

中药复方对猪源耐药大肠杆菌分离株的体外抑制作用

杨建英^{1,2}, 郭小权³, 肖莉春^{1,3}, 黄名钱^{1,3}, 孔祥峰^{1*}

¹中国科学院亚热带农业生态研究所 亚热带农业生态过程重点实验室, 湖南省畜禽健康养殖工程技术研究中心, 长沙 410125;

²河南科技大学 医学技术与工程学院, 洛阳 471003; ³江西农业大学 动物科学技术学院, 南昌 330045

摘要: 为了筛选对耐药大肠杆菌具有抑制作用的中药复方, 为临床大肠杆菌病的防治提供依据, 本研究利用前期研究筛选出的体外抑菌作用较强的 12 味中药, 根据配伍原则组成 5 个复方, 制备其水提液, 采用打孔法、倍比稀释法测定其对 10 个猪源耐药大肠杆菌分离株和 3 个大肠杆菌标准株的体外抑制活性。结果表明, 5 个复方对同一受试菌的抑菌圈大小依次为: 复方 5 > 复方 4 > 复方 1 (SEC616、SEC911、SEC1284 和 C197 除外) > 复方 2 > 复方 3。复方 5 对 13 株受试菌的抑菌圈直径最大、MIC 值最小, 提示其体外抑菌作用最强; 复方 3 对 13 株受试菌的抑菌圈直径最小、MIC 值最大, 提示其体外抑菌作用最弱; 复方 1、复方 2 和复方 4 对 13 株受试菌的抑菌圈直径和 MIC 也存在差异。上述结果提示, 复方 5 对耐药大肠杆菌的体外抑制作用最强, 可作为养猪生产中防治猪大肠杆菌病的备选方剂。

关键词: 中药复方; 大肠杆菌; 抑菌作用; 猪

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.029

In vitro Inhibitory Effects of Chinese Herbal Formulae against Antibiotic-resistant Isolates of *E. coli* from Swine

YANG Jian-ying^{1,2}, GUO Xiao-quan³, XIAO Li-chun^{1,3}, HUANG Ming-qian^{1,3}, KONG Xiang-feng^{1*}

¹Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Hunan Engineering and Research Center of Animal and Poultry Science, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences,

Changsha 410125, China; ²College of Medical Technology and Engineering, He'nan University

of Science and Technology, Luoyang 471003, China; ³College of Animal Science

and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract: This study was conducted to screen out Chinese herbal formula with antimicrobial activity against antibiotic-resistant *E. coli*, and provide basis for prevention and clinical cure of colibacillosis. According to the principles of compatibility, 5 different kinds of Chinese herbal formulae were made by 12 kinds of Chinese herbal medicines with strong antimicrobial activity, screened out from our previous study, and then their *in vitro* antimicrobial activities against 10 isolated strains of antibiotic-resistant *E. coli* and 3 type strains of *E. coli* were evaluated by determining the diameter of inhibition zone (IZD) and minimal inhibitory concentration (MIC). Results showed that different formulae had different IZD on the same tested bacteria, in other words, the IZD were Formula 5 > Formula 4 > Formula 1 (except for SEC616, SEC911, SEC1284, and C197) > Formula 2 > Formula 3. The Formula 5 had the maximum IZD and minimum MIC against the 13 tested strains of *E. coli*, respectively, which suggested that this formula presented the strongest *in vitro* antibacterial activity; the Formula 3 had the minimum IZD and maximum MIC against 13 tested strains of *E. coli*, which suggested that Formula 3 presented the weakest *in vitro* antibacterial activity. In addition, the IZD and MIC values of Formula 1, Formula 2, and Formula 4 against different tested strains of *E. coli* were also different. These findings indicated that Formula 5 had the strongest *in vitro* antimicrobial activity against antibiotic-resistant *E. coli*, which could be an alternative prescription for prevention and cure of colibacillosis in swine production.

Key words: Chinese herbal formula ; *E. coli*; antimicrobial activity; swine

收稿日期: 2014-09-03 接受日期: 2015-03-03

基金项目: 国家科技支撑计划专题(2012BAC17B0102); 中科院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-EW-411); 国家自然科学基金(31201119); 河南省高校青年骨干教师项目(2013GGJS-067)

猪大肠杆菌病是由某些特定血清型的大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)感染引起的几种肠道

传染性疾病的总称,主要包括仔猪黄痢、白痢和水肿病,其临床特征主要表现为肠炎、严重腹泻、脱水或败血症,患猪生长停滞或死亡。因其发病率高、致病力强,给养猪业带来了巨大的经济损失^[1]。临床上多使用抗菌药物对该病进行防治,虽有一定效果,但长期、大剂量使用可导致病原菌耐药性不断增强,治疗效果越来越差,而治疗成本却越来越高^[2]。多重耐药性大肠杆菌的产生严重制约着我国养猪业的健康发展,同时给食品安全带来了隐患,严重威胁着人类健康。中药属于天然药物,毒副作用小,不易产生耐药性,在保障动物机体健康和动物源性食品安全方面具有显著优势^[3]。笔者的前期研究系统评价了29种常用中药对猪源耐药大肠杆菌的体外抑制活性^[4],以及中药水提物与四环素联用对猪源耐四环素大肠杆菌的体外抑制活性^[5]。本研究进一步

利用筛选出的12味体外抑菌活性较强的中药,根据配伍原则组成了5个中药复方,采用打孔法、倍比稀释法测定了其水提液对10个猪源耐药大肠杆菌分离株和3个大肠杆菌标准株的体外抑制活性,旨在筛选出效果最佳的中药复方,为研制有效防治猪大肠杆菌病的中药方剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

10个猪源大肠杆菌分离株由扬州大学焦新安教授课题组提供,其菌株号、血清型、基因型和毒素鉴定情况及耐药谱如表1和表2所示;3个致病大肠杆菌标准株(K88、K99、K101)由中国科学院亚热带农业生态研究所畜禽健康养殖研究中心保存。

表1 10个猪源大肠杆菌分离株的情况

Table 1 Information of 10 isolates of *E. coli* from swines

菌株号 Strain number	分离部位 Separation location	日龄 Day of age	血清型 Serotype	基因型 Genotype	毒素 Toxins
C023	肛拭	5	O111	qnrA + oqxAB + aac(6)-ib-cr	-
C193	肛拭	120	-	qnrS + oqxAB	-
C197	粪样	110	O4	qnrS + aac(6)-ib-cr	SLT-2e
SEC206	肝	45	O116	oqxAB	STaSTbLTSLT-2e
SEC298	肛拭	45	O107	oqxAB	STaSTbSLT-2e
SEC470	肛拭	39	O4	oqxAB	STaSTbLTSLT-2e
SEC616	肛拭	30	未	oqxAB	STa
SEC817	小肠	3	O107	oqxAB	STbSLT-2e
SEC911	肛拭	30	O107	oqxAB	STa
SEC1284	肛拭	75	O107	oqxAB	STaSTbLTSLT-2e

表2 10个猪源大肠杆菌分离株的耐药表型

Table 2 Antibiotics-resistance phenotypes of 10 isolates of *E. coli* from swines

抗菌药物 Antibiotics	受试大肠杆菌菌株 <i>E. coli</i> isolates tested									
	C023	C193	C197	SEC206	SEC298	SEC470	SEC616	SEC817	SEC911	SEC1284
氨苄青霉素 Ampicillin	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R
氧哌嗪青霉素 Piperacillin	S	I	I	S	I	S	S	S	S	S
头孢噻吩 Cephalothin	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
复达欣 Ceftazidime	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
头孢噻肟 Cefotaxime	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
单环菌素 Monobactam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
美洛培南 Meropenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
庆大霉素 Gentamicin	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R

丁胺卡那 Amikacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
链霉素 Streptomycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
四环素 Tetracycline	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
丙氟哌酸 Ciprofloxacin	R	S	I	R	S	R	R	R	I	R
左氟沙星 Levofloxacin	R	S	S	R	S	R	R	R	I	R
诺氟沙星 Norfloxacin	R	S	S	R	S	I	R	R	I	R
萘啶酸 Nalidixicacid	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R
复方新诺明 Sinomin Composita	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
氯霉素 Chloramphenicol	S	S	I	S	S	S	R	R	R	I
磷霉素 Fosfomycin	I	R	S	S	S	S	S	S	R	S
呋喃妥因 Nitrofurantoin	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S

注:S,敏感;I,中度敏感;R,耐药。引自肖莉春等的报道^[4]。

Notes:S,Sensitivity;I,Intermediate sensitivity;R,Resistance. Referred from Xiao, *et al* ^[4].

1.2 中药复方水提液的制备

在29味常见中药提取物抑菌试验^[4]的基础上,筛选出12味中药(见表3,均购自湖南省长沙市药材公司),根据配伍原则组成5个方剂。复方1(白头翁汤):由白头翁、黄柏、黄连和秦皮按4:2:3:4比例组成;复方2(三黄汤):由黄连、黄柏和大黄按2:2:1比例组成;复方3:由山楂、黄芩、黄柏和栀子按2:4:4:3比例组成;复方4:由白头翁、连翘、鱼腥草

和蒲公英按1:1:1:1比例组成;复方5:由五倍子、山楂和连翘按1:1:1比例组成。

取每种中药复方各100g,加500mL蒸馏水,武火加热至沸腾,然后改用文火加热,维持微沸1h,期间不断搅拌,4层纱布过滤;在药渣中再加入500mL蒸馏水,同法煎煮、过滤。合并滤液,加热浓缩至1g/mL,于-20℃保存备用。使用前加热充分溶解,混合均匀。

表3 中药来源

Table 3 Sources of Chinese herbal medicines

药材 Medicinal materials	产地 Origin	药材 Medicinal materials	产地 Origin
白头翁(<i>Radix Pulsatillae</i> , RP)	东北	蒲公英(<i>Herba Taraxaci</i> , HT)	河北
大黄(<i>Radix et Rhizoma Rhei</i> , RRR)	甘肃	秦皮(<i>Cortex fraxini</i> , CF)	辽宁
黄柏(<i>Cortex Phellodendri</i> , CP)	河北	山楂(<i>Fructus Crataegi</i> , FC)	湖南
黄连(<i>Rhizoma Coptidis</i> , RC)	四川	五倍子(<i>Galla Chinensis</i> , GC)	江西
黄芩(<i>Radix Scutellariae</i> , RS)	山西	鱼腥草(<i>Herba Houttuyniae</i> , HH)	浙江
连翘(<i>Fructus forsythiae</i> , FF)	山西	栀子(<i>Fructus Gardeniae</i> , FG)	湖南

1.3 中药复方水提液对大肠杆菌抑菌圈直径的测定

将菌株接种于LB固体培养基上,37℃培养24h后,挑取单个菌落接种于LB液体培养基中,37℃振荡培养6~8h。用分光光度计测定其OD₆₀₀值,然后将菌液稀释成浓度为10⁷cfu/mL的菌悬液。取稀释后的菌悬液100μL于LB平板内,用无菌涂布棒涂匀,再用直径6mm的无菌打孔器在每个平皿内均匀打5个孔,挑去孔内琼脂,在酒精灯上加热封底。每孔加入对应标号的中药复方水提液,以刚刚注满为准,37℃培养24h后,测定抑菌圈直径^[6]。

1.4 中药复方水提液对大肠杆菌MIC的测定

对筛选出具有明显抑菌活性的中药复方水提液,在48孔板上用LB液体培养基稀释成500、250、125、62.5、31.25、15.6和7.8mg/mL,每孔加入稀释后的菌液100μL,混匀后37℃培养24h。若培养液透明,可直接判定结果;若培养液色泽较深,不易判定结果,则在培养结束后,取适量培养液在固体培养基上划线接种,培养24h后观察结果,以无菌生长的最低稀释度为各受试复方的MIC^[6]。

2 结果与分析

2.1 中药复方水提液对大肠杆菌的抑菌圈直径

由表4可见,不同复方对同一受试菌株的抑菌圈大小依次为:复方5 > 复方4 > 复方1 (SEC616、SEC911、SEC1284 和 C197 除外) > 复方2 > 复方3。复方5对13株受试菌的抑菌圈直径均介于13.00

~15.00 mm,提示其体外抑制作用最强。与其它菌株相比,复方1、复方2、复方3和复方5对菌株SEC206的抑菌圈直径最大,5个复方对菌株SEC1284的抑菌圈直径最小,提示中药复方对不同菌株的抑制作用存在差异。

表4 中药复方水提液对13株大肠杆菌的抑菌圈直径(mm)

Table 4 Inhibition zone diameter of water extracts of Chinese herbal formula against 13 strains of *E. coli* (mm)

菌号 Strain Number	复方 Formula				
	1	2	3	4	5
K88	9.00	8.67	8.00	11.00	14.00
K99	9.33	8.67	8.00	11.00	14.00
K101	9.33	9.00	8.00	11.00	14.00
SEC023	9.33	9.00	8.00	11.67	13.33
SEC206	10.00	9.33	8.67	11.33	15.00
SEC298	9.33	9.00	8.00	11.67	14.33
SEC470	9.00	8.67	8.33	11.67	14.00
SEC616	9.00	9.00	8.67	11.33	14.00
SEC817	9.33	9.00	8.67	11.33	14.33
SEC911	8.67	9.00	8.33	11.00	13.67
SEC1284	8.67	8.67	7.67	10.67	13.00
C193	9.00	8.67	8.00	11.00	13.33
C197	8.67	9.00	8.67	11.67	13.67

2.2 中药复方水提液对13株大肠杆菌的MIC

由表5可见,复方5对13株受试菌的MIC值最小,对菌株SEC206的MIC为62.5 mg/mL,其余均为125 mg/mL;复方3对13株大肠杆菌的MIC值相

对较大,为250或500 mg/mL;复方1、复方2和复方4的MIC值分别为125~250 mg/mL、250~500 mg/mL和125~250 mg/mL,提示中药复方对不同菌株的抑制作用强弱不同。

表5 中药复方水提液对13株大肠杆菌的最小抑菌浓度值MIC(mg/mL)

Table 5 MIC of water extracts from Chinese herbal formula against 13 strains of *E. coli* (mg/mL)

菌号 Strain Number	复方 Formula				
	1	2	3	4	5
K88	250	250	500	250	125
K99	250	250	500	250	125
K101	250	250	500	250	125
SEC023	250	250	500	250	125
SEC206	125	250	250	125	62.5
SEC298	250	250	500	250	125
SEC470	250	250	500	250	125
SEC616	250	250	250	250	125
SEC817	250	250	250	250	125
SEC911	500	500	250	250	125
SEC1284	500	500	500	250	125

C193	250	500	500	250	125
C197	250	250	250	125	125

3 讨论

猪大肠杆菌病可引起仔猪的大批死亡或生长发育不良,从而给养猪业造成巨大的经济损失。抗生素耐药性的快速产生和广泛传播,给猪大肠杆菌病的防治带来了很大困难。因此,从植物提取物、酸化剂、活性肽、益生菌等物质中筛选绿色、有效的抗生素替代物,已成为目前畜牧兽医领域的研究热点之一^[7]。本研究利用前期筛选出的体外抑菌活性较强的中药组成了5个复方,并评价了其水提液对猪源耐药大肠杆菌的体外抑制活性,发现由五倍子、山楂和连翘组成的复方5具有较强的体外抑菌作用。

在复方5的三种组份药中,五倍子的味酸、涩,具有涩肠止泻、收敛止血、清热解毒等功能,主治久泻久痢、各种出血症等;山楂的味酸、甘,具有消食化积、行气散瘀等功能,主治食积腹胀、伤食泄泻等,其中含有的多种有机酸均具有抑菌作用;连翘的味苦,具有清热解毒、利水消肿等功能,对多种细菌均有抑制作用^[8]。笔者前期的研究也表明,五倍子和连翘对13株受试耐药大肠杆菌的抑制作用最强,山楂、秦皮、大黄、黄连和黄芩等对部分受试菌也有一定抑制作用^[4]。张霞^[9]等也曾报道,五倍子浸提物对大肠杆菌具有很好的抑制效果;五倍子的主要抑菌成分为五倍子鞣质和没食子酸等,这些成分可使微生物细胞内的原生质发生凝固^[10]。连翘中富含挥发油,具有抑菌、抗炎、抗氧化等作用^[11],尤其是对大肠杆菌具有很好的抑菌效果^[12]。另外,本研究评价的复方4由白头翁、连翘、鱼腥草和蒲公英组成,也具有较强的抑菌活性。总之,中药复方对耐药大肠杆菌的抑制作用与其组份药中富含的抑菌成分密不可分。

在本研究中,复方1由白头翁、黄柏、黄连和秦皮组成,即白头翁汤,具有清热解毒、凉血止痢等功能,主治湿热痢疾、热泻等,其药理作用与抗菌、镇静、镇痛有关。研究显示,白头翁在生产中具有止泻、止痢疾的功效,但在体外对大肠杆菌并无抑制作用,因此白头翁可能需要在体内经过代谢后才能发挥药效,其作用机制还有待进一步研究。复方2由黄连、黄柏和大黄组成,即三黄汤,具有清热解毒等功效^[8]。虽然复方2的组份药也具有一定的抑菌作

用,但其抑菌效果一般。这可能与复方中各组份药的比例以及提取方法有关。本研究采用的水提法以水为溶剂,选择性差,对有些中药的脂溶性抑菌成分不能有效提取,高温煎煮过程中也极有可能破坏热稳定性较差的有效成分,从而使其水提液的抑菌效果较弱^[13]。现代药理学研究表明,黄连的主要抑菌成分为小檗碱^[14],秦皮的抑菌成分为秦皮甲素和秦皮乙素等^[15],大黄的抑菌成分为大黄素、芦荟大黄素和大黄酸等^[16]。在上述抑菌成分中,生物碱、黄酮类、挥发油、帖类、萜醌和香豆精等均能溶于乙醇,所以中药醇提物的抑菌作用一般强于其水提物。

综上所述,由五倍子、山楂、连翘组成的复方5对猪源耐药大肠杆菌具有很好的抑制作用,可作为治疗猪大肠杆菌病的备选方剂。由于某些中药是通过体内次生代谢产物发挥抑菌作用的,因此需要进一步通过体内试验并结合临床用药效果观察,才能最终筛选出效果良好的抑菌药物。

参考文献

- 1 Wang TY (王天有), Liu BG (刘保国), Zhao HZ (赵恒章). Modern diagnosis and treatment technology of swine infectious disease. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2005. 314-316.
- 2 Cai KZ (蔡葵蒸), Jin GQ (靳国琴), Chai JX (柴君秀), et al. Investigation and research of pathogenic characteristics of diarrhea caused by *E. coli* in piglets. *Pro Vet Med* (动物医学进展), 2002, 23: 101-103.
- 3 Kong XF (孔祥峰), Wu X (吴信), Yin YL (印遇龙), et al. Research and development of Chinese medicine feed additive. *Anim Husb Vet Med* (畜牧与兽医), 2007, 39(11): 35-37.
- 4 Xiao LC (肖莉春), Kong XF (孔祥峰), Huang MQ (黄名钱), et al. Antimicrobial activities of Chinese herb extracts against antibiotic-resistant isolates of *E. coli* from swine farms. *Acta Agric Univ Jiangxiensis* (江西农业大学学报), 2013, 35: 1248-1254.
- 5 Huang MQ (黄名钱), Kong XF (孔祥峰), Xiao LC (肖莉春), et al. Inhibitory activity of Chinese herbal aqueous extracts to tetracycline-resistant *E. coli* of swine. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2013, 46: 2370-2376.