

硫酸化人参皂苷体外抗新城疫病毒作用

高 煊, 韩立秋, 胡 林, 张亚宁, 王德云*

南京农业大学 中兽医学研究室, 江苏 南京 210095

摘要: 目的 观察硫酸化人参皂苷(sGS)抗新城疫病毒的活性。方法 采用氯磺酸-吡啶法制备 sGS, 红外光谱仪对 sGS 结构进行分析, MTT 法检测硫酸化修饰前后人参皂苷(GS)预先给药、接种病毒后给药、与病毒同时给药 3 种不同给药方式的抗新城疫病毒活性。结果 硫酸化修饰后人参皂苷在 1 144、807 cm^{-1} 有 2 个特征吸收峰, 表明硫酸基已经和糖链结合成酯。预先给药或病毒接种后给药, 加入一定质量浓度范围内的 GS 和 sGS 的 CEF 培养液的 A_{570} 值均显著大于未给药的病毒组 ($P<0.05$), 且 GS 与 sGS 的抗病毒活性无显著差异 ($P>0.05$); GS 和 sGS 与病毒同时给药, 两药在一定质量浓度范围内的 A_{570} 值也均显著大于未给药的病毒组 ($P<0.05$), 且 sGS 的最大病毒抑制率显著高于 GS。结论 GS 经硫酸化修饰后可提高其抗新城疫病毒活性, 主要表现为提高其直接杀灭病毒的作用。

关键词: 人参皂苷; 硫酸化人参皂苷; 抗病毒; 新城疫病毒; 氯磺酸-吡啶法

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2492-05

Antiviral activity of sulfated ginsenoside on Newcastle disease virus *in vitro*

GAO Huan, HAN Li-qiu, HU Lin, ZHANG Ya-ning, WANG De-yun

Institute of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Objective In order to observe the antiviral activity of sulfated ginsenoside (sGS) on Newcastle disease virus (NDV). **Methods** sGS was prepared by chlorosulfonic acid-pyridine method and the structure of sGS was analyzed by FTIR spectra. Then, the antiviral activity of ginsenosides (GS) and sGS was determined with MTT by three modes. **Results** The results showed that two characteristic absorptive peak presented at 1 144 and 807 cm^{-1} , respectively, which proved that the sulfated group had linked with polysaccharide to form sulfate ester. In pre-adding drug and post-adding drug modes: the A_{570} values of GS and sGS in CEF culture medium were significantly higher than those of virus control at some concentration ($P<0.05$), but it was not significant difference between GS and sGS ($P>0.05$). In simultaneous adding drug and NDV, the A_{570} values of GS and sGS were significantly higher than those of virus control at some concentration ($P<0.05$) and the maximum virus inhibitory rate of sGS was significantly higher than that of GS. **Conclusion** The antiviral activity of GS on NDV could be improved with sulfation, which appears to improve the effect on directly killing the virus.

Key words: ginsenoside (GS); sulfated ginsenoside (sGS); antiviral; Newcastle disease virus (NDV); chlorosulfonic acid-pyridine method

皂苷主要由糖链和苷元组成, 糖链在皂苷的结构中占重要位置, 且是皂苷发挥生物活性的主要单元^[1], 对皂苷进行硫酸化修饰可提高其生物活性。人参皂苷(GS)是人参属植物的主要有效成分, 具有抗肿瘤、增强免疫功能、调血脂和抗动脉硬化等作用^[2-5], 且 GS 经过硫酸化修饰后其抗病毒(如抗马立克病毒等)作用有所增强^[6], 但硫酸化人参皂苷(sGS)抗新城疫病毒的研究鲜见报道。本实验对 GS 进行硫酸化修饰, 并检测了 sGS 体外抗新城

疫病毒的作用, 旨在筛选出作用较强的抗新城疫病毒药物。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

GS 购自宁波金艾农生物科技有限公司, 质量分数 86%; 极限必需培养基(MEM 培养基), Invitrogen Corporation 公司产品, 按说明书配制, 加入小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司产品)达 5%为细胞生长液, 2%为细胞维持液, 加入青霉素、链霉

收稿日期: 2011-06-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901085); 教育部科学技术重点项目(108153)

作者简介: 高 煊(1986—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究。

*通讯作者 王德云 Tel: (025)84395203 E-mail: dywang@njau.edu.cn

素各 100 U/mL; 胰蛋白酶, 用 PBS (pH 7.4) 配制成 0.25% 的溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌, 分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用; MTT 溶液, 用 pH 值为 7.4 的 PBS 溶解成 5 mg/mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌, 分装, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存 (1 个月内用完); 裂解液, 二甲亚砜 (DMSO), 天津科密欧化学试剂公司; 氯磺酸, 分析纯, 上海金山亭新化工试剂厂; 吡啶, 西陇化工股份有限公司; 95% 乙醇, 氢氧化钠 (NaOH) 等均为分析纯。

1.2 仪器

JAC—500 型超声处理器, 济宁奥波超声电器有限公司; 754 紫外分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; CO_2 培养箱, 美国 Revco 公司; TS100 型倒置显微镜, Nikon 公司; RT—6000 型酶标分析仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司; 透析袋, 上海绿鸟科技发展有限公司。

1.3 病毒

新城疫 IV 系弱毒苗 (Lasota 株), 中牧股份南京药械厂, 批号 0301485。

2 方法

2.1 sGS 制备

采用氯磺酸-吡啶法^[7]制备 sGS。将带有搅拌装置和冷凝装置的三颈烧瓶置盐水冰浴中, 加入预冷的无水吡啶 30 mL, 剧烈搅拌, 使之充分冷却, 逐滴加入 10 mL 氯磺酸, 于 40 min 内加完, 待烧瓶中出現大量淡黄色固体时终止反应, 即得酯化试剂。精确称取待修饰的 GS 200 mg, 加入盛有酯化试剂烧瓶中, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中搅拌反应 1.5 h 后冷却至室温, 反应液加入 100 mL 预冷的冰水中, 用饱和 NaOH 溶液中和至 pH 7.5, 再加入 3 倍体积的无水乙醇, 静置 24 h。取沉淀用自来水透析 3 d、蒸馏水透析 1 d, 透析液冷冻干燥, 得 sGS。所得 sGS 用红外光谱法进行结构分析, 采用常规 KBr 混合压片法, 测定范围 $4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 。

2.2 病毒处理

按 Reed-Muench 法^[8]测定病毒对培养的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 的半数组织培养感染剂量 (TCID_{50}) 为 1×10^{-5} 。临用前用细胞维持液将病毒稀释成 1×10^{-3} (100 TCID_{50})。

2.3 CEF 培养

取 10 日龄鸡胚 (中牧股份南京药械厂提供), 用碘酊消毒蛋壳气室部, 打开, 取出鸡胚置于培养皿中, 去头、爪、翅和内脏, 用 Hank's 液冲洗 3 遍,

洗去血液, 置 25 mL 烧杯内剪成 1 mm^3 左右的碎块, 再用 Hank's 液洗 3 遍, 加 3~5 倍量的 0.25% 胰蛋白酶溶液, 置 $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化, 隔 10 min 轻轻振摇 1 次, 至组织块变得疏松、表面发毛后取出, 静置 1~2 min 后吸去上层胰蛋白酶液, 加入 Hank's 液洗涤 3 遍, 再加入生长液, 以吸管吹打数次使细胞悬浮, 静置 1~2 min 使组织块下沉, 轻轻吸取细胞悬液, 重复悬浮和收集多次, 合并细胞悬液, 用 3 层灭菌纱布滤过, 细胞染色计数后将细胞数调至 $1\times 10^6/\text{mL}$, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL , 于 $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。

2.4 最大安全质量浓度测定

将 GS 和 sGS 用 2% MEM 溶液分别自 2 mg/mL 倍比稀释至 11 个质量浓度。待 CEF 长成单层时, 弃去细胞培养液, 加入 GS 和 sGS, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 每个质量浓度重复 4 孔, 同时设不加药液的细胞对照孔和空白调零孔。加药后每隔 12 h 观察 1 次细胞单层完好程度, 继续培养 72 h 后, 按 MTT 法^[9]、用酶联免疫检测仪测定 570 nm 波长处吸光值 (A_{570} 值)。当 GS 和 sGS 组的 A_{570} 值显著大于对照组时, 表明 2 个样品显著促进细胞生长。选择 A_{570} 值不显著小于对照组的所需 GS、sGS 的最大质量浓度作为它们的最大安全质量浓度。

2.5 sGS 和 GS 体外抗新城疫病毒作用

根据最大安全质量浓度测定结果, 将 GS 和 sGS 用 2% MEM 液自 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 倍比稀释至 3.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 共 5 个质量浓度 (62.5、31.25、15.63、7.81、3.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行测定。同法培养 CEF, 待 CEF 长成致密单层后, 倒掉培养板孔内液体, 用维持液洗 3 次。实验组分别以 3 种给药方式加入各质量浓度 GS、sGS, 以及新城疫病毒: 预先给药后接种病毒, 待细胞长成单层后, 倒掉孔内液体, 用维持液洗 3 次, 每孔加入不同质量浓度的药液 100 μL , 培养 4 h 后弃液体, 加入病毒液 100 μL ; 先接种病毒后给药, 待细胞长成致密单层后, 倒掉孔内液体, 用维持液洗 3 次, 每孔加入病毒液 100 μL , 培养 2 h 后倒掉孔内液体, 加入不同质量浓度的药液 100 μL ; 药物和病毒同时加入, 将病毒液分别加入到不同质量浓度的药液中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 2 h 后, 再接种到已长成单层的 CEF 中, 每孔 100 μL 。病毒组用的病毒液同条件放置 2 h。以上每种质量浓度药液重复 4 孔。

实验设给药组、病毒组 (只加病毒)、对照组 (细胞只加维持液) 和无细胞的空白调零孔。各组细胞

38.5 ℃、5% CO₂ 箱继续培养 72 h 测定细胞活性。当 GS 和 sGS 组的 A_{570} 值显著大于病毒组时, 表明 GS 和 sGS 均显著抑制新城疫病毒感染 CEF。计算最大病毒抑制率^[10]。

$$\text{最大病毒抑制率} = (A_{\text{最高药物+病毒}} - A_{\text{病毒}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{病毒}})$$

当 sGS 组的最大病毒抑制率显著大于 GS 组时, 表明 sGS 的抗病毒效果较好。

2.6 数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件进行 Duncan 多重分析, 比较 GS 和 sGS 对 CEF 的安全质量浓度, 以及对 CEF 生长的影响和抵抗新城疫病毒感染 CEF 的影响。两药最大病毒抑制率均数比较用 t 检验。

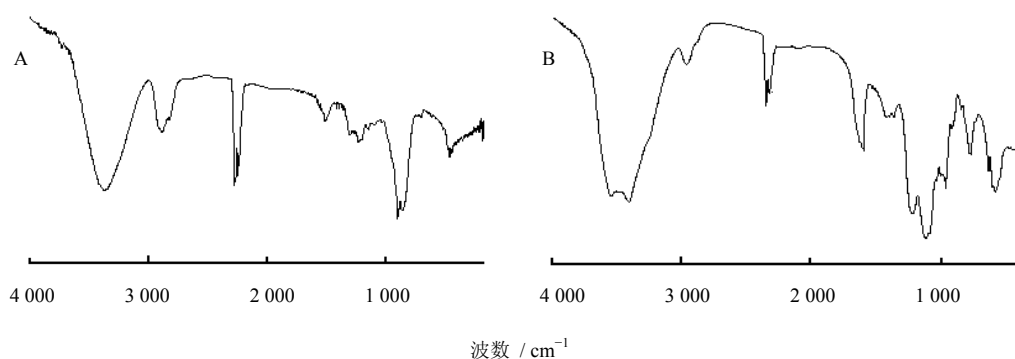


图 1 GS (A) 和 sGS (B) 的红外光谱图

Fig. 1 IR spectra of GS (A) and sGS (B)

3.2 对 CEF 生长的影响和最大安全质量浓度

由表 1 可知, GS 在 1 000~500 μg/mL 时的 A_{570} 值均显著小于对照组 ($P < 0.05$), 而在其他质量浓度与对照组的差异不显著 ($P > 0.05$)。sGS 在 1 000~125 μg/mL 时的 A_{570} 值均显著小于对照 ($P < 0.05$), 而在其他质量浓度与对照的差异不显著 ($P > 0.05$)。GS 在 250 μg/mL 时的 A_{570} 值与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), sGS 在 62.5 μg/mL 时的 A_{570} 值与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 因此将 250、62.5 μg/mL 分别定为 GS、sGS 的最大安全质量浓度。

3.3 预先给药对新城疫病毒感染 CEF 能力的影响

GS 3.91 μg/mL、sGS 7.81 μg/mL 时的 A_{570} 值都显著大于病毒组 ($P < 0.05$), 说明 GS 和 sGS 在此质量浓度时具有抑制新城疫病毒感染 CEF 的活性。结果见表 2。GS 组、sGS 组的最大病毒抑制率分别为 53.72%、62.81%, 差异不显著 ($P > 0.05$), 说明预先给药, sGS 未显示更强的抗病毒活性。

3 结果

3.1 红外光谱分析

从 GS 红外光谱(图 1-A)可以看出, 在 3 392 cm⁻¹ 处有强的吸收, 显示有 O-H 伸缩振动的特征峰; 在 2 939 cm⁻¹ 处为 -CH₂ 的 C-H 伸缩振动; 在 1 456、1 387 cm⁻¹ 处有弱的吸收, 显示有 -CH₃ 伸缩振动, 在 896~1 078 cm⁻¹ 处的强吸收是 C-O-C (糖环) 的伸缩振动, 这些都说明是 GS 的结构。sGS 红外光谱 (图 1-B) 显示, 除了 GS 特征吸收峰得以保留外, 还出现两个特征吸收峰, 一个在 1 144 cm⁻¹ 处, 其为 OSO₃⁻ 的 S=O 伸缩振动; 另一个在 807 cm⁻¹ 处, 其为 C-O-S 的拉伸振动, 这些是硫酸键的特征吸收峰。红外光谱检测结果提示 GS 已形成硫酸酯。

3.4 接种病毒后给药对新城疫病毒感染 CEF 能力的影响

GS 在 15.63~3.91 μg/mL, sGS 在 62.5、3.91 μg/mL 时的 A_{570} 值都显著大于病毒组 ($P < 0.05$), 说明 GS 和 sGS 在此质量浓度时均能显著抑制新城疫病毒感染 CEF。结果见表 3。GS 组、sGS 组的最大病毒抑制率分别为 177.39%、190.43%, 差异不显著 ($P > 0.05$), 说明在加入病毒后给药, sGS 并未显示更强的抗病毒活性。

3.5 与新城疫病毒作用后对其感染 CEF 能力的影响

sGS 在 62.5、31.25 μg/mL, GS 在 62.5 μg/mL 的 A_{570} 值都显著大于病毒组 ($P < 0.05$), 说明 GS 与 sGS 均有一定的抗新城疫病毒作用。结果见表 4。GS 组、sGS 组的最大病毒抑制率分别为 46.10%、92.91%, 差异显著 ($P < 0.05$), 说明在药物与病毒作用一定时间后加入细胞中, sGS 的抗病毒活性明显强于 GS。结果见图 2。

表 1 GS 和 sGS 对 CEF 生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 1 Effect of GS and sGS on CEF growth ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$\rho /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A_{570} 值	组别	$\rho /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A_{570} 值
GS	1 000	0.470±0.001 ^{e*}	sGS	1 000	0.130±0.022 ^{e*}
	500	0.524±0.018 ^{e*}		500	0.355±0.013 ^{d*}
	250	0.632±0.013 ^b		250	0.423±0.003 ^{c*}
	125	0.659±0.016 ^{ab}		125	0.484±0.031 ^{b*}
	62.5	0.687±0.021 ^{ab}		62.5	0.562±0.021 ^a
	31.25	0.681±0.002 ^{ab}		31.25	0.542±0.007 ^a
	15.63	0.706±0.018 ^{ab}		15.63	0.571±0.005 ^a
	7.81	0.686±0.041 ^{ab}		7.81	0.563±0.010 ^a
	3.91	0.704±0.004 ^{ab}		3.91	0.547±0.007 ^a
	1.95	0.720±0.006 ^a		1.95	0.558±0.009 ^a
	0.98	0.740±0.022 ^a		0.98	0.529±0.010 ^a
对照	—	0.668±0.021 ^{ab}	对照	—	0.553±0.010 ^a

不同字母者表示差异显著 ($P<0.05$); 与对照组比较: $*P<0.05$
下同
Different letters indicate significant differences ($P<0.05$); $*P<0.05$ vs
control group, same as below

表 2 GS 和 sGS 预先给药对新城疫病毒感染 CEF 能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 2 Effect of GS and sGS by pre-adding on CEF
infection of NDV ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$\rho /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A_{570} 值	组别	$\rho /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A_{570} 值
对照	—	0.251±0.008 ^a	对照	—	0.251±0.008 ^a
病毒	—	0.130±0.007 ^c	病毒	—	0.130±0.007 ^c
GS	62.5	0.144±0.013 ^c	sGS	62.5	0.124±0.022 ^c
	31.25	0.124±0.029 ^c		31.25	0.142±0.006 ^c
	15.63	0.109±0.009 ^c		15.63	0.127±0.010 ^c
	7.81	0.122±0.019 ^c		7.81	0.206±0.006 ^{bΔ}
	3.91	0.195±0.013 ^{bΔ}		3.91	0.120±0.006 ^c

与病毒对照组比较: $\Delta P<0.05$; 下同
 $\Delta P<0.05$ vs viral control group, same as below

4 讨论

在常用的硫酸化方法中, 与浓硫酸法和三氧化硫-吡啶法相比, 氯磺酸-吡啶法反应条件相对简单、产物回收方便、回收率和取代度均较理想, 故本实验采用氯磺酸-吡啶法对 GS 进行硫酸化修饰。通过红外光谱法对修饰的 sGS 进行结构分析, 发现光谱中显示出两个特征性的吸收峰, 一个在 $1\,144\text{ cm}^{-1}$ 处, 表明为 OSO_3^- 的 $\text{S}=\text{O}$ 伸缩振动, 另一个在 807 cm^{-1} 处, 表明为 $\text{C}-\text{O}-\text{S}$ 的拉伸振动, 这些均提示为硫酸

表 3 GS 和 sGS 在接种病毒后给药对新城疫病毒感染 CEF 能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 3 Effect of GS and sGS by post-adding after virus
inoculated on CEF infection of NDV ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$\rho /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A_{570} 值	组别	$\rho /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A_{570} 值
对照	—	0.265±0.014 ^b	对照	—	0.265±0.014 ^b
病毒	—	0.150±0.023 ^d	病毒	—	0.150±0.023 ^c
GS	62.5	0.156±0.013 ^d	sGS	62.5	0.354±0.016 ^{aΔ}
	31.25	0.200±0.005 ^{cd}		31.25	0.159±0.011 ^c
	15.63	0.218±0.022 ^{bcΔ}		15.63	0.211±0.007 ^{bc}
	7.81	0.227±0.016 ^{bcΔ}		7.81	0.203±0.032 ^{bc}
	3.91	0.369±0.010 ^{aΔ}		3.91	0.258±0.016 ^{bΔ}

表 4 GS 和 sGS 与病毒作用后对新城疫病毒感染 CEF 能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 4 Effect of GS and sGS mixed adding with virus
on CEF infection of NDV ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$\rho /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A_{570} 值	组别	$\rho /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A_{570} 值
对照	—	0.301±0.010 ^a	对照	—	0.301±0.010 ^a
病毒	—	0.160±0.009 ^{cd}	病毒	—	0.160±0.009 ^c
GS	62.5	0.225±0.027 ^{bΔ}	sGS	62.5	0.233±0.023 ^{bΔ}
	31.25	0.135±0.005 ^c		31.25	0.291±0.008 ^{aΔ}
	15.63	0.170±0.005 ^c		15.63	0.127±0.006 ^d
	7.81	0.156±0.013 ^c		7.81	0.120±0.004 ^d
	3.91	0.165±0.032 ^c		3.91	0.202±0.009 ^{bc}

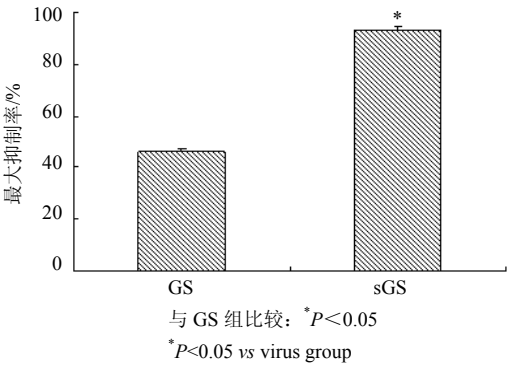


图 2 与新城疫病毒作用后对其感染 CEF 能力的最大抑制率
Fig. 2 Maximum inhibitory rate on CEF infection of NDV

键的特征吸收峰, 表明已形成硫酸酯, 证明采用氯磺酸-吡啶法对人参皂苷进行硫酸化修饰方法可行。
比较 GS 硫酸化修饰前后对 CEF 生长的影响 (即最大安全质量浓度) 可以看出, GS 小于 250

$\mu\text{g/mL}$ 的各质量浓度的 A_{570} 值与对照组的差异不显著,表明这些质量浓度 GS 对 CEF 是安全的;而 sGS 小于 $62.5 \mu\text{g/mL}$ 的各质量浓度 A_{570} 值与对照差异不显著,表明在这些质量浓度 sGS 对 CEF 也是安全的。提示 GS 经过硫酸化修饰后毒性增加,这与以前的报道一致^[11-12]。

本实验采用3种给药方式观察GS与sGS的抗新城疫病毒作用。结果表明,给药后接种病毒,GS和sGS在一定质量浓度范围内的 A_{570} 值均显著大于病毒组 ($P<0.05$),表明GS硫酸化前后均有一定的抗新城疫病毒作用,两药效果差异不明显;先接种病毒后加药物,GS和sGS在一定质量浓度范围内的 A_{570} 值也均显著大于病毒组 ($P<0.05$),表明GS硫酸化修饰前后均有一定的抗新城疫病毒作用,两药效果差异也不明显,且 $3.91\sim 62.5 \mu\text{g/mL}$ sGS 的抗病毒效果均弱于GS,可能是由于GS经硫酸化修饰后毒性增加,性效比降低的缘故;药物与病毒作用后同时加入细胞,GS和sGS在一定质量浓度范围内的 A_{570} 值也均显著大于病毒组 ($P<0.05$),表明GS硫酸化修饰前后均有一定的抗新城疫病毒作用,而sGS的抗病毒效果显著优于GS,证明硫酸化修饰能增强人参皂苷的抗病毒活性,与本研究室曾经的研究证实硫酸化修饰能提高黄芪多糖和淫羊藿多糖的抗病毒活性^[13-14]相一致。

参考文献

- [1] 丁林生. 中药化学 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2005.
- [2] 于晨. 人参皂苷对心血管系统药理作用的研究 [J]. 天津药学, 2011, 22(4): 45-47.
- [3] 潘维华, 刘晓颖, 王英平, 等. 人参皂苷对小鼠脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞免疫活性的影响 [J]. 特产研究, 2011(1): 16-19.
- [4] 吕梦捷, 曾耀英, 宋兵, 等. 人参皂苷 Rb_1 对小鼠 T 淋巴细胞体外活化、增殖及凋亡的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 743-748.
- [5] 徐晓军, 石淑文, 汤永民, 等. 人参皂苷 Rh_2 抗白血病多药耐药细胞 k562/VCR 作用研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1131-1135.
- [6] 褚秀玲, 苏建青, 付本懂. 人参皂苷及其衍生物抗马立克病毒作用的超微结构和病理变化观察 [J]. 中国兽医学报, 2009, 29(7): 901-904.
- [7] 黄小燕, 孔祥峰, 王德云, 等. 多糖硫酸化修饰和多糖硫酸酯的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(2): 328-332.
- [8] 殷震. 动物病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [9] 胡元亮, 孔祥峰, 李祥瑞, 等. 10 种中药成分对 CEF 的增殖和抵抗 NDV 感染的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(3): 301-305.
- [10] 冯秀梅, 陈邦银, 张汉萍. 黄芪多糖硫酸酯的合成及其抗病毒活性研究 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(2): 146-148.
- [11] 黄小燕, 胡元亮, 王君敏, 等. 硫酸化黄芪多糖对 CEF 的生长及抵抗 IBDV 感染的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 110-114.
- [12] 卢宇, 胡元亮, 黄小燕, 等. 淫羊藿多糖的硫酸化修饰及其对 IBDV 感染细胞的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(2): 251-256.
- [13] Huang X Y, Wang D Y, Hu Y L, *et al.* Effect of sulfated astragalus polysaccharide on cellular infectivity of infections bursal disease virus [J]. *In J Biol Macromol*, 2008, 42(2): 166-171.
- [14] Lu Y, Wang D Y, Hu Y L, *et al.* Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV [J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 71(2): 180-186.