

# 中草药复方对畜禽肠道病原菌的体外抑菌试验

陈虹 刘磊 吴润 杨孝朴\* (甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070)

**摘要** [目的] 为应用中草药复方治疗畜禽肠道病提供参考数据。[方法] 用改良试管二倍稀释法测定15组中草药复方对8种畜禽肠道病原菌的最小抑菌浓度(MIC)。[结果] 乌梅和五倍子、诃子分别配伍对大肠杆菌 O<sub>8</sub> 的 MIC 高达 15.6 ng/ml, 五倍子和大黄、诃子和黄连、黄芩和大黄配伍的 MIC 为 31.25 ng/ml。五倍子和大黄、诃子和乌梅配伍对大肠杆菌 O<sub>78</sub> 的 MIC 为 31.25 ng/ml。五倍子和黄连、黄芩和大黄配伍对鸡白痢沙门氏菌的 MIC 高达 3.9 ng/ml, 诃子和大黄配伍的 MIC 达 7.8 ng/ml, 诃子和艾叶配伍的 MIC 达 15.6 ng/ml, 五倍子和乌梅、五倍子和黄柏、诃子和乌梅、黄芩和乌梅、黄芩和艾叶配伍的 MIC 为 31.25 ng/ml。乌梅和五倍子、诃子分别配伍对鼠伤寒沙门氏菌的 MIC 为 31.25 ng/ml。五倍子和乌梅、艾叶分别配伍对猪伤寒沙门氏菌的 MIC 达 31.25 ng/ml。黄芩和大黄、艾叶分别配伍对猪霍乱沙门氏菌的 MIC 高达 15.6 ng/ml, 五倍子和乌梅、诃子和大黄配伍的 MIC 为 31.25 ng/ml。[结论] 本试验所选 15 组中草药复方, 大部分表现出协同作用。

**关键词** 中草药复方; 最小抑菌浓度; 协同作用

中图分类号 S814.1 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2009)13 - 06005 - 02

## Bacteriostatic Test in vitro of Chinese Herbal Medical Compounds against Enteric Pathogenic Bacteria in Livestock and Poultry

CHEN Hong et al (College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

**Abstract** [Objective] The aim was to supply reference data for treating intestinal disease in livestock and poultry with Chinese herbal medical compounds. [Method] The minimum inhibitory concentrations (MIC) of 15 Chinese herbal medical compounds on 8 enteric pathogenic bacteria in livestock and poultry were determined by improved tube double dilution method. [Result] The MIC of compatibilities of *Fructus mume* and *Galla chinensis*, *F. mume* and *Fructus chebulae* on *Escherichia coli* O<sub>8</sub> were up to 15.6 ng/ml and that of compatibilities of *G. chinensis* and *Radix et rhizoma*, *F. chebulae* and *Rhizoma coptidis*, *Radix scutellariae* and *R. et rhizoma* were 31.25 ng/ml. The MIC of compatibilities of *G. chinensis* and *R. et rhizoma*, *F. chebulae* and *F. mume* on *E. coli* O<sub>78</sub> were 31.25 ng/ml. The MIC of compatibilities of *G. chinensis* and *R. coptidis*, *R. scutellariae* and *R. et rhizoma* on *Salmonella pullorum* were up to 3.9 ng/ml, that of compatibility of *F. chebulae* and *R. et rhizoma* was up to 7.8 ng/ml, that of compatibility of *F. chebulae* and *Folium artemisiae argyi* was up to 15.6 ng/ml and that of compatibilities of *G. chinensis* and *F. mume*, *G. chinensis* and *Cortex phellodendri chinensis*, *F. chebulae* and *F. mume*, *R. scutellariae* and *F. mume*, *R. scutellariae* and *F. artemisiae argyi* were 31.25 ng/ml. The MIC of compatibilities of *F. mume* and *G. chinensis*, *F. mume* and *F. chebulae* on *Salmonella typhi murium* were 31.25 ng/ml. The MIC of compatibilities of *G. chinensis* and *F. mume*, *G. chinensis* and *F. artemisiae argyi* on *Salmonella typhisuis* were 31.25 ng/ml. The MIC of compatibilities of *R. scutellariae* and *R. et rhizoma*, *R. scutellariae* and *F. artemisiae argyi* on *Salmonella choleraesuis* were 15.6 ng/ml and that of *G. chinensis* and *F. mume*, *F. chebulae* and *R. et rhizoma* were 31.25 ng/ml. [Conclusion] Most of the 15 selected Chinese herbal medical compounds showed synergistic effect.

**Key words** Chinese herbal medical compounds; Minimum inhibitory concentration; Synergistic effect

近几十年来,随着抗生素的长期使用,畜禽体内药物残留及病原菌抗药性逐渐增强的问题日益突出<sup>[1]</sup>。中草药作为我国特有的中医药理论与实践的产物<sup>[2]</sup>,具有治疗、保健、营养、促生长等作用,以其低毒、无药物残留、耐药性发生率低的独特优势,被广泛地应用于临床上,用来治疗畜禽疫病<sup>[3]</sup>。按照中药配伍理论中药复方是中药的精髓<sup>[4]</sup>,任何一味药物,其作用不是单一的,根据临床的不同需要,进行适当配伍,可充分发挥一药多能的效果<sup>[5]</sup>。中草药的合理配伍应用,能使疫病得到控制,达患畜早日康复之目的<sup>[6]</sup>。因此,笔者将8味中药单药任意两味以1:1配伍后,随机抽取15组中药组合,测定对8种畜禽肠道病原菌的最小抑菌浓度(MIC),以期为临床应用提供参考数据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

**1.1.1 药材。**五倍子 *Galla chinensis*、诃子 *Fructus chebulae*、黄芩 *Radix scutellariae*、乌梅 *Fructus mume*、黄连 *Rhizoma coptidis*、大黄 *Radix Et Rhizoma Rhei*、黄柏 *Cortex phellodendri Chinensis*、艾叶 *Folium artemisiae Argyi*,均购自兰州安泰堂中药饮片有限公司。所有药物经检定符合生药质量标准。

基金项目 甘肃省农业科技专项农业科技示范基地建设项目(0623-006)。

作者简介 陈虹(1981-),女,回族,甘肃临夏人,硕士研究生,研究方向:基础兽医学。\* 通讯作者,教授, E-mail: yangxpu@gsau.edu.cn。

收稿日期 2009-03-09

**1.1.2 菌种。**大肠杆菌 *Escherichia coli*: O<sub>2</sub>、O<sub>139</sub>、O<sub>8</sub>、O<sub>78</sub>, 鸡白痢沙门氏菌 *Salmonella pullorum*, 鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhi murium*, 猪伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhisuis*, 猪霍乱沙门氏菌 *Salmonella choleraesuis*, 均由甘肃农业大学动物医学院微生物实验室保存,试验前在斜面培养基上接种复活。

**1.1.3 试剂。**蛋白胨(批号20080402,北京奥博星生物技术有限责任公司),琼脂粉(批号20070302,北京奥博星生物技术有限责任公司),牛肉浸膏(批号20070515,北京双旋微生物培养基制品厂),NaCl(批号20040421,天津市标准科技有限公司),K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(批号791107,成都化学试剂厂),NaOH(批号720623,西安化学试剂厂)。

**1.1.4 培养基。**普通营养琼脂平板、普通营养肉汤均按常规方法配制,高压灭菌后置4℃冰箱保存备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 药液煎制。**称取50g生药,装入具塞的三角烧瓶中,加10倍量水浸泡30min后,电炉加热煮沸30min,纱布过滤,药渣再加8倍量水煮沸30min,纱布过滤。合并2次滤液,滤纸过滤,恒温水浴加热浓缩至25ml(每ml含2g生药提取物),4℃封存备用。以上所制8种药液按减量均等法(各中草药的比例相同)量取各种中药液彼此充分混合均匀<sup>[7]</sup>,从中选取15组两味组合,进行试验。

**1.2.2 菌液制备。**菌种接种于普通琼脂培养基上,37℃培养24h,挑取典型菌落接种于新鲜肉汤培养基中,37℃培养18h,备用。

**1.2.3 中草药复方最小抑菌浓度(MC)的测定。**采用试管二倍稀释法<sup>[8]</sup>测定药液对各供试菌的MC: 取13×100 mm 灭菌有棉塞试管11支,编号,每管先加入无菌肉汤培养基2.0 ml,然后于第一管中加入灭菌的受试中药水提物2.0 ml,混匀后取出2.0 ml放入第2管中,依次类推做1/2~1/512的梯度稀释,直到第9管取出2.0 ml弃去。第10管不加药物,作为阳性对照,第11管加受试中药水提物2.0 ml,混匀后取出2.0 ml弃去,不加细菌,作为阴性对照。各管平行3份。经肉汤培养基培养18 h的试验菌液用无菌肉汤稀释100倍。取细菌稀释液0.1 ml分别加入上述1~10管中混匀,11号管加0.1 ml 灭菌生理盐水,置各管于恒温培养箱中培养24 h,观察结果。在阳性对照管细菌生长呈浑浊状,而阴性对照管无细菌生长呈透明状的前提下,观察其他试管的浑浊情况。如试管内浑浊,说明有细菌生长;如试管内澄清透明,证明无细菌生长。眼观选出无细菌生长的各管,分别取其液体涂布于琼脂平板培养基上,于恒温培养箱培养24 h,观察结果。琼脂平板上无细菌生长而含药液浓度最低者,即为该种药物对该菌株的最低抑菌浓度。

## 2 结果与分析

由表1可知,大多数药物配伍后产生协同作用,其中有一部分对所试菌株有非常显著的抑菌效果,如乌梅和五倍子、诃子分别配伍后对大肠杆菌O<sub>8</sub>的抑菌效果相当好,MC

高达15.6 ng/ml,五倍子和大黄、诃子和黄连、黄芩和大黄则次之,MC为31.25 ng/ml;五倍子和大黄、诃子和乌梅的水提取物对大肠杆菌O<sub>78</sub>的抑菌效果较好,MC为31.25 ng/ml;对鸡白痢沙门氏菌,五倍子和黄连、黄芩和大黄配伍后对其抑菌效果相当显著,MC竟高达3.9 ng/ml,诃子和大黄水提物的抑菌效果也达到了7.8 ng/ml,诃子和艾叶配伍后的MC也达到了15.6 ng/ml,五倍子和乌梅、五倍子和黄柏、诃子和乌梅、黄芩和乌梅、黄芩和艾叶的配伍液次之,均为31.25 ng/ml;对鼠伤寒沙门氏菌,乌梅和五倍子、诃子分别配伍后的抑菌效果都很好,MC为31.25 ng/ml;五倍子和乌梅、艾叶分别配伍后对猪伤寒沙门氏菌的MC也达到了31.25 ng/ml;黄芩和大黄、艾叶分别配伍后对猪霍乱沙门氏菌的抑菌效果相当显著,MC高达15.6 ng/ml,五倍子和乌梅、诃子和大黄的抑菌效果也不错,MC为31.25 ng/ml。还有相当一部分药物配伍后对所试菌株也有较好的抑菌效果,它们对所试菌株的MC在62.50~125.00 ng/ml,占了大多数。另有一小部分药物配伍后对所试菌株有微弱的抑菌作用,MC在250.00~500.00 ng/ml。也有些药物配伍后可能互相拮抗而抵消作用,如黄芩和黄连配伍后,对大肠杆菌O<sub>2</sub>、大肠杆菌O<sub>8</sub>、猪伤寒沙门氏菌均无抑菌效果;黄芩和黄柏的配伍液对大肠杆菌O<sub>2</sub>、大肠杆菌O<sub>139</sub>无抗菌作用;黄芩和艾叶配伍后大肠杆菌O<sub>2</sub>、猪伤寒沙门氏菌均无抑菌作用。

表1 15组中草药复方对8种畜禽肠道病原菌的MC值

药物	大肠杆菌O <sub>2</sub>	大肠杆菌O <sub>139</sub>	大肠杆菌O <sub>8</sub>	大肠杆菌O <sub>78</sub>	鸡白痢沙门氏菌	鼠伤寒沙门氏菌	猪伤寒沙门氏菌	猪霍乱沙门氏菌
Medicament	E.coli O <sub>2</sub>	E.coli O <sub>139</sub>	E.coli O <sub>8</sub>	E.coli O <sub>78</sub>	S. pulorum	S.typhimurium	S.typhisuis	S.choleraesuis
五倍子+ 乌梅 G. chinensis + F. mume	62.50	62.50	15.60	62.50	31.25	31.25	31.25	31.25
五倍子+ 黄连 G. chinensis + R. coptidis	500.00	125.00	62.50	62.50	3.90	62.50	62.50	62.50
五倍子+ 大黄 G. chinensis + Radix Et Rhizoma Rhei	62.50	62.50	31.25	31.25	62.50	62.50	125.00	62.50
五倍子+ 黄柏 G. chinensis + C. phellodendri Chinensis	62.50	62.50	125.00	62.50	31.25	62.50	125.00	62.50
五倍子+ 艾叶 G. chinensis + F. artemisiae Argyi	125.00	125.00	62.50	62.50	62.50	62.50	31.25	125.00
诃子+ 乌梅 F. chebulae + F. mume	62.50	62.50	15.60	31.25	31.25	31.25	62.50	62.50
诃子+ 黄连 F. chebulae + R. coptidis	125.00	125.00	31.25	125.00	62.50	125.00	62.50	62.50
诃子+ 大黄 F. chebulae + Radix Et Rhizoma Rhei	62.50	125.00	62.50	62.50	7.80	62.50	62.50	31.25
诃子+ 黄柏 F. chebulae + C. phellodendri Chinensis	62.50	62.50	250.00	250.00	62.50	62.50	125.00	125.00
诃子+ 艾叶 F. chebulae + F. artemisiae Argyi	125.00	125.00	125.00	125.00	15.60	62.50	62.50	62.50
黄芩+ 乌梅 R. scutellariae + F. mume	125.00	62.50	62.50	125.00	31.25	62.50	125.00	125.00
黄芩+ 黄连 R. scutellariae + R. coptidis	-	125.00	-	125.00	62.50	125.00	-	250.00
黄芩+ 大黄 R. scutellariae + Radix Et Rhizoma Rhei	250.00	250.00	31.25	62.50	3.90	62.50	500.00	15.60
黄芩+ 黄柏 R. scutellariae + C. phellodendri Chinensis	-	-	500.00	125.00	125.00	500.00	500.00	500.00
黄芩+ 艾叶 R. scutellariae + F. artemisiae Argyi	-	62.50	500.00	62.50	31.25	500.00	-	15.60

注:“-”表示无抑菌效果。

Nte:“-”means no bacteriostatic action.

## 3 结论

试验结果表明,试验所选15组2味中药组合,大部分组合具有协同作用,只有少数药物配伍后可能互相拮抗而抵消

作用,显示了中草药的配伍优势,为研制防治畜禽肠道病的复方制剂作了有益的探索。

(下转第6022页)

脏外科认可并在实践中证实。1861 年研究发现, 结扎部分门静脉分支后, 结扎侧的肝叶出现萎缩, 而非结扎侧的肝叶出现代偿性增生肥大。李波等<sup>[9]</sup>研究表明, 大鼠 90% 肝叶门静脉支结扎 2 周后行二期肝切除, 可有效预防一期 90% 肝切除术后急性肝衰竭。Makuuchi 等<sup>[10]</sup>认为, 术前 PBL 的作用有两个: 可以引起未来残留肝脏的代偿性肥大再生; 同时避免肝叶切除后门静脉压力突然升高。这可以减少术后肝功能衰竭的发生率, 提高大范围肝切除(特别是合并肝硬变的患者)的安全性。该模型的建立及应用对预防大范围肝切除导致的急性肝衰竭起到积极的作用。

### 3 化学药物损伤模型

研究正常情况下肝再生没有临床价值, 肝再生是一种病理生理过程, 研究病理状态下肝再生日益受到重视。很多化学药物如四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)、D-半乳糖胺、酒精、硫代乙酰胺、对乙酰氨基酚等对肝脏具有毒性, 长期过量服用会造成肝脏损害、肝实质细胞死亡并伴随肝再生。通过建立实验性药物损伤动物肝再生模型, 研究肝脏病变后的再生机制, 具有十分重要的现实意义。

**3.1 CCl<sub>4</sub> 损伤模型** CCl<sub>4</sub> 是经典的肝脏毒素, 经肝脏代谢产生高活性的三氯甲基自由基, 后者引发脂质过氧化进而损伤肝细胞膜。特别是自由基作用于 DNA 时, 损伤核糖和碱基, 使核酸直接破坏, 引起 DNA 链的断裂或 DNA 链间或与蛋白质间交联, 影响其信息传递功能以及转录和复制特性, 改变癌基因和抑癌基因的活性状况, 最后可引发细胞增殖失控而至癌变<sup>[11]</sup>。一次性口服、腹腔注射和皮下注射一定剂量的 CCl<sub>4</sub> 造成的肝损伤是急性、可逆的, 特点是门管区肝叶坏死, 但是肝脏能完全再生。有研究表明, 采用灌胃给药的方式或者联合使用巴比妥可提高 CCl<sub>4</sub> 的肝脏毒性。与部分肝切除相比, CCl<sub>4</sub> 毒性损伤后大鼠肝细胞 DNA 合成和细胞分裂延迟。该模型是肝损伤的经典模型, 能准确反映肝细胞的功能、代谢及形态学变化。

**3.2 D-半乳糖胺损伤模型** Kepler 等<sup>[12]</sup>首先应用 D-GalN 制备大鼠肝损伤模型。将 D-半乳糖胺(D-GalN)溶于生理盐水, 大鼠或小鼠 1 次性腹腔注射 600~900 ng/kg, 造成急性肝损伤模型。研究证实 D-GalN 在肝细胞内结合尿苷酸(UDP)代谢, 由于这种结合利用的速度大大超过了尿苷酸的生物合成速度, 致使尿苷酸耗竭, 进而导致依赖其进行生物合成的核酸、糖蛋白和糖脂等物质减少, 限制了细胞器的再生及酶的生成和补充, 细胞器受损, 肝细胞的结构和功能均出现异常甚至死亡。该模型自建立以来主要用于研究肝脏受到毒性损伤后肝纤维化进程, 而不是用于研究肝再生。

此外, 对乙酰氨基酚损伤模型和酒精性损伤模型在研究

药物损伤造成的肝再生机理方面也有一定的临床应用价值<sup>[13]</sup>。但是, 化学性药物损伤动物模型在制作方式、药物浓度及持续时间不同等导致试验结果存在差异, 试验标准很难统一。

### 4 小结

各种实验动物模型的建立促进了肝脏再生机理的研究, 为临床肝脏外科手术的开展和肝脏疾病的治疗提供了理论指导。但是, 用实验动物研究肝再生以下问题应引起研究者的关注: 其一, 动物模型的制作必须在严格的标准条件下进行, 因为肝再生不仅受到肝细胞增殖的生理节奏影响, 还受到实验动物的年龄、性别和营养状况的影响; 其二, 人体中肝再生主要发生在肝脏受到毒素、病毒的损伤后, 因此毒物诱导的肝再生模型更具有临床价值。但是, 在该类模型中, 肝细胞坏死和肝细胞再生交织在一起, 很难对试验结果作出科学评价; 其三, 迄今为止, 对病人中已经病变的肝脏(如肝硬化、遗传性肝脏缺陷等)的肝再生研究较少, 应加大这类模型的研究力度; 最后, 为深入研究肝再生的机理, 有必要对毒素诱导的肝再生和外科手术诱导的肝再生进行比较研究, 以提高现有肝再生模型的临床应用价值, 以便更好地将研究成果用于肝脏疾病的治疗。

### 参考文献

- [1] HGGINS G M, ANDERSON R M. Experimental pathology of the liver. I: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal [J]. Arch Pathol, 1931, 12: 186 - 202.
- [2] SIMPSON G E. The pattern of regeneration of rat liver after repeated hepatectomies [J]. J Path Bact, 1963, 86: 361 - 369.
- [3] DAGRAD A. Regeneration of the liver following multiple resection [J]. Surgery, 1964, 55: 109 - 112.
- [4] 吴毅平, 吴在德. 大鼠反复肝切除后再生肝组织的实验形态学研究 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4(1): 28 - 33.
- [5] 徐存拴, 李永辉, 段瑞峰, 等. 短间隔连续部分肝切除对大鼠生存和肝组织结构的影响 [J]. 动物学报, 2001, 47(6): 659 - 665.
- [6] GAUBJ. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy [J]. Hepatology, 1984, 4(5): 902 - 904.
- [7] 毛一雷, 于卓, 桑新亭. 极限肝切除术后延长大鼠生存时间的研究 [J]. 中华普通外科杂志, 2004, 19(5): 301 - 304.
- [8] HONA G C, PETER E L. Subtotal hepatectomy: a porcine model for the study of liver regeneration [J]. J Surg Res, 2004, 116(1): 181 - 186.
- [9] 李波, SALLE A. 大鼠门静脉分支结扎预防 90% 肝切除术后急性肝功能衰竭 [J]. 华西医科大学学报, 1997, 28(1): 87 - 90.
- [10] MAKUCHI M, THAI B L, TAKAYASU K, et al. Reoperative partial hepatectomy to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report [J]. Surgery, 1990, 107: 511 - 517.
- [11] CASTRO G D, GOMEZ M I, CASTRO J A, et al. DNA bases attack by reactive metabolites produced during carbon tetrachloride biotransformation and promotion of liver microsomal lipid peroxidation [J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997, 95: 253 - 258.
- [12] KEPLER D, LESCHR, REUTER W. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine [J]. Exp Mol Pathol, 1968, 9: 279 - 290.
- [13] 唐云安, 刘玉清, 王国钦. 肝损伤动物模型研究进展 [J]. 卫生毒理学杂志, 2002, 16(4): 236 - 238.

(上接第 6006 页)

### 参考文献

- [1] 李笑春, 黄建国, 崔敏. 三种中草药复方提取物的体外抑菌试验 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2006(1): 11 - 13.
- [2] 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.
- [3] 李淑梅, 杨帆. 中草药提取物对大肠杆菌的体外抑菌试验 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(23): 6212 - 6222.
- [4] 傅文栋. 中草药及其有效成分体外抗菌抗病毒研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2006(5): 66 - 67.
- [5] 李琦. 中药配伍略谈 [J]. 大同医学专科学校学报, 1999, 19(4): 35 - 36.
- [6] 何志生, 焦镭. 兽医临床常用中草药配伍之我见 [J]. 中兽医学杂志, 2005(6): 38 - 39.
- [7] 刘富来, 陈志华, 冯翠兰, 等. 中草药对禽大肠杆菌的体外抑菌试验 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2003(2): 12 - 14.
- [8] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 36 - 38.