

蔡丙严,田其真,戴建华,等. 13 种中药体外抑制猪传染性胸膜肺炎放线杆菌试验[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):174-176.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.044

# 13 种中药体外抑制猪传染性胸膜肺炎放线杆菌试验

蔡丙严, 田其真, 戴建华, 刘 莉, 郝福星, 李 雅

(江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

**摘要:**研究 13 种具有清热解毒功效的中药对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的体外抑菌效果,采用煎煮法制备药液,对部分临床分离的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌致病菌株进行单味及部分复方药的体外抑菌试验,测量各药液对胸膜肺炎放线杆菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, 简称 MIC)及最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, 简称 MBC)。结果表明,单味中药水煎液具有显著体外抑菌活性的为五倍子,其抑菌圈直径为 15 mm, MIC 为 7.80 mg/mL, MBC 为 15.60 mg/mL;五倍子与野拔子复方药液的抑菌效果优于五倍子单味药,其抑菌圈直径为 18 mm, MIC 为 3.90 mg/mL, MBC 为 7.80 mg/mL。试验结果为进一步研发以五倍子与野拔子为主要成分的抑制猪传染性胸膜肺炎放线杆菌复方中药制剂奠定基础。

**关键词:**中药;体外抑制;猪胸膜肺炎放线杆菌;五倍子;野拔子

**中图分类号:**S852.61;S853.74

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2018)21-0174-03

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌极易感染 2~4 月龄的猪,临床上称为猪传染性胸膜肺炎,其临床症状主要表现为出血性纤维素性胸膜肺炎,可造成猪的突然死亡,给规模化猪场造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。该病现已在世界上许多国家和地区普遍存在<sup>[2]</sup>,近年来我国中小规模的养猪场,尤其是商品猪育肥的中后期多发<sup>[3]</sup>,同时,猪传染性胸膜肺炎放线杆菌对现有抗生素极易产生耐药性<sup>[4]</sup>,而现有疫苗多为针对某种血清型的单价或多价苗,不能满足对所有血清型的免疫<sup>[5]</sup>。伴随市场对绿色无公害猪肉产品的需求,寻求开发具有显著治疗效果的药物具有重要的临床意义。我国中药资源丰富,中医药文化博大精深,而中兽药制剂对猪病的防控已成为当今兽医临床上研究的热点<sup>[6]</sup>。现代中药药理研究结果表明,部分清热解毒功效的中药具有抑制多种病原微生物的作用<sup>[7]</sup>。

为了筛选临床上具有显著抑制猪传染性胸膜肺炎放线杆菌活性的中药并进行组方,笔者所在项目组收集了 13 种具有清热解毒功效的中药,采用水提法制备中药药液,对临床上分离得到的有致病性的猪传染性胸膜肺炎杆菌进行体外药敏试验,筛选出有显著抑菌活性的五倍子、野拔子、大黄连等 3 种单味中药和五倍子与野拔子的 1 个中药复方,以期为后期研制抑制猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的复方中药制剂、探索中药防治猪传染性胸膜肺炎奠定试验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以江苏省某猪场提供的病猪肺脏作为病样,经江苏农牧科技职业学院猪病检测中心分离鉴定为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌致病菌株, -70℃ 冰箱保存备用。

翻白草、野拔子、虎杖、透骨草、癞蛤蟆草、小黄连等 13 种中药,采自海拔约 1 700 m 处的云南禄劝彝族苗族自治县,为当地野生药材,经当地药检部门鉴定为地道中药材。

胰蛋白胨大豆琼脂(tryptic soy agar, 简称 TSA)培养基、

收稿日期:2017-07-17

基金项目:江苏省农业三新工程项目(编号: SXGC[2017]251)。

作者简介:蔡丙严(1980—),男,河南濮阳人,硕士,讲师,主要从事猪病防治研究。E-mail: caibingyan20@qq.com。

[3] 黄 贺,狄生伟,田亚光,等. 民猪 *PRLR* 基因 PCR-SSCP 多态性与产仔数关联分析[J]. 中国农业科学,2011,44(11):2341-2346.

[4] 刘 远,李良良,莫小雨,等. *PRLR*、*RBP4* 基因多态性分布及其对大白猪产仔数的影响[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(7):120-123.

[5] 张陈华,丁月云,王 阳,等. 圩猪和定远猪 *PRLR* 基因多态性与产仔数的关联分析[J]. 中国农业大学学报,2011,16(3):117-121.

[6] Tomas A, Casellas J, Ramirez O, et al. High amino acid variation in the intracellular domain of the pig prolactin receptor (*PRLR*) and its relation to ovulation rate and piglet survival traits[J]. Journal of Animal Science, 2006, 84(8):1991-1998.

[7] Chu M X, Wang X C, Jin M, et al. DNA polymorphism of 5' flanking region of prolactin gene and its association with litter size in sheep

[J]. Journal of Animal Breeding and Genetics, 2009, 126(1):63-68.

[8] 张 珂. 山羊 *PRLR* 基因多态性及其与产羔数相关性分析[D]. 雅安:四川农业大学,2009.

[9] 洪坤月. 鸡 *PRL*、*PRLR*、*FSHβ* 和 *ESRα* 基因多态性及其与早期产蛋性能关系的研究[D]. 南京:南京农业大学,2007.

[10] 王 健,张宜辉,张 蕊,等. 反季节调控对鹅 *PRL* 和 *PRLR* 基因表达的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2014,35(4):23-26.

[11] 高 天,鄞忠斌,王晓杜,等. 嘉兴黑猪 *ESR2* 和 *FSHβ* 及 *PRLR* 基因多态性与繁殖性状相关性分析[J]. 中国畜牧杂志,2016,52(5):9-15.

[12] 孙延晓,曾勇庆,唐 辉,等. 猪 *PRLR* 和 *RBP4* 基因多态性与产仔性能的关系[J]. 遗传,2009,31(1):63-68.

胰蛋白胨大豆肉汤 (tryptic soy broth, 简称 TSB) 培养基, 均购自碧迪医疗器械 (上海) 有限公司; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, 简称 NAD), 购自 Roche 公司; 无支原体犍牛血清购于江苏晶美生物科技有限公司。

电子天平 (Sartorius)、气浴恒温振荡培养箱 (JY92 - IID)、超净工作台 (AH - 100)、CO<sub>2</sub> 培养箱 (HF151) 均购自南京瑶恩仪器设备仪器有限公司; 电子万用炉, 购自西安广大电炉有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 中药水煎液制备 分别称取 25 g 五倍子、小黄连、大黄连、野拔子、金银花、马鞭梢、透骨草、苎麻、虎杖、翻白草、清于胆草、冬凌草、癞蛤蟆草等 13 种中药, 置于 100 mL 蒸馏水中浸泡 1 h, 在万用炉上用大火加热至煮沸, 改为文火煮 30 min, 文火时要保持微沸状态, 收集第 1 次的煎液, 继续加 100 mL 水, 同法煎制, 30 min 后收集, 将 2 份煎液混匀, 滤纸过滤, 加热浓缩至浓度为 1 g/mL, 用 2% ~ 4% NaOH 溶液调节药液的 pH 值为 7.2 ~ 7.4, 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min, 4 ℃ 保存备用。

1.2.2 TSA 培养基平板与 TSB 菌液制备 参照文献[8], 制备 TSA 培养基平板及 TSB 液体培养基, 均加入 0.02% NAD 和 5% 犍牛血清, 置于 4 ℃ 冰箱备用。取 0.1 mL 已分离鉴定保存的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌, 接种于 TSB 液体培养基, 在 37 ℃ 气浴恒温振荡培养箱中 150 r/min 培养 8 h, 最后将细菌浓度稀释至 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>7</sup> CFU/mL, 即用。

1.2.3 单味药及部分复方中药药敏试验 用新华定性滤纸打孔制成直径为 6 mm 的药敏纸片, 分装于药敏瓶, 每瓶 50 片, 121 ℃ 高压灭菌 15 min, 烘干后加入 1 mL 制备好的单味药液, 中药浓度为 20 μg/片, 浸泡 2 h 后烘箱烘干, 放入 -20 ℃ 冰箱保存备用。将培养好的菌液取 0.1 mL 用涂布棒均匀涂布在 TSA 固体培养基上, 待其干燥, 将药敏纸片贴在平皿上, 放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 37 ℃ 恒温培养 36 ~ 48 h, 观察结果, 测量含药纸片抑菌圈直径。根据抑菌圈直径大小, 选取敏感度较高的单味药液制成复方, 各取 0.5 mL 混匀加入纸片瓶中, 其他步骤同单味药, 观察结果。

1.2.4 最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, 简称 MIC) 测定 选择对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌有中度敏感以上的单味中药及复方, 采用二倍稀释法<sup>[9]</sup>测定 MIC。在无菌条件下, 取 10 支高压灭菌过的试管, 1 ~ 9 支为试验组, 第 10 支为对照组。分组编号后向 1 ~ 10 管中各加 1 mL TSB 液体培养基, 吸取 1 mL 药液加入第 1 管, 混匀后吸取 1 mL 加入第 2 管, 依次至第 9 管, 混匀后弃去 1 mL, 此时试管内药液质量浓度分别为 500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.60、7.80、3.90、1.95 mg/mL, 第 10 管不加药物。用微量移液器取 0.1 mL 菌液加入 1 ~ 10 管中, 充分摇匀, 37 ℃ 恒温振荡培养 18 ~ 24 h 后, 分别观察细菌的生长状况并作好记录。若试验管中溶液浑浊, 则表示细菌生长状况良好, 该浓度药液没有抑菌作用; 如果试验管中没有浑浊, 则说明猪胸膜肺炎放线杆菌的生长受到了抑制, 此时的药液稀释浓度即为该药物的最小抑菌浓度。

1.2.5 最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, 简称 MBC) 依据 MIC 测定的结果, 继续培养试验管至 48 h, 在

试验组中取出没有生长细菌的试管, 用微量移液器吸取 0.1 mL 用涂布棒涂布于 TSA 培养基平板上, 于 37 ℃ 培养 24 ~ 36 h, 观察结果, 以细菌菌落个数不超过 5 个的管内药物浓度为该药的最小杀菌浓度。

2 结果与分析

2.1 单味药及部分复方中药药敏试验结果

13 种单味中药及 2 种复方中药体外抑制猪传染性胸膜肺炎的药敏试验结果见表 1。

由表 1 可知, 五倍子、野拔子、大黄连等 3 种单味中药对猪胸膜肺炎放线杆菌有明显的抑制作用, 尤其是对五倍子表现为高度敏感。对金银花、透骨草、清鱼胆草、翻白草、苎麻根、虎杖、冬凌草、癞蛤蟆草等表现为低度敏感, 对小黄连、马鞭梢则不敏感。五倍子与野拔子、五倍子与大黄连 2 种复方中药对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抑制作用优于单味五倍子、大黄连, 中药复方后 2 种药物有协同作用, 药效有所增强。

表 1 单味药及部分复方中药药敏试验结果

中药名称	抑菌圈直径 (mm)	敏感度
五倍子	15	高度
大黄连	11	中敏
野拔子	13	中敏
金银花	8	低敏
透骨草	8	低敏
苎麻根	6	低敏
虎杖	6	低敏
翻白草	7	低敏
清鱼胆草	8	低敏
冬凌草	6	低敏
癞蛤蟆草	6	低敏
小黄连	0	不敏感
马鞭梢	0	不敏感
五倍子 + 野拔子	18	高敏
五倍子 + 大黄连	16	高敏

注: 猪胸膜肺炎放线杆菌药敏试验的抑菌圈直径标准: > 20 mm 为极度敏感; 15 ~ 20 mm 为高度敏感; 10 ~ 14 mm 为中度敏感; < 10 mm 为低度敏感; 无抑菌圈的为不敏感<sup>[10]</sup>。

2.2 最小抑菌浓度与最小杀菌浓度测定结果

由表 2 可知, 五倍子与野拔子中药复方的 MIC 与 MBC 分别为 3.90、7.80 mg/mL, 对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌有明显的体外抑制作用, 属高度敏感药物。五倍子单味中药、五倍子与大黄连中药复方两者之间的 MIC 与 MBC 结果相同, 分别为 7.80、15.60 mg/mL, 同属高度敏感药物。单味中药野拔子、大黄连两者之间的 MIC 与 MBC 相同, 分别为 31.25、62.50 mg/mL, 属于中度敏感药物。上述药物 MIC 与 MBC 测定结果与抑菌圈直径测量结果基本一致。

3 讨论与结论

本研究所选五倍子、野拔子、大黄连等均为清热解毒类中药, 具有较显著的体外抗菌活性。其中, 五倍子有清肺、解毒的功效, 可治肺虚咳嗽、下痢、腹泄, 对变形杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌、肺炎球菌均有抑制作用<sup>[12]</sup>。野拔子是云南地区的一种药食同源植物, 具有疏风解表、利湿、消食化积的功效, 研究

表 2 单味中药及复方 MIC 与 MBC 测定结果

中药	药物不同质量浓度下的细菌生长情况									MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
	500.00 mg/mL	250.00 mg/mL	125.00 mg/mL	62.50 mg/mL	31.25 mg/mL	15.60 mg/mL	7.80 mg/mL	3.90 mg/mL	1.95 mg/mL		
五倍子	-	-	-	-	-	-	+	+	+	7.80	15.60
野拔子	-	-	-	-	+	+	+	+	+	31.25	62.50
大黄连	-	-	-	-	+	+	+	+	+	31.25	62.50
五倍子 + 野拔子	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3.90	7.80
五倍子 + 大黄连	-	-	-	-	-	-	+	+	+	7.80	15.60

注：“-”表示细菌未生长；“+”表示细菌生长。判定标准：MIC≤7.80 mg/mL 为高度敏感；7.80 mg/mL < MIC < 250.00 mg/mL 为中度敏感；MIC≥250.00 mg/mL 为不敏感<sup>[11]</sup>。

表明其粗提液对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌有较好的抑制效果<sup>[13]</sup>。大黄连为毛茛科植物黄连、三角叶黄连或云连的干燥根茎,具有清热燥湿、泻火解毒的功效,现代药理研究表明,其对多种细菌、真菌以及病毒均有较好的拮抗作用<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,五倍子、野拔子、大黄连等 3 种单味中药对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌具有明显的体外抑菌活性,尤其是五倍子,为高度敏感药物,抑菌圈直径为 15 mm。以五倍子为主药分别配伍野拔子、大黄连组成的复方中药,其对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的抑菌活性比单味中药有所增强,两者配伍有协同抑菌作用。

本研究所选的 13 种中药对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的体外抑制作用,与康帅报道的 20 种中药对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的抑菌活性中,黄连、虎杖等为中度敏感药物的结论<sup>[15]</sup>较为一致。刘仁志等报道,大蒜挥发油及其复方对猪胸膜肺炎放线杆菌的最低抑菌浓度为 3.90 mg/mL,最低杀菌浓度为 7.80 mg/mL<sup>[16]</sup>,本次试验中五倍子与野拔子复方的 MIC、MBC 与之相一致。中药体外抑菌活性试验结果受众多因素如试验手段、条件、中药批次、提取方式不同的影响,因此在进行相关试验时要采取科学的试验方法、统一的测定标准,以提高结果的准确性。

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌感染已成为养猪业的一大威胁,在一定程度上阻碍了育肥猪的健康养殖。目前临床上主要治疗方法是注射头孢噻唑、氟苯尼考等广谱抗生素,由于不按疗程、盲目加大剂量等不规范用药,使该菌产生了一定的耐药性,治疗效果已不明显,且过多抗生素在猪体内蓄积,亦严重危害人类健康。众多研究结果表明,中药在防治猪胸膜肺炎放线杆菌上具有较好的疗效,并且已经取得一定的成果。本研究所筛选的中药五倍子与野拔子复方,体外具有显著的抑杀猪传染性胸膜肺炎放线杆菌活性,为后续临床疗效奠定了基础。研发以五倍子与野拔子为主药的中药制剂,对临床防治猪传染性胸膜肺炎放线杆菌具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Rita S, Búza L, Laszlo M, et al. Experiences of respiratory disease caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 16 in a Hungarian swine herd[J]. Magyar Allatorvosok Lapja, 2016, 138(12): 713–720.

[2] Kamimura S, Sameshima T, Ito H. Serovar and antimicrobial resistance profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Japan from 2006 to 2011[J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 2016, 50(1): 73–77.

[3] 郭 坤,高晓娜,罗军荣,等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(2): 59–62.

[4] Zutic J, Pavlovic L, Radanovic O, et al. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig's clinical samples in Serbia [J]. Medycyna Weterinarna, 2016, 72(10): 637–640.

[5] Zhang F, Cao S J, Zhu Z, et al. Immunoprotective efficacy of six in vivo – induced antigens against *Actinobacillus pleuropneumoniae* as potential vaccine candidates in murine model [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(6): 728–732.

[6] 万遂如. 中兽药制剂在猪病防控中的科学应用[J]. 现代畜牧兽医, 2014(1): 27–33.

[7] 马钦海,邢学锋,罗佳波. 清热解毒类中药抗呼吸道病毒研究进展[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(5): 658–661.

[8] Ito H, Matsumoto A. Isolation and genetic characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar K12: O3 strain[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2015, 27(1): 102–106.

[9] Wang L, Guo Z T, Yang F, et al. Bacteriostatic test in vitro of traditional Chinese medicine *Radix dichroa* powder on common pathogens[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(2): 594–600.

[10] Kong L C, Gao D, Jia B Y, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of macrolide resistance of *Mycoplasma bovis* isolates from multiple provinces in China [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2016, 78(2): 293–296.

[11] Hyun T K, Kim H C, Kim J S. In vitro screening for antioxidant, antimicrobial, and antidiabetic properties of some Korean native plants on Mt. Halla, Jeju Island [J]. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 77(6): 668–674.

[12] 徐小娟,刘英志,陈碧莲,等. 氟化物联合五倍子水提取物对变形链球菌影响的体外研究[J]. 中国医学创新, 2015, 12(5): 110–112.

[13] Liu A L, Liu B, Qin H L, et al. Anti – influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* [J]. Planta Medica, 2008, 74(8): 847–851.

[14] Feng X, Yan D, Zhao K J, et al. Applications of microcalorimetry in the antibacterial activity evaluation of various *Rhizoma coptidis* [J]. Pharmaceutical Biology, 2011, 49(4): 348–353.

[15] 康 帅. 中药组方“乌黄虎”合剂的研制及其毒理学研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2015.

[16] 刘仁志,程桂林,王安如,等. 大蒜挥发油及其复方对猪胸膜肺炎放线杆菌体外抑菌试验[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(3): 45–46.