

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.02.09

基于中草药提取方法差异对鸡源变形杆菌的体外抑菌作用比较

陈圣威,马丹怡,丁月霞*

(广东海洋大学农学院,广东 湛江 524088)

[收稿日期] 2019-09-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)02-0053-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为探究中草药提取液对临床分离鸡源变形杆菌抑菌效果,本试验对野菊花、穿心莲等 9 种中草药,采取水提法和醇提法提取中草药的有效成分,并采用试管二倍稀释法测定中草药提取液对鸡源变形杆菌的最小抑菌浓度(MIC),采用微量肉汤稀释棋盘法对抑菌效果较佳的黄芩等 5 种水提液与虎杖等 3 种醇提液分别进行体外联合药敏试验,测定其 FIC 指数。结果表明:水提液中,黄芩抑菌效果最佳,MIC 为 62.5 mg/mL,穿心莲、虎杖、黄连、香薷次之,MIC 均为 125 mg/mL;醇提液中,虎杖、穿心莲、香薷抑菌效果较好,MIC 均为 125 mg/mL;体外联合药敏试验中,本试验各组合均无协同作用;说明黄芩水提液对鸡源变形杆菌抑菌效果最佳,其余药物水提液抑菌效果一般或较差;醇提取液抑菌效果为一般或较差;本试验各联合用药的效果不佳。

[关键词] 中草药;鸡源变形杆菌;抑菌作用;提取方法

Comparison of Antibacterial Effects *in vitro* of Chinese Herbal Medicine Extraction Methods on *Proteus* from Chickens

CHEN Sheng-wei, MA Dan-yi, DING Yue-xia*

(Agricultural College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong, 524088, China)

Corresponding author: DING Yue-xia, E-mail: dingyuexia2006@163.com

Abstract: To study the antibacterial effect of Chinese herbal medicine extract on clinical isolates of *Proteus*. Nine kinds of Chinese herbal medicines were selected in this experiment, including *Dendranthema indicum* and *Andrographis paniculate*. The active constituents of Chinese herbal medicines were extracted by water extraction and alcohol extraction, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of the herbal extracts against *Proteus* was determined by double dilution method. According to the results of MIC, choosing five water extracts including

基金项目: 广东海洋大学创新强校工程项目(Q18290);广东海洋大学科研启动项目(R17020)

作者简介: 陈圣威,硕士研究生,从事畜牧方向研究。

通讯作者: 丁月霞。E-mail: dingyuexia2006@163.com

Scutellaria baicalensis Georgi etc, and three alcohol extracts, such as *Reynoutria japonica* Houtt. etc, which were combined in vitro for medicine sensitivity test, and their FIC index was measured. The results showed that the antibacterial effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi was the best in the aqueous extract, the MIC was 62.5 mg/mL, and *Andrographis paniculata*, *Reynoutria japonica* Houtt, *Coptis chinensis* Franch and *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland were next, MIC were 125 mg/mL. In the alcohol extract, *Reynoutria japonica* Houtt, *Andrographis paniculata* and *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland had better bacteriostasis effect, MIC was 125 mg/ml. In vitro combined susceptibility test, there was no synergistic effect among the combinations in this experiment. This experiment showed that the water extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi had the most significant bacteriostasis effect on *Proteus* from chickens, while the other medicine bacteriostasis effects were generally or poorly, the bacteriostatic effect of alcohol extract was generally or poorly, the combined effect of all medicine in this experiment was not significant.

Key words: Chinese herbal medicine; *Proteus vulgaris* from chicken; minimal inhibitory concentration; combined medicine sensitivity test.

变形杆菌属分为普通变形杆菌、奇异变形杆菌、潘纳变形杆菌和产黏液变形杆菌共 4 个种,该菌属为革兰氏阴性菌,为医源性感染的机会致病菌,其致病因子有鞭毛、菌毛、内毒素、溶血素和肠毒素。变形杆菌可以导致鸡发生急性热性细菌性传染病,使鸡发生菌血症、败血症,单侧性或双侧性瘫痪或水样腹泻,能够发生暴发性流行疾病,需要养殖业引起重视^[1-2]。

许多研究发现中草药具有良好的抑菌效果,不易导致细菌耐药性的产生,并且能够提高禽类的免疫能力,增强动物机体的体质,具有较高的研究价值,能够为临床用药提供更多选择^[3]。根据相关文献资料,本试验选取了黄芩、穿心莲及虎杖等 9 种具有抑菌效果的中草药,通过水提法和醇提法制备出中药提取液,对鸡源变形杆菌进行体外抑菌试验,筛选抑菌效果较好的中草药提取液进行体外联合药敏试验,测定其部分抑菌浓度(FIC 指数)。以期为研究中草药抑菌效果提供参考,为临床使用中草药治疗普通变形杆菌感染提供依据。

1 材料

1.1 试验菌种 鸡源变形杆菌,采自广东海洋大学动物医院临床病例,经分离鉴定后保存。

1.2 试验药材 野菊花、穿心莲、虎杖、黄连、黄

芩、香薷、金银花、栀子、黄柏,购于湛江市大参林药房。

1.3 主要试剂 营养琼脂,购于北京陆桥技术有限责任公司;营养肉汤,购于北京陆桥技术有限责任公司。

1.4 主要仪器 GZX - GF · 101 - 2 - BS 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂),SPX - 250B - II 生化培养箱(上海跃进医疗器械厂),LDZF - 50KB 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂),TDL - 5Z 台式多管架自动平衡离心机(上海安亭科学仪器厂),BCD - 206STPA 海尔牌冷藏冷冻箱(青岛海尔股份有限公司),SY - CJ - 2FD 双人单面净化工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),DFY - 500500 克摇摆式高速中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司),HWS - 24 数显恒温搅拌水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 中草药提取液的制备

2.1.1 水提液的制备 称取所需中草药 50 g,加 500 mL 蒸馏水室温浸泡 30 min,加热至沸腾后小火煮 30 min,经六层纱布过滤,药渣再加 400 mL 蒸馏水,加热至沸腾后小火煮 30 min,经六层纱布过滤,合并 2 次滤液,滤液经恒温沸腾浓缩至 50 mL,即药

物浓度为 1 g/mL, 4 °C 保存备用^[4]。

2.1.2 醇提液的制备 将药物分别粉碎 20 目, 各称重 50 g, 加入 200 mL 90% 乙醇溶液, 浸泡 1 周, 经六层纱布过滤, 药渣加入 100 mL 90% 乙醇溶液, 再次浸泡 24 h, 经六层纱布过滤, 合并 2 次滤液。将滤液经 3000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 置沸水浴中挥尽乙醇, 浓缩成膏, 再用无菌生理盐水定容至 50 mL, 4 °C 保存备用^[5]。

2.2 供试菌液的制备 挑取保存的菌株, 接种于营养肉汤中, 置于恒温培养箱 37 °C 培养 16 ~ 24 h, 次日于营养琼脂平板上划线培养 16 ~ 24 h, 第三天挑取单个菌落接种于 2 mL 营养肉汤中, 置于恒温培养箱培养 16 ~ 24 h, 吸取上述菌液 0.2 mL, 用营养肉汤按 10^{-1} 进行梯度稀释, 与 0.5 麦氏比浊管对比, 将菌液校正至细菌含量约为 1.5×10^8 CFU/mL, 再稀释为 1.0×10^5 CFU/mL 的供试菌液, 4 °C 冰箱保存。

2.3 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定 中草药的水提液与醇提液均采用试管二倍稀释法进行最小抑菌浓度的测定: 取灭菌后的试管, 排序 1 ~ 12 号, 将 1 ~ 10 号试管的药物浓度依次稀释为 500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.97、1.98 和 0.99 mg/mL。11 号试管不加药物作为阳性对照, 12 号试管不接种细菌作为阴性对照。重复 2 次。将各管置于 37 °C 恒温箱中培养 16 ~ 24 h, 观察结果。在阳性对照管浑浊, 阴性对照管透明不浑浊的条件下, 1 ~ 10 号试管内, 液体澄清透明的最低浓度为最小抑菌浓度。

2.4 体外联合药敏试验 选取最小抑菌浓度 ≤ 125 mg/mL 的中草药水提液和醇提液, 分别进行体外联合药敏试验。采用微量肉汤稀释棋盘法, 将测定的中草药提取液单独对受试菌的最小抑菌浓度 (MIC) 作为中心浓度, 选择 AB 两种药, 将两药 MIC 的 2 倍、1 倍、1/2 倍、1/4 倍以及 MIC 的 1/8、1/16 和 1/32 浓度在 96 孔反应板上进行联合, 接菌量为 1.0×10^5 CFU/mL。置于 37 °C 恒温箱中培养 16 h, 观察结果并计算 FIC 指数。

$$\text{FIC 指数} = \frac{\text{甲药联用时的 MIC}}{\text{甲药单用时的 MIC}} + \frac{\text{乙药联用时的 MIC}}{\text{乙药单用时的 MIC}}$$

FIC 指数 ≤ 0.5 表示两药联合结果为协同作用; FIC 指数 $> 0.5 \sim 1$ 表示两药联合结果为相加作用; FIC 指数 $> 1 \sim 2$ 表示两药联合结果为无关作用; FIC 指数 > 2 表示两药联合结果为无关作用。

3 结果与分析

3.1 最小抑菌浓度 (MIC) 测定结果 不同中草药提取液对鸡源变形杆菌的 MIC 结果见表 1。由表可知, 黄芩水提液对鸡源变形杆菌抑菌效果最显著, 其 MIC 值为 62.5 mg/mL, 黄连、香薷、虎杖、穿心莲的抑菌效果次之, MIC 值为 125 mg/mL, 黄柏抑菌效果一般, MIC 值为 250 mg/mL, 野菊花、栀子的抑菌效果较差, MIC 值为 500 mg/mL, 金银花抑菌效果最差, MIC 值大于 500 mg/mL。

在醇提液中, 香薷、虎杖、穿心莲对鸡源变形杆菌抑菌效果较好, MIC 值为 125 mg/mL, 其次为黄芩、黄连、野菊花、栀子, MIC 值为 250 mg/mL, 黄柏抑菌效果较差, MIC 值为 500 mg/mL, 金银花抑菌效果最差, MIC 值大于 500 mg/mL。

表 1 最小抑菌浓度 (MIC) 测定结果

Tab 1 Results of Minimum inhibitory concentration (MIC)

药物名称	水提液 MIC/(mg · mL ⁻¹)	醇提液 MIC/(mg · mL ⁻¹)
黄芩	62.5	250
黄连	12.5	250
香薷	125	125
虎杖	125	125
穿心莲	125	125
黄柏	250	500
野菊花	500	250
栀子	500	250
金银花	>500	>500

3.2 体外联合药敏试验结果 中草药提取液联合药敏试验结果见表 2、表 3。由表 2 可知, 在水提液

联合药敏试验中,黄连和虎杖联合为拮抗作用(FIC >2),黄芩和穿心莲、黄芩和香薷、黄芩和虎杖、黄连和穿心莲、黄连和香薷、穿心莲和香薷、穿心莲和虎杖、香薷和虎杖联合均为无关作用(FIC >1~2),

黄芩和黄连联合无法计算试验结果,无 FIC 指数。由表 3 可知,醇提液联合药敏试验中,穿心莲和香薷联合为拮抗作用(FIC 指数 >2),虎杖和香薷、穿心莲和香薷联合呈现为无关作用(FIC 指数 >1~2)。

表 2 水提液体外联合药敏试验结果

Tab 2 Results of combined drug sensitivity test with water extraction

甲药 + 乙药	甲药 MIC/(mg · mL ⁻¹)		乙药 MIC/(mg · mL ⁻¹)		FIC 指数	结果
	单 MIC	联 MIC	单 MIC	联 MIC		
黄芩 + 黄连	—	—	—	—	—	—
黄芩 + 穿心莲	15.63	15.63	250.00	125.00	1.50	无关
黄芩 + 香薷	15.63	15.63	250.00	125.00	1.50	无关
黄芩 + 虎杖	15.63	15.63	31.25	31.25	2.00	无关
黄连 + 穿心莲	125.00	125.00	250.00	250.00	2.00	无关
黄连 + 香薷	62.50	62.50	250.00	250.00	2.00	无关
黄连 + 虎杖	62.50	125.00	250.00	125.00	2.50	拮抗
穿心莲 + 香薷	250.00	250.00	250.00	250.00	2.00	无关
穿心莲 + 虎杖	125.00	62.50	250.00	250.00	1.50	无关
香薷 + 虎杖	250.00	125.00	31.25	31.25	1.50	无关

注:“—”表示结果无法计算。

表 3 醇提液体外联合药敏试验结果

Tab 3 Results of combined drug sensitivity test with alcohol extraction

甲药 + 乙药	甲药 MIC/(mg · mL ⁻¹)		乙药 MIC/(mg · mL ⁻¹)		FIC 指数	结果
	单 MIC	联 MIC	单 MIC	联 MIC		
虎杖 + 穿心莲	31.25	31.25	62.50	31.25	1.50	无关
虎杖 + 香薷	31.25	31.25	125.00	62.50	1.50	无关
穿心莲 + 香薷	31.25	62.50	125.00	62.50	2.50	拮抗

4 讨论与结论

4.1 不同中草药的抑菌效果 根据试验结果显示,不同的中草药对鸡源变形杆菌的抑菌效果不同。其中黄芩的水提液对鸡源变形杆菌的最小抑菌浓度(MIC)值为 62.5 mg/mL,抑菌效果最显著,黄芩醇提液 MIC 值为 250 mg/mL,抑菌效果一般,有研究表明,黄芩有广泛的药理作用,如抗真菌、抗病毒和抗菌等,其主要有效成分为黄芩苷和黄芩素^[6]。而金银花抑菌效果最差。金银花的水提液

与醇提液的 MIC 值均大于 500 mg/mL,崔艳^[7]等人研究发现金银花具有抗菌、消炎、抗氧化等作用,主要有效成分为机酸类、黄酮类、挥发油和环烯醚萜类化合物等。本试验中金银花对鸡源变形杆菌不具有体外抑菌作用,但其在体内是否能对鸡源变形杆菌产生抑制作用,仍需要进一步的研究。

4.1.2 不同提取方法对体外抑菌效果的影响 根据试验结果显示,同种中草药提取方法不同所得的中草药提取液对鸡源变形杆菌抑菌效果不同。本

试验中黄芩、黄连、黄柏的醇提液抑菌效果较水提液差,而金银花、香薷、虎杖、穿心莲的醇提液抑菌效果与水提液相同,野菊花和栀子的醇提液抑菌效果优于水提液。其中醇提液与水提液抑菌效果相差最大的为黄芩,邢逞^[8]等人的研究显示黄芩水提液中的黄芩素成分含量高于黄芩醇提液,而在本试验中发挥抑菌效果的有效成分是否确定为黄芩素则需要进一步研究。谢新芳^[9]等人的研究显示金银花的醇提液抑菌效果优于水提液,与本试验结果不一致,但其菌种为奇异变形杆菌,与本试验所用菌种存在差异。本试验说明不同的提取方法,可能会影响提取液中对特定病原菌具有抑制作用的有效成分的含量,进而影响体外的抑菌效果。其中影响最大的因素可能是有效成分在溶剂中的溶解度。

学者们一直在研究中草药的有效成分,但关于中草药的提取方法和作用机理等都需要进一步研究,根据提取的方法、温度、时间、试剂等的不同中草药的抑菌效果都会有差别,例如水提法虽然操作条件简便,但其煎煮条件等缺少标准,有些中草药受到煎煮温度、时间等的影响,其中热稳定性较差的有效成分容易被破坏,影响中草药的抑菌效果,并且某些药物的有效成分不易溶于水,则水提法就不能较好地发挥出中草药的药效;而醇提法受到乙醇浓度、用量等的影响,会有不同的效果,若乙醇浓度过高,用量过大,则可能失去较多不溶于乙醇的有效成分,若浓度过低,用量过少,就不能达到较好的除杂效果^[10]。

本试验为同种药物的不同提取方法以及不同药物的同种提取方法的抑菌效果进行了研究,为该几种中草药的临床用药和试验研究提供参考。关于中草药不同的提取方法对中草药抑菌效果的影响还需要进一步研究,以达到中草药最优的抑菌效果,为临床用药提供参考。

4.2 体外联合药敏试验结果分析 本试验中,黄连和虎杖水提液以及穿心莲和香薷醇提液的体外联合药敏试验结果为拮抗作用,可能是由于药物在进行配伍时,有效成分之间相互反应,发生结合、吸

附等作用,使药物的有效抑菌成分溶出减少,或相互发生化学反应,从而使药物的抑菌活性下降^[11]。还可能是药物之间的作用位点相同,导致相互之间产生竞争作用,从而出现拮抗。其余组合的体外联合药敏试验结果均为无关作用。这些药物的配伍在体内试验中是否仍为拮抗或无关作用,还需要进一步的研究。

本试验体外联合药敏试验结果能为该几种中草药的在临床上的配伍使用提供参考,而中草药在联用时,其配伍方式和比例对抑菌效果的影响、配伍后有效成分的变化等都需要进一步的研究探讨。

参考文献:

- [1] 吴义龙. 扬子鳄源普通变形杆菌生物被膜特性及形成相关基因研究 [D]. 南京农业大学, 2014.
Wu Y L, Character of proteus vulgaris biofilm of Chinese alligator and study on its forming gene [D]. Nanjing Agricultural University, 2014.
- [2] 郭玉梅, 张慧贤, 秦丽云, 等. 肉鸡和市售生鸡产品中变形杆菌的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(14):2009 - 2010 + 2021.
Guo Y M, Zhang H X, Qin L Y, et al. Study on proteus in chicken and raw chicken products [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(14):2009 - 2010, 2021.
- [3] 陶虚谷. 南蛇藤根皮提取液对金黄色葡萄球菌的抑菌作用研究 [D]. 湖南农业大学, 2012.
Tao X G. Bacteriostatic effect of Celastrus root skin extraction fluid on Staphylococcus aureus [D]. Hunan Agricultural University, 2012
- [4] 陈奇. 中药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988:69.
Chen Q. Research methodology of traditional Chinese Medicine [M]. Beijing: People's Health Press, 1988:69
- [5] 张理平, 梁娟, 陈彬, 等. 22 味酸味药性中药提取物影响黑色素合成的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(5): 618 - 622.
Zhang L P, Liang J, Chen B, et al. Melanin synthesis was affected by extracts of 22 kind Chinese herbs of acid taste; an experimental study [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2015, 35(5): 618 - 622.

- [6] Jang E J, Cha S M, Choi S M, *et al.* Combination effects of baicalein with antibiotics against oral pathogens[J]. Archives of Oral Biology, 2014, 59: 1233 - 1241.
- [7] 崔艳, 徐红梅. 金银花的药理作用研究综述[J]. 科学技术创新, 2018(2): 20 - 21.
- Chui Y, Xu H M. A review of the pharmacological action of honeysuckle[J]. Scientific and Technological Innovation, 2018(2): 20 - 21.
- [8] 邢逞, 张丽, 马林, 等. 黄芩及其提取物中黄芩素成分分析标准物质的研制[J]. 医药导报, 2019, 38(3): 298 - 303.
- Xing Ch, Zhang L, Ma L, *et al.* Development of certified reference material of baicalein in scutellaria baicalensis and its extracts [J]. Herald of Medicine 2019, 38(3): 298 - 303.
- [9] 谢新芳, 刘潭, 冯格, 等. 金银花叶提取物对奇异变形杆菌抑菌作用的研究[J]. 宜春学院学报, 2017, 39(12): 21 - 24.
- Xie X F, Liu T, Feng G, *et al.* Study on bacteriostasis effects of leaves extracts of Ionicera japonica thunb on proteus mirabilis [J]. Journal of Yichun University, 2017, 39(12): 21 - 24.
- [10] 张莉, 吴润, 刘磊, 等. 不同提取方法对中草药抑菌效果的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2012, 47(2): 25 - 33.
- Zhang L, Wu R, Liu L, *et al.* Effects of extraction methods on antibacterial activity of Chinese herbal medicine [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2012, 47(2): 25 - 33.
- [11] 王洪彬, 朱利霞, 吴同垒, 等. 半滑舌鳎源创伤弧菌分离鉴定与药敏试验[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(5): 912 - 918.
- Wang H B, Zhu L X, Wu T L, *et al.* Isolation and identification of pathogenic Vibrio vulnificus isolated from Cynoglossus semilaevis and antibacterial test [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2019, 39(5): 912 - 918.

(编辑:陈希)