

连翘对奶牛子宫内膜炎致病菌 (乳房链球菌和无乳链球菌)生长曲线的影响

张祎娜^{1,2}, 白佳桦², 黄正², 马玉忠¹, 刘彦²

(¹河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001; ²北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097)

摘要:为指导中草药连翘在治疗奶牛子宫内膜炎时的合理应用,在患子宫内膜炎奶牛的子宫颈口分泌物中分离鉴定出了乳房链球菌、无乳链球菌,同时通过对乳房链球菌、无乳链球菌生长曲线的测定。结果显示连翘对乳房链球菌最低抑菌浓度为7.812 mg/mL,对无乳链球菌最低抑菌浓度为31.25 mg/mL。说明连翘对此2种链球菌均有良好的体外抑制作用,这对用中草药连翘防治奶牛子宫内膜炎具有十分重要的指导意义。

关键词:连翘;奶牛子宫内膜炎;乳房链球菌;无乳链球菌;抑菌活性

中图分类号:S854

文献标志码:A

论文编号:2011-0190

Effects of *Forsythia suspense* on Growth Curve of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* about Endometritis Pathogens in Dairy Cows

Zhang Yina^{1,2}, Bai Jiahua², Huang Zheng², Ma Yuzhong¹, Liu Yan²

(¹College of Veterinary Medicine, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001;

²Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract: To direct the application of the herbal medicine *Forsythia suspense* for treatment of dairy cow endometritis. The two pathogens, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* caused dairy cow endometritis were isolated and identified, and the bacteria growth curves were compared and analyzed after the bacteria were treated by *Forsythia suspense* extract. The minimal inhibitory concentration (MIC) on *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* were 7.812 mg/mL and 31.25 mg/mL, respectively. *Forsythia suspense* extract had significant inhibitory effects on the two bacteria, it's very important for herbal medicine *Forsythia suspense* to prevent and treat dairy cow endometritis.

Key words: *Forsythia suspense*; dairy cow endometritis; *Streptococcus uberis*; *Streptococcus agalactiae*; antibacterial activity

0 引言

乳房链球菌、无乳链球菌是造成奶牛子宫内膜炎的重要致病菌^[1-3],可给奶牛养殖业造成巨大的经济损失。随着抗生素的频繁使用及细菌耐药性的产生,寻求一种能有效抑制这2种致病菌的中草药将成为解决问题的重要研究方向。中草药连翘(*Forsythia suspense*)具有清热解毒、消肿散结之功效,

可用于治疗痈疽、瘰疬、乳痈丹毒等疾病^[4],是临床用于治疗子宫内膜炎的常用药^[5]。但目前,关于连翘抑菌作用的报道很少^[5-9]。笔者开展连翘提取物对无乳链球菌及乳房链球菌生长曲线的影响研究,来探讨连翘对这2种致病性链球菌的药用机理,为综合开发利用该药预防和治疗奶牛子宫内膜炎具有十分重要的意义。

基金项目:北京市科委项目“基于创新型乡镇建设的农业新技术研究与示范”(T080005032508024)。

第一作者简介:张祎娜,女,1985年出生,河北廊坊人,硕士,研究方向为临床药理与药物代谢。通信地址:071001 河北省保定市河北农业大学动物科技学院, Tel: 0312-7528446, E-mail: zyn964@126.com。

通讯作者:刘彦,男,1965年出生,河北张北人,研究员,研究方向为动物营养繁殖。通信地址:100097 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, Tel: 010-51503450, E-mail: liuyanbhv@sohu.com。

收稿日期:2011-01-19, **修回日期:**2011-03-02。

1 材料与方法

1.1 细菌分离鉴定

无菌采取患子宫内膜炎奶牛子宫颈口分泌物,加5%胎牛血清的马丁肉汤37℃增菌培养后接种于血平板,选溶血单菌落进行分离培养、纯化。革兰氏染色阳性球菌,氧化酶阴性的菌株使用API 20strep 鉴定系统(购自法国生物—梅里埃公司)鉴定,选取无乳链球菌和乳房链球菌。

1.2 连翘中药液

连翘 5 g, 500 mL 水, 文火煎煮 2 h, 去渣浓缩至 1000 mg/mL, 储存备用。

1.3 试验仪器

752 紫外可见分光光度计、电炉、恒温培养箱、超净工作台、恒温摇床、电子天平、移液枪等。

1.4 液体培养基分组

取无菌试管 11 个, 编号 2~12, 以 5% 胎牛血清的马丁肉汤做稀释, 各管含连翘水煎液的浓度为 500 mg/mL、250 mg/mL、125 mg/mL、62.5 mg/mL、31.25 mg/mL、15.625 mg/mL、7.812 mg/mL、3.906 mg/mL、

1.953 mg/mL、0 mg/mL、1.953 mg/mL。各管含液体培养基 10 mL。

1.5 细菌生长曲线测定

摇匀上述各管, 并测各自的起始 OD_{600} 数值。将无乳链球菌 37℃ 恒温培养至对数期, 并将其菌液 OD_{600} 调制 0.5, 2~11 号管中分别加入 0.1 mL 上述菌液, 其中 11 号管为阳性对照, 12 号管不加菌液作为阴性对照。将处理后各离心管于 37℃ 恒温摇床培养。以 5% 胎牛血清的马丁肉汤做空白, 每小时测一次各管的 OD_{600} 值并记录, 测前摇匀。使用 excel 制备生长曲线图形。乳房链球菌 OD_{600} 的测定及生长曲线制备同上。

2 结果与分析

2.1 校正前连翘提取物对乳房链球菌和无乳链球菌生长曲线的影响

图 1 和图 2 分别为不同连翘提取物浓度处理后测得的乳房链球菌和无乳链球菌生长曲线。由于连翘各浓度提取物本身对 OD 值会产生影响, 且每支试管中加入的连翘提取物的量各不相同, 所以使得图 1 和图 2 中各条曲线的起点不在同一水平线上, 虽然图 1 和图 2

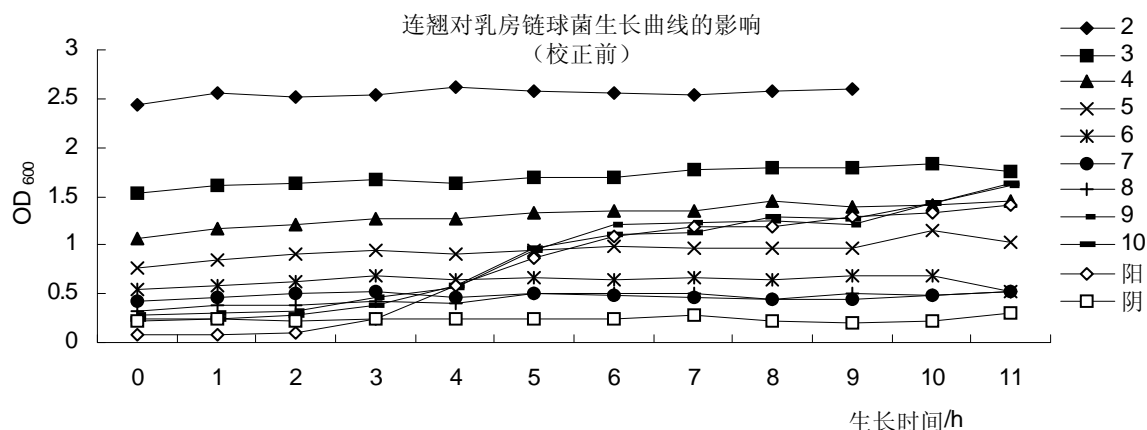


图1 不同提取物浓度下乳房链球菌生长曲线

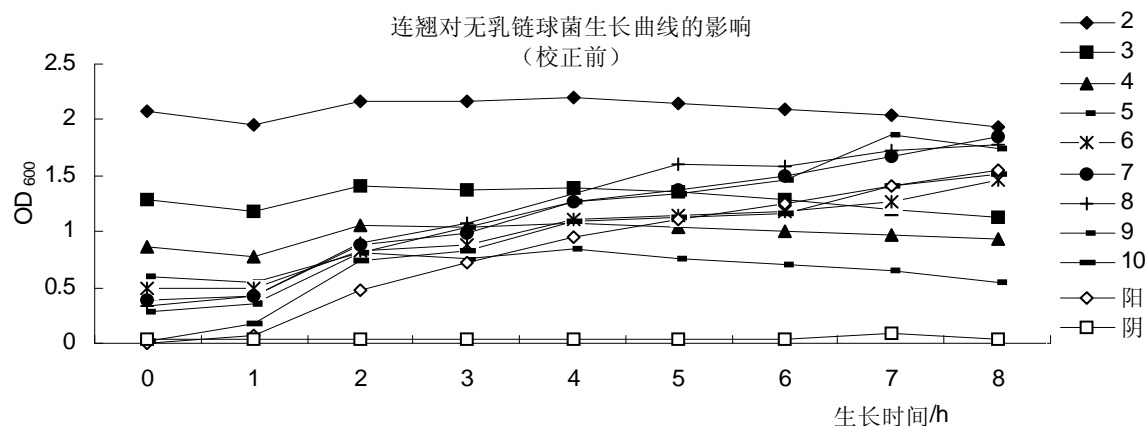


图2 不同提取物浓度下无乳链球菌生长曲线

曲线可以清晰地显示出不同浓度培养液中细菌 OD 值的变化,但难以比较不同提取物浓度组对细菌生长曲线影响的差别。将含连翘提取物的各浓度组的数据均减去连翘提取物本身的 OD 值(加入菌液前所测 OD₆₀₀ 值),即可以近似地反映出不同时间培养液中菌体的实际 OD₆₀₀ 值,进而反应出菌体的实际浓度,由此作出的生长曲线将具有相同的起点。剔除提取物对 OD 值的影响,并使各条曲线处于同一水平线及同一零点上后,将有利于生长曲线的比较和分析。

2.2 校正后连翘提取物对乳房链球菌和无乳链球菌生长曲线的影响

校正处理后分别得出两种细菌的生长曲线校正图,如图3和图4。由图3可发现,编号2~10生长曲线各期均低于阳性组,即试验中连翘各浓度提取物均可不同程度地抑制乳房链球菌的生长,且7.812 mg/mL时即可达到明显抑菌浓度。由图4可发现,编号2~7生长曲线各期均低于阳性组,且6号以前各组显著低于阳性组,即连翘提取物浓度为31.25 mg/mL时即出

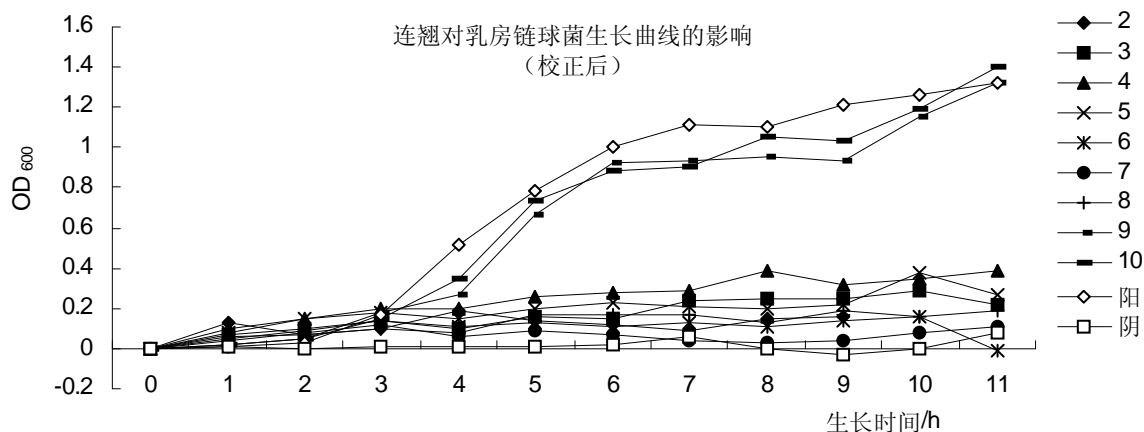


图3 不同提取物浓度下乳房链球菌的校正生长曲线

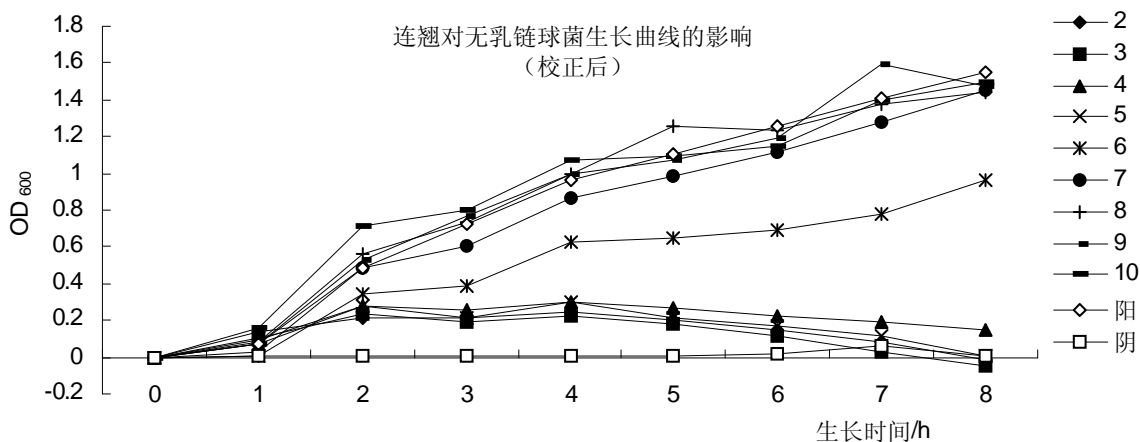


图4 不同提取物浓度下无乳链球菌的校正生长曲线

现显著抑菌效果。说明连翘提取物对乳房链球菌的抑菌效果更为敏感。

3 讨论

以往直接求MIC(最小抑菌浓度)或MBC(最小杀菌浓度)的方法,只能判断药物对细菌有无作用,却无法揭示药物对细菌群体整个生长增殖周期的影响情况。而利用生长曲线的变化揭示药物的抑菌效果,则可通过生长曲线反映微生物的群体生长规律,并从中探知微生物对培养基成分的利用情况、微生物对环境

的适应状况、药物中成分对微生物产生的作用以及药效强弱随时间的变化情况等多种有意义的信息。

阴性对照组 OD 值未升高,证明连翘提取液本身无菌。加入连翘后,2种菌体的生长曲线均呈现出与不加药物组或多或少的差异性,表明细菌生长受到不同程度的抑制。这可能与连翘可破坏细菌细胞壁的肽聚糖层结构有关,包膜屏障通透性改变,从而使细菌生长受到抑制^[10-11]。但提取物浓度和抑菌效果之间并不存在简单的正比关系,且提取物浓度过低时,甚至出现

微弱的促进细菌生长的作用,中草药的某些成分能够作为细菌生长的营养物质^[12-13]。此外,中草药中的某些成分会促使菌体产生钝化酶或菌膜,使细菌出现耐药性^[14-15]。这就提示,研究中草药的抑菌活性时,应该充分考虑到中草药成分和作用的复杂性。

生长曲线法呈现出中草药的抑菌作用机理及过程的复杂性,但同时也给广大研究者对中草药的研究提供了广阔的思路和方向。中草药对细菌生长曲线影响研究方法的引入,必将吸引更多的学者开展这方面的研究和探讨。

参考文献

- [1] 王爽,和翀翼,刘文,等.黑龙江地区奶牛子宫内膜炎病原菌的分离鉴定与药物敏感性试验[J].中国兽药杂志,2008,42(5):33-35.
- [2] 高玉梅,何宝祥,覃广胜,等.奶水牛子宫内膜炎细菌的分离鉴定及药敏试验[J].分析中国奶牛,2010, 6: 38-40.
- [3] Ryuk J A, Choi G Y, Kim Y H, et al. Application of genetic marker and real-time polymerase chain reaction for discrimination between *Forsythia viridissima* and *Forsythia suspensa*[J]. *Biological & pharmaceutical bulletin*,2010;33(7):1133-1137.
- [4] 赵新先.原色中草药图谱[M].广州:世界图书出版,2003:152-292.
- [5] 王洪海,王国卿,郭梦尧,等.中药治疗奶牛子宫内膜炎研究进展[J].中国兽医杂志,2010,46(8):64-65.
- [6] 栾兰,王刚力,林瑞超.连翘水提物化学成分研究[J].中药材,2010,33(2):220-221.
- [7] 郭强,王智民,林丽美,等.连翘属药用植物化学成分研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(5):74-78.
- [8] 冯卫生,李珂珂,郑晓珂.连翘化学成分的研究[J].中国药学杂志,2009,44(7):490-492.
- [9] 胡庭俊,温日清,赵灵颖.连翘不同极性段提取物制备及体外抑菌作用[J].江苏农业科学,2009,3:268-269.
- [10] Chang M J, Hung T M, Min B S, et al. Lignans from the Fruits of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl Protect High-Density Lipoprotein during Oxidative Stress[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*,2008,72(10):2750-2755.
- [11] Wang F N, Ma Z Q, Liu Y, et al. New Phenylethanoid Glycosides from the Fruits of *Forsythia Suspense* (Thunb.) Vahl[J]. *Molecules*, 2009,14(3):1324-1331.
- [12] Ma Y C, Wang X Q, Hou F, et al. Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) analysis and studies on the stability of Shuang-Huang-Lian preparations[J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*,2011,54(2):265-272.
- [13] Cui Y, Wang Q, Shi X, et al. Simultaneous quantification of 14 bioactive constituents in *Forsythia suspensa* by liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry[J]. *Phytochemical Analysis*,2010,21(3):253-260.
- [14] Wong R W, Hägg U, Samaranyake L, et al. Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study. *International journal of oral maxillofacial surgery*[J]. 2010,39(6):599-605.
- [15] Ni L J, Zhang L G, Hou J, et al. A strategy for evaluating antipyretic efficacy of Chinese herbal medicines based on UV spectra fingerprints[J]. *Journal of ethnopharmacology*,2009,124(1):79-86.