

彭练慈, 殷中琼, 贾仁勇, 等. 20 味中药提取物对无乳链球菌的体外抑菌活性研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(4): 22-25.

20 味中药提取物对无乳链球菌的 体外抑菌活性研究

彭练慈¹, 殷中琼¹, 贾仁勇^{1,2}, 李 莉¹, 代如意¹, 曲 径¹, 刘明辉¹, 陈 萍¹
(1 四川农业大学 动物医学院, 四川 雅安 625014; 2 四川农业大学 预防兽医研究所, 四川 雅安 625014)

摘要:【目的】筛选对无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae* 具有良好体外抑菌效果的中药.【方法】通过乙醇回流、超声波方法提取 20 味中药的抗菌活性部位, 采用试管二倍稀释法测定黄连 *Coptis chinensis* 等 20 味中药提取物对无乳链球菌的最低抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 和最低杀菌浓度 (Minimal bactericidal concentration, MBC), 并评价抗菌活性较强的几味中药的体外联合抑菌效果.【结果和结论】乌梅 *Prunus mume*、黄连、黄芩 *Scutellaria baicalensis*、虎杖 *Polygonum cuspidatum* 和地榆 *Sanguisorba officinalis* 5 味中药提取物对无乳链球菌的 MIC 范围为 7.80 ~ 31.25 mg/mL. 蒲公英 *Taraxacum mongolicum*、茵陈 *Artemisia scoparia*、秦皮 *Fraxinus rhynchophylla*、艾叶 *Artemisia argyi*、黄柏 *Phellodendron chinense*、鱼腥草 *Houttuynia cordata*、紫花地丁 *Viola yedoensis* 和白头翁 *Pulsatilla chinensis* 8 味中药提取物的 MIC 范围为 62.50 ~ 125.00 mg/mL. 何首乌 *Po. multiflorum*、苦参 *Sophora flavescens*、穿心莲 *Andrographis paniculata*、杜仲 *Eucommia ulmoides*、连翘 *Forsythia suspensa*、金银花 *Lonicera japonica* 和夏枯草 *Prunella vulgaris* 7 味中药提取物的 MIC 范围为 250.00 ~ 500.00 mg/mL. 联合抑菌试验结果表明, 黄芩、虎杖、地榆和黄连的联合抑菌指数 (FICI) ≤ 1, 虎杖、黄芩和地榆的 FICI > 2. 黄连、黄芩、虎杖和地榆对无乳链球菌均具有很强的体外抗菌活性, 地榆、黄连为相加作用, 黄连、黄芩和虎杖为协同作用, 地榆与黄芩、虎杖为拮抗作用.

关键词: 无乳链球菌; 中药提取物; 抗菌活性
中图分类号: S825.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2014)04-0022-04

Effects of twenty traditional Chinese medicine extracts against *Streptococcus agalactiae* in vitro

PENG Lianci¹, YIN Zhongqiong¹, JIA Renyong^{1,2}, LI Li¹,
DAI Ruyi¹, QU Jing¹, LIU Minghui¹, CHEN Ping¹
(1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;
2 Preventive Veterinary Research Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract:【Objective】Screening for the traditional Chinese medicines which have good antibacterial effects on *Streptococcus agalactiae* in vitro. 【Method】Using ethanol reflux and ultrasonic method, extracts of 20 different traditional Chinese medicines were obtained. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of *Coptis chinensis* and other 19 extracts of traditional Chinese medicines on *St. agalactiae* were detected by macrodilution broth method, and combined antibacterial effects in vitro of them were also observed. 【Result and conclusion】The MICs of the extracts obtained from *Prunus mume*, *Coptis chinensis*, *Scutellaria baicalensis*, *Polygonum cuspidatum* and *Sanguisorba officinalis* against *St. agalactiae* ranged from 7.80 to 31.25 mg/mL. The MICs of the extracts obtained from *Taraxacum mongolicum*, *Artemisia scoparia*, *Fraxinus rhynchophylla*, *Artemisia arg-*

yi, *Phellodendron chinense*, *Houttuynia cordata*, *Violae yedoensis* and *Pulsatilla chinensis* ranged from 62.50 to 125.00 mg/mL. The MICs of the extracts obtained from *Po. multiflorum*, *Sophora flavescens*, *Andrographis paniculata*, *Eucommia ulmoides*, *Forsythia suspensa*, *Lonicera japonica* and *Prunella vulgaris* ranged from 250.00 to 500.00 mg/mL. The results of joint bacteriostatic test showed that the fractional inhibitory concentration index (FICI) of the extracts obtained from *Sc. baicalensis*, *Po. cuspidatum*, *Sa. officinalis* and *C. chinensis* was less than or equal to 1. The FICI of *Po. cuspidatum*, *Sc. baicalensis* and *Sa. officinalis* was more than 2. *C. chinensis*, *Sc. baicalensis*, *Po. cuspidatum* and *Sa. officinalis* showed a good antibacterial effect against *St. agalactiae* *in vitro*. The combination of *Sa. officinalis* and *C. chinensis* was characterized by a additive effect, whereas the combination of *C. chinensis*, *Sc. baicalensis* and *Po. cuspidatum* was characterized by a synergism effect. The combination of *Sa. officinalis* and *Sc. baicalensis*, *Po. cuspidatum* showed antagonism effect.

Key words: *Streptococcus agalactiae*; traditional Chinese medicine extract; antimicrobial activity

无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae* 又称 B 群链球菌 (GBS), 可引起奶牛乳房炎, 我国因无乳链球菌引起的奶牛乳房炎占总发病率的 20% ~ 40%。目前, 对于奶牛乳房炎的治疗主要依赖抗生素, 由于反复大量使用, 造成乳汁中抗生素残留日益严重, 耐药菌株不断出现, 使乳房炎的治疗效果不断下降^[1-2]。

中草药具有调节畜禽机体免疫力、杀灭或抑制细菌和病毒等作用, 并因其低毒、低残留、不易产生耐药性等特点越来越受到人们的重视^[3], 从传统中草药中筛选出有效的抗无乳链球菌药物符合食品安全和公共卫生需要。本研究选取黄连 *Coptis chinensis* 等 20 味中药作为研究对象, 以水和乙醇对其有效成分进行提取。通过测定黄连等 20 味中药提取物对无乳链球菌的最低抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 和最低杀菌浓度 (Minimal bactericidal concentration, MBC), 筛选得到具有良好体外抗菌活性的中药提取物, 然后通过棋盘稀释法^[4-5] 研究不同中药提取物两两联合对无乳链球菌的体外抑制效果, 为进一步研制治疗奶牛乳房炎的中药组方制剂提供參考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 无乳链球菌编号为 CVCC1886, 购自中国兽药监察所。

1.1.2 药材 黄连 (产地四川, 批次: 080406)、黄芩 *Scutellaria baicalensis* (产地陕西, 批次: 040824)、乌梅 *Prunus mume* (产地四川, 批次: 120315)、虎杖 *Polygonum cuspidatum* (产地四川, 批次: 081102)、地榆 *Sanguisorba officinalis* (产地陕西, 批次: 040827)、蒲公英 *Taraxacum mongolicum* (产地贵州, 批次: 100217)、苦参 *Sophora flavescens* (产地云南, 批次: 081121)、何首

乌 *Po. multiflorum* (产地甘肃, 批次: 080301)、茵陈 *Artemisia scoparia* (产地河北, 批次: 080923)、秦皮 *Fraxinus rhynchophylla* (产地山西, 批次: 100330)、金银花 *Lonicera japonica* (产地四川, 批次: 080919)、穿心莲 *Andrographis paniculata* (产地四川, 批次: 100310)、黄柏 *Phellodendron chinense* (产地四川, 批次: 080923)、艾叶 *Ar. argyi* (产地甘肃, 批次: 080921)、鱼腥草 *Houttuynia cordata* (产地四川, 批次: 100310)、杜仲 *Eucommia ulmoides* (产地云南, 批次: 080916)、连翘 *Forsythia suspensa* (产地四川, 批次: 100310)、白头翁 *Pulsatilla chinensis* (产地四川, 批次: 100310)、夏枯草 *Prunella vulgaris* (产地河南, 批次: 101114)、紫花地丁 *Violae yedoensis* (产地四川, 批次: 100310) 20 味中药均购于四川雅安惠民堂药业连锁有限责任公司, 由四川农业大学药理学系副教授范巧佳鉴定为正品。

1.1.3 培养基 加有 5% 小牛血清的营养肉汤, 鲜血营养琼脂培养基按照常规方法制作, 用于无乳链球菌的培养。

1.1.4 仪器设备和试剂 电热恒温培养箱、超净工作台、旋转蒸发仪、索氏提取器、微量进样器、二甲亚砷、无水乙醇、T 型涂布棒、90 mm 玻璃培养皿。

1.2 方法

1.2.1 有效成分的提取 按照文献[6-16]的方法提取黄连等 20 味中药的有效成分, 乌梅、黄连、黄芩、虎杖、蒲公英、茵陈、秦皮、黄柏、鱼腥草、紫花地丁、白头翁、何首乌、苦参、穿心莲、杜仲、连翘、金银花和夏枯草采用乙醇回流提取法, 地榆和艾叶采用超声波提取法。各自合并滤液, 浓缩制成浸膏, 并计算浸膏得率。使用前将浸膏用适量二甲亚砷溶解, 制成生药质量浓度为 1 g/mL 的药液, 100 °C 流通蒸汽灭菌 30 min, 置于 4 °C 冰箱备用。

1.2.2 细菌菌悬液的制备 挑取新鲜培养无乳链球菌的 2 个菌落接种于 3 mL 的肉汤培养基中,置于 37 ℃ 恒温摇床中培养 18 ~ 24 h 后取出. 吸取菌液 0.5 mL,用生理盐水作 10^{-1} 梯度稀释,取 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 3 个梯度的菌液 0.1 mL 分别在 6 个鲜血琼脂培养基上均匀摊开,放入 37 ℃ 恒温培养箱中培养 18 ~ 24 h. 计算出原液的细菌个数为 1.6×10^{11} CFU/mL.

临用前将菌原液用肉汤培养基稀释成菌液浓度为 1.6×10^9 CFU/mL.

1.2.3 体外抑菌试验 测定 MIC:采用试管 2 倍稀释法,取 18 支灭菌试管,将其中 16 支分为试验组和阴性对照组,每组 8 支. 18 支试管分别加营养肉汤 1 mL. 在 2 组的第 1 管中分别加 1 mL 药液,混匀后吸取 1 mL 至第 2 管中,依次类推,直至第 8 管,第 8 管吸取 1 mL 弃去. 然后,向试验组的 8 支试管中加 0.1 mL 的稀释菌液,阴性对照组 8 支试管不加菌液,加 0.1 mL 生理盐水. 第 17 管不加药液加 0.1 mL 菌液作为阳性对照,第 18 管不加药液和菌液作为空白对照. 则试验组和阴性对照组的第 1 管至第 8 管的药液浓度依次为 500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.60、7.80、3.90 mg/mL. 置于 37 ℃ 恒温摇床中培养 18 ~ 24 h. 以无菌生长的最低稀释度为 MIC.

测定 MBC:观察药物 MIC 以上未见细菌生长的各管培养物,分别各取 0.1 mL 移种至不含药物的鲜血营养琼脂平皿上,轻轻推开药液,置 37 ℃ 培养过夜,观察有无细菌生长. 平皿培养基中,计数少于 5 个菌落者作为该药的 MBC^[17].

1.2.4 体外联合抑菌试验 根据单味中药的体外抑菌结果,选择其中抑菌活性较强的中药分别以其中 2 种药的 4MIC,2MIC,MIC,1/2MIC,1/4MIC 分别进行联合. 以黄连与黄芩为例:用灭菌后的 2 mL EP 管 50 个,分为试验组和对照组. 在第 1 ~ 6 行沿 X 轴(从左到右)每管中依次加入用肉汤稀释好的 4MIC、2MIC、MIC、1/2MIC、1/4MIC 的黄连药液各 0.2 mL. 以同样的方法在第 1 ~ 6 列沿 Y 轴方向(从上到下)每管中依次加入用肉汤稀释好的 1/4MIC、1/2MIC、MIC、2MIC、4MIC 的黄芩药液各 0.2 mL,将两药混合均匀后加入制备好的菌液 40 μ L,对照组加入等量的营养肉汤,其他操作同试验组. 37 ℃ 培养 18 ~ 24 h,观察结果.

结果判断依据:联合抑菌指数(Fraction inhibitory concentration index,FICI) = 甲药联合时的 MIC/甲药单独时的 MIC + 乙药联合时的 MIC/乙药单独时的 MIC. FICI $\leq$ 0.5 时为协同作用,0.5 < FICI $\leq$ 1 时为相

加作用,1 < FICI $\leq$ 2 时为无关作用,FICI > 2 时为拮抗作用.

2 结果与分析

2.1 20 味中药提取物对无乳链球菌的体外抑菌活性

20 味中药提取物对无乳链球菌的体外抑菌结果见表 1. 由表 1 可知,黄连、黄芩、乌梅、虎杖和地榆 5 味中药提取物的 MIC 的范围为 7.80 ~ 31.25 mg/mL, MBC $\leq$ 31.25 mg/mL 抑菌效果最好. 蒲公英、茵陈、秦皮、艾叶和紫花地丁 5 味中药提取物的 MIC 均为 62.50 mg/mL,抑菌效果较好. 黄柏等 10 味中药提取物的 MIC 均大于或等于 125.00 mg/mL,抑菌效果较差.

表 1 20 种中药提取物对无乳链球菌的体外抑菌活性
Tab. 1 Antimicrobial activities of active ingredients extracts of twenty tradition Chinese medicines to *Streptococcus agalactiae* in vitro

中药提取物	MIC	MBC
黄连	31.25	31.25
黄芩	7.80	7.80
乌梅	31.25	31.25
虎杖	15.60	15.60
地榆	15.60	15.60
蒲公英	62.50	62.50
苦参	250.00	250.00
何首乌	250.00	250.00
茵陈	62.50	62.50
秦皮	62.50	125.00
金银花	500.00	500.00
穿心莲	500.00	500.00
黄柏	125.00	125.00
艾叶	62.50	125.00
鱼腥草	125.00	125.00
杜仲	500.00	500.00
连翘	250.00	250.00
白头翁	125.00	125.00
夏枯草	500.00	500.00
紫花地丁	62.50	125.00

2.2 黄连等 4 味中药提取物对无乳链球菌的体外联合抑菌活性

通过单味药的体外抑菌结果,选择黄连、黄芩、虎杖和地榆进行体外联合抑菌试验,联合抑菌结果见表 2. 根据 FICI 值的判定依据,黄芩提取物与虎杖提取物、黄芩提取物与黄连提取物及黄连提取物与虎杖提取物对无乳链球菌的 FICI $\leq$ 0.50,为协同作用. 地榆提取物与虎杖提取物及地榆提取物与黄芩提取物对无乳链球菌的 FICI > 2,为拮抗作用. 地榆提取物与黄连提取物对无乳链球菌的 FICI = 1,为相加作用(表 2).

表2 4味中药两两联合用药对无乳链球菌的FICI¹⁾

Tab.2 The FICI to pairwise combination of four herbs against *Streptococcus agalactiae*

联合药物	黄芩		虎杖		黄连		地榆		FICI	作用效应
	MIC _A	MIC _C	MIC _A	MIC _C	MIC _A	MIC _C	MIC _A	MIC _C		
黄芩+虎杖	7.80	0.96	15.60	1.95					0.25	协同
黄芩+黄连	7.80	1.95			31.25	7.80			0.50	协同
黄芩+地榆	7.80	15.60					15.60	31.25	4.00	拮抗
虎杖+黄连			15.60	1.95	31.25	3.90			0.50	协同
虎杖+地榆			15.60	15.60			15.60	31.25	3.00	拮抗
黄连+地榆					31.25	15.60	15.60	7.80	1.00	相加

1) MIC_A、MIC_C 分别为单药、联合用药的 MIC,单位均为 mg · mL⁻¹.

3 讨论

中药成分复杂,提取其中的有效成分对于提高其药效具有重要作用. 中药提取方法众多,其中乙醇回流法、超声波提取法因操作简单方便,适合试验操作而被广泛使用.

本研究根据20味中药的不同有效成分,分别采用乙醇回流法和超声波提取法对20味中药的有效成分进行提取^[6-16],沿用文献报道筛选的最佳工艺条件,使有效成分得到了极大的提取,从而保证了药效.

20味中药提取物的体外抑菌活性试验结果表明,虎杖、黄连和黄芩的 MIC 分别为 15.60、31.25、7.80 mg/mL,其 MBC≤31.25 mg/mL 说明黄连、黄芩和虎杖具有很强的抑菌作用. 该结果与王庆玲等^[17]和金建玲等^[18]报道结果一致. 抑菌活性好的地榆及抑菌活性较好的紫花地丁和蒲公英比金建玲等^[18]报道的抑菌效果更优. 本研究选取文献报道中筛选出的最佳提取工艺条件对黄连^[6]、黄芩^[7]、虎杖^[8]等20味中药的有效成分进行提取,使提取物中的有效成分尽可能地多,从而达到了较好的抑菌效果. 陈微等^[19]报道夏枯草和黄柏对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌有很好的抑菌活性,但在本研究中对无乳链球菌的抑菌效果并不好,可能因为不同的提取方法以及中药提取物的 pH 不同,对不同的细菌产生不同的抑菌效果,且提取物中不溶成分偏多,对中草药抗菌活性成分有一定的影响,使得抑菌效果不那么理想.

联合抑菌试验显示,黄连和黄芩、虎杖联合都产生协同作用,具有良好的抗菌作用. 地榆和黄芩、虎杖联合都产生拮抗作用. 地榆的有效成分是鞣质,具有大分子多元酚类结构,容易发生缩合反应或沉淀反应而失去相应的抗菌活性,与黄芩、虎杖联合后,3种有效成分发生化学反应,可能使药物的有效结构发生改变,导致联合后产生拮抗作用.

本研究表明,黄连、黄芩和虎杖联合产生协同作用,增强了抑菌效果,可以组成一个复方. 本研究为抗无乳链球菌的中药组方提供参考.

参考文献:

[1] 倪春霞,蒲万霞,胡永浩,等. 奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 西北农业学报,2010,19(2): 20-24.

[2] 杨锐,李英伦,李金良,等. 四川雅安临床型奶牛乳房炎病原菌分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2009,45(4):41-42.

[3] 闫丽霞. 中药制剂技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2004.

[4] MARCHETTI O, MOREILLON P, GLAUSER M, et al. Potent synergism of combination of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*[J]. Anti-microb Agents Chemother, 2000,44(9):2373-2381.

[5] MUKHERJEE P K, SHEEHAN D J, HITCHCOOK C A , et al. Combination treatment of invasive fungal infections [J]. Clin Microbiol Rev , 2005,18(1):163-194.

[6] 王志华,陈碧. 黄连提取方法的试验研究[J]. 实用药物与临床,2008,11(3):191-192.

[7] 石俊英,张小伟,张会敏. 正交试验法优选黄芩苷提取纯化工艺[J]. 山东中医药大学学报,2008,32(5):413-415.

[8] 刘丹,汤海峰,张三奇,等. 虎杖中有效成分提取方法的研究[J]. 中成药,2007,29(4):516-521.

[9] 刘梦茵,刘芳,周涛,等. 乌梅乙醇提取物抑菌作用及其抑菌成分分析[J]. 食品科学,2011,32(17):190-192.

[10] 唐志国. 优选地榆鞣质的超声波提取工艺[J]. 中国民康医学,2011,23(6):764-765.

[11] 于玲,刘影,阎婷,等. 秦皮中秦皮乙素的提取纯化工艺研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(22):11236-11237.

[12] 范家佑,张松竹. 黄柏中总生物碱的提取工艺优化[J]. 井冈山学院学报,2010,31(5):112-117.

[13] 冯丽娟,孙智勇,陈芳,等. 三种方法提取的艾叶有效成分的抑菌作用比较[J]. 食品工程,2011,56(4):35-37.

[14] 黄亮,王金龙,李方,等. 鱼腥草叶乙醇提取液的抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(2):719-722.

[15] 宋科标,时维静,周杰,等. 白头翁提取方法比较[J]. 中兽医医药杂志,2011,13(4):19-21.

[16] 陈胡兰,汤沛然,陈兴,等. 紫花地丁抗炎及体外抑菌作用活性部位的筛选研究[J]. 成都中医药大学学报, 2008,31(2):52-53.

[17] 王庆玲,李保院,邱世翠,等. 虎杖的体外抑菌作用研究 [J]. 时珍国医国药,2006,17(5):762-763.

[18] 金建玲,王剑,高培基. 30余种常见中药对肺炎链球菌的体外抑菌活性实验研究[J]. 内蒙古中医药,2009,28(3):56-58.

[19] 陈微,曾艳,贺月林,等. 20种中草药体外抑菌活性研究 [J]. 中兽医医药杂志,2010,12(3):34-36.