

黄连、五倍子醇提物 对罗非鱼源性链球菌生长曲线的影响

李一珊¹, 倪晨¹, 童建辉², 林吉^{1*}, 赖小平¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广东恒发集团有限公司, 广州 510730)

[摘要] **目的:**探讨黄连、五倍子醇提物对罗非鱼源性链球菌抑制活性。**方法:**采用BHI(脑心浸液肉汤)固体培养基琼脂稀释法分别检测黄连、五倍子醇提物对链球菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC);选取五倍子生药质量浓度MIC(3.125 g·L⁻¹)为该实验的低浓度、2倍MIC为中质量浓度(6.25 g·L⁻¹)、3倍MIC为高质量浓度(9.375 g·L⁻¹)。黄连生药质量浓度MIC(13.33 g·L⁻¹)为低浓度、MBC(20.00 g·L⁻¹)为中浓度、2倍MIC(26.67 g·L⁻¹)为高浓度。挑取链球菌单菌落于各组中,搅拌后,于37℃ 200 r·min⁻¹的条件下培养,于0.5,1.5,2.5,3.5,4.5,5.5,6.5,7.5,8.5 h取样,计算菌落数,并绘制体外杀菌曲线,观察低、中、高浓度下黄连和五倍子醇提物链球菌的动态杀菌过程。**结果:**五倍子醇提物低浓度和中浓度、高浓度分别在2.5,0.5 h出现抑菌作用。高、中、低浓度分别在6.5,8.5,8.5 h达到杀菌效果。黄连醇提物各浓度在0.5 h出现抑菌作用。高、中、低浓度分别在2.5,4.5,4.5 h达到杀菌效果。**结论:**黄连和五倍子均有较强的体外抑菌杀菌作用,特别是黄连,使无乳链球菌无正常生长周期,直接进入衰竭期,达到杀菌效果。

[关键词] 黄连95%乙醇提取物;五倍子70%乙醇提取物;最小抑菌浓度;杀菌曲线

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0234-04

Effect of Coptidis Rhizoma and Galla Chinensis Ethanol extract on the Growth Curve of *Streptococcus agalactiae* from Tilapia

LI Yi-shan¹, NI Chen¹, TONG Jian-hui², LIN Ji^{1*}, LAI Xiao-pin¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2 Guangdong Hengfa Group Co., Ltd, Guangzhou 510730, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antifungal effect and antifungal mechanism of the essential ethanol extract of Coptidis Rhizoma and Galla Chinensis on *Streptococcus agalactiae* from viscera of ill tilapia. **Method:** Low concentration and middle concentration were determined by the agar dilution method (Brain Heart Infusion Broth). Select Galla Chinensis MIC (3.125 g·L⁻¹), 2 time MIC (6.25 g·L⁻¹), 3 time MIC (9.375 g·L⁻¹) for the experiment concentration. Select Coptidis Rhizoma MIC (13.33 g·L⁻¹), MBC (20.00 g·L⁻¹), 2 time MIC (26.67 g·L⁻¹) for the experiment concentration. The single colony was selected into medium, cultured on the 37℃ 200 r·min⁻¹, under the three concentrations, on the 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 h samples were collected and the quantity of the bacterial colony was counted. Then, time-kill curves observation of the *S. agalactiae* was carried out. **Result:** The antifungal effect of Galla Chinensis low concentration on occurred from 2.5 h, until 8.5 h. The antifungal effect of middle concentration and high concentration from 2.5 h, until 6.5 h. The antifungal effect of Coptidis Rhizoma, middle concentration and high concentration was found at 2.5 h, low concentration at 4.5 h. **Conclusion:** The Coptidis Rhizoma and Galla Chinensis has powerful antifungal effect.

[收稿日期] 20121017(002)

[基金项目] 广东省科学技术厅项目(2011B090400543);“十二五”国家科技支撑计划课题(2011BAI01B01)

[第一作者] 李一珊,硕士研究生,从事中药新药研究开发,Tel:15521139887,E-mail:574034859@qq.com

[通讯作者] *林吉,博士,教授,从事中药新药研究开发,Tel:13602793023,E-mail:LJDT888@163.com

[Key words] 95% ethanol extract of *Coptidis Rhizoma*; 70% ethanol extract of *Galla Chinensis*; MIC; time-kill curves

罗非鱼(*Mossabica tilapia*),俗称非洲鲫鱼,原产于非洲,有600多种,目前被养殖的有15种。罗非鱼以其“生长快、适应性和抗病力强”等优势备受养殖户推崇,然而在罗非鱼养殖的密集区,暴发性疾病时有发生。危害罗非鱼健康的疾病以生物源性为主,集中在细菌性疾病上。其中,链球菌病是全球公认的罗非鱼最重要的病原体,每年在全球范围内造成大批的罗非鱼死亡^[1]。所以防治罗非鱼链球菌病刻不容缓。

有研究表明,五倍子提取物对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌、白假丝酵母以及耐药菌株都表现出良好的抗菌活性。黄连也有抗菌作用,且抗菌谱广,常用于解热镇痛、抗肠道细菌感染^[2-5]。本课题通过筛选大量中药提取物的体外抗链球菌作用,结果证明五倍子和黄连对链球菌具有抑菌作用。笔者通过预试验考察体外抑制链球菌结果,选择黄连95%乙醇提取物和五倍子70%乙醇提取物为该实验供试品。本实验通过研究五倍子和黄连对链球菌生长曲线的影响进一步探讨它们抑菌作用。

1 材料

1.1 菌种 实验菌株从罗非鱼病鱼(广州恒发水产有限公司提供)体内分离纯化所得,经显微观察及过氧化氢酶、溶血性、精氨酸水解、马脲酸水解、七叶苷水解、菊糖、甘露醇、棉籽糖、核糖、水杨苷、山梨醇、海藻糖、乳糖的生化鉴定为无乳链球菌。

1.2 药物与试剂 五倍子 *Galla Chinensis*、黄连为味连 *Coptidis Rhizoma*,由广州思国药材行购买经广州中医药大学中药鉴定教研室鉴定(批号20110822);阳性对照头孢氨苄胶囊(石药集团欧意药业有限公司,批号054090),琼脂粉(批号20110530),脑心浸液肉汤(批号20101020,青岛高科园海博生物技术)。

1.3 仪器 单人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司),高压蒸气灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司),恒温培养箱(池本理化业株式会社),空气浴振荡器(哈尔滨市东联电子科技开发有限公司),旋转蒸发器(EYELA Rotary Evaporator N-1001),ZF90型暗箱式紫外透射仪(上海顾村光电仪器厂),水浴锅(精科华瑞)、提取浓缩干燥罐(中国温州天众机械制造有限公司 TD-200)。

2 方法

2.1 五倍子供试品制备 称取15 g五倍子,分别用10倍量,8倍量70%乙醇60℃回流提取1.5 h。抽滤后减压浓缩至生药浓度为1 g·mL⁻¹,常温干燥成粉末,制得五倍子醇提物。该醇提物经有机试剂处理,以没食子酸为对照品。254 nm下检视,供试品与对照品显示相同颜色斑点。根据《中国药典》2005年版一部附录XB项下方法测定五倍子中的鞣酸含量30.2%。通过固体培养基琼脂稀释法^[6-8]确定MIC(生药量3.125 g·L⁻¹)为该实验的低浓度,6.25,9.375 g·L⁻¹为中、高质量浓度。阳性对照头孢氨苄实验浓度为固体培养基琼脂稀释法确定MIC(0.83 g·L⁻¹)。

2.2 黄连供试品制备 称取15 g黄连,分别用10倍量,8倍量95%乙醇60℃回流提取1 h。抽滤后减压浓缩至含生药质量浓度为1 g·mL⁻¹,常温干燥成粉末,制得黄连醇提物。该醇提物经有机试剂处理,盐酸小檗碱对照品。检测波长为345 nm,经HPLC测得供试品中小檗碱含量为6.12%。选定通过固体培养基琼脂稀释法确定MIC(生药量13.33 g·L⁻¹)为该实验的低浓度,另外选20.00,26.67 g·L⁻¹为中、高浓度。阳性对照头孢氨苄实验浓度同2.1。

2.3 五倍子供试品稀释梯度的确定和平板计数 用接种环分别挑取链球菌单菌落于各组中,搅拌后,置于空气振荡摇床中37℃200 r·min⁻¹的条件下培养,于0.5,1.5,2.5,3.5,4.5,5.5,6.5,7.5,8.5 h取0.1 mL培养液,用10倍递增稀释法选取预试验稀释倍数,取0.1 mL于平板涂布,置于温箱37℃0.5% CO₂条件下过夜培养,计数。生药量3.125,6.25,9.375 g·L⁻¹为该实验的低,中,高浓度。

2.4 黄连供试品稀释梯度的确定和平板计数 操作步骤同2.3,取样时间点为0.5,1.5,2.5,3.5,4. h。

3 结果

3.1 各浓度五倍子供试品对无乳链球菌生长曲线的影响 由图1可知,在五倍子供试品的影响下该无乳链球菌不能进入正常的生长周期,在低浓度下,2.5 h之前与空白对照相比呈现有缓慢增长趋势,2.5 h之后进入衰竭期,在7.5~8.5 h杀菌速度最快。8.5 h之后维持完全杀菌效果。在中浓度下,0.5 h后直接进入衰竭期,在4.5~6.5 h杀菌速度

表 1 各浓度五倍子供试品无乳链球菌生长曲线测定各时间点的稀释倍数

分组	质量浓度 /g·L ⁻¹	稀释倍数								
		0.5 h	1.5 h	2.5 h	3.5 h	4.5 h	5.5 h	6.5 h	7.5 h	8.5 h
空白对照	-	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
头孢氨苄	0.83	10 ³	1 000	10	-	-	-	-	-	-
五倍子	3.125	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ³	1 000	-
	6.25	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	1 000	10	-	-	-
	9.375	10 ⁴	10 ³	10 ³	1 000	10	-	-	-	-

注:低浓度为 MIC(生药量 3.125 g·L⁻¹),2 倍 MIC 为中浓度(生药量 6.25 g·L⁻¹),3 倍 MIC 为高浓度(生药量 9.375 g·L⁻¹)。阳性对照头孢氨苄浓度为 MIC(0.83 g·L⁻¹)。

表 2 各浓度黄连供试品对链球菌生长曲线测定各时间点的稀释倍数

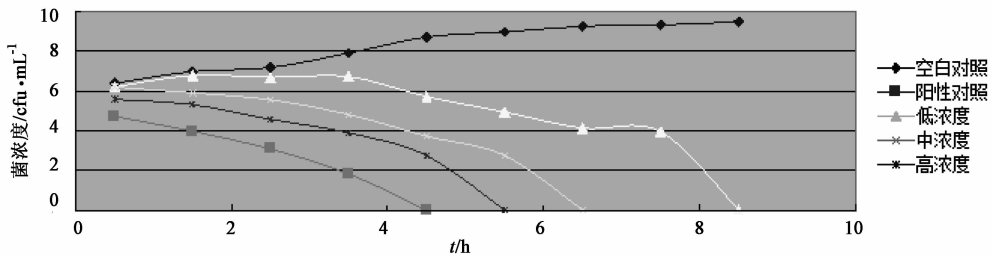
分组	质量浓度 /g·L ⁻¹	稀释倍数				
		0.5 h	1.5 h	2.5 h	3.5 h	4.5 h
空白对照	-	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
头孢氨苄	0.83	10 ³	1000	10	-	-
黄连	13.33	10 ⁴	10 ³	10 ²	1	-
	20.00	10 ⁴	10 ²	-	-	-
	26.67	10 ⁴	10 ²	-	-	-

注:低浓度为 MIC(生药量 13.33 g·L⁻¹),MBC(生药量 20.00 g·L⁻¹)为中浓度,2 倍 MIC(生药量 26.67 g·L⁻¹)为高浓度。阳性对照头孢氨苄实验浓度为 MIC(0.83 g·L⁻¹)。

最快,6.5 h 之后维持完全杀菌效果。在高浓度下,在 3.5~5.5 h 杀菌速度最快,5.5 h 之后维持完全杀菌效果。阳性对照组在 3.5 h 达到完全杀菌效果,与高浓度组相比,提前 2 h 达到杀菌效果。

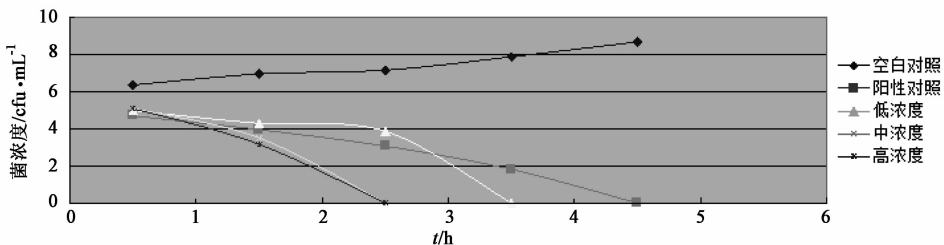
3.2 各浓度黄连供试品对链球菌生长曲线的影响

由图 2 可知,各浓度黄连供试品在 0.5 h 已显示出抑菌效果,均直接进入衰竭期。低浓度在 2.5~4.5 h 杀菌速度最快,在 4.5 h 后持续完全杀菌效果。高浓度和中浓度在 1.5~2.5 h 杀菌速度最快,在 2.5 h 之后持续完全杀菌效果,与阳性对照相比,提前 1 h 达到杀菌效果。



五倍子醇提取物低浓度为 MIC(生药量 3.125 g·L⁻¹);2 倍 MIC 为中浓度(生药量 6.25 g·L⁻¹);3 倍 MIC 为高浓度(生药量 9.375 g·L⁻¹)。阳性对照头孢氨苄浓度为 MIC(0.83 g·L⁻¹)。

图 1 各浓度五倍子供试品对无乳链球菌杀菌曲线



黄连醇提取物低浓度为 MIC(生药量 13.33 g·L⁻¹);MBC(生药量 20.00 g·L⁻¹)为中浓度;2 倍 MIC(生药量 26.67 g·L⁻¹)为高浓度;阳性对照头孢氨苄实验浓度为 MIC(0.83 g·L⁻¹)。

图 2 各浓度黄连供试品对无乳链球菌杀菌曲线

4 讨论

通过研究最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 和最低杀菌浓度 (minimal bactericidal concentration, MBC) 下链球菌的生长抑制情况,对黄连和五倍子抗菌动物实验的剂量选取和基础研究提供数据支持和理论指导意义。并且选择 2 倍 MIC (中浓度) 和 3 倍 MIC (高浓度) 作为供试浓度,探讨供试品浓度与菌落数是否呈一定的线性关系,结果,黄连供试品在 1 h 取样点各浓度与菌落数呈一定线性关系,五倍子供试品在 2.5 h 取样点各浓度与菌落数呈一定线性关系。

在五倍子供试品的杀菌曲线中,在低浓度下,2.5 h 之前与空白对照相比呈现有缓慢增长趋势,2.5 h 之后进入衰竭期,在 7.5 ~ 8.5 h 杀菌速度最快。8.5 h 之后维持完全杀菌效果。在中浓度下,0.5 h 后直接进入衰竭期,在 4.5 ~ 6.5 h 杀菌速度最快,6.5 h 之后维持完全杀菌效果。在高浓度下,在 3.5 ~ 5.5 h 杀菌速度最快,5.5 h 之后维持完全杀菌效果。在黄连各浓度供试品杀菌曲线中,0.5 h 有抑菌效果,均直接进入衰竭期。低浓度在 2.5 ~ 4.5 h 杀菌速度最快,在 4.5 h 后维持完全杀菌效果。高浓度 ($26.67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和中浓度 ($20.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 杀菌曲线相似,说明提取物抑制细菌生长的活性与其浓度之间并不呈正比关系,而是表现成一种最适的杀菌曲线。在 1.5 ~ 2.5 h 杀菌速度最快,在 2.5 h 之后维持完全杀菌效果,并且较之阳性对照组,提前 1h 达到杀菌效果。通过比较它们的杀菌曲线,可得出它们均能有效、快速的抑菌杀菌的结论。五倍子对细菌的抑制作用主要通过抑制细菌代谢所需的酶类而产生,而对细菌没有直接杀灭作用^[9]。链球菌的生长调整期为 1 ~ 4 h,此期中细菌体积增大,代谢活跃,为细菌的分裂增殖合成、储备充足的酶、能量及中间代谢产物。而黄连高中低浓度在 4 h 之内

均达到完全抑菌效果。黄连通过影响调整期的某个过程,有可能通过抑制细菌的 DNA 合成,从而抑制致病菌的增殖生长^[10]。

黄连和五倍子均有较强的体外抑菌杀菌作用,特别是黄连,使无乳链球菌无正常生长周期,直接进入衰竭期,达到杀菌效果,在实际养殖中,可用于急症和重症的治疗,而五倍子可预防为主,降低对链球菌病的易感性及应激性。

[参考文献]

- [1] 汪开毓,陈德芳,赵敏,等. 罗非鱼主要疾病介绍与防治技术[J]. 科学养鱼,2010,6:12.
- [2] 王荣. 不同炮制方法对黄连主成分含量及抗菌活性的影响[J]. 中国医药导报,2012,9(1):58.
- [3] 向丽,周铁军,叶迎春,等. 五倍子鞣质提取物对白假丝酵母的抗菌活性研究[J]. 现代医药卫生,2012,28(12):1785.
- [4] 赵保胜,刘永刚,王秀丽. 黄连解毒汤解热、抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(11):55.
- [5] 王莉,赵桦. 小从红景天脂溶性成分及抗菌活性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):127.
- [6] 邓琪,梁粤,郭丽冰,等. 三丫苦对乙型溶血性链球菌的体外抗菌作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):123.
- [7] 马建苹,胡志明,张云丁,等. 阳荷提取物体外抗菌作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):206.
- [8] 史跃杰. 黄芩、黄连水煎剂对厌氧菌的体外抑菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):226.
- [9] 谢倩,李继遥,左渝陵,等. 天然药物五倍子提取物对致龋菌生长的影响[J]. 华西口腔医学杂志,2005,23(1):82.
- [10] 陶翠,魏琴,殷中琼,等. 油樟叶挥发油对三种真菌的抗菌效果[J]. 中国兽医科学,2011,41(01):89.

[责任编辑 聂淑琴]