

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.06.10

金银花等 5 种中药对猪源大肠杆菌抗菌活性的影响

孙茂永

(武陟县动物疫病预防控制中心,河南武陟 454950)

[收稿日期] 2020-04-01 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 06-0066-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为观察金银花、五味子、黄连、赤芍、鱼腥草对猪源大肠杆菌体外抑菌效果,测定其最小抑菌浓度,本实验采用平皿打孔法测定各中草药的抑菌圈直径,梯度稀释法测定各中草药抑制病原菌生长的最小抑菌浓度,结果表明,金银花、五味子、黄连、赤芍、鱼腥草对猪源大肠杆菌的抑菌圈直径分别为 23.6、20.2、22.1、15.3、17.1 mm,最小抑菌浓度分别为 0.2、0.3、0.2、0.6、0.5 g/mL,金银花、五味子、黄连、赤芍、鱼腥草对猪源大肠杆菌体均有体外抑菌效果,其中金银花,黄连,五倍子的抑菌效果最好,赤芍和鱼腥草抑菌效果不明显。

[关键词] 中药;大肠杆菌;抑菌圈直径;最小抑菌浓度

Effect of 5 kinds of Chinese Traditional Medicine such as Honeysuckle on Antibacterial Activity of Pig – derived *E. coli*

SUN Mao – yong

(Wuzhi Animal Disease Prevention and Control Center, Wuzhi, Henan 454950, China)

Abstract: In order to observe the antibacterial effect of honeysuckle, schisandra, coptis, radix paeoniae rubra and herba houttuyniae on *E. coli* derived from pigs, and determine its minimum inhibitory concentration, in this experiment, the diameter of the bacteriostatic circle of each Chinese traditional medicine was determined by the method of plate drilling, and then a gradient dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration of each Chinese traditional medicine to inhibit the growth of pathogenic bacteria. The results showed that the diameter of inhibition zone (mm) of honeysuckle, schisandra, coptis, radix paeoniae rubra and herba houttuyniae cordata against *E. coli* derived from swine were 23.6, 20.2, 22.1, 15.3, 17.1, minimum bacteriostatic concentration (g/mL) were 0.2, 0.3, 0.2, 0.6, 0.5. Honeysuckle, schisandra, coptis, radix paeoniae rubra, herba houttuyniae have antibacterial effect on *E. coli* from pigs. Among them, honeysuckle, coptis and schisandra have the best bacteriostatic effect, and the bacteriostatic effect of radix paeoniae rubra and herba houttuyniae is not obvious.

Key words: Chinese traditional medicine; *E. coli*; diameter of inhibition zone; minimum bacteriostatic

基金项目: 河南省科技计划项目(162107000031)

作者简介: 孙茂永,高级畜牧师,从事动物疫病防控工作。E-mail:sun15939188126@163.com

20 世纪微生物学对人类最为重大的贡献之一是抗生素的产生,它一产生就在临床上具有了统治地位,在治疗细菌感染所表现出来的优势使其越来越难以被其他药物所取代。因其优异的疗效,在临床上开始大肆不合理的使用抗生素,并且形成了依赖,大量细菌已经开始产生耐药性,且常以多重耐药为特点^[1-3]。耐药菌株大量出现后,原本在临床上用抗生素治疗的疾病开始出现感染和复发,并且往往导致治疗失败,甚至使患病群体死亡,最令人恐惧的是“超级细菌”的产生。现代畜牧业发展迅速,畜牧业中广泛使用和滥用抗生素,大量产生抗药性细菌,增加了治疗难度,同时也增加了死亡率。中草药在治疗病原菌引起的疾病方面所表现出来的优势,已经广泛引起了全世界的关注。世界各国的科学家也对中草药进行了越来越广泛和深入的研究。中药在中国已经使用了数千年,它的毒性副作用很小,成本低,安全性高,无抗生素耐药性,本研究对临床上多种中草药进行筛选和观察,选出了在临床抗菌方面具有成效的 5 种中药,观察其对猪源大肠杆菌的最小抑菌浓度,同时测定其逆转耐药性,以期为以后治疗微生物感染类疾病的理论指导提供帮助以及有效成分的分离及中兽药临床应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品 金银花、五味子、黄连、赤芍、鱼腥草共 5 种中药均采购于洛阳同仁堂大药房。抗生素药敏纸片、青霉素、红霉素、庆大霉素、强力霉素和舒巴坦 5 种抗菌药物均购于上海广锐生物科技有限公司。

1.1.2 菌种 猪源大肠杆菌(k88、k99)都由河南科技大学动物科技学院动物医学临床实验室鉴定保存。

1.1.3 试剂 蛋白胨、氯化钠、牛肉膏、琼脂粉、燃烧用酒精、氢氧化钠、盐酸、蒸馏水、医用消毒酒精。

1.1.4 主要仪器 恒温培养箱、无菌操作台、高压锅、天平、电炉、平皿、移液器。

1.2 实验方法

1.2.1 中草药药液的提取 利用传统水煎法提取金银花、五味子、黄连、赤芍、鱼腥草 5 种中草药药液,每种中药的浓度都为 1 g/mL,高压灭菌锅内 121 ~ 126 kpa 下灭菌 30 min,4 ℃ 保存备用。

1.2.2 培养基的制备 常规制备。

1.2.3 菌液的制备及稀释 将实验室保存的猪源大肠杆菌用接种环在超净工作台上酒精灯外焰半径 5 cm 周围接种于普通肉汤培养基中,时刻注意无菌操作,而后倾斜放置于恒温震荡培养箱上于 37 ℃ 的条件下培养 18 h,之后与标准的麦氏比浊管对照,用无菌生理盐水分别稀释菌液,稀释至与 0.5 号单位的比浊管浊度相当,将其配成大约 1.5×10^8 CFU/mL 含菌量的实验用菌液。

1.2.4 中药抗菌活性的测定 本实验利用平皿打孔法来观察金银花、五味子、黄连、赤芍、鱼腥草的抗菌活性,测定的抑菌圈直径大小作为衡量抗菌活性大小的依据,观察记录所有三次重复实验的结果,计算其平均值。

1.2.5 中药最小抑菌浓度(MIC)的测定 采用梯度稀释法测定金银花、五味子、黄连、赤芍、鱼腥草的最小抑菌浓度(MIC)。

1.2.6 实验数据的处理 实验数据均用 SPSS 软件进行生物学统计分析,计算其单因素方差,结果以 $X + SD$ 表示, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

所选中药对猪源大肠杆菌体外抗菌活性的测定结果。中药对猪源大肠杆菌体外抗菌活性的测定结果见图 1 和表 1、表 2、表 3。

由表 1 可知金银花、五味子、黄连、赤芍、鱼腥草这五种中药的抑菌圈大小,平均抑菌圈直径(mm)分别为 23.6、20.2、22.1、15.3、17.1;由表 2 和表 3 可知金银花、五味子、黄连、赤芍、鱼腥草这五种中药的 MIC(g/mL)分别为 0.2、0.3、0.2、0.6、0.5。这说明金银花、五味子、黄连、赤芍、鱼腥草对猪源大肠杆菌都有抑菌浓度,抗菌活性最好的为金银花,五味子,且金银花和黄连抗菌活性相同,而鱼腥草和赤芍抗菌效果不明显。

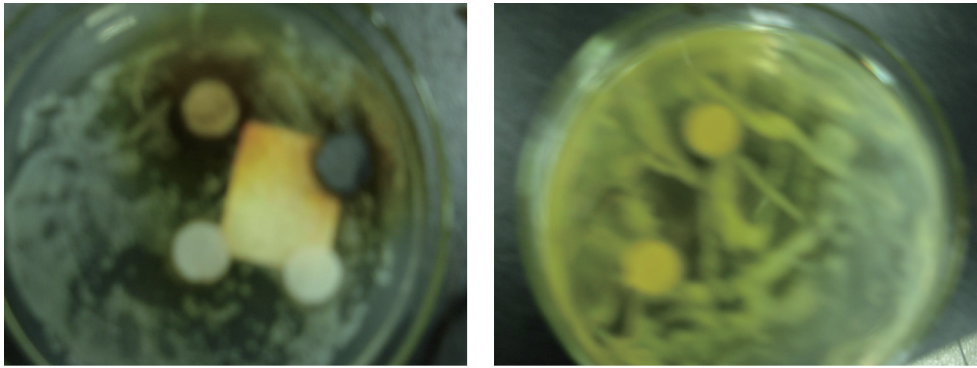


图 1 中药对猪源大肠杆菌体外抗菌活性的测定结果

Fig 1 Results of antibacterial activity of traditional Chinese medicines to *Escherichia coli* from pigs

表 1 5 种中草药对猪源大肠杆菌的抑菌圈直径 (mm)

Tab 1 diameter of bacteriostatic ring of 5 Chinese herbal medicines against *Escherichia coli* from pigs (mm)

中药名	A 组直径	B 组直径	C 组直径	平均直径
金银花	23.0	23.4	24.4	23.6 ± 0.9
五味子	21.3	19.2	20.1	20.2 ± 1.05
黄连	22.1	23.0	21.2	22.1 ± 0.9
赤芍	14.3	16.0	15.6	15.3 ± 0.89
鱼腥草	17.0	16.2	18.1	17.1 ± 0.95

纸片自身的直径为 7 mm

表 2 5 味中草药对猪源大肠杆菌最小抑菌浓度的测定

Tab 2 determination of minimum inhibitory concentration of 5 Chinese herbal medicines on *Escherichia coli* from pigs

中药名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
金银花	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++
五味子	++	++	-	-	-	-	-	-	-	++
黄连	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++
赤芍	++	++	++	++	+	-	-	-	-	++
鱼腥草	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++

“++”表示中度长菌，“+”表示轻度长菌，“-”表示不长菌

表 3 5 种中药对猪源大肠杆菌最小抑菌浓度的测定结果

Tab 3 determination results of minimum inhibitory concentrations of five traditional Chinese medicines on

Escherichia coli from pigs

	金银花	五味子	黄连	赤芍	鱼腥草
MIC/(g·mL ⁻¹)	0.2	0.3	0.2	0.6	0.5

3 讨论与结论

3.1 中药抗菌活性的探讨 中药种类繁多,安全可靠,副作用小,并且可抑制和杀菌,本实验选择的金银花既能宣热解毒,还能清解血毒,用于各种热病,五味子能提高身体免疫力,滋肾等,黄连是清热燥湿类中药,鱼腥草属于清热解毒药,赤芍有清凉,活血的作用。对致病性猪源大肠杆菌的最小抑菌浓度测定结果表明,所选中药都有抑菌效果,其中以金银花,黄连,五味子抑菌效果明显,鱼腥草和赤芍相对较弱。

本实验采取传统的煎药方法对所选中药的有效成分进行提取,然后用平皿打孔法来对中药抗菌活性进行测定,其中鱼腥草对猪源大肠杆菌具有抑菌效果,且其最小抑菌浓度为 500 mg/mL,但韦嫔等^[4]采用改良的肉汤二倍稀释法测定的鱼腥草对猪源致病性大肠杆菌 EC1, EC2, EC3, EC4, EC5 最小抑菌浓度均大于 500 mg/mL,及对所测的致病菌没有抑菌效果,与本实验测定的结果不符,与杜银忠所报道的结果^[5]也不符;他们实验中测得的黄连对致病菌 EC3, EC5 最小抑菌浓度均为 250 mg/mL,与本实验测得的黄连的最小抑菌浓度 200 mg/mL 差别不大,但是对猪源致病性大肠杆菌 EC1, EC2, EC4 的最小抑菌浓度 (mg/mL) 为 500, 125, 500, 与本实验差异比较大,黄连对临床上的大肠杆菌的抑菌作用较强,这与黄玲等所报道的结果^[6]一致;同时他们实验测的金银花对致病菌 EC4 的最小抑菌浓度为 250 mg/mL,与本实验测的金银花的最小抑菌浓度 200 mg/mL 相差不大,但是对与 EC1, EC2, EC3, EC5 的最小抑菌浓度均为 500 mg/mL 相差很大,同时金银花在体外对猪源大肠杆菌的抑菌效果与陈希文等的报道^[7]一致,但是与刘荣欣的报告^[8]不同。所以,不同药剂对同一种致病菌的抗菌活性可能不同,这可能是有效成分不同的原因;并且同种名字的致病菌也有不同的类型,也会导致同种中药出现不同抗菌活性的情况,这可能是同种致病菌接受中药作用效果不同的原因;并且不同人对同一种中药对同一种病原菌的实验结果也不相同,这可能是不同地区中药成分有差异,采摘季节,提取方

法不同造成的。

细菌的耐药性问题越来越受关注,并且耐药菌株发展也越来越快,降低或消除大肠杆菌的耐药性,使其部分或者全部恢复敏感性,对于临床治疗细菌感染及防止耐药菌株的传播有很大的意义,并且对人类的安全问题有很大意义。

本实验用 5 种药敏片来测定所选中药对于猪源大肠杆菌的逆转耐药性问题,用 SPSS 软件分析实验结果后,所选中药均具有逆转致病性猪源大肠杆菌耐药性的作用,这与韦嫔^[2]等测定的黄连,金银花,鱼腥草对致病性大肠杆菌庆大霉素耐药性的消除率均高于 SDS 对照组实验结果吻合,同时芦亚君等^[9]测定三种方剂逆转大肠杆菌耐药性的实验观察中 3 种方剂与未经任何逆转的大肠杆菌都有显著性差异,而其中三黄汤和五味消毒饮的主要成分分别有黄连和金银花,也与本实验的显著性差异结果想吻合。但是根据抑菌圈直径可以看出,同种中药对同种致病菌的逆转效果可能不同,这可能是时间影响其逆转耐药性的原因,随着时间的改变,其逆转耐药性也会逐渐改变;而且,本实验用四种药敏片测的逆转耐药性效果也不尽相同,这可能说明中药成分对不同的抗生素有不同的效果。目前来说,中药消除细菌耐药性的机制仍然比较复杂,但是筛选开发出抑菌效果好、耐药性消除率高的中草药依然是控制耐药性发展的有效方法。

3.2 各种因素对本实验的结果的影响 通过对本实验与相关研究进行比较,分析得出这些差别可能与本实验采取的中药提取方法、提取条件、培养基的制备、菌种的来源、菌悬液的浓度有关,还可能与环境因素,中药的产地,采摘季节等有关,并且可能和培养温度,培养时间甚至湿度的不同,都会对抑菌效果产生不同影响,这都有待进一步研究。此次实验只是检测各中草药对大肠杆菌这种供试菌在体外有无抗菌作用及其逆转性效果,而在体内是否具有抗菌活性和逆转耐药性的作用尚未可知,需要进一步研究。本次实验结果为其进一步研究和临床应用提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 向双云,周珍辉,杨生涛,等. 大肠杆菌耐药性测定[J]. 山东畜牧兽医, 2020,41(2):4-6.
Xiang shuangyun, Zhou Zhenhui, Yang Shengtao, *et al.* Determination of drug resistance of *Escherichia coli* [J]. Shandong Animal Husbandry and veterinary, 2020, 41 (2): 4-6
- [2] 李崇,陈韵如,李沁媚,等. 广西某地区猪源大肠杆菌耐药性及部分菌株耐药基因调查[J]. 中国畜牧兽医 2019,46(12):3749-3758.
Li Chong, Chen Yunru, Li Qinmei, *et al.* Investigation on resistance genes of *E. coli* and some strains in a certain area of Guangxi [J]. China animal husbandry and veterinary, 2019, 46 (12): 3749-3758.
- [3] 陈美玲. 中西药对大肠杆菌生物膜形成和毒力基因表达影响的初步研究[D]. 山东大学, 2013.
Chen Meiling. A preliminary study on the effect of Chinese and Western Medicine on the formation of *E. coli* biofilm and the expression of virulence genes [D]. Shandong University, 2013.
- [4] 韦 斌,谭艾娟,吕世明,等. 中药消除致病性大肠杆菌耐药性的研究[J]. 江苏农业科学, 2017,45(11):127-129.
Wei Di, Tan aijuan, Lv Shiming, *et al.* Study on elimination of drug resistance of pathogenic *Escherichia coli* by traditional Chinese medicine [J]. Jiangsu agricultural science, 2017, 45 (11): 127-129.
- [5] 杜银忠. 3 种中药对产酶菌 R 质粒消除作用的研究[J]. 青海大学学报:自然科学版, 2009,27(1):82-85.
Du Yinzong. Study on the elimination of R plasmid of enzyme producing bacteria by three kinds of traditional Chinese medicine [J]. Journal of Qinghai University: Natural Science Edition, 2009, 27 (1): 82-85
- [6] 黄 玲,林居纯,马 驰,等. 12 种中药的体外抑菌试验[J]. 动物医学进展, 2010, 31(6):50-52.
Huang Ling, Lin juchun, Ma Chi, *et al.* *In vitro* antibacterial test of 12 kinds of traditional Chinese medicine [J]. Animal medicine progress, 2010, 31 (6): 50-52
- [7] 陈希文,王雄清,代 敏,等. 24 种中药对猪沙门氏菌的体外抑菌活性[J]. 江苏农业科学, 2008,(5):180-182.
Chen Xiwen, Wang Xiongqing, Dai min, *et al.* *In vitro* antibacterial activity of 24 kinds of traditional Chinese medicine against *Salmonella pig* [J]. Jiangsu agricultural science, 2008, (5): 180-182.
- [8] 刘荣欣,鲁改儒,郭吉勇. 中药及其组方对大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4):2265-2267.
Liu Rongxin, Lu gairu, Guo Jiyong. *In vitro* antibacterial test of traditional Chinese medicine and its formulation against *Escherichia coli* [J]. Anhui Agricultural Science, 2011, 39 (4): 2265-2267
- [9] 芦亚君,程 宁. 3 种中药方剂逆转大肠杆菌耐药性的实验观察[J]. 西北药学杂志,2007,22(6):309-311.
Lu Yajun, Cheng Ning. Experimental observation on reversal of drug resistance of *Escherichia coli* by three kinds of traditional Chinese medicine prescriptions [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2007, 22 (6): 309-311.

(编辑:侯向辉)