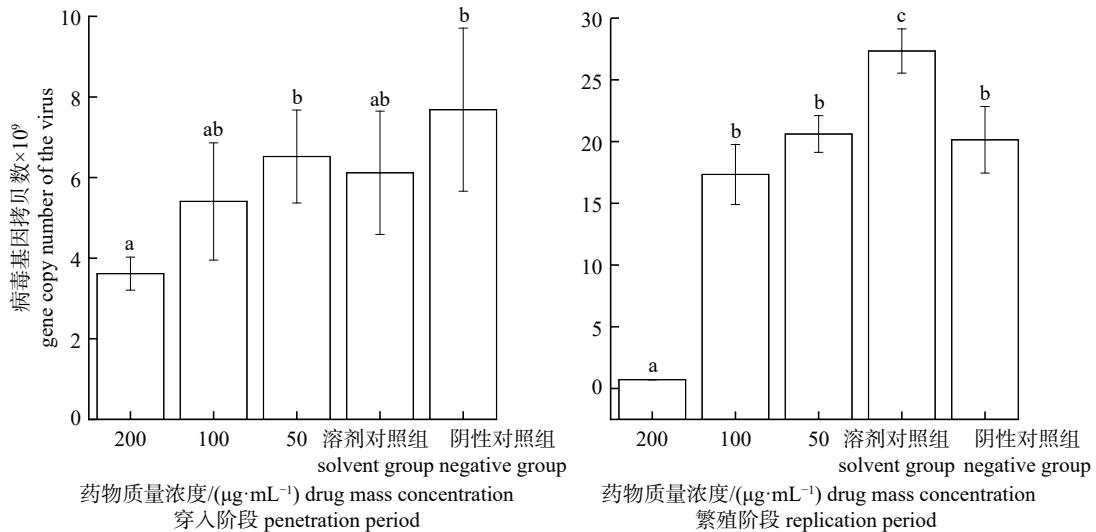
除了总黄酮外, 山柰提取物中总糖、总多酚和总皂苷含量分别为61.37%、1.22%和3.10%。

2.5 山柰提取物体外抗PRV活性及其作用方式

山柰提取物对PK-15细胞毒性较低, 其 CC_{50}

为313.53 μ g/mL, IC_{50} 为55.85 μ g/mL, 治疗指数为5.6。提示山柰提取物为有效低毒的药物, 对PRV具有明显的抑制活性, 有较高的利用价值。溶剂组没有观察到抗病毒活性, 提示溶剂中乙醇含量不超过1%时不具有抗PRV活性。

在对细胞的保护作用以及抑制病毒吸附作用研究中, 药物组的细胞病变率和病毒组无显著差异, 提示山柰提取物抗PRV的作用并非通过保护作用和影响病毒吸附细胞实现。由图2可知: 在PRV穿入阶段, 200 μ g/mL的山柰提取物能显著抑制病毒的感染($P<0.05$)。在PRV繁殖阶段, 药物组(200、100、50 μ g/mL)的病毒基因组拷贝



注: 柱形图上不同的字母表示差异显著 ($P<0.05$); 下同。

Note: The different letters on a column differ significantly ($P<0.05$); the same as below.

图2 山柰提取物对病毒穿入阶段和繁殖阶段的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Anti-PRV activity of *K. galanga* extract at viral penetration and replication steps

数均显著低于病毒组 ($P<0.05$), 且呈剂量依赖性。

以上结果表明在病毒穿入和繁殖阶段, 山柰提取物具有较强的抑制作用。

为了进一步研究山柰提取物作用的时间阶段, 在 PRV 感染后不同时间点加入山柰提取物, 测定其抗病毒活性。不同加药时间的抗病毒活性结果(图3)表明: 在病毒感染 24 h 内加入药物, 均可显著抑制病毒增殖; 加药时间越早, 抗病毒活性越强; 在病毒感染后 16 h 内加入药物均可使病毒量下降一个数量级。

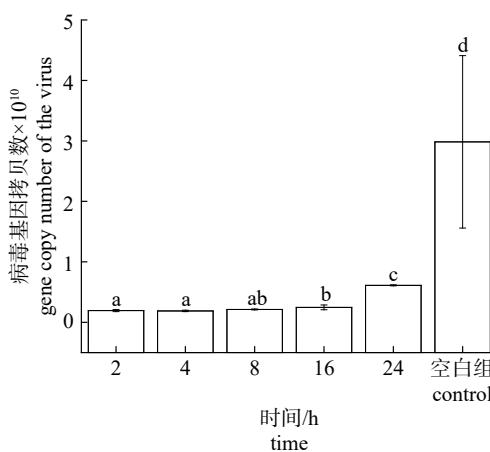


图3 不同加药时间的抗病毒活性 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Anti-PRV activity of *K. galanga* extract at different times post-infection

3 讨论

伪狂犬病是危害中国养猪业的主要传染病之一。自 2011 年末开始^[15], 国内超过 15 个省份的免疫疫苗猪场陆续暴发伪狂犬病, 说明临床使用的基因缺失苗已经不能对 PRV 变异株的侵染提供足够保护。寻找新的防控伪狂犬病药物对养猪业的发展具有重要意义。本研究发现: 山柰提取物具有显著抗 PRV 活性, 且在病毒感染 24 h 内均有显著的抑制作用, 表明山柰可能成为一种新的防控伪狂犬病的药物, 同时为山柰的开发利用提供新的思路。

黄酮类物质有广泛的抗病毒功效^[16], 且山柰中的黄酮类成分——山柰酚具有抗病毒作用^[17]。因此, 本研究通过响应面法, 以山柰提取物中总黄酮的含量为响应值来优化提取工艺。单因素试验表明: 总黄酮的提取率均随着乙醇体积分数、超声时间和超声功率的升高而出现先增加后减少的趋势。原因可能为乙醇体积分数超过 80% 后, 随着极性增加, 更多脂溶性物质溶出^[18], 使得黄酮浸出困难; 超声时间过长可能导致总黄酮结构发生改变或部分被超声波溶解, 导致提取率降低; 超声功率过高可能导致温度增加, 使乙醇挥发进而导致提取率下降, 且过高的功率所释放的能量可能破坏了黄酮部分活性成分结构, 导致黄酮减少^[19]。此外, 功率过高, 破坏细胞能力增

强, 使得细胞壁粉碎程度高, 比表面积增大, 能吸附其他活性物质^[20]。为探究山柰提取物的组成成分, 测定了山柰提取物中总糖、总多酚、总皂苷的含量, 结果显示山柰提取物中的总糖和总皂苷含量较高。有研究表明人参皂苷 Rb₁ 能抑制单纯疱疹病毒感染所导致的细胞凋亡^[21], 而总糖可以通过提高机体免疫而发挥作用。以上结果提示皂苷和多糖也对山柰提取物发挥抗 PRV 活性具有一定的促进作用。

已有研究表明: 一些中药提取物具有抑制 PRV 感染活性^[22-23], 但其作用方式较为单一, 且抗病毒活性不强。本研究发现: 山柰提取物活性更高且同时抑制病毒的穿入及其在胞内繁殖。这种多途径多靶点的特点更有利于提高抗病毒活性。王林青等^[24]研究发现: 金银花和山银花黄酮类提取物体外对 PRV 均有显著的阻断吸附和抑制胞内繁殖的作用, 推测其作用机制可能是某种活性成分增加了细胞膜的稳定性, 通过阻止病毒颗粒吸附靶细胞或抑制病毒在胞内的复制保护感染细胞。山柰提取物与金银花、山银花黄酮类提取物具有类似的抗病毒作用机制, 但具体机制以及活性成分还需要进一步阐明。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(2015年版):一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- [2] JAGADISH P C, LATHA K P, MUDGAL J, et al. Extraction, characterization and evaluation of *Kaempferia galanga* L. (Zingiberaceae) rhizome extracts against acute and chronic inflammation in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 194: 434. DOI: [10.1016/j.jep.2016.10.010](https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.010).
- [3] SULAIMAN S F, SAJAK A A B, OOI K L, et al. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24(4/5): 506. DOI: [10.1016/j.jfca.2011.01.020](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.020).
- [4] 童光志, 陈焕春. 伪狂犬病流行现状及我国应采取的防治措施[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(1): 1. DOI: [10.3969/j.issn.1005-4545.1999.01.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-4545.1999.01.001).
- [5] 马博, 卜三平. 猪伪狂犬病的净化和防治措施[J]. 中国猪业, 2018, 13(12): 47.
- [6] 姚婷, 孙雪, 许瑞程, 等. 响应曲面法优化撕裂蜡孔菌多糖的微波辅助提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 微生物前沿, 2018, 7(1): 1. DOI: [10.12677/AMB.2018.71001](https://doi.org/10.12677/AMB.2018.71001).
- [7] 陈克克, 史丽, 李莺, 等. 黄精总黄酮和总酚的含量测定[J]. 陕西农业科学, 2012, 58(1): 58. DOI: [10.3969/j.issn.0488-5368.2012.01.021](https://doi.org/10.3969/j.issn.0488-5368.2012.01.021).
- [8] 李艳杰, 鲁文慧, 罗伙军. 草果配方颗粒中总黄酮含量测定[J]. 吉林中医药, 2017, 37(5): 517. DOI: [10.13463/j.cnki.jlzyy.2017.05.025](https://doi.org/10.13463/j.cnki.jlzyy.2017.05.025).
- [9] 孙文, 巢志茂, 王淳, 等. 瓜蒌饮片中总糖及还原糖的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 96. DOI: [10.11653/syfj2013090096](https://doi.org/10.11653/syfj2013090096).
- [10] 薛丹, 黄豆豆, 姚风艳, 等. 中药木瓜中总糖及还原糖的含量测定[J]. 中国医药导报, 2015, 12(12): 121.
- [11] 郑柏勤. 叶下珠药材中总多酚的含量测定[J]. 农技服务, 2017, 34(14): 24. DOI: [10.3969/j.issn.1004-8421.2017.14.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-8421.2017.14.013).
- [12] 张学文, 韦玮, 程悦, 等. 地榆药材中总皂苷及地榆皂苷-I 的含量测定[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(2): 186. DOI: [10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.022](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.022).
- [13] 王辉, 陶小红, 王洋, 等. 荔枝核提取物体外抗病毒活性及其机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(5): 437. DOI: [10.3321/j.issn:1000-5048.2008.05.010](https://doi.org/10.3321/j.issn:1000-5048.2008.05.010).
- [14] ZHAO X H, CUI Q K, FU Q T, et al. Antiviral properties of resveratrol against pseudorabies virus are associated with the inhibition of IκB kinase activation[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8782. DOI: [10.1038/s41598-017-09365-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-09365-0).
- [15] AN T Q, PENG J M, TIAN Z J, et al. Pseudorabies virus variant in bartha-k61-vaccinated pigs, China, 2012[J]. Emerging Infectious Diseases, 2013, 19(11): 1749. DOI: [10.3201/eid1911.130177](https://doi.org/10.3201/eid1911.130177).
- [16] 赵薪苑, 陈婧, 方建国, 等. 中药和天然药物中黄酮抗病毒活性及其机制研究进展[J]. 医药导报, 2018, 37(4): 410. DOI: [10.3870/j.issn.1004-0781.2018.04.002](https://doi.org/10.3870/j.issn.1004-0781.2018.04.002).
- [17] 牛俊瑞, 吕瑞霞. 多酚类物质潜在药理活性及其研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(9): 128. DOI: [10.3969/j.issn.1006-0979.2013.09.129](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-0979.2013.09.129).
- [18] 王小梅, 薛慧君, 孙润广. 超声提取功率对麦冬多糖体外清除羟基自由基作用影响的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 72. DOI: [10.13386/j.issn.1002-0306.2011.04.029](https://doi.org/10.13386/j.issn.1002-0306.2011.04.029).
- [19] 张晓艳. 马齿苋活性物质的提取及其抗氧化性研究[D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2017.
- [20] 相辉. 汉中杜仲叶功能成分提取技术及提取物功能研究[D]. 汉中: 陕西理工学院, 2016.
- [21] MOCHIZUKI M, YOO Y C, MATSUZAWA K, et al. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 1995, 18(9): 1197. DOI: [10.1248/bpb.18.1197](https://doi.org/10.1248/bpb.18.1197).
- [22] 仇微红, 张盼锋, 李志华, 等. 黄芪、千里光、蟾酥等6味中药体外抗伪狂犬病病毒作用的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009(9): 100.
- [23] 张红英, 胡梅, 夏平安, 等. 4种中药多糖体外抗猪伪狂犬病毒的作用研究[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(3): 532. DOI: [10.3969/j.issn.1000-4440.2010.03.016](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-4440.2010.03.016).
- [24] 王林青, 崔保安, 张红英. 金银花、山银花黄酮类提取物体外抗伪狂犬病病毒作用研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(3): 183.

责任编辑: 何馨成