

韩晓云,刘 鹏,王 震,等.核桃青皮提取液在腹泻小鼠体内的抑菌效果[J].江苏农业科学,2019,47(24):162-165.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.039

核桃青皮提取液在腹泻小鼠体内的抑菌效果

韩晓云,刘 鹏,王 震,范学红

(商洛职业技术学院,陕西商洛 726000)

摘要:分析了核桃青皮乙醇提取液对致病性大肠杆菌 O157:H7 在小鼠体内的抑菌作用,以及对其他肠道微生物生长繁殖的影响,为研究开发新型抗感染药物提供临床依据。用 95% 乙醇回流提取核桃青皮获得灌胃治疗液,通过对 KM 小鼠用大肠杆菌 O157:H7 灌胃 7 d 使其发生腹泻感染,并用核桃青皮乙醇提取液灌胃治疗腹泻小鼠 7 d,观察治疗情况。期间隔天采集小鼠粪便分析小鼠肠道微生物的变化情况。结果表明,与正常小鼠相比,感染大肠杆菌 O157:H7 的小鼠粪便中致病性大肠杆菌、肠杆菌等条件致病菌数量显著增加($P < 0.05$),乳酸菌和双歧杆菌等益生菌显著减少($P < 0.05$)。核桃青皮乙醇提取液灌胃治疗后,其粪便中的条件致病菌数量(大肠杆菌、肠杆菌)则显著降低($P < 0.05$),而乳酸菌和双歧杆菌两类益生菌数量变化不显著($P > 0.05$)。研究结果显示核桃青皮乙醇提取液可较好地抑制小鼠肠道内致病菌大肠杆菌 O157:H7 的生长繁殖,对治疗感染大肠杆菌 O157:H7 的腹泻小鼠有一定的作用,但其同样对肠道内乳酸菌、双歧杆菌的生长繁殖显示了抑制作用。

关键词:核桃青皮乙醇提取物;大肠杆菌 O157:H7;肠道微生物

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)24-0162-04

抗生素的应用解决了很多医学难题,但是正是由于抗生素较好的抑菌效果,使得抗生素被广泛滥用,从而引发了一系列问题,如耐药菌的产生。耐药菌的产生给人类公共卫生及健康造成了巨大的威胁。当前我国抗生素滥用问题尤为严重,每年抗生素总用量约占世界的一半,这使得我国病菌耐药

现象也异常广泛。其中大肠杆菌的耐药问题不容忽视,其耐药率在临床中呈上升趋势^[1],且多重耐药检出率也较高,给临床治疗带来很大困难^[2]。

研究表明,核桃青皮提取物在体外具有较好的抑菌效果^[3-5],但关于其体内抑菌效果试验研究甚少。为减少抗生素的使用及减缓耐药菌株的产生,本试验首次研究核桃青皮乙醇提取物对致病性大肠杆菌 O157:H7 腹泻模型小鼠的体内抑菌效果,为开发新型抗感染药物提供依据。

收稿日期:2019-09-17

基金项目:2017 年度陕西省教育厅专项科研计划(编号:17JK0961)。
作者简介:韩晓云(1984—),女,山西运城人,硕士,讲师,从事农作物的利用研究。E-mail:rxmrdbnzn@163.com。

致谢:野外采样得到江苏省骆马湖渔业管理委员会办公室的大力帮助,在此深表感谢!

参考文献:

- [1] 杨士建. 骆马湖富营养化发生机制与防治途径初探[J]. 环境监测,2004,20(3):59-62.
- [2] 冯照军,王光标,赵彦禹,等. 江苏骆马湖湿地鱼类资源及其保护[J]. 四川动物,2007,26(1):126-129.
- [3] 盛桂莲,程龙飞. 宿迁市湿地资源的现状 & 保护对策[J]. 国土绿化,2015(2):37.
- [4] 周化民,白延明. 骆马湖鱼类的初步研究[J]. 徐州师范学院学报(自然科学版),1994,12(2):53-58.
- [5] 王 飞,叶慎忠,朱 泉. 骆马湖采砂作业对水体影响分析及对策思考[J]. 江苏水利,2015(7):36-37.
- [6] 唐晟凯,张彤晴,李大命,等. 骆马湖夏季鱼类群落结构及其空间分布[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):107-111.
- [7] 倪 勇,伍汉霖. 江苏鱼类志[M]. 北京:中国农业出版社,2006:84-891.
- [8] Pinkas L, Oliphant M S, Iverson I L K. Food habits of albacore, bluefin tuna, and bonito in California water [J]. California Department of Fish and Game, Fish Bulletin, 1971, 152: 1-105.

- [9] Hyslop E J. Stomach contents analysis: a review of methods and their application[J]. Journal of Fish Biology, 1980, 17(4): 415-429.
- [10] Margalef R. Information theory in ecology [J]. General System, 1957, 3: 37-71.
- [11] Krebs C J. Ecological methodology [M]. New York: Harper Collins Publishers, 1989: 654.
- [12] Wilhm J L. Use of biomass units in Shannon's formula [J]. Ecology, 1968, 49(1): 153-156.
- [13] Pielou E C. Ecological diversity [M]. New York: Wiley, 1975: 1-165.
- [14] Tang S K, Zhang T Q, Lu J M, et al. Temporal and spatial variation in fish assemblages in Lake Taihu, China [J]. Journal of Freshwater Ecology, 2015, 30(1): 181-196.
- [15] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement [M]. New Jersey: Princeton University Press, 1988: 1-192.
- [16] 段金荣,徐东坡,刘 凯,等. 长江下游增殖放流效果评价[J]. 江西农业大学学报,2012,34(4):795-799.
- [17] 刘恩生,刘正文,陈伟民,等. 太湖鱼类产量、组成的变动规律及与环境的关系[J]. 湖泊科学,2005,17(3):251-255.
- [18] 陈家长,沈公铭,孟顺龙,等. 长江下游流域水产养殖外来物种调查研究[J]. 中国农学通报,2010,26(3):315-319.

1 试验材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌 O157 : H7 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;大肠杆菌选择性培养基(麦康凯琼脂)、乳酸菌选择性培养基(MRS 琼脂)、肠杆菌选择性培养基(VRBDA)及双歧杆菌选择性培养基(TPY)均购自青岛海博生物技术有限公司。KM 小鼠购自陕西省医学实验动物中心,保持饲养环境温度 25 ℃ 左右,标准小鼠饲料喂养,自由饮水。

PYX - DHS - 50X65 - BS 隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);ZHCH - C1106B 超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司);YKH - I 型液体快速混合器(江西医疗器械厂);YX280 型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器(上海三申医疗器械有限公司);JA2003 电子天平(上海衡际科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 动物试验设计 随机选取无特定病原体(SPF 级)昆明(KM)小鼠 60 只随机分为 3 组,即 I 组、II 组、III 组,每组 20 只。II 组、III 组连续 7 d 中午灌胃大肠杆菌菌液,灌胃体积为 10 mL/kg(菌悬液/小鼠体质量)^[6];空白对照组灌胃等体积生理盐水。灌胃 7 d 后,第 8 天开始治疗,III 组每天灌胃核桃青皮乙醇提取物,II 组用生理盐水作对照,持续时间为 7 d。试验设计方案见表 1。

表 1 小鼠灌胃试验设计

组别	动物数	灌胃液	
		造模过程:1 ~ 7 d	8 ~ 14 d
I 组	20	无菌生理盐水	无菌生理盐水
II 组	20	大肠杆菌	无菌生理盐水
III 组	20	大肠杆菌	核桃青皮乙醇提取物

1.2.2 灌胃液制备

1.2.2.1 大肠杆菌灌胃液的制备 先将大肠杆菌 O157 : H7 标准菌株进行增菌培养,并绘制菌株的生长曲线图确定其群体生长的稳定期,取稳定期(16 h)的大肠杆菌菌液 5 000 mL,在 4 ℃ 条件下,离心 10 min 后收集菌体,无菌生理盐水清洗 3 次后称质量,向菌体中加入一定体积的无菌生理盐水,调整菌浓度为 10⁸ CFU/mL,4 ℃ 储存待用。

1.2.2.2 核桃青皮乙醇提取物治疗液的制备 手工剥下新鲜核桃青皮^[7],采用冷冻干燥法进行处理^[8]。冷冻条件:压力为 10 Pa,温度为 -45 ℃,含水率为 3.28%。待样品充分干燥后,进行粉碎并过 0.425 mm 筛网。称取冷冻干燥的样品粉末 10.00 g,加入 200 mL 95% 乙醇溶液,65 ℃ 下回流提取 2 h,将提取物进行过滤后再浓缩,再将浓缩液用水定容至 1 000 mL,相当于生药含量为 10 mg/mL,作为试验母液。取母液 10 mL,用蒸馏水稀释至生药含量为 1 mg/mL,用于抑菌试验。

1.2.3 灌胃后小鼠的表象观测 在对小鼠进行试验过程中,每天观察记录 3 组小鼠的身体状况(包括小鼠精神状态、进食状况、外观毛发、粪便形态),用以评价小鼠的表象特征。

1.2.4 小鼠肠道菌群的检测

1.2.4.1 粪便采集 每天 09:00 用逼迫法采粪便,轻轻挤尾

巴根部直肠末端,待排粪便后收集于无菌管中;粪便混悬液制备:将采集到的粪便进行称量,再加入相应体积的无菌生理盐水,在混悬仪上充分混合,制成粪便混悬液;粪便混悬液稀释:将混悬液进行 10 倍梯度稀释,每个稀释做 3 个平行。

1.2.4.2 检测指标及方法 大肠杆菌计数。采用涂布平板法,将 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 梯度粪便稀释液 1 mL 均匀涂布于麦康凯琼脂 37 ℃ 培养 10 h,对平板中的显金属光泽的紫色菌落进行计数^[9],计算出 1 g 粪便中的菌含量(CFU/g),结果以活菌数常用对数值表示^[10]。

肠杆菌计数。采用涂布平板法,将 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 梯度粪便稀释液 1 mL 均匀涂布于营养琼脂 37 ℃ 培养 10 h,对显红色且有胆盐沉淀环的菌落计数,计算出 1 g 粪便中的菌含量(CFU/g),结果以活菌数常用对数值表示。

乳酸菌计数。采用涂布平板法,将 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰ 梯度粪便稀释液 1 mL 均匀涂布于 MRS 琼脂厌氧环境下 37 ℃ 培养 10 h,对平板菌落进行计数,计算出 1 g 粪便中的菌含量(CFU/g),结果以活菌数常用对数值表示。

双歧杆菌计数。采用涂布平板法,将 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 梯度粪便稀释液 1 mL 均匀涂布于 TPY 琼脂厌氧环境下 37 ℃ 培养 10 h,对平板菌落进行计数,计算出 1 g 粪便中的菌含量(CFU/g),结果以活菌数常用对数值表示。

2 结果与分析

2.1 核桃青皮乙醇提取物对感染大肠杆菌 O157 : H7 小鼠表象的影响

在灌胃期间,每天观察试验小鼠的表象特征。试验前 3 d 各组小鼠变化不大,但是在试验第 4 天,II 组和 III 组小鼠出现精神状态不佳及少量腹泻现象,且其毛发光泽度较 I 组小鼠明显暗淡,进食量也显著减少,此类表象说明小鼠已经发生病变,造模成功。在试验第 8 天开始,III 组小鼠在灌胃核桃青皮乙醇提取物后,病症较 II 组有所减轻,进食量也有所增加。这说明核桃青皮乙醇提取物对治疗感染大肠杆菌 O157 : H7 的小鼠有一定的抑菌疗效。

2.2 核桃青皮乙醇提取物对感染大肠杆菌 O157 : H7 小鼠肠道微生物数量的影响

2.2.1 核桃青皮乙醇提取物对感染大肠杆菌 O157 : H7 小鼠肠道大肠杆菌数量的影响 从图 1 中可以看出,I 组小鼠体内大肠杆菌数量在试验期间波动不大,而 II 组与 III 组出现了明显的变化。在灌胃第 3 天后,II 组与 III 组的小鼠肠道内的大肠杆菌数量开始增多,并在灌胃 7 d 后,出现了升高约 3 个数量级的差异。这可能是由于大肠杆菌作为生物肠道内的条件致病菌,虽在机体正常情况下,对人体无害,但是当机体菌群失调后,它们会随即转为有害菌开始对机体造成威胁,使机体出现肠胃生理功能紊乱的症状。外在开始进行核桃青皮乙醇提取物灌胃治疗后,III 组小鼠肠道内大肠杆菌数量开始减少,并在治疗后第 4 天数量大幅下降,达到了 I 组的正常水平,与 II 组小鼠肠内状况有显著差异($P < 0.05$)。此结果说明核桃青皮乙醇提取物对肠道内致病性大肠杆菌有一定的抑制或杀灭作用。

2.2.2 核桃青皮乙醇提取物对感染大肠杆菌 O157 : H7 小鼠肠杆菌数量的影响 从图 2 中可以看出,I 组小鼠体内肠

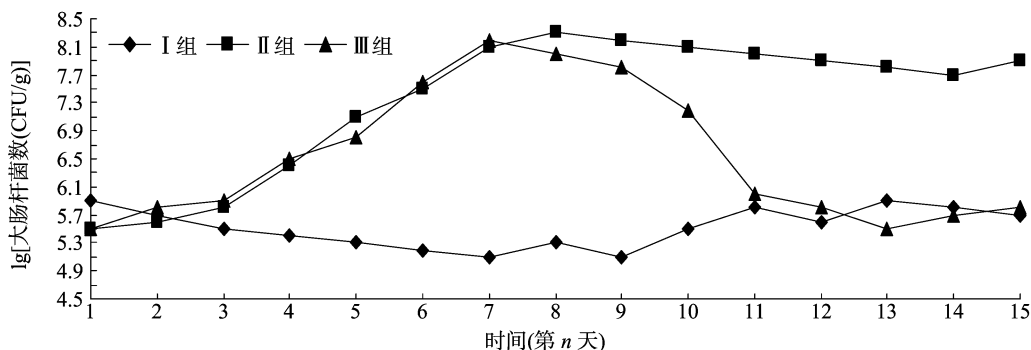


图1 核桃青皮乙醇提取物对感染大肠杆菌 O157:H7 小鼠肠道中大肠杆菌数量的影响

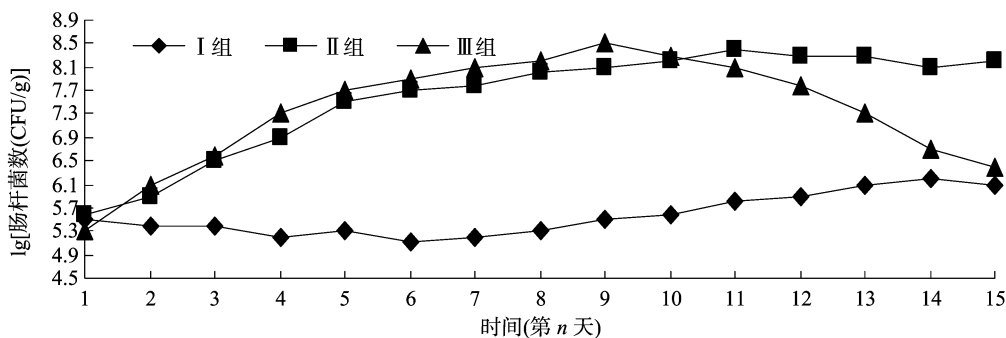


图2 核桃青皮乙醇提取物对感染大肠杆菌 O157:H7 小鼠肠道中肠杆菌数量的影响

杆菌数量相对较低,且在试验期间一直维持在同一水平,而Ⅱ组与Ⅲ组均出现了明显的变化。在灌胃后第2天Ⅱ组与Ⅲ组的小鼠肠道内的肠杆菌数量开始增多,之后每天肠杆菌检出数量都在增多,并在灌胃7 d后达到最高,升高了约4个数量级。这主要是由于肠杆菌中如变形杆菌等大多属于条件致病菌,当机体由于进入大量致病菌大肠杆菌 O157:H7 时,小鼠肠道内条件致病菌由正常菌群变成致病菌,一方面通过营养竞争,另一方面通过释放胺等物质发挥生物拮抗作用,最终使得益生菌数量大大减少。在开始药物治疗后,Ⅲ组小鼠肠道内肠杆菌数量于试验第9天开始下降,并在药物灌胃第15天达到Ⅰ组的正常水平,与未进行治疗的Ⅱ组小鼠肠道状况形成了显著差异($P < 0.05$)。此结果说明核桃青皮乙醇提取物对肠道内肠杆菌有一定的抑制或杀灭作用。

2.2.3 核桃青皮乙醇提取物对感染大肠杆菌 O157:H7 小

鼠肠道乳酸菌的影响 从图3中可以看出,Ⅰ组小鼠体内乳酸菌数量相对较高,且在试验期间波动不大,而Ⅱ组与Ⅲ组同样出现了明显的变化。在灌胃后第2天Ⅱ组与Ⅲ组的小鼠肠道内的乳酸菌数量开始减少,之后每天检出数量都在减少,并在灌胃7 d后乳酸菌减少了2个数量级。这也主要是由于致病性大肠杆菌的增多导致了肠道内环境的微生态平衡遭到破坏,使得乳酸菌等益生菌的生长繁殖因为营养竞争等关系受到抑制。图3显示,在进行核桃青皮乙醇提取物进行灌胃后Ⅱ组与Ⅲ组的小鼠肠道内乳酸菌的数量也没有恢复如初,与Ⅰ组的小鼠肠道乳酸菌状况有显著差异($P < 0.05$)。这可能是由于核桃青皮乙醇提取物对肠道菌群有广谱抑菌效果,在抑制致病菌、条件致病菌的过程中,对肠道益生菌也起了抑制作用。

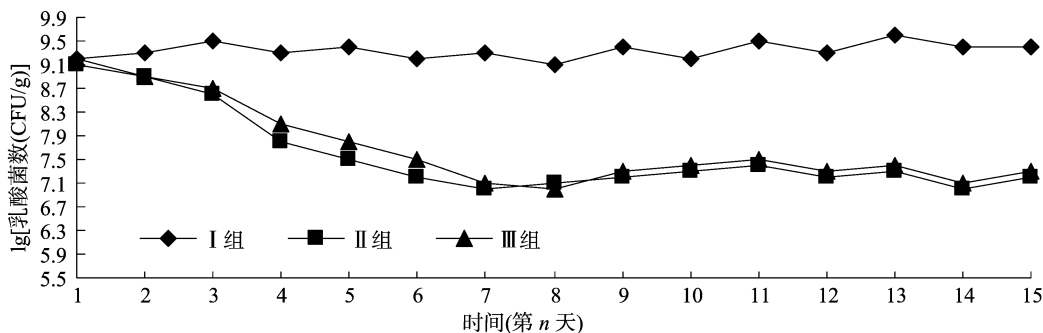


图3 核桃青皮乙醇提取物对感染大肠杆菌 O157:H7 小鼠肠道中乳酸菌数量的影响

2.2.4 核桃青皮乙醇提取物对感染大肠杆菌 O157:H7 小鼠肠道双歧杆菌的影响

由图4可知,Ⅰ组小鼠肠道内双歧杆菌数量相对稳定,与Ⅰ相比,Ⅱ与Ⅲ组在对小鼠进行大肠杆

菌 O157:H7 灌胃期间,小鼠肠道内双歧杆菌数量在逐渐下降,且灌胃时间越长,数量减少得越多,这主要是由于大肠杆菌灌胃后,短时间大肠杆菌数量急剧增多,破坏了小鼠肠道

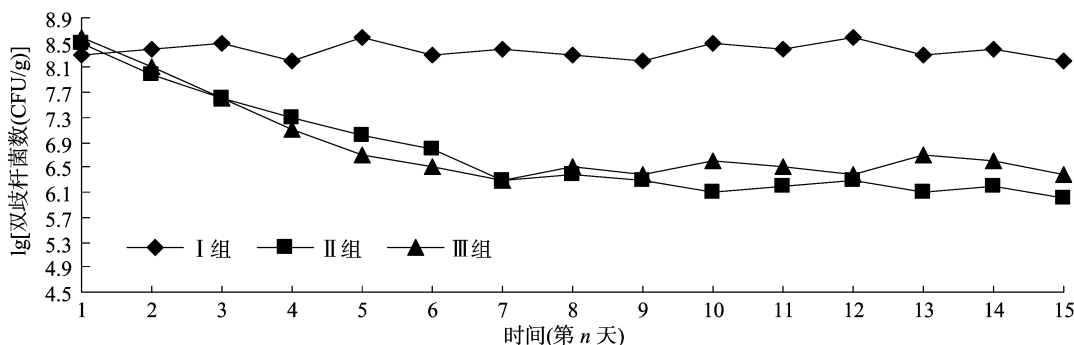


图4 核桃青皮乙醇提取物对感染大肠杆菌 O157:H7 小鼠肠道中双歧杆菌数量的影响

内的微环境,取代了肠道内最初优势菌,成为最新优势菌,并通过营养竞争抑制了双歧杆菌的生长繁殖。进行核桃青皮乙醇提取物药物治疗后,双歧杆菌数量也未能明显增加,这可能是由于核桃青皮乙醇提取物具有广谱抑菌作用,对双歧杆菌的生长繁殖也发挥了抑制作用导致的结果。

3 结论与讨论

吕海宁等研究发现核桃青皮对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌具有显著的抑菌活性^[11],张卫星等研究表明核桃青皮提取物具有抗菌和抗氧化活性^[12-13],丁存宝等研究发现,核桃青皮烘干粉末 95% 乙醇萃取液对白色葡萄球菌、伤寒杆菌具有一定的抑菌作用^[14]。唐春丽等研究发现核桃青皮提取物具有很强的抗菌和抗真菌效果^[15-16]。本试验首先对小鼠进行大肠杆菌 O157:H7 灌胃造模,在造模第 4 天试验小鼠出现病症,说明造模成功。随后用核桃青皮乙醇提取物进行灌胃治疗,小鼠病症减轻。试验期间对小鼠肠道内大肠杆菌、肠杆菌等条件致病菌的数量进行计数,结果表明在进行大肠杆菌 O157:H7 灌胃期间,条件致病菌数量呈上升趋势,且上升明显,但在进行核桃青皮乙醇提取液灌胃治疗后,条件致病菌数量开始下降,且在灌胃 7 d 后回到初始水平,与 I 组小鼠无差异。小鼠临床病症及体内条件致病菌数量的检测结果都说明该提取物对治疗大肠杆菌 O157:H7 感染引起的腹泻有一定的疗效,这与前人的体外试验有抑菌作用的结果相一致。但是核桃青皮提取物治疗腹泻的机制是否是由单一的抑菌效果所导致的,又或者通过刺激肠道黏膜增强黏膜相关免疫的屏障作用来协同抑菌的,还须要做深入研究。

乳酸菌、双歧杆菌等属于生物肠道中益生菌,他们的存在可以增强肠道黏膜免疫屏障作用,调节免疫系统,预防和治疗肠道感染。须要注意的是,试验期间对小鼠肠道内乳酸菌、双歧杆菌等益生菌的数量进行计数,结果表明在进行大肠杆菌 O157:H7 灌胃期间,乳酸菌、双歧杆菌等益生菌数量呈下降趋势,且下降明显,且在进行核桃青皮乙醇提取液灌胃治疗后,益生菌数量下降趋势得到一定的改善,但在灌胃治疗 7 d 后,益生菌数量亦没有显著提升,与 I 组小鼠体内益生菌熟练形成显著差异,这说明该提取物具有广谱抗菌作用,在抑制大肠杆菌 O157:H7 生长繁殖的同时,对肠道内益生菌也发挥了抑制作用。因此核桃青皮乙醇提取液在以后用作新兴医疗抗感染药物时要考虑联合使用益生菌产品,来帮助病人的肠道微生态环境尽快恢复平衡^[17]。

参考文献:

- [1] 李耘,吕媛,薛峰,等. 卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarín)2011—2012 年革兰阴性菌耐药监测报告[J]. 中国临床药理学杂志,2014,30(3):260-277.
- [2] 高海涛,韩俊丽,关道明. 大肠杆菌耐药现状的严峻性[J]. 生命科学,2017,29(5):514-520.
- [3] 吴莹,包晓玮,陈勇,等. 核桃青皮提取物抗氧化及抑菌活性的研究[J]. 畜牧兽医学报,2017,48(6):1118-1127.
- [4] 龚斌荣,刘华英,司杰. 核桃青果皮系统溶剂提取物抑菌作用研究[J]. 天津农业科学,2012,18(2):46-48.
- [5] 张卫星,何开泽,蒲蓓. 核桃青皮提取物的抗菌和抗氧化活性[J]. 应用与环境生物学报,2014,20(1):87-92.
- [6] Yang H, Liu S, Ibrahim S A, et al. Oral administration of live *Bifidobacterium* substrains isolated from healthy centenarians enhanced immune function in BALB/c mice[J]. Nutrition research, 2009,29(4):281-289.
- [7] 魏芳,陈庆敏,傅茂润,等. 脱皮方式对核桃青皮成分和功能活性的影响[J]. 食品科技,2018,43(12):44-47.
- [8] 张立华,李妍,张沛,等. 干燥方式对核桃青皮胡桃醌含量与抑菌性能的影响[J]. 食品工业科技,2017,10(38):141-145.
- [9] 王友湘,陈庆森. 瑞士乳杆菌对小鼠肠道微生物区系的影响[J]. 食品科学,2008,29(9):542-546.
- [10] Zhang L, Xu Y Q, Liu H Y, et al. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses[J]. Veterinary Microbiology, 2010,141(1/2):142-148.
- [11] 吕海宁,张克诚,崔增杰,等. 核桃青皮体外抑菌活性的研究[J]. 华西药理学杂志,2011,26(2):150-152.
- [12] 张卫星,何开泽,蒲蓓. 核桃青皮提取物的抗菌和抗氧化活性[J]. 应用与环境生物学报,2014,20(1):87-92.
- [13] 郑渝川,黄仲华,黄伊嘉,等. 3 种核桃副产物多酚提取液的体外抗氧化活性分析[J]. 四川林业科技,2019,40(1):15-19.
- [14] 丁存宝,李桂秋,刘海燕,等. 核桃青皮次生物质的抑菌活性研究[J]. 食品科技,2013(6):223-226.
- [15] 唐春丽,杨冰,方自扬,等. 核桃青皮提取物的抑菌和协同抑菌作用[J]. 中国药师,2018,21(4):577-580.
- [16] 尹向田,曲静,张子文,等. 核桃青皮抑菌剂对葡萄病原真菌的抑制作用[J]. 中国果菜,2018,38(10):44-47.
- [17] 袁辉,聂国明,柯婕婕. 鼠李糖乳杆菌预防儿童抗生素相关性腹泻的研究进展[J]. 华南国防医学杂志,2018,32(11):814-817.