

艾叶等 20 种中药对禽多杀性巴氏杆菌的体外抗菌活性

曲 径¹ 殷中琼¹ 贾仁勇^{1,2} 彭练慈¹ 康 帅¹ 李 莉¹

1. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014; 2. 四川农业大学预防兽医研究所, 雅安 625014

摘要 通过乙醇回流、水煎煮和超声波等方法提取艾叶等 20 种中药的有效成分, 采用二倍稀释法测定其对禽多杀性巴氏杆菌(C48-1, 血清型 A : 1) 的体外抗菌活性; 并研究抗菌活性较强的几味中药的体外联合抑菌效果。结果显示, 艾叶、黄连、黄柏、秦皮、地榆、虎杖 6 种中药提取物对巴氏杆菌的最低抑菌浓度值(MIC) 范围在 6.25~50 mg/mL; 赤芍、何首乌、茵陈、射干、甘草、蒲公英、白鲜皮 7 种中药提取物的 MIC 值范围在 50~100 mg/mL; 金银花、柴胡、板蓝根、夏枯草、穿心莲、知母、苦参 7 种中药提取物的 MIC 值大于 100 mg/mL。联合抑菌试验结果表明, 黄连、黄柏、秦皮、虎杖和艾叶的联合抑菌指数(FICD) ≤ 0.5 , 黄柏、秦皮、黄连和虎杖的联合抑菌指数(FICD) ≥ 2 ; 秦皮、地榆和黄柏的联合抑菌指数(FICD) ≥ 2 。通过以上数据可以看出, 黄连、黄柏、地榆、艾叶对巴氏杆菌均具有较好的体外抗菌活性; 黄连、黄柏、地榆和艾叶为相加、协同作用; 地榆和黄柏为拮抗作用。

关键词 中药提取物; 禽多杀性巴氏杆菌; 抗菌活性

中图分类号 R 282.74 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)02-0091-04

巴氏杆菌为无芽孢、不运动、兼性厌氧、菌体两端常染色浓重的革兰氏阴性小杆菌。因 1880 年巴斯德氏首先自病鸡分离到本属中的多杀性巴氏杆菌而得名。本属已确定的种有多杀性巴氏杆菌、嗜肺巴氏杆菌、溶血巴氏杆菌、尿巴氏杆菌和鸭疫巴氏杆菌等。其中多杀性巴氏杆菌是一种重要的动物病菌, 对禽畜养殖业有较大的危害, 可感染各种家畜、家禽及野生动物, 某些不发达国家可因饮水及卫生条件差而引发人类致病。在动物养殖业中, 多杀性巴氏杆菌可使鸡、鸭发生禽霍乱, 可致猪肺疫、牛羊兔马及许多野生动物的败血症, 并多与其他疾病混合感染或继发, 导致养殖户严重的经济损失^[1]。目前主要采用抗生素治疗巴氏杆菌, 随着大量抗菌药物不合理的应用, 特别是将抗菌药物作为抗菌生长促进剂(以治疗剂量)添加到饲料中, 使巴氏杆菌表现为耐药率高、耐药范围广、呈多重耐药等特点, 其直接后果不仅给控制和治理该病带来困难, 而且加剧了抗生素在动物体内的残留, 严重危害了动物食品安全^[2-3]。由于人类对健康的关注度越来越高, 家禽行业中绿色、无公害、无耐药性的新抗菌中兽药

将逐步成为市场的主导。因此, 如何从中药中寻找抗禽多杀性巴氏杆菌新药已经成为药物开发热点。本研究通过对中药有效成分的提取, 研究其对禽多杀性巴氏杆菌的体外抗菌活性及抗菌活性较强的几味中药有效成分的提取物联合抑菌活性, 旨在为筛选治疗禽多杀性巴氏杆菌病中药及其复方奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种与培养基

禽多杀性巴氏杆菌(C481)血清 A : 1、菌种购于中国兽医药品监察所, MH 肉汤培养基(Meller-Hinton broth)、营养琼脂培养基(nutrient agar), 均购自北京奥博星生物技术有限公司。

1.2 主要仪器设备

中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); 手提式高压灭菌器 YWQ. SG41. 280(海益恒试验仪器有限公司); 电热恒温培养箱 PYX-DHS-40X-50(上海跃进医疗器械厂); SW-CJ-IB 型超净工作台(苏州净化设备有限公司); 旋转蒸发器 R502B(上海亚荣生化仪器厂); HS-120D 超声波清洗机(上海

收稿日期: 2014-03-15

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2011BAD34B03); 四川省青年科技创新研究团队项目(2013TD0015)

曲 径, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物。E-mail: 369968533@qq.com

通信作者: 殷中琼, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物。E-mail: yinzhongq@163.com

新芝生物技术研究所),索氏提取器,96 微孔细胞培养板等。

1.3 中药提取物的制备

将艾叶、黄连、黄柏等几味中药按照文献[4-19]的方法提取,最后将提取物浓缩得到提取物浸膏即中药有效成分(中药的药效是各种成分的协同作用,而不是单一的,即各部分都有些成分对禽多杀巴氏杆菌有抑制作用),4℃冰箱中保存。

1.4 药液制备

将 20 种中药提取物浸膏溶于二甲亚砜中,配制成浸膏质量浓度为 1 g/mL 的储备液,100℃高压蒸汽灭菌,4℃冰箱保存。临用前用含血清的肉汤培养基将药液倍比稀释至 500、250、125、62.5、31.25、15.60、7.80 mg/mL。

1.5 细菌悬液的制备

取 9 个灭菌试管,每个试管中加入 4.5 mL 生理盐水,自第 1 管加入 0.5 mL 经纯培养的巴氏杆菌肉汤培养基开始依次 10 倍稀释至第 9 管。用微量移液器取 $10^5 \sim 10^9$ 稀释梯度的稀释液 0.1 mL 加入血清琼脂培养基上,用 L 棒均匀涂布,每个稀释度涂 3 个平板,37℃、CO₂ 恒温培养 24 h 后,对细菌数在 30~300 个的平板进行计数,求平均值,以 cfu/mL 为单位。最后将其稀释至 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL。

1.6 各中药有效部位对巴氏杆菌的 MIC、MBC 测定

取菌液 100 μL 分别加入含有不同浓度中药的肉汤培养基中,肉汤培养基中中药的质量浓度自第 1 管开始依次倍比释释至第 7 管(500、250、125、62.50、31.25、15.60、7.80 mg/mL),第 8 管不加中药提取液,作为空白对照。每管肉汤培养基和药液各 1 mL,37℃培养 24 h 后取出,观察细菌生长情况,与浊度对照组比较,以肉眼观察无细菌生长的最低浓度判定为中药的最小抑菌浓度。

将上述中药组完全抑制的管中液体取 100 μL 接种涂布于血清营养琼脂培养基平板上,经 37℃培养 24 h 后观察结果。以肉眼观察菌落不生长视为 100% 被杀灭,此最低药物浓度值为其 MBC 值。

1.7 各种中药对巴氏杆菌 MIC 的判断标准

参考刘忠仪等^[20]介绍的判断标准, MIC < 7.80 mg/mL, 为高度敏感, 7.80 mg/mL < MIC < 250 mg/mL, 为中度敏感, MIC > 250 mg/mL, 为不敏感。

1.8 联合抑菌试验

根据前期 20 味中药体外 MIC 值的测定,选取其中抑菌活性较强的几味进行两两联合抑菌活性的研究,联合药敏试验采用肉汤稀释棋盘法^[21]。以各药对应 MIC 值的 2 倍、1 倍、1/2 倍、1/4 倍、1/8 倍等浓度分别进行联合药敏试验。置 37℃恒温培养箱培养 18~24 h,观察结果。

1.9 联合用药效果评价

试验结果以联合抑菌指数(fractiona inhibitory concentration index, FICI)来判断联合效应,表示为 FICI = MIC(A)联合/MIC(A)单独 + MIC(B)联合/MIC(B)单独。

当 FICI ≤ 0.5 时为协同作用; 0.5 < FICI ≤ 1 时为相加作用; 1 < FICI ≤ 2 时为无关作用; 当 FICI > 2 时为拮抗作用。

2 结果与分析

2.1 20 种中药提取物的抑菌活性

20 种中药提取物的抑菌活性结果见表 1。由表 1 可知,20 种中药有效部位提取物中体外抑菌活性最强的为黄连、艾叶、赤芍、黄柏、地榆、秦皮, MIC

表 1 20 种中药提取物对禽多杀性巴氏杆菌的体外抑菌活性

Table 1 Antimicrobial activities of active ingredients extracts of twenty tradition Chinese medicine to *Pasteurella multocida*

		mg/mL	
药物名称 Name of medicine	最小抑菌 质量浓度 MIC	最小杀菌 质量浓度 MBC	
黄柏 <i>Cortex phellodendri</i>	7.80	7.80	
黄连 <i>Coptidis rhizoma</i>	7.80	7.80	
知母 <i>Rhizoma anemarrhenae</i>	500.00	500.00	
金银花 <i>Honeysuckle</i>	125.00	125.00	
蒲公英 <i>Dandelion</i>	31.25	31.25	
柴胡 <i>Radix bupleuri</i>	62.50	62.50	
板蓝根 <i>Radix isatidis</i>	62.50	62.50	
艾叶 <i>Artemisia argyi</i>	7.80	15.60	
白鲜皮 <i>Cortex dictamni</i>	31.25	31.25	
茵陈 <i>Capillary Artemisia</i>	15.60	15.60	
何首乌 <i>Polygonum multiflorum</i>	15.60	31.25	
秦皮 <i>Rortex fraxini</i>	7.80	7.80	
赤芍 <i>Radix paeoniae Rubra</i>	15.60	15.60	
地榆 <i>Sanguisorba</i>	7.80	7.80	
穿心莲 <i>Herba andrographitis</i>	62.50	62.50	
虎杖 <i>Polygonum cuspidatum</i>	7.80	7.80	
射干 <i>Rhizoma belamcandae</i>	31.25	31.25	
苦参 <i>Radix sophorae flavescens</i>	125.00	125.00	
甘草 <i>Liquoric</i>	31.25	31.25	
夏枯草 <i>Prunella vulgaris</i>	125.00	125.00	

值为 7.8 mg/mL;其次为赤芍、茵陈、甘草等 11 味中药, MIC 值为 15.6~100.0 mg/mL;活性最差的为知母、金银花、苦参, MIC 值均大于 100.0 mg/mL。因此,我们选取抑菌活性最强的艾叶、黄连、黄柏、地榆、秦皮、虎杖进行后续联合抑菌活性的研究。

2.2 中药提取物对巴氏杆菌的体外联合抑菌活性

6 味中药对巴氏杆菌的体外联合抑菌活性见表 2。黄连提取物、黄柏提取物、艾叶提取物、虎杖提取物、秦皮提取物和地榆提取物分别用 A、B、C、D、E、F 表示。由表 2 可见,黄连、黄柏、秦皮、虎杖和艾叶的联合抑菌指数(FICI)≤0.5 为协同作用,黄柏、秦皮、黄连和虎杖以及秦皮、地榆和黄柏的联合抑菌指数(FICI)≥2 为拮抗作用,其余中药联合抑菌指数在 0.5~2.0 之间,为相加或无关反应。

表 2 6 味中药有效部位提取物对禽多杀性巴氏杆菌的联合抑菌

Table 2 Combined antimicrobial effect of active ingredients extracts of six tradition Chinese medicine on *Pasteurella multocida* mg/mL

联合用药 Drug combination	联合 MIC Combination MIC	FICI
A-B	A:0.975 B:0.975	0.25
A-C	A:0.975 C:0.975	0.25
A-D	A:1.95 D:15.60	2.25
A-E	A:1.95 E:7.80	1.25
A-F	A:1.95 F:3.95	0.75
B-C	B:0.975 C:0.975	0.25
B-D	B:31.25 D:31.25	>2.00
B-E	B:7.80 E:15.60	>2.00
B-F	B:7.80 F:7.80	2.00
C-D	C:0.975 D:0.975	0.25
C-E	C:1.95 E:1.95	0.50
C-F	C:3.95 F:3.95	1.00
D-E	D:15.60 E:3.95	2.25
D-F	D:7.80 F:3.95	1.50
E-F	E:3.95 F:3.95	1.00

3 讨 论

中药的不同提取部位抑菌活性不同,大多数中药的有效提取物对细菌、病毒等都有一定的抑制作用。据报道,黄连、黄柏和艾叶均具有广谱抗菌活性,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、猪链球菌均有较强抑菌作用,说明 3 种中药有效部位有较好的抑菌作用^[22-24]。本研究得到黄连、黄柏和艾叶的 MIC 值均为 7.8 mg/mL,说明黄连、黄柏和艾叶有效成分对禽多杀性巴氏杆菌有较强的抑菌活性,为中药抗禽多杀性巴氏杆菌新药开发奠定了一定基础。

联合抑菌试验结果表明,黄连、黄柏、秦皮、虎杖和艾叶呈协同作用,说明艾叶有效提取物增强了其余 4 味中药有效部位提取物的抑菌活性,其具体增强机制有待进一步研究。黄柏、秦皮、黄连和虎杖呈拮抗作用,这可能是由于联合时产生某些有机酸使虎杖中主要抗菌成分白藜芦醇和总蒽醌被水解^[25]。秦皮、地榆和黄柏呈拮抗作用,黄柏中主要有效抗菌成分是小檗碱,可能是由于联合中产生化学反应,导致小檗碱含量下降^[26]。

中药联合抑菌多数都凭借临床上经验对动物进行给药,中药种类繁多,利用价值也很低,中药的有效成分不能得到很好的利用。本研究旨在探讨不同中药对巴氏杆菌的体外抗菌活性,结果表明,黄连、黄柏、艾叶、虎杖、秦皮、地榆等中药呈现出对巴氏杆菌较好的抗菌活性,黄连、黄柏、秦皮、虎杖和艾叶呈协同作用,提高了其抑菌活性,可以组方为中药复方用于畜禽巴氏杆菌病的治疗。

参 考 文 献

- [1] 李浩,刘阳,李长安. 多杀性巴氏杆菌病研究进展[J]. 畜牧兽医杂志,2011,30(2):35-37.
- [2] 闻重阳,杨尚斌. 肉仔鸡多杀性巴氏杆菌病的诊治[J]. 养禽与禽病防治,2001(5):68-69.
- [3] 张琼文,杨昌宏,符曼萍. 牛猪多杀性巴氏杆菌病的诊治[J]. 中国兽医杂志,2000(2):100-102.
- [4] 孙静,张俏,杜文娟,等. 黄柏中小檗碱乙醇提取工艺优选[J]. 现代中医药,2009(3):76-77.
- [5] 王志华,陈碧,陈新玉. 黄连提取方法的试验研究[J]. 实用药物与临床,2008,11(3):191-192.
- [6] 陈丛谨,黄克瀛,岗建伟,等. 知母总皂苷元的提取工艺研究[J]. 应用化工,2007,36(2):87-88.
- [7] 刁兴彬,蒋海强,王海燕,等. 正交优选金银花总黄酮的最佳提取工艺[J]. 社区医学杂志,2011,9(22):25-27.

- [8] 赵美瑾,许莉,关巍岱,等. 中药蒲公英提取研究[J]. 中国当代医药,2009,16(19):24-25.
- [9] 余晓东,刘田云,孙付军,等. 黄芩-柴胡药对提取工艺的正交优选[J]. 中国医院药学杂志,2009(22):43-44.
- [10] 牛英国,李国耀. 优化板蓝根提取工艺的研究[J]. 中国新技术新产品,2011(20):3.
- [11] 冯丽娟,孙智勇,陈芳,等. 三种方法提取的艾叶有效成分的抑菌作用比较[J]. 食品工艺,2011,12(4):35-37.
- [12] 苏伟梁,靳丽梅. 正交法优选白鲜皮的提取工艺[J]. 黑龙江医药,2006,19(1):16.
- [13] 李娟,郝晓光,马占强. 微量提取法提取茵陈总黄酮的工艺研究[J]. 广东农业科学,2010(11):165-167.
- [14] 张伟业. 何首乌提取工艺研究[J]. 中国实用医药,2011,6(6):57-58.
- [15] 陈娜,初正云. 正交试验法优选秦皮最佳提取工艺[J]. 辽宁中医药大学学报,2009(6):218-219.
- [16] 邓一鸣,孙晓霞,薛立安. 赤芍中药药苷的提纯工艺研究[J]. 南京中医药大学学报:自然科学版,2004,20(6):363-364.
- [17] 徐耀,郁建平. 长叶地榆多糖提取工艺研究[J]. 食品科学,2008,29(3):181-183.
- [18] 刘丹,汤海峰,张三奇,等. 虎杖中有效成分提取方法的研究[J]. 中成药,2007,29(4):516-521.
- [19] 李安林,熊双丽. 夏枯草总黄酮的提取与抑菌活性研究[J]. 食品研究与开发,2011,32(5):27-29.
- [20] 刘忠义,张国威,何云. 志解豚支原体中药药敏试验[J]. 中华皮肤科杂志,1996,29(5):349-351.
- [21] 郭永刚,李荣誉,周延州,等. 恩诺沙星与磺胺间甲氧嘧啶联合药敏试验[J]. 中国兽医药杂志,2009,43(6):9-11.
- [22] 王春华,周铁忠,张正莹,等. 甘草、黄连等五味中药对体外抗菌作用的研究[J]. 中国农学通报,2012,28(17):63-67.
- [23] 曾雪花,周桂保,杨湘江,等. 黄连解毒汤体外抗菌活性研究[J]. 中国医药导报,2012,9(19):161-162.
- [24] 游思湘,何湘蓉,隆雪明,等. 艾叶挥发油体外抗菌作用研究[J]. 中兽医医药杂志,2011(3):74-75.
- [25] 陈易彬,孙宝祥,陈佳希. 虎杖中白藜芦醇的稳定性研究[J]. 中药材,2007,30(7):805-807.
- [26] 侯小涛,戴航,周江煜. 黄柏的药理研究进展[J]. 时珍国医国药,2007(2):125-127.

Antibacterial activity of crude extract from twenty traditional Chinese medicines like *Artemisia argyi* against *Pasteurella multocida* in vitro

QU Jing¹ YIN Zhong-qiong¹ JIA Ren-yong^{1,2} PENG Lian-ci¹ KANG Shuai¹ LI Li¹

1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Preventive Veterinary Research Institute of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract Active ingredients of 20 traditional Chinese medicines were extracted by ethanol circumfluence, water decoction, and ultrasonic extraction. Double dilution method is used to determine the antibacterial activity on *Pasteurella multocida* in vitro. And then the joint bacteriostatic activities of a few traditional Chinese medicines were evaluated. The result showed that the minimal inhibitory concentration (MIC) was in a range of 6.25~50 mg/mL mugwort leaf (*Artemisia argyi*), *Rhizoma coptidis*, *Cortex phellodendri*, *Cortex fraxini*, *Garden burnet*, *Giant knotweed*'s extracts, in range of 50 to 100 mg/mL for *Radix paeoniaerubra*, *Radix-polygonimultiflora*, *Herba artemisiae capillaris*, *Rhizomabel-amcandae*, *Licorice root*, *Dandelion*, *Cortex dictamni*'s extracts, and more than 100 mg/mL for *Honeysuckle*, *Radix bupleuri*, *Radix isatidis*, *Prunella vulgaris*, *Herba andrographitis*, *Rhizoma anemarrhenae*, *Radix sophorae flavescens*'s extracts. The results of joint bacteriostatic test showed that the fractional inhibitory concentration index (FICI) of *R. coptidis*, *C. phellodendri*, *C. fraxini*, *G. knotweed*, and *A. argyi* were less than or equal to 0.5 and the fractional inhibitory concentration index (FICI) of *C. phellodendri*, *C. fraxini*, *R. coptidis* and *G. knotweed*, Qin leather, *G. burnet* and *C. phellodendri* were more than or equal to 2. In conclusion, *R. coptidis*, *C. phellodendri*, *G. burnet*, and *A. argyi* had good antimicrobial activities against *P. multocida*. *R. coptidis*, *C. phellodendri*, *G. burnet* and *Mugwort* showed additive or synergy action, while *Sanguisorba* and *C. phellodendri* showed antagonistic action.

Key words herbal extract; *Pasteurella multocida*; antibacterial activity

(责任编辑:边书京)