

中药抗大肠杆菌病研究进展

褚秀玲, 苏建青, 韦旭斌* (1. 聊城大学农学院, 山东聊城252000; 2. 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林长春130062)

摘要 分析了大肠杆菌给人类和动物造成的危害, 介绍了大肠杆菌的防治现状, 阐述了中药防治大肠杆菌概况, 并从中药抗大肠杆菌病的研究近况和临床应用前景方面论述了目前国内外中草药的研究现状。

关键词 大肠杆菌; 中草药; 前景

中图分类号 S859.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-09093-02

Research Progress in the Antibacterial of Chinese Traditional Medicine and its Clinical Application

CHU Xiu-ling et al (College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252000)

Abstract In this text the research progress in the antiviral of Chinese herbal medicine and its clinical application were discussed. The development direction of the antibacterial of Chinese traditional medicine with high efficiency and low poison was pointed out.

Key words E. coli; Chinese herbal medicine; Foreground

大肠杆菌病是在世界范围内影响养殖业发展的主要细菌病之一, 常招致巨大的经济损失。有效防治大肠杆菌病一直是养殖业的一项重要课题。按中兽医辨证理论, 大肠杆菌病为湿热壅积肠道而引起的里热症, 宜清热解毒、燥湿止痢^[1]。我国传统中草药在防治细菌方面积累了许多经验, 君臣佐使配合, 互相协调为用, 可以达到标本兼治、扶正祛邪的效果。笔者就中药抗大肠杆菌病的最新研究现状和临床应用前景作一综述, 旨在为相关研究提供参考。

1 大肠杆菌给人类和动物造成的危害

致病性大肠杆菌是医学和兽医学临床感染中最常见的病原菌之一。据估计, 全球每年因感染产毒素性大肠杆菌至少可导致6.5亿人发病, 并引起约80万5岁以下儿童死亡。我国许多地区大肠杆菌在腹泻病人的病原谱中占首位^[2]。据报道, O₁₅₇型大肠杆菌曾在日本等国家引起食品污染事故, 致病性较严重, 通常会导致患者腹泻、脱水甚至死亡。在兽医临床上, 致病性大肠杆菌一年四季均可致病, 鸡的发病率约为10%~69%, 死亡率约为3.8%~72.0%。尤其是20世纪80年代以来, 随着我国养殖业集约化程度的不断提高, 畜禽大肠杆菌病在各地的流行趋于严重, 在受不利环境因素和其他传染因子应激的畜禽群中, 大肠杆菌感染一直居于首位。严重影响着我国畜牧养殖业的发展。

2 大肠杆菌病防治现状

抗菌药物和大肠杆菌疫苗在养殖业上广泛使用, 极大地促进了规模化、集约化畜牧业的发展。但抗生素的广泛持续和不当使用造成了畜禽产品中的药物残留, 抗菌药物残留除了可能对消费者造成直接的急、慢性毒性外, 还有可能产生过敏反应, 或者对人类胃肠道的正常菌群产生不良的影响, 如部分敏感菌受到抑制或被杀死, 致使平衡破坏。此外, 抗菌药物残留可能会导致某些条件性致病菌大量繁殖, 或体外病原的乘机侵入, 严重损害人类健康。并且, 随着抗生素使用时间的延长, 多重耐药性的问题越来越严重, 目前我国家禽大肠杆菌耐药性严重而复杂, 几乎对所有的抗菌药物都已经产生了耐药性。中国兽医药品监察所对其保存的大肠杆

菌进行药敏试验发现, 20世纪50年代分离的菌株基本上不存在耐药性问题; 20世纪60年代的菌株耐药谱也较窄, 在15种目前常用的抗生素中仅对链霉素和四环素具有耐药性, 而且耐药性仅为20%; 从20世纪70年代起, 大肠杆菌的耐药性迅速增加, 并出现了多重耐药的菌株; 20世纪80~90年代分离的菌株多为多耐药菌株; 20世纪90年代分离的菌株有87%可同时耐5种以上的抗菌素^[3-7]。家禽大肠杆菌耐药性产生的速度极快, 与我国目前的家禽养殖环境、养殖方式和技术水平密切相关。通过在山东地区对盐酸环丙沙星进行连续3年的耐药性调查发现, 1996年盐酸环丙沙星治疗大肠杆菌的有效率为100%, 1997年为63.7%, 而其毒力因子就能成为致病的菌株^[8]。故迄今对其所引起的疾病尚无理想的疫苗来预防。因此, 使用中草药防治该病, 既是饲养动物的需要, 也是人们生活保健的需求。虽然市场上已有不少中草药兽医产品, 但由于对中草药的基础研究比较薄弱, 许多中药的抑菌作用机制尚未弄清楚, 部分中药制剂缺乏科学性。

3 中药防治大肠杆菌病概况

由于肠道微生物抗原和抗原决定簇复杂, 免疫机制存在差异, 从疫苗角度尚未取得突破性进展, 而且抗菌药的滥用和大量亚治疗量的预防、饲料添加用药及无节制地延长用药时间, 均导致了大肠杆菌耐药性的产生、传播, 同时造成了药物残留而危害人畜健康及公共卫生的可能。据此, 有许多科研工作者开始关注在我国已有几千年使用历史的中草药, 并开发研究植物提取物。如苑丽等选用了11种中草药, 分别对禽大肠杆菌O₇₄、金黄色葡萄球菌、猪大肠杆菌O₁₃₈、猪链球菌进行体外抑菌试验, 结果显示, 11种中药均有一定的抑菌效果, 其中黄芩、大黄、蒲公英抗菌活性较强^[9]。夏薛梅等选用24种中草药水提物作大肠杆菌的抑菌试验, 结果显示, 多种中草药有不同程度的抑菌效果^[10]。

随着养殖业的不断集约化, 多种疾病混合感染的机率逐渐增多。而祖国医学恰是群体论治方面的一项杰作, 具有广阔的应用和发展前景。中草药治疗传染病不一定对细菌起直接杀灭作用, 但可通过扶正和祛邪2方面来达到现代医学所说的增强体质、防御病邪的侵袭, 提高机体免疫力和抗病力的作用^[11]。而且, 中草药与化学药物相比, 有一定的优势, 主要是毒副作用相对较小, 不易在食用动物性产品中形成有

基金项目 河北省教育厅资助项目(2007408)。

作者简介 褚秀玲(1970-), 女, 河北宣化人, 博士, 讲师, 从事临床中兽医学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-05-09

害残留^[12]。大量研究表明,单味中药具有一定的抑菌作用。杜云良等通过抑菌试验证明,牛至提取物对禽大肠杆菌高度敏感。刘玉庆等通过平板稀释法和管碟法观察了黄连、穿心莲、诃子等23味常用中药和三黄汤等18个复方的抑菌效果,结果发现诃子、黄芩、秦皮、黄连、人黄等单味药对大肠杆菌抑菌效果较好。有研究表明,部分中药在体外对内毒素有直接的清除作用,如金银花、连翘、穿心莲、黄芩、赤芍、大黄、黄连、大青叶、丹参等。绞股蓝总皂甙、黄苏甙等9个中药化学成分可以降低内毒素所致试验动物的死亡率,逆转内毒素引起的心血管功能紊乱、低血压弥散性血、管内凝血及血尿素氮和血浆肌醇的升高;抑制肿瘤坏死因子、一氧化氮、血小板活性因子及乳过氧化物酶等的合成和过度释放等多种途径发挥其抗内毒素活性^[13]。刘云海等发现,连翘、大青叶、黄连等75味中药皆具有拮抗内毒素活性的作用^[14-18]。

4 中药组方抗大肠杆菌的研究

4.1 中药组方抗大肠杆菌的敏感性研究 早在20世纪50年代,我国医药工作者即开始了中药抑菌作用与抑菌成分研究,并发现了许多具有抗菌作用的中药。王岳等测定70种福州草药的乙醇浸提物的抗菌效能,并于70种中选出8种(秦皮、青黛、五味子、桂枝、丁香、黄柏、丹皮、沙参)连同百部,制得乙醇浸提物,测定其抗菌谱^[19]。山东医学院则根据中药分类,证明清热药绝大部分具有抑菌作用,并证实具广泛抗菌谱的药物有夏枯草、黄芩、地榆、硼砂、蟾蜍、丁香、五味子^[20]。部分研究的目的是在前人工作的基础上,采用现代药理学的方法,以清热解毒、清热燥湿为药物筛选方向,找出针对致病性大肠杆菌敏感性较强的单味中药与组方^[21]。研究发现,中药复方在体外对内毒素有直接的清除作用,如双黄连粉针、清开灵注射液、板蓝根注射液、热毒平、鱼腥草注射液等在体外具有较好的拮抗内毒素作用。而对体内内毒素清除作用的机理研究发现,该作用有被机体解毒机制解毒,被药物解毒灭活2个途径。与之相应的中医治法为益气解毒、清热解毒和通腑解毒。益气解毒法的本质是应用益气扶正方药提高机体以网状内皮系统的吞噬活性为主的对内毒素的解毒机制,从而清除血流中的内毒素;清热解毒法的实质是应用清热方药直接使体内的内毒素解毒灭活,并对抗内毒素所致机体发热等多种“热象”;通腑泻毒法的实质是应用能荡涤肠腑的润下之品清除肠道内毒素,并通过改善肠道血液循环以减少肠源性内毒素的吸收^[22-23]。

热毒清是由金银花、人青叶、蒲公英、鱼腥草等中药制成的静脉注射液,用于治疗多种急性感染性疾病。杨光等试验表明,热毒清能通过抑制TNF- α 、IL-8活性减轻内毒素诱导的肝损害。杨明纬等通过体内、体外对内毒素影响试验发现,热毒清在体外能裂解大肠杆菌内毒素的网状结构,在体内能减少家兔内毒素性DIC和肾小球血栓的形成,减轻内毒素引起的家兔发热反应。在对该方防治内毒素性DIC进行多方面深入研究后,发现其防治机制为降低TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8和NO水平,降低活性期蛋白、血清C反应蛋白、铜蓝蛋白量,保护肝微粒体,维护钙稳态和防止脂质过氧化作用。

4.2 中药组方抗大肠杆菌的作用机制研究 致病性大肠杆菌是兽医临床最常见的病原菌之一,它可引起禽大肠杆菌

病、仔猪黄白痢和水肿病及其他各种家畜的大肠杆菌病,给养殖业造成巨大的经济损失^[24]。针对目前我国畜禽疾病发生和防治的现实情况,兽医临床治疗方案确定越来越需要药物抗病原菌的机制作为指针。国内外学者对中药抗大肠杆菌的机制进行了一些研究,认为:中药通过影响致病性大肠杆菌的DNA、RNA、蛋白质的合成对其产生抑制作用^[25-26];中药通过对致病性大肠杆菌黏附性的影响^[27]来阻止大肠杆菌的繁殖;中草药提取物可以消除大肠杆菌耐药性及耐药质粒^[28-29],从而达到抑杀目的。

耐药质粒又称R质粒或耐药因子,是造成大肠杆菌产生耐药性的主要原因。大黄、黄连、黄芩对R质粒均有不同程度的消除作用。国内陈少英等曾用大黄素作为消除剂,对金黄色葡萄球菌的R质粒进行了消除研究,其消除率为0.87%。徐建国曾用黄连素作为消除剂,对去污染小鼠进行了痢疾杆菌R质粒的消除作用研究,其消除率在1.4%~1.6%。以黄芩和黄连的提取物为质粒消除剂,携带R质粒的多重耐药性大肠杆菌E.102株为靶细菌,采用倍比稀释和影印的培养方法及Kado法进行研究发现,黄连和黄芩作用24h,对大肠杆菌R质粒的消除率为2.42%~5.00%,延长至48h,消除率为22.57%~26.14%,R质粒的消除可以表现为单一或2种耐药性的丢失。另有研究以黄芩和复方止痢灵(主要成分为白头翁、黄柏和苦参)为消除剂,用携带多重耐药性大肠杆菌E.010株为靶细菌,发现单独使用黄芩和止痢灵,其消除率分别为2.42和2.14,绝大多数细菌表现为单一耐药性的丢失,其中以链霉素的耐药性丢失最多,其次为氨苄青霉素。而黄芩和止痢灵配伍使用,消除率可提高到18.14%,这可能与中药配伍产生的联合药理作用有关。细菌不仅表现为单一耐药性消除率的明显提高,还表现对链霉素+四环素及氨苄青霉素+四环素多重耐药性的消除率明显升高。该试验研究不仅证实了中药黄芩和止痢灵对R质粒的消除作用,而且观察了中药配伍使用能够明显增强其消除R质粒的作用,指出了中药作为消除剂的临床运用前景。

参考文献

- [1] 汪德刚,张志远.中药防治鸡大肠杆菌病的实验[J].养禽与禽病防治,2002(9):14-15.
- [2] 鞠洪涛.大肠杆菌耐庆大霉素基因定位[M].长春:解放军军需大学,1999:2-6.
- [3] SIMON SHANE. Cdif α infection are responsible for heavy losses[J]. Wild Poultry,2001,17:35-37.
- [4] 刘倍增,张强.肉仔鸡大肠杆菌病的防治措施[J].中国家禽,2002,24(8):46.
- [5] 韩正康.动物生理学[M].北京:中国农业出版社,1999:71-79.
- [6] 刘桂江,杨汉春,王建航.鸡源大肠杆菌的耐药性监测[J].中国兽医杂志,2004,40(6):48-49.
- [7] KOHLER T, MICHAEL HAMZEHPOUR M, PLESAT P. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother,1997,41(11):2540-2543.
- [8] 冯翔宇.肠出血性大肠杆菌毒力因子研究进展[J].医学综述,2002,8(1):19.
- [9] 苑丽,胡功政.十一种中草药对常见病原菌的体外抑菌试验[J].兽药与饲料添加剂,2001,6(1):20.
- [10] 夏薛梅,裴春.中草药对大肠埃希氏菌的抑菌试验[J].中兽医学杂志,1998(3):5.
- [11] 王桂英,武目胜,司振书.复方郁金散对鸡大肠杆菌病的临床疗效观察[J].山东畜牧兽医,2003(3):9-10.
- [12] 陈友梅.中药化学[M].济南:山东科学技术出版社,1988:85-101.
- [13] 刘云海,吴旭清,施春阳.几种中药化学成分抗内毒素研究现状[J].中国医院药学杂志,2003,23(1):46-48.

2 结果与分析

2.1 提取工艺研究结果 对影响超声提取的主要因素(乙醇浓度、料液比、超声温度)按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验。因素水平见表1,结果见表2。

表1 试验因素水平

Table 1 Factors and levels of the test

水平 Level	因素Factor		
	乙醇浓度A %	料液比B	提取温度C
	Ethanol concentration	Solid-liquid ratio	Extraction temperature
1	50	1:8	40
2	60	1:10	50
3	70	1:12	60

表2 三七总皂苷乙醇超声法提取正交试验设计 $L_9(3^4)$ 及结果

Table 2 Design and result of $L_9(3^4)$ orthogonal test of PNS extraction by ethanol ultrasonic method

试验号 Est No.	因素Factor				提取率 %Extraction rate		
	A	B	C	空列	k ₁	k ₂	k ₃
	Blank row						
1	50	1:8	40	1	6.25	6.46	6.42
2	50	1:10	50	2	5.11	5.36	5.32
3	50	1:12	60	3	5.09	5.18	4.93
4	60	1:8	50	3	4.70	4.98	4.94
5	60	1:10	60	1	4.71	4.96	4.79
6	60	1:12	40	2	6.89	6.69	6.74
7	70	1:8	60	2	4.36	4.61	4.44
8	70	1:10	40	3	6.25	6.46	6.42
9	70	1:12	50	1	5.11	5.36	5.32
k ₁	5.57	5.24	6.20	5.47			
k ₂	5.49	5.18	5.12	5.50			
k ₃	5.05	5.69	4.79	5.13			
R	0.52	0.51	1.42	0.37			

由表2中极差可见,各因素的影响大小为 $C > A > B$,方差分析表明,各因素在所选水平上均极显著地影响提取率。由k值可以看出,在所选水平上温度越高提取率下降越多,乙醇浓度越高提取率也下降越多。k值确定的最优组合为 $A_1B_3C_1$,试验最佳组合为 $A_2B_3C_1$,经验证, $A_1B_3C_1$ 试验结果略高于 $A_2B_3C_1$,即采用40%及50%的乙醇浓度,料液比1:12,超声提取2次,所用提取时间合计为100 min。常用的乙醇回流法温度远高于50℃(达乙醇溶液的沸点),乙醇浓度为70%,料液比1:10,回流提取3次(每次1.5 h),提取时间合计为270 min^[4]。这说明超声波法可以比传统方法节省溶剂、降

(上接第9094页)

- [14] 王毅,朱佩芳,王国正,等.黄芩甙对内皮细胞保护作用及其生化机理[J].中国中医急症,1994,3(6):260.
- [15] 周晓红,翟佳,凌亦凌,等.黄芩抗内毒素休克的实验研究[J].河北中医药学报,2001,16(1):32-33.
- [16] 汤亚玲,谭红,李燃遍,等.黄芩对产黑色素类杆菌内毒素影响的实验研究[J].广东牙病防治,2002,10(2):94-96.
- [17] 刘云海,李清香,石玉梅.大青叶抗内毒素实验[J].中药材,1994,17(6):36-37.
- [18] 刘晓波,马布仁.应用产色基质偶氮法筛选抗内毒素中草药[J].实用中西医结合杂志,1995,8(8):583-584.
- [19] 王岳.70种药用植物抗菌效能的试验[J].植物学报,1954,3(2):121-131.
- [20] 山东医学院微生物学教研室组.110种中药抗菌谱试验的初步结果[J].山东医学院学报,1959,7(2):42-45.
- [21] 胡宇莉.中草药防治禽大肠杆菌病的研究进展[J].山东家禽,2003

低能耗、提高效率。

2.2 三七总皂苷急性毒性试验结果 为考察超声提取产品的安全性,将提取液精制为固体粉末后以去离子水制成溶液做试验。灌胃前,小白鼠经连续观察3 d未发现有任何异常,灌入精制三七总皂苷溶液后亦未见任何异常(表3)。这表明该工艺所制得的三七总皂苷粉最大耐受量MTD大于20.0 g/kg体重,属无毒级。此结果与耿家玲等对水提三七皂苷胶囊的急性毒性试验结果一致,说明小鼠口服三七总皂苷是相当安全的^[9]。鉴于三七皂苷有很好的保健功能且总皂苷口服无毒,应进一步开展其在食品功能性添加剂方面的研究。

表3 急性毒性试验结果

Table 3 Result of acute toxicity test

性别 Sex	动物数 Animal number	浓度 ng/ml Concentration	剂量 g/kg Dosage	观察情况 Observation situation	死亡数 Death number	死亡率 % Death rate
雄 Male	10	500	20.0	无异常 No abnormal	0	0
雌 Female	10	500	20.0	无异常 No abnormal	0	0

3 结论

通过研究三七总皂苷的乙醇超声法提取工艺,发现在所选因素和水平上的最佳提取工艺参数为以12倍的50%乙醇浸泡三七粉末12 h后,在40℃下超声50 min过滤,滤渣再次提取后合并滤液。滤液经减压干燥、除杂、浓缩后所得三七总皂苷粉末为无毒产品。

参考文献

- [1] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典(二部)[M].北京:中国农业出版社,2006.
- [2] 肖培根.新编中药志第五卷[M].北京:化学工业出版社,2006:220-229.
- [3] 徐世义,张国刚,张洪霞,等.三七总皂苷提取工艺研究[J].特产研究,2005(3):9-12.
- [4] 瞿林海,郑明,楼宜嘉.三七总皂苷提取工艺研究[J].中药材,2006,29(6):593-595.
- [5] 王兴文,孙小玲.水提三七总皂苷产业化研究[J].云南中医中药杂志,2006,27(4):14-15.
- [6] 吴少雄,王保兴,郭祀远,等.三七叶苷的提取分离与纯化[J].食品与发酵工业,2005,31(1):149-151.
- [7] 谢茵,邢桂琴,刘秀芬.三七提取液中三七总皂苷的分离纯化工艺研究[J].山西医科大学学报,2006,37(6):613-615.
- [8] 中华人民共和国卫生部中国国家标准化管理委员会.GB15193.3-2003.急性毒性试验[S].北京:中国标准出版社,2004.
- [9] 耿家玲,孙小玲,罗燕,等.水提三七总皂苷胶囊的安全性研究[J].云南中医中药杂志,2006,27(5):37-39.
- [10] 耿家玲,孙小玲,罗燕,等.水提三七总皂苷胶囊的安全性研究[J].云南中医中药杂志,2006,27(5):36-38.
- [22] 刘进.中药化学成分抗内毒素研究现状[J].医药导报,2004,23(7):486-488.
- [23] 高淑娟,戴锡珍,要华民.几种清热解毒中药抗内毒素作用的比较实验[J].天津中医,1992,9(3):42.
- [24] 房海.大肠埃希氏菌[M].石家庄:河北科学出版社,1997:179-183.
- [25] 方芳,吕昭萍,王正文,等.山苍子油抗念珠菌的敏感性及其作用机理的电镜研究[J].中华皮肤科杂志,2002,35(5):349-351.
- [26] 张文平,傅颖媛,谢小梅.柠檬醛、肉桂醛抗曲霉作用机制研究[J].江西医学院学报,2003,43(6):10-14.
- [27] 韩冬,徐锡鸿.细菌黏附和中医药抗细菌黏附研究进展[J].辽宁中医杂志,1994,21(12):569-570.
- [28] 康梅,许秀成.三黄片对大肠杆菌耐药质粒消除作用的研究[J].华西药学杂志,1999,14(5):406-408.
- [29] 鞠洪涛,韩文瑜,王世若,等.大肠杆菌耐药基因定位及耐药质粒消除[J].中国兽医学报,2000,20(6):561-562.