

赵君微, 杨帅, 袁婧, 等. 诃子提取物对3种致病菌的体外抑菌效果及其机制研究[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(2): 63-70.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.02.008

诃子提取物对3种致病菌的体外抑菌效果及其机制研究

赵君微, 杨帅, 袁婧, 杨利国

华中农业大学动物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为探究诃子在畜禽疫病防控中的作用及应用潜力, 以大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌3种常见致病菌为对象, 对比诃子和其他11种中药提取物的抑菌圈直径和最小抑菌浓度(MIC), 分析诃子培养上清液的总漏出率和电导率、蛋白浓度及诃子对细菌DNA和蛋白含量的影响。结果显示: 诃子比其他11种中药的抑菌效果更强, 表现为抑菌圈直径更大, MIC更低。培养上清液的电导率和漏出率增加, 用2倍MIC诃子药液处理8h后, 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌上清液蛋白浓度显著增加($P < 0.05$)。诃子抑制大肠埃希菌蛋白合成, 使分子质量约为80 ku的蛋白缺失; 对肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌蛋白质合成影响不明显, 对细菌DNA也没有明显的凝胶阻滞作用, 但能降解DNA。以上结果表明: 诃子具有较好的抑菌效果, 其作用机制是通过破坏细菌细胞膜通透性, 抑制细菌核酸和蛋白合成而发挥抑菌作用。

关键词 诃子; 致病菌; 大肠埃希菌; 肺炎克雷伯菌; 阴沟肠杆菌; 细菌耐药性; 抑菌作用; 凝胶阻滞; 中草药

中图分类号 S852.61 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)02-0063-08

大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌是常见的革兰氏阴性菌^[1]。大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌感染可致奶牛乳房炎, 对畜牧业造成直接危害; 阴沟肠杆菌感染可引起牛腹泻、肺炎和死亡^[2]。而抗菌药物的广泛使用已经引起较为严峻的细菌耐药问题^[3-4]。耐药菌主要通过产生破坏抗生素结构的酶^[5]、改变抗生素作用的靶向位点^[6]、改变细菌细胞壁或细胞膜通透性、生成主动外排系统^[7]和遗传变异等获得耐药性。耐药菌获得耐药性方式的多样性和多重耐药性^[8]的特点, 增加了动物疫病防治工作的难度, 对环境和畜牧业也会造成一定程度的污染和危害。在畜禽养殖中, 为了避免细菌产生耐药性, 多数抗生素已被禁用; 在乳用家畜中, 用抗生素治疗后必须弃奶, 造成巨大经济损失。因此, 迫切需要找到可以替代或减少使用抗生素的新型药物。

中药在我国有悠久的历史, 由于其易获得、残留少、不易产生耐药性的优点, 成为治疗耐药菌感染的理想药物^[9]。关于中药抑菌效果的报道很多, 如含地锦草、石榴皮等的中药复方药效与阿莫西林相似, 能

降低大肠杆菌感染雏鸭造成的死亡率^[10]。黄芩、地榆能抑制致犊牛腹泻的大肠杆菌^[11], 五倍子对奶牛乳房炎主要致病菌均有抑制作用^[12]。诃子(*Terminalia chebula*)是使君子科植物, 分布于云南、广东、广西等地, 其药用部位为成熟果实, 药理作用主要是抗菌、抗氧化、促消化和保肝利胆等^[13]。诃子具有多种活性成分, 如没食子酸甲酯、槲皮素等都具有一定的抑菌作用^[14-15]。近年来, 已有研究报道了诃子提取物的有效活性成分及诃子对鲍曼不动杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果^[16-17], 但对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌的抑菌作用及与其他药物的比较研究很少。因此, 本研究探讨诃子提取物对3种常见致病菌的抑菌效果和作用机制, 旨在为我国畜禽传染病防控技术提供新思路。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

本试验采用的中药醇提取物(10:1)为固体粉末, 包括连翘、诃子、苦参、黄连、五味子、紫花地丁、

收稿日期: 2022-07-29

基金项目: “十四五”国家重点研发计划(2022YFD1301001)

赵君微, E-mail: 347511612@qq.com

通信作者: 杨利国, E-mail: 1592137597@qq.com

金银花、苏木、乌梅、女贞子、蒲公英、黄芪共12种,均购自陕西西迪生物科技有限公司;MH肉汤、NA琼脂,购自青岛海博生物技术有限公司;Bradford法蛋白浓度检测试剂盒、空白药敏纸片,购自北京索莱宝科技有限公司;细菌总蛋白提取试剂盒,购自北京庄盟国际生物科技有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,购自北京康为世纪生物科技有限公司;考马斯亮蓝染色液(G-250)和蛋白预制胶试剂盒,购自兰杰柯科技有限公司。

1.2 菌种

标准大肠埃希菌(FSCC149002)、肺炎克雷伯菌(FSCC167002)、阴沟肠杆菌(FSCC145003)由华中农业大学动物遗传育种教育部重点实验室保存。

1.3 中药提取物药液和菌液的制备

取本文“1.1”中12种中药提取物各4g,分别溶于20mL无菌水中制成0.2g/mL的药液,水浴锅加热溶解后,置于121℃灭菌锅灭菌15min,4℃保存,备用。

划线复苏冻存大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌菌株,分别挑取单菌落于MH肉汤培养基37℃、220r/min培养16h,调整各菌悬液浓度分别为 1×10^8 和 1×10^5 cfu/mL,4℃保存,备用。

1.4 药敏纸片制备

于96孔板加入药敏纸片,每孔分别加入制备好的12种中药提取物药液和ddH₂O(对照)100μL,使药敏纸片充分吸收药液,而后将纸片取出,于60℃烘箱烘干备用。

1.5 抑菌效果检测

1) 抑菌圈。采用药敏纸片扩散法^[18],将制备好的3种菌液(终浓度为 1×10^8 cfu/mL)100μL用涂布棒分别均匀涂布于NA琼脂平板,在通风橱通风30min使平板干燥,取同种中药提取物药液的3个药敏纸片呈正三角形分布贴于NA平板。药敏纸片直径6mm,2个药敏纸片间距>24mm,药敏纸片距培养皿边缘>15mm。在37℃恒温培养箱培养16h,采用游标卡尺测量抑菌圈直径,从不同方向测量,结果取平均值。

2) 最小抑菌浓度(MIC)。用二倍稀释法^[19],在96孔板各孔加入150μL MH肉汤培养基,各排第1孔分别加入不同的中药提取物药液150μL,横向2倍稀释到第10孔,在第1~11孔加入菌液(终浓度为 1×10^5 cfu/mL),第11孔作阳性对照,第12孔不处理作阴性对照。每组3个重复,放入恒温培养箱培养

24h,观察每孔澄清程度,以每组澄清孔对应的最小浓度为最小抑菌浓度。

1.6 总漏出率和电导率的测定

依据比色法测定诃子培养上清液的总漏出率(OD_{600nm})和培养液电导率(OD_{450nm})相对值^[20]。取3种菌液各500μL(终浓度为 1×10^8 cfu/mL)至1.5mL离心管中,分别加入500μL不同浓度的诃子提取物药液,使其终浓度分别为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌的1倍、2倍和4倍MIC,以500μL ddH₂O作对照,37℃孵育,分别取培养0、2、4、6、8h的培养液5000r/min离心10min,取上清液,用酶标仪在600nm波长下测菌体培养液的总漏出率,在450nm波长下测定菌体培养液的电导率。

1.7 胞外蛋白浓度测定

细菌培养液蛋白浓度用Bradford法^[21]测定。取3种菌液各500μL(终浓度为 1×10^8 cfu/mL)至1.5mL离心管中,分别加入500μL不同浓度的诃子提取物药液,使其终浓度分别为该细菌的1倍和2倍MIC,以500μL ddH₂O作对照,37℃孵育0、8h,5000r/min离心10min。取上清液测定蛋白浓度,重复3次。数据取其平均值,以诃子浓度为横坐标,8h后上清液中增加的蛋白浓度为纵坐标绘制柱状图。

1.8 DNA含量的凝胶电泳分析

取3种菌液各500μL(终浓度为 1×10^8 cfu/mL)至1.5mL离心管中,分别加入500μL不同浓度诃子提取物药液,使其终浓度分别为1倍、2倍和4倍MIC,以500μL ddH₂O作对照,37℃孵育0、2、4、6h,提取细菌基因组DNA,用10g/L琼脂糖凝胶电泳,并用凝胶成像仪显影。

1.9 胞内蛋白SDS-PAGE分析

分别加入诃子提取物药液至终浓度为1倍、2倍和4倍MIC 2mL,ddH₂O为阴性对照,菌液2mL,37℃培养8h,用细菌总蛋白提取试剂盒提取胞内蛋白,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。每个样品取16μL加入4μL蛋白上样缓冲液,沸水浴5min,冷却至室温,吸取15μL上样,电压80V,当样品到达分离胶边缘时加压至120V,直至样品移动至距胶底端1cm结束,取下胶板,染色,脱色完全后置于凝胶成像系统进行观察。

1.10 DNA迁移情况分析

用改良的凝胶阻滞方法^[22]分析DNA迁移情况,

即取细菌基因组DNA,构建基因组与诃子的作用体系。在微量离心管中分别加入5 μL 0.5、1、2和4倍MIC浓度诃子提取物药液和5 μL基因组DNA,加入超纯水使各体系补足至20 μL,混匀后置于37℃恒温培养箱孵育10 min,用10 g/L琼脂糖凝胶电泳,利用凝胶成像仪检测DNA的迁移情况。

1.11 数据处理

用Excel 2010软件对试验数据进行统计分析,数据均以“平均值±标准误”表示,用SPSS 24统计软件对细菌蛋白浓度进行单因素ANOVA分析组间显

著性,用GraphPad Prism 8软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 诃子的抑菌效果

比较12种中药提取物对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌的抑菌圈直径测量结果(表1)可见,诃子对3种致病菌的抑菌圈直径均高于其他中药提取物。除诃子外,乌梅也表现出一定的抑菌效果,但乌梅对肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌的抑菌效果不及诃子,对大肠埃希菌未表现出抑菌作用。

表1 诃子等12种中药提取物对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌的抑菌圈直径

Table 1 Inhibitory circle diameter of 12 Chinese herbal extracts on *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumoniae and *Enterobacter cloacae*

mm

中药提取物 Chinese herbal extract	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>
诃子 <i>Terminalia chebula</i>	8.53±0.34	8.61±0.35	8.51±0.42
乌梅 <i>Fructus mume</i>	—	8.10±0.65	7.95±0.89
黄连 <i>Coptis chinensis</i>	—	7.30±0.29	—
五味子 <i>Schisandra chinensis</i>	7.13±0.24	7.30±0.43	8.70±0.37
蒲公英 <i>Taraxacum mongolicum</i>	7.19±0.36	7.27±0.24	6.73±0.33
女贞子 <i>Fructus Ligustri</i>	7.03±0.25	7.39±0.28	7.50±0.75
金银花 <i>Lonicera japonica</i>	6.20±0.16	6.87±0.09	6.40±0.16
苏木 <i>Caesalpinia sappan</i>	—	7.83±0.24	6.37±0.29
连翘 <i>Forsythia suspensa</i>	—	7.07±0.82	6.63±0.42
紫花地丁 <i>Viola philippica</i>	—	7.50±0.45	—
苦参 <i>Sophora flavescens</i>	—	7.60±0.08	—
黄芪 <i>Astragalus memranaceus</i>	—	—	7.25±0.05

注:—表示抑菌效果不明显。Note:— indicates that the antibacterial effect is not obvious.

比较12种中药提取物对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌的最小抑菌质量浓度(MIC)(表2),可见诃子的MIC最小,与抑菌圈试验结果基本一致。除诃子和乌梅外,其他中药对几种常见致病菌几乎没有抑菌效果。相较于乌梅,诃子对几种致病菌的MIC更低。

2.2 诃子对致病菌总漏出率、电导率和蛋白增量的影响

大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌3种致病菌用0、1、2和4倍MIC浓度诃子药液处理后,培养液总漏出率、电导率和蛋白增量结果见图1。各致病菌对诃子药液均敏感,随着培养时间延长,细胞膜通透性增加,造成大量物质外泄,表现为光密度值升高(图1 A、B和C),而对照组的光密度值相对平稳;高浓度的诃子药液(质量浓度为4倍MIC和2倍MIC)

2 h便可发挥抑菌效果,漏出率迅速升高,而低浓度的诃子溶液则在作用后期才发挥抑菌优势。

用不同质量浓度诃子药液处理后,3种致病菌大量离子外流,使得胞外离子浓度增大,光密度增加(图1 D、E和F)。诃子处理致病菌后,细菌中大分子蛋白外流,加速菌体死亡;诃子作用8 h,各致病菌胞外蛋白含量均高于对照组,其中大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌在2倍MIC诃子浓度下培养液中蛋白含量显著高于对照组($P<0.05$)(图1 G和H),但阴沟肠杆菌在1倍和2倍MIC诃子浓度下培养液中蛋白含量均无显著变化(图1 I)。

2.3 致病菌用诃子处理后的DNA含量

大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌分别用0、1、2和4倍MIC浓度诃子药液处理后,致病菌DNA的含量变化如图2所示。对照组中3种致病菌

表2 诃子等12种中药提取物对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌的最小抑菌浓度
Table 2 Minimal inhibitory concentration of 12 Chinese herbal extracts on *Escherichia coli*,

中药提取物 Chinese herbal extract	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>
诃子 <i>Terminalia chebula</i>	6.25	12.50	6.25
乌梅 <i>Fructus mume</i>	50.00	50.00	50.00
黄连 <i>Coptis chinensis</i>	—	25.00	—
五味子 <i>Schisandra chinensis</i>	—	—	—
蒲公英 <i>Taraxacum mongolicum</i>	—	—	—
女贞子 <i>Fructus Ligustri</i>	—	—	—
金银花 <i>Lonicera japonica</i>	—	—	—
苏木 <i>Caesalpinia sappan</i>	—	—	—
连翘 <i>Forsythia suspensa</i>	—	—	—
紫花地丁 <i>Viola philippica</i>	—	—	—
苦参 <i>Sophora flavescens</i>	—	—	—
黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i>	—	—	—

注:—表示质量浓度为100 mg/mL时,无抑菌效果。Note:— means that no antibacterial effect is observed when the concentration is 100 mg/mL.

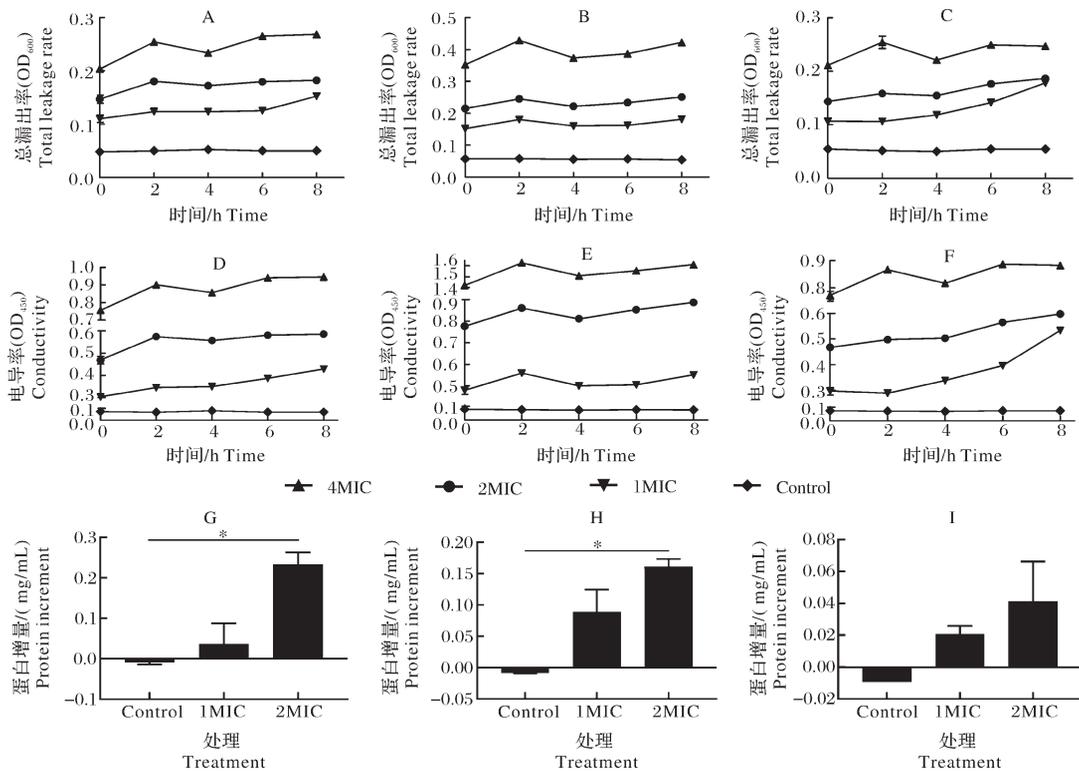


图1 大肠埃希菌(A、D、G)、肺炎克雷伯菌(B、E、H)和阴沟肠杆菌(C、F、I)经诃子药液处理后,培养液的总漏出率(A、B、C)、电导率(D、E、F)和蛋白增量(G、H、I)

Fig.1 The total leakage rate (A,B,C), conductivity (D,E,F) and protein increment (G,H,I) of *Escherichia coli* (A,D,G), *Klebsiella pneumoniae*(B,E,H) and *Enterobacter cloacae*(C,F,I) treated with *Terminalia chebula* 的DNA条带随时间延长变亮,表明细菌数在增加。诃子提取物药液处理组的DNA条带随时间延长变暗,说明诃子能抑制细菌的增殖,其抑菌强度与剂量及作用时期呈正相关关系。

2.4 诃子处理后的致病菌蛋白含量

用1倍MIC浓度诃子药液处理3种致病菌0、4和8h的菌体蛋白含量变化如图3所示。大肠埃希菌用诃子提取物药液处理后4、8h,SDS-PAGE图谱中

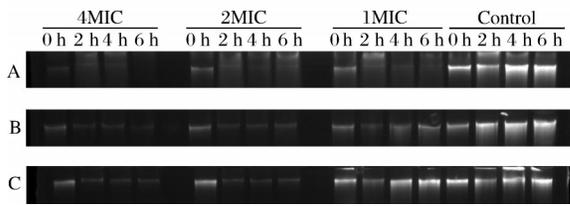


图 2 大肠埃希菌(A)、肺炎克雷伯菌(B)和阴沟肠杆菌(C)用诃子药液处理 0、2、4 和 6 h 的 DNA 凝胶电泳图

Fig.2 DNA gel electrophoresis results of *Escherichia coli*(A), *Klebsiella pneumoniae*(B) and *Enterobacter cloacae*(C) treated with *Terminalia chebula* for 0, 2, 4 and 6 h

缺少 1 个约为 80 ku 的条带, 而对照组存在该条带(图 3A), 说明诃子抑制大肠埃希菌蛋白合成, 从而表现

出缺失。肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌用诃子提取物药液处理后, 菌体蛋白电泳图谱未出现蛋白缺失现象(图 3B 和 C)。

2.5 诃子对致病菌 DNA 的凝胶阻滞作用

取 3 种致病菌 DNA, 分别用 0、0.5、1、2 和 4 倍 MIC 浓度诃子药液处理 10 min 后, DNA 的凝胶阻滞结果见图 4。发现 DNA 条带未出现拖尾现象, 说明没有明显的阻滞作用。随着诃子药液浓度的增加, 3 种致病菌的 DNA 条带明显变暗, 而对照组的 DNA 条带清晰可见, 表明诃子虽不能直接与细菌 DNA 相互作用, 但诃子对 DNA 有明显的降解作用。

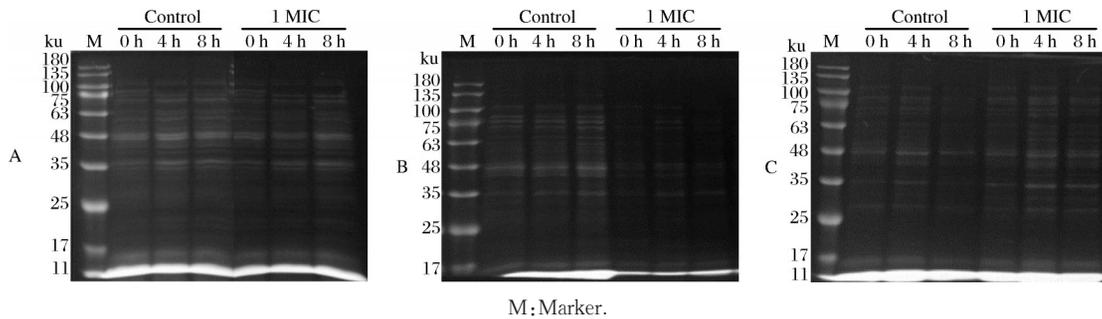


图 3 大肠埃希菌(A)、肺炎克雷伯菌(B)和阴沟肠杆菌(C)用 0 和 1 倍 MIC 浓度诃子药液处理 0、4 和 8 h 的蛋白 SDS-PAGE 图

Fig.3 SDS-PAGE of proteins of *Escherichia coli*(A), *Klebsiella pneumoniae*(B) and *Enterobacter cloacae*(C) treated with *Terminalia chebula* in concentration of 0 and 1 MIC for 0, 4 and 8 h

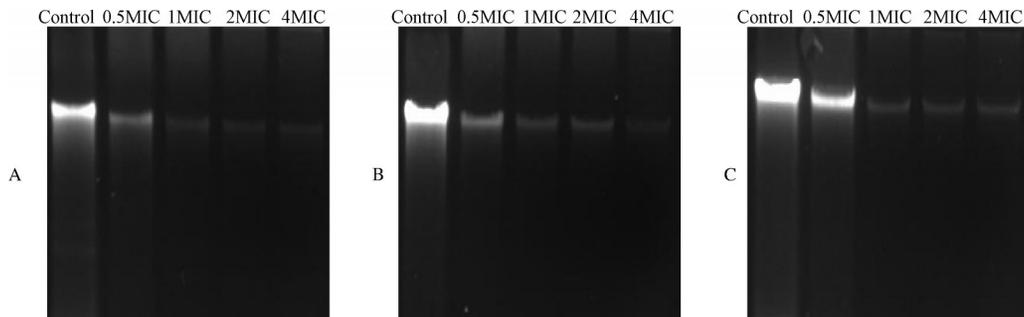


图 4 大肠埃希菌(A)、肺炎克雷伯菌(B)和阴沟肠杆菌(C)的 DNA 用 0、0.5、1、2 和 4 倍 MIC 浓度诃子药液处理 10 min 的 DNA 凝胶电泳图

Fig.4 DNA gel electrophorograms of *Escherichia coli*(A), *Klebsiella pneumoniae*(B) and *Enterobacter cloacae*(C) treated with *Terminalia chebula* in concentration of 0, 0.5, 1, 2 and 4 MIC for 10 min

3 讨论

通常, 某种中草药只对 1 种或少数几种致病菌有抑菌作用, 如艾叶、黄芩对大肠埃希菌有抑菌效果^[23], 黄连、连翘对肺炎克雷伯菌有抑菌效果^[24], 番石榴叶对阴沟肠杆菌有抑菌效果^[25]。本研究比较诃子与 11 种中草药的抑菌效果, 发现诃子对 3 种致病

菌均表现出较好的抑菌效果, 而其他中药只对特定致病菌表现出抑菌效果且效果较差。因此, 相比于其他中药, 诃子提取物的抑菌效果更强。本研究中除诃子外的 11 种中药, 其抑菌效果与其他文献报道有一定差异^[24,26], 可能与本试验所采用的中药提取方法或所用致病菌的耐药性有关。

细胞膜是细菌天然保护屏障,在维持细胞内环境稳定代谢和调节选择物质交换方面有重要作用^[27]。细菌细胞内含有大量的水、离子、大分子蛋白和细胞器。当细菌受到抑菌剂或杀菌剂作用时,膜被破坏,其通透性和流动性增加,导致大量电解质流向胞外^[28]。郭娟等^[22]通过分析大分子释放量和电导率,发现抗菌肽P-1破坏粉红单端孢,使胞内电解质和大分子释放达到抑菌效果,这和本研究中诃子药液处理后细菌上清液电导率、漏出率和蛋白浓度增加结果一致,表明诃子抑菌的作用机制之一,是破坏细菌细胞膜的结构,改变膜通透性,使其电解质及大分子流出,导致细菌死亡。

DNA和蛋白在细菌增殖中保持相对稳定,而抑菌剂可以影响细菌DNA的合成、蛋白表达,或直接作用于DNA。本试验中用诃子处理后的3种致病菌,DNA浓度降低,细菌数量减少,表明诃子能抑制细菌的增殖,并具有杀菌效果。研究丁香酚和异丁香酚的抑菌机制时,发现丁香酚能破坏细胞壁、膜,细胞膜通透性改变,使其失去生命力,并且抑制部分蛋白合成^[29],可合理解释本试验关于诃子处理大肠埃希菌后细菌总蛋白缺失80 ku条带的结果,表明诃子的抑菌机制之二,可能是抑制蛋白质的合成导致细菌死亡。

凝胶阻滞作用可以反映药物是否与DNA直接作用,是探究药物作用机制的重要手段。本研究用诃子处理细菌DNA后,虽没有发现明显的阻滞作用,但DNA条带明显变暗,表明诃子能降解DNA,即诃子的抑菌机制之三,是通过抑制DNA合成和降解部分DNA发挥抑菌作用。

总之,诃子在体外可以通过多种机制抑菌,如破坏细菌细胞膜、改变核酸和蛋白的合成,具有良好体外抑菌效果,在畜禽呼吸系统和消化系统病原体疾病的防控中具有应用潜力,值得进行临床应用研究。

参考文献References

[1] AHOYO T A, BANKOLÉ H S, ADÉOTI F M, et al. Prevalence of nosocomial infections and anti-infective therapy in Benin: results of the first nationwide survey in 2012[J/OL]. *Antimicrobial resistance and infection control*, 2014, 3: 17 [2022-07-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24883183/>. DOI:

10.1186/2047-2994-3-17.

[2] 李昊,叶昱,宋德平,等.七彩山鸡致病性阴沟肠杆菌的分离鉴定、毒力和遗传进化分析[J].*黑龙江畜牧兽医*,2018(8):85-88. LI H, YE Y, SONG D P, et al. Isolation, identification, virulence, and phylogenetic analysis of a pathogenic *Enterobacter cloacae* from diseased Pheasants in Jiangxi[J]. *Heilongjiang animal science and veterinary medicine*, 2018(8):85-88 (in Chinese with English abstract).

[3] 胡丽庆,孙定河,王盛,等.2017—2019年某院耐碳青霉烯肠杆菌临床分布及耐药性[J].*中国消毒学杂志*,2020,37(9):683-685. HU L Q, SUN D H, WANG S, et al. Clinical distribution and drug resistance of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a hospital from 2017 to 2019[J]. *Chinese journal of disinfection*, 2020, 37(9):683-685 (in Chinese with English abstract).

[4] 戴蕴,肖群.292例血流感染病原菌分布特点及耐药性分析[J].*中国医学创新*,2020,17(31):111-115. DAI Y, XIAO Q. Distribution characteristics and drug resistance analysis of 292 strains of bloodstream infection pathogens[J]. *Medical innovation of China*, 2020, 17(31):111-115 (in Chinese with English abstract).

[5] 刘兴旺.细菌耐药性产生机理的研究进展[J].*中国畜禽种业*,2014,10(1):28-29. LIU X W. Research progress on the mechanism of bacterial drug resistance[J]. *The Chinese livestock and poultry breeding*, 2014, 10(1):28-29 (in Chinese).

[6] HUSSAIN S, JOO J, KANG J, et al. Antibiotic-loaded nanoparticles targeted to the site of infection enhance antibacterial efficacy[J]. *Nature biomedical engineering*, 2018, 2(2):95-103.

[7] BUTAYE P, CLOECKAERT A, SCHWARZ S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria[J]. *International journal of antimicrobial agents*, 2003, 22(3):205-210.

[8] SALLOUM S, TAWK M, TAYYARA L. Bacterial resistance to antibiotics and associated factors in two hospital centers in Lebanon from January 2017 to June 2017[J/OL]. *Infection prevention in practice*, 2020, 2(2):100043 [2022-07-29]. <https://doi.org/10.1016/j.infpip.2020.100043>.

[9] 黄梅,谭余庆,罗俊,等.植物类中药抗菌耐药性的研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*,2018,24(23):218-224. HUANG M, TAN Y Q, LUO J, et al. Antimicrobial resistance of Chinese herbal medicine[J]. *Chinese journal of experimental traditional medical formulae*, 2018, 24(23):218-224 (in Chinese with English abstract).

[10] 秦枫,刘云,吴植,等.中药复方对大肠杆菌感染雏鸭的防治效果研究[J].*中国畜牧兽医*,2020,47(10):3371-3378. QIN F, LIU Y, WU Z, et al. Study on the prevention and control effect of Chinese herbal compound on *E. coli* infected ducklings[J]. *China animal husbandry & veterinary medicine*, 2020, 47(10):3371-3378 (in Chinese with English abstract).

[11] 杨教校,唐慕德,和玉丹,等.中药对致犊牛腹泻大肠杆菌体外

- 抑菌效果[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(2): 102-106, 134. YANG X X, TANG M D, HE Y D, et al. *In vitro* antibacterial effect of traditional Chinese medicines on calf diarrhea-causing *Escherichia coli* [J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2022, 58(2): 102-106, 134 (in Chinese with English abstract).
- [12] 谢成运, 程璐, 张娟, 等. 20味中药水提液对奶牛乳房炎主要致病菌体外抑菌效果筛选[J]. 动物医学进展, 2021, 42(11): 65-68. XIE C Y, CHENG L, ZHANG J, et al. Antibacterial effects *in vitro* of 20 traditional Chinese herb water extracts on main pathogenic bacteria of dairy cow mastitis [J]. Progress in veterinary medicine, 2021, 42(11): 65-68 (in Chinese with English abstract).
- [13] 杨雨航, 侯璐瑶, 杨映, 等. 诃子的成分、生物学功能及其在水产养殖领域中应用的研究进展[J]. 饲料研究, 2022, 45(15): 144-148. YANG Y H, HOU L Y, YANG Y, et al. Research progress on components, biological functions and application of *Fructus chebulae* in aquaculture [J]. Feed research, 2022, 45(15): 144-148 (in Chinese with English abstract).
- [14] ACHARYYA S, SARKAR P, SAHA D R, et al. Intracellular and membrane-damaging activities of methyl gallate isolated from *Terminalia chebula* against multidrug-resistant *Shigella* spp. [J]. Journal of medical microbiology, 2015, 64(8): 901-909.
- [15] WANG S G, YAO J Y, ZHOU B, et al. Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative *in vivo* and its antibacterial mechanism *in vitro* [J]. Journal of food protection, 2018, 81(1): 68-78.
- [16] 詹轶雯, 李金贵. 诃子活性成分及抑菌作用研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(4): 34-37. ZHAN Y W, LI J G. Research progress on antibacterial effect of active ingredients of *Terminalia chebula* [J]. Journal of traditional Chinese veterinary medicine, 2020, 39(4): 34-37 (in Chinese with English abstract).
- [17] 崔念臻, 李士生, 韩旭. 诃子提取物的抗菌活性研究[J]. 吉林医药学院学报, 2016, 37(3): 170-172. CUI N Z, LI S S, HAN X. Studies on the antibacterial activity of *Fructus chebulae* extracts [J]. Journal of Jilin Medical University, 2016, 37(3): 170-172 (in Chinese with English abstract).
- [18] KALEMBA D, KUNICKA A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils [J]. Current medicinal chemistry, 2003, 10(10): 813-829.
- [19] 郝督, 陈琛, 张小莺. 中草药提取物与抗菌药联用对耐药大肠杆菌的抑菌作用研究[J]. 中国饲料, 2020(6): 14-17. HAO D, CHEN S, ZHANG X Y. Antibacterial activity of traditional Chinese herb extract combined with antibiotics against drug-resistant *Escherichia coli* [J]. China feed, 2020(6): 14-17 (in Chinese with English abstract).
- [20] 姜晓文, 燕鸽, 李叔洪, 等. 板蓝根微粉水提物抗大肠杆菌活性及其机制的探究[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(9): 2968-2978. JIANG X W, YAN G, LI S H, et al. Study on the anti-*Escherichia coli* activity and mechanism of water extract of *Radix isatidis* powder [J]. China animal husbandry & veterinary medicine, 2020, 47(9): 2968-2978 (in Chinese with English abstract).
- [21] 张钰皎, 陈忠军, 满都拉, 等. 具有抑菌特性的乳杆菌对食源性病原菌生物被膜形成的影响[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(22): 168-174. ZHANG Y J, CHEN Z J, MANDLAA, et al. The effect of antibacteria activity *Lactobacillus* on biofilm formation of food-borne pathogens [J]. Food research and development, 2020, 41(22): 168-174 (in Chinese with English abstract).
- [22] 郭娟, 负建民, 邓展瑞, 等. *Bacillus pumilus* HN-10 抗菌肽 P-1 对粉红单端孢的抑菌机理[J]. 食品科学, 2019, 40(19): 17-22. GUO J, YUN J M, DENG Z R, et al. Antimicrobial mechanism of antimicrobial peptide P-1 from *Bacillus pumilus* HN-10 against *Trichothecium roseum* [J]. Food science, 2019, 40(19): 17-22 (in Chinese with English abstract).
- [23] 同小妮, 林娜娜, 张珊珊, 等. 六种单味药对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑菌效果研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(38): 147, 180. TONG X N, LIN N N, ZHANG S S, et al. Study on the bacteriostatic effect of six single drugs on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. Electronic journal of clinical medical literature, 2020, 7(38): 147, 180 (in Chinese).
- [24] 张蕊, 刘景武, 董佳, 等. 黄连、连翘、紫花地丁等中药对碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌体外抑菌研究[J]. 医学动物防制, 2020, 36(12): 1177-1179, 1239. ZHANG R, LIU J W, DONG J, et al. Bacteriostatic effects of *Coptis chinensis*, *Forsythia suspensa*, *Viola fruticosa* and other traditional Chinese medicine on Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae in vitro* [J]. Journal of medical pest control, 2020, 36(12): 1177-1179, 1239 (in Chinese with English abstract).
- [25] 易富, 蔡敬琪, 李娅, 等. 番石榴叶水提取物对11种细菌的体外抑菌实验[J]. 西南国防医药, 2013, 23(11): 1168-1169. YI F, CAI M Q, LI Y, et al. Study on antimicrobial effects of guava leaf water extract on 11 kinds of bacteria *in vitro* [J]. Medical journal of national defending forces in southwest China, 2013, 23(11): 1168-1169 (in Chinese with English abstract).
- [26] 徐倩倩, 吕素芳, 李峰, 等. 38味中药对猪大肠杆菌的体外抑菌活性[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(5): 66-71. XU Q Q, LYU S F, LI F, et al. *In vitro* bacteriostatic activity of 38 traditional Chinese medicines against a swine *E. coli* [J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2020, 56(5): 66-71 (in Chinese with English abstract).
- [27] RAPOSO G, STOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends [J]. The journal of cell biology, 2013, 200(4): 373-383.
- [28] TAKEUCHI K, TAKAHASHI H, SUGAI M, et al. Channel-forming membrane permeabilization by an antibacterial protein, sapecin: determination of membrane-buried and oligomerization surfaces by NMR [J]. The journal of biological chemistry, 2004,

- 279(6):4981-4987. antibacterial activity and mechanism of action of the eugenol and isoeugenol[D].Linfen:Shaanxi Normal University, 2017(in Chinese with English abstract).
- [29] 李建菲. 丁香酚与异丁香酚的抗氧化、抑菌活性及抑菌机理研究[D]. 临汾:山西师范大学, 2017. LI J F. Antioxidant activity,

***In vitro* antibacterial effect and mechanism of *Terminalia chebula* extract on three pathogenic bacteria**

ZHAO Junwei, YANG Shuai, YUAN Jing, YANG Liguo

College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In order to investigate the role and application potential of *Terminalia chebula* in the prevention and control of livestock and poultry diseases, three species of common pathogenic bacteria, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* were selected as test organisms. The inhibition circle diameter and minimum inhibitory concentration (MIC) of *T. chebula* and 11 other Chinese herbal extracts were compared, the total leakage rate, electrical conductivity, protein concentration in the supernatant, and the effects of *T. chebula* on the DNA and protein content of bacteria were analyzed. The results showed that *T. chebula* had stronger antibacterial effect than other Chinese herbs, with larger circle diameter and lower concentration of bacteriostatic. The conductivity and leakage rate of culture supernatant increased. The protein concentration of the supernatant of *E. coli* and *K. pneumoniae* significantly increased ($P < 0.05$) after 2-fold MIC *T. chebula* treatment for 8 h. *T. chebula* inhibited the protein synthesis of *E. coli*, resulting in the deletion of a protein with a molecular weight of about 80 ku. However, *T. chebula* had no obvious effect on protein synthesis of *K. pneumoniae* and *E. cloacae*. *T. chebula* had no significant gel-blocking effect on bacterial DNA, but could degrade DNA. The above results indicate that *T. chebula* could exert its antibacterial effect by disrupting the permeability of bacterial cell membrane and inhibiting the synthesis of bacterial nucleic acid and protein. Therefore, the rational application of the *T. chebula* extract is a new idea for the prevention and control of livestock and poultry infectious diseases in China.

Keywords *Terminalia chebula*; pathogenic bacteria; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Enterobacter cloacae*; bacterial resistance; antibacterial function; gel block; Chinese medicinal herb

(责任编辑:边书京)