

抗鸡致病性大肠杆菌中药的筛选及其疗效观察

庞向红^{1,2}, 褚秀玲², 苏建青³, 梁淑珍³, 李全福³, 胡满³

(1. 河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001; 2. 河北北方学院动物科技学院, 河北张家口 075131; 3. 聊城大学农学院, 山东聊城 252059)

摘要 [目的] 为获得有效防治鸡大肠杆菌病的中药制剂奠定基础。[方法] 以西药盐酸洛美沙星氯化钠注射液为对照, 对15味中药及7个自拟中药复方进行药敏试验, 并对7个中药复方和体外抑菌效果较好的单味中药进行体内试验。[结果] 药敏试验结果表明, 15味单味中药均有一定的抗大肠杆菌作用, 其中以芦荟、石榴皮、地榆等抑菌效果明显。7个自拟复方中复方一、复方二和复方五的抗大肠杆菌效果较好。体内试验结果表明, 中药对人工感染大肠杆菌的鸡只治疗效果优于西药, 以复方一和复方二效果较好。[结论] 中药制剂对鸡大肠杆菌病具有较好的治疗效果, 但其在体内与体外的抑菌作用机制有所不同。

关键词 中药制剂; 药敏试验; 鸡大肠杆菌病; 体内试验

中图分类号 S853.72 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)09-04040-02

Screening and Efficacy Observation of Traditional Chinese Medicine Against Chicken Pathogenic Escherichia coli

PANG Xiang hong et al (College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract [Objective] The aim of this study was to lay a foundation for obtaining effective traditional Chinese medicine preparations controlling chicken colibacillosis. [Method] With the western medicine Lomefloxacin Hydrochloride / Sodium Chloride Injection as the control, drug sensitivity tests of 15 traditional Chinese herbs and seven self-made Chinese herbal compounds were conducted. Subsequently, the single traditional Chinese herbs presenting good in vitro antibacterial effects against Escherichia coli and all the seven compounds were given to the chicken artificially infected with E. coli to observe their efficacies. [Result] The results of drug sensitivity tests showed that all the 15 traditional Chinese herbs had certain antibacterial effects against E. coli, among which aloe, pomegranate rind and radix sanguisorbae were the best. Compound 1, 2 and 5 had good antibacterial effects in vitro. By in vivo test, traditional Chinese medicines showed superior efficacy on chicken infected with E. coli than western medicine, and compound 1 and 2 performed good effects. [Conclusion] Traditional Chinese medicine preparation is good at controlling chicken colibacillosis, but their bacteriostasis mechanism in vivo is different with that in vitro.

key words Traditional Chinese medicine preparation; Drug sensitivity test; Chicken colibacillosis; In vivo test

大肠杆菌病是目前鸡场常见传染病之一, 其发生率已经占到某些地区鸡场常见细菌性疾病的前两位^[1-4]。近年来, 抗菌药物和大肠杆菌疫苗在养殖业上广泛使用, 虽然极大地促进了规模化、集约化畜牧业的发展, 但其广泛、持续和不当使用导致了畜禽产品中的药物残留, 除了可能对消费者造成直接的急、慢性毒性外, 还有可能引起过敏反应, 或者影响人类胃肠道的正常菌群, 严重损害人类健康^[5-7]。因此, 中国传统兽医学得到日益广泛的关注。该试验采用中兽医经典理论与现代药理实验技术相结合的方法筛选出抗菌效果较好的单味及复方中药, 并考察其临床疗效, 为最终获得有效防治鸡大肠杆菌病的中药制剂奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 供试动物。1日龄雏鸡, 常规雏鸡饲料隔离平面笼养至7日龄(鸡苗和饲料皆购自河北北方学院实验牧场)。

1.1.2 供试菌株及培养基。O₈型大肠杆菌由河北北方学院卫检实验室提供。普通肉汤培养基、普通营养琼脂培养基。

1.1.3 仪器。DHG 9140 鼓风干燥箱(宁波江南仪器厂), KQ 500 超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司), DH6000 恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司), 高压消毒器(山东新华医疗器械股份有限公司), 超净工作台(上海淀山湖净化设备厂), 电子天平(上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂)等。

1.1.4 药物。盐酸洛美沙星氯化钠注射液(浓度为1%, 阳性对照药物)购自湖北中佳药液有限公司; 中药(白芍、鱼腥

草、麻黄、生山楂、石榴皮、地榆、秦皮、丹皮、炒白术、乌梅、芦荟、蒲公英、甘草、锦灯笼、车前子、黄柏、板蓝根、柴胡、黄连、黄芪、连翘、金银花、黄芩、知母、党参、大黄)购自张家口安国中药店。依据中药配伍原则, 自拟7个复方: 石榴皮45 g, 黄柏40 g, 板蓝根20 g, 柴胡20 g, 芦荟30 g; 黄连40 g, 地榆35 g, 板蓝根20 g, 黄芪30 g, 芦荟30 g; 黄柏45 g, 连翘40 g, 金银花20 g, 地榆30 g, 鱼腥草20 g; 黄连45 g, 芦荟40 g, 金银花30 g, 白术30 g, 麻黄30 g; 黄芩50 g, 石榴皮45 g, 板蓝根45 g, 地榆40 g, 知母30 g; 石榴皮45 g, 黄芪30 g, 黄柏40 g, 党参30 g, 大黄40 g; 黄芪45 g, 白芍30 g, 板蓝根40 g, 金银花50 g。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌的培养与记数。将冻干的大肠杆菌苗室温下融化, 无菌条件下划线接种于普通营养培养基上, 37℃培养24 h后挑取生长良好的单个菌落接种于普通肉汤培养基中, 37℃培养24 h, 准确吸取细菌培养液1 ml, 加入装有9 ml 无菌生理盐水的试管中, 振荡20 min, 使细菌分散, 静置片刻, 即成10⁻¹稀释液; 按照倍比稀释法, 依次配制稀释度为10⁻²~10⁻⁹的菌悬液。采用10⁻⁴~10⁻⁹稀释度的菌液进行计数。分别移取不同稀释度的菌液0.1 ml, 均匀涂布在营养琼脂平板上, 平放于桌上20~30 min, 使菌液渗透于培养基内, 然后将培养皿倒转, 37℃培养24 h后计数。每个浓度重复4次。

1.2.2 中药的煎制。将单味中药称取100 g, 复方中药按所配伍的剂量称取, 加800~1 000 ml 蒸馏水, 浸泡30 min后煎煮, 煮沸后文火煎20 min, 用4层纱布过滤药液, 取药渣加300~500 ml 蒸馏水煎煮, 煮沸后文火煎20 min, 用4层纱布过滤后, 合并2次的药液, 用文火浓缩至药液中生药含量为1 g/ml, 高压灭菌后备用(注: 车前子水煎后比较粘稠, 不易过滤且易糊锅, 故需用纱布包裹后煎煮)。

基金项目 河北省教育厅资助项目(2007408)。

作者简介 庞向红(1968-), 女, 河北张家口人, 在读硕士, 高级实验师, 从事中药抗菌研究。

收稿日期 2008-12-24

1.2.3 药敏试验。将滤纸用打孔机打成直径6 mm的圆片,160 干热灭菌2 h。在超净台中将制备好的中药药液及原浓度、10倍稀释、100倍稀释的盐酸洛美沙星氯化钠注射液各1 ml加入100片纸片中,室温浸泡2 h,4 保存备用。将普通肉汤内培养的菌液稀释成 10^{-4} ,然后吸取0.1 ml均匀涂布于营养琼脂平板上,待干燥后用镊子夹住药敏片按顺序平均分布于琼脂表面,每个平板按需要放8~9个药敏片,每个平板做2~3个重复(表1),37 培养24 h后用直尺测量抑菌圈直径。

表1 药敏片的分组

Table 1 Grouping of sensitive tablets

组别 Group	药物 Drugs	重复数 Number of repetitions
1	炒白术; 乌梅; 芦荟; 蒲公英; 甘草; 锦灯笼; 丹皮; 麻黄; 盐酸洛美沙星氯化钠	3
2	车前子; 地榆; 鱼腥草; 石榴皮; 秦皮; 生山楂; 白芍; 盐酸洛美沙星氯化钠	3
3	复方一; 复方二; 复方三; 复方四; 复方五; 复方六; 复方七; 盐酸洛美沙星氯化钠	3
4	炒白术; 地榆; 芦荟; 石榴皮; 甘草; 生山楂; 丹皮; 麻黄; 盐酸洛美沙星氯化钠	2
5	车前子; 乌梅; 鱼腥草; 蒲公英; 秦皮; 锦灯笼; 白芍; 盐酸洛美沙星氯化钠	2
6	炒白术; 地榆; 芦荟; 复方四; 复方五; 锦灯笼; 石榴皮; 盐酸洛美沙星氯化钠	2

注:1~3组中,盐酸洛美沙星氯化钠药敏片的3个重复分别由该药的原液、10倍稀释液和100倍稀释液制成。4~6组中,盐酸洛美沙星氯化钠药敏片的2个重复均由该药原液制成。

Note: In the groups of 1-3, three repetitions of Lomefloxacin Hydrochloride / Sodium Chloride sensitive tablets are prepared with the raw liquid, 10 times dilution and 100 times dilution of this drug respectively; in the groups of 4-6, two repetitions of Lomefloxacin Hydrochloride / Sodium Chloride sensitive tablets are prepared with the raw liquid of this drug.

1.2.4 体内试验。取健康状况良好的7日龄雏鸡120只,随机分为12组,每组10只。对第1~11组进行攻毒,每只鸡胸部肌肉注射0.2 ml稀释度为 10^{-3} 的菌液,第12组为空白对照组。攻毒10 h后,对第1~10组分别给予复方一、复方二、复方三、复方四、复方五、复方六、复方七、芦荟、石榴皮、盐酸洛美沙星氯化钠进行治疗,第11组为阴性对照组,不予治疗。中药拌于饲料中喂食,每天2次,每次4 ml;盐酸洛美沙星氯化钠注射液用水稀释至0.1%,拌于饲料中喂食,每天2次,每次30 ml。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌的记数结果 选取菌落数在30~300的平皿作为菌落总数测定的标准。每个稀释度使用4个平皿,取其平均数,再乘以稀释倍数,即为菌落总数。通过试验选取 10^{-6} 作为计数标准,得出原液中大肠杆菌数为 4.2×10^8 个/ml。

2.2 药敏试验结果 药敏试验结果(表2)显示:15味单味中药均有一定的抗大肠杆菌作用,其中以芦荟、石榴皮、地榆等抑菌效果明显。7个自拟复方中复方一、复方二和复方五有良好的抗大肠杆菌效果。

2.3 体内试验结果 正常对照组(空白对照)鸡整个试验过程中均精神状态和食欲良好,没有任何症状。攻毒对照组和

药物治疗组在攻毒6 h后,先后出现羽毛蓬松、翅膀下垂、采食量减少,拉黄白色稀粪等症状,在24 h后开始有鸡出现死亡,试验结束时攻毒对照组仅剩1只鸡,并处于发病状态。中药复方、单方和西药均有不同程度的治疗作用,其中以中药复方一、复方二、芦荟、石榴皮效果较好,分别有7、6、6和6只鸡存活,且精神状态良好。从健康状态上看,复方一和复方二的治疗鸡整体上优于单方组,中药治疗组优于西药治疗组。通过对各组存活鸡体重、免疫器官胸腺和脾脏重量的比较(表3),发现中药治疗组3个指标明显优于西药治疗组,复方一的体重和脾脏重量与正常对照组差异不显著,复方二和复方五的胸腺脾脏、重量与正常对照组差异不显著。表明中药在发挥抗大肠杆菌作用的同时,可以提高机体的免疫力,效果明显优于西药治疗组。

表2 药敏试验结果

Table 2 Results of drug sensitivity test

药物 Drug	抑菌直径 Antibacterial circle diameter	药物 Drug	抑菌直径 Antibacterial circle diameter
炒白术	0.70	生山楂	0.78
乌梅	0.81	白芍	0.70
芦荟	1.52	复方一	0.88
蒲公英	0.70	复方二	0.90
甘草	0.72	复方三	0.70
锦灯笼	0.85	复方四	0.72
丹皮	0.78	复方五	1.02
麻黄	0.80	复方六	0.70
车前子	0.70	复方七	0.70
地榆	1.05	盐酸洛美沙星氯化钠(1%)	1.65
鱼腥草	0.70	盐酸洛美沙星氯化钠(0.1%)	0.85
石榴皮	1.19	盐酸洛美沙星氯化钠(0.01%)	0.72
秦皮	0.70		

表3 存活鸡只的体重及胸腺、脾脏重量

Table 3 Body weight, thymus weight and spleen weight of survival chicken

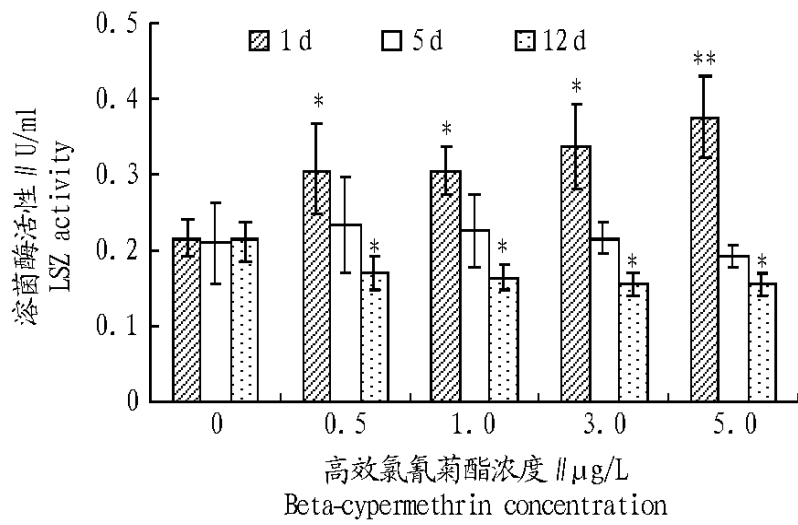
组别 Group	体重 Body weight	胸腺重 Thymus weight	脾脏重 Spleen weight
复方一 Compound prescription 1	98.1 ± 3.51	0.25 ± 0.06*	0.22 ± 0.07
复方二 Compound prescription 2	89.0 ± 4.34*	0.28 ± 0.08	0.22 ± 0.09
复方三 Compound prescription 3	78.6 ± 3.97*	0.21 ± 0.05*	0.14 ± 0.04*
复方四 Compound prescription 4	73.4 ± 5.11*	0.21 ± 0.03*	0.11 ± 0.06*
复方五 Compound prescription 5	86.0 ± 4.67*	0.27 ± 0.09	0.21 ± 0.07
复方六 Compound prescription 6	64.5 ± 5.72*	0.20 ± 0.04*	0.16 ± 0.08*
复方七 Compound prescription 7	79.5 ± 3.84*	0.19 ± 0.08*	0.20 ± 0.05
芦荟 Aloe	84.5 ± 4.62*	0.20 ± 0.05*	0.18 ± 0.09
石榴皮 Pomegranate rind	79.0 ± 3.78*	0.19 ± 0.09*	0.17 ± 0.07*
盐酸洛美沙星氯化钠 Lomefloxacin Hydrochloride/ Sodium Chloride	60.5 ± 4.11*	0.17 ± 0.03*	0.13 ± 0.04*
正常对照 Normal control	120.4 ± 3.92	0.30 ± 0.06	0.21 ± 0.08

注:*表示与正常对照组差异显著(P < 0.05)。

Note:* means significant difference with normal control group (P < 0.05).

3 讨论

药敏试验结果显示,单味中药芦荟、石榴皮有良好的抑菌效果,其抑菌效果和西药对照盐酸洛美沙星氯化钠的相当。体内试验无论从鸡只的死亡率上,还是体重和免疫器官(下转第4072页)



注: *、** 分别表示与对照组有显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 差异。

Note: * and ** mean significant difference ($P < 0.05$) and extremely significant difference ($P < 0.01$) respectively.

图1 不同浓度高效氯氰菊酯暴露下草鱼血清 LSZ 活性的动态变化

Fig.1 Dynamic changes of LSZ activity in serum of grass carp exposed to different concentration of beta-cypermethrin

非特异性免疫因子之一,主要在肝内合成,分布于全身,在鱼体抵抗感染性致病菌方面具有重要作用。水产动物血清中 LSZ 活性既是衡量动物机体免疫状态的指标之一,又是衡量养殖环境污染程度的重要指标^[18]。

靳晓敏等的研究发现,高效氯氰菊酯和功夫菊酯在低浓度、短时间作用下,可提高鲤鱼血清溶菌酶活性,而低浓度、长时间或高浓度作用下,鲤鱼的血清溶菌酶活性显著受到抑制^[19],这与该研究结果一致。该研究中,草鱼血清溶菌酶活性随高效氯氰菊酯暴露时间的延长先升后降,显示出明显的时间—效应关系。表明机体受到外界胁迫时,会产生较多溶菌酶或提高酶活性,来缓和环境污染对机体的影响,但胁迫强度超出机体的耐受范围时,机体的代偿作用机制被破坏,酶活性明显降低;高浓度暴露处理中,高效氯氰菊酯直接作用于草鱼的单核细胞,使其分泌功能受到抑制,从而导致酶量下降。

(上接第4041页)

重量上中药组均优于西药对照。7组中药复方的体外抑菌效果虽不及单味中药芦荟、石榴皮,但在体内却发挥了较好的抑菌作用,治疗效果优于它们。说明中药(特别是配伍后的复方中药)的抗菌机制与西药不完全相同,有待于进一步研究。

体内试验各组鸡只大约在攻毒后6h出现发病症状,死亡高峰出现在攻毒后第2天,以攻毒对照组最为明显。对不同组死亡鸡只脏器病变观察发现,攻毒组均表现出了大肠杆菌感染后的特征病变,但中药制剂减少了肝周炎、心包炎和腹膜炎的发生,降低了动物脏器损伤程度。对各组未死亡鸡只体重及免疫器官(胸腺、脾脏)重量的比较结果显示,空白对照组的雏鸡体重明显大于其他攻毒组,且胸腺发育良好,其他组雏鸡生长和免疫器官的发育均受到一定影响,但中药治疗较西药(盐酸洛美沙星氯化钠)治疗可更大

参考文献

- [1] 胡志强,许良忠,任雪景,等.拟除虫菊酯类杀虫剂的研究进展[J].青岛化工学院学报,2002,23(1):48-51.
- [2] WENDE RASCHL,HRZADEH P,WON P.Effects of metsulfuron methyl and cypermethrin exposure on freshwater model ecosystems[J].Aquat Toxicol,2003,63(3):243-256.
- [3] DAS B K,MUKHERJEE S C.Toxicity of cypermethrin in Labeo rohita fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences[J].Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol,2003,134(1):109-121.
- [4] BRADBURY S P,COATS J R.Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides[J].Rev Environ Contam Toxicol,1989,108:133-177.
- [5] SMITH T M,STRATTON G W.Effects of synthetic pyrethroid insecticides on nontarget organisms[J].Residue Rev,1986,97:93-120.
- [6] 龚瑞忠,蔡道基.拟除虫菊酯类农药对水生生物的毒性评价研究[J].环境科学研究,1988(4):39-44.
- [7] 王朝晖,尹伊伟,许忠级,等.8种拟除虫菊酯农药对稀有鲫的急性亚慢性毒性研究[J].应用与环境生物学报,1998,4(4):379-382.
- [8] 姚爱琴,翟良安,赵小春,等.农药杀灭菊酯对鱼类毒性的研究[J].淡水渔业,1989(2):29-32.
- [9] 潘厚军,呈淑勤,黄志诚,等.鱼类对有机磷和溴氰菊酯农药的敏感研究[J].淡水渔业,2000,30(7):44-45.
- [10] 王明学,扶庆,周志刚,等.溴氰菊酯对草鱼早期发育阶段的毒性效应[J].水利渔业,2000,20(6):39-40.
- [11] 周志刚,王明学,吕敢堂,等.溴氰菊酯对草鱼鱼种脑 AchE 及 AIP 酶活性的影响[J].华中农业大学学报,1999,18(2):176-179.
- [12] 翟良安,姚爱勤,赵小春,等.溴氰菊酯对鱼类毒性的研究[J].淡水渔业,1990(4):10-13.
- [13] 孟紫强.环境毒理学基础[M].北京:高等教育出版社,2003:361-363.
- [14] BRADFORD M M A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein dye binding[J].Anal Biochem,1976,72:248-254.
- [15] 刘树青,江晓路,牟海津,等.免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J].海洋与湖沼,1999,30(3):278-283.
- [16] WESTER P W,VEHIAAK A D,VANMISWINKEL W B.Fish as biomarkers in immunotoxicology[J].Toxicology,1994,86(3):213-232.
- [17] RICE C D,KENGOSEN D H,ADAMS S M.Immune function as a bioindicator of pollution stress in fish[J].Ectotoxicology and Environmental Safety,1996,32(2):186-192.
- [18] CHRISTOPHER J B,LENA G K.The acute phase response and innate immunity of fish[J].Developmental and Comparative Immunology,2001,25:725-723.
- [19] 靳晓敏,吴垠,卢刚,等.两种菊酯类农药对鲤血清溶菌酶和转氨酶的影响[J].水产科学,2006,(25):383-386.

程度地减小机体损伤,以复方一和复方二效果较好。该试验为研制有效防治鸡大肠杆菌病的中药制剂奠定了一定的基础,但不同药物浓度对体内试验结果的影响,单味及复方中药对大肠杆菌的抑制机制及不同配伍药物之间的相互作用等尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 刘天龙,郭世宁,刘钟杰.中草药防治禽大肠杆菌病的研究进展[J].山东家禽,2004(9):41-42.
- [2] 王双山,欧阳素贞,刘书梅,等.中草药复方防治肉仔鸡大肠杆菌病效果的研究[J].畜牧兽医杂志,2008,27(1):9-13.
- [3] 张庆茹,郭红斌,李清艳,等.中草药防治鸡传染病研究综述[J].河北畜牧兽医报,2003(8):10.
- [4] 刘钟杰,许剑琴.中兽医[M].3版.北京:中国农业出版社,2006:144-146.
- [5] 钟镇光,谭丽屏.我国近年来鸡大肠杆菌病的流行特点和防治方法[J].中国动物检疫,1997,14(3):35-37.
- [6] 褚秀玲,苏建青,韦旭斌.中药抗大肠杆菌病研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(21):9093-9094.
- [7] 张东平,郑明学,古少鹏.鸡大肠杆菌病的现状与综合防治[J].应用技术,2006(8):59.