

复方中药体外抗猪衣原体活性研究

王金福, 张永霞, 顾剑新, 王彤光, 孙维平, 曹彩琴

(上海农林职业技术学院, 上海 201600)

[摘要] 应用微量 Vero 细胞培养法, 检测复方中药的体外抗衣原体活性, 为防治猪衣原体病提供依据。结果表明, 复方中药的 MIC 值是 39.06 mg/mL, 随着中药浓度升高, 包涵体的体积缩小、数量减少, 直至消失, 对照组未见中药对 Vero 细胞有毒性作用。试验结果显示, 复方中药体外对猪衣原体有抗菌活性。

[关键词] 复方中药; 衣原体; 抗菌活性

[中图分类号] S811.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1005-5228(2014)08-0070-02

猪衣原体病是由鹦鹉热衣原体感染引起的一种人、兽、禽类共患的接触性传染病。主要表现为母猪繁殖障碍, 公猪睾丸炎, 仔猪肺炎、肠炎及多发性关节炎等症状, 持续潜伏传染为猪衣原体病的主要流行病学特征^[1]。不同年龄、不同品种的猪均易感染, 一般以怀孕母猪和仔猪多发, 给养猪业带来了很大的损失^[2]。人的医学临床研究上有报道部分清热中药方剂对衣原体有比较好的治疗效果^[3], 但在养猪业上是否具有抗衣原体活性仍不清楚。本试验用微量 Vero 细胞培养法, 对由柴胡、黄连、鱼腥草、大青叶、当归等中药组成的复方制剂在体外抗猪衣原体的活性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验用中药 柴胡、黄连、鱼腥草、大青叶、当归等中药原料均购自上海余天成医药有限公司, 按常规水提法进行中药有效成分的提取, 即先用蒸馏水按 10:1 的比例浸泡 1 h, 大火烧开煮沸后换文火维持 30 min, 收集滤液, 向残渣中再加蒸馏水煮沸 30 min, 过滤, 将 2 次滤液合并。蒸发浓缩成 1 g/mL 的水煎剂, 调 pH 7.2~7.4, 2 500 rmp/min 离心 10 min, 过滤, 将滤液分装成 5 mL/瓶的规格, 高压灭菌消毒后放 4℃冰箱保存备用。

1.1.2 猪衣原体菌株 猪衣原体菌株为从松江一家庭农场的猪只中分离得到的, 经 SPF 鸡胚中传 6

代, Vero 细胞传 3 代, 能在 Vero 细胞上形成稳定的包涵体的菌株。

1.1.3 单层 Vero 细胞的制备 Vero 细胞用 1640 培养液培养(含 10%乳牛血清)培养, 取 200 μ L Vero 细胞悬液滴入 96 孔微量细胞培养板, 置 37℃培养箱中培养 24 h, 待细胞长成致密单层后备用。

1.2 方法

1.2.1 衣原体接种 取生长合格的 Vero 细胞, 弃去培养液, 用 pH7.2 的 Hanks 液轻洗细胞 2 次, 按原培养液的 10%加入衣原体接种液, 37℃吸附 2 h 后弃去, 每孔加入 100 μ L 含放线菌酮(2 μ g/mL)的衣原体分离培养液待用^[4]。

1.2.2 复方中药制剂抗衣原体活性试验 试验共设计 3 组: 第一组是不含中药的衣原体阳性对照组、第二组是不含衣原体中药对照组、第三组是中药与衣原体作用组, 每组做 8 个重复。中药组是将 1 g/mL 中药用 Hanks 液倍比稀释成系列浓度后, 分别取 100 μ L 加入到接种好的 Vero 细胞的微量培养板, 于 37℃继续培养 120 h 后弃去培养液, 用 95%乙醇固 5 min 后, 姬姆萨染色镜检观察胞浆内是否有包涵体形成。

1.2.3 结果判断 染色后在光镜下镜检, 在无中药阳性对照组中每孔均能看到衣原体包涵体, 不加衣原体中药阴性对照组细胞生长良好的条件下, 再看中药组的试验结果。光镜下未见到包涵体的最低浓度为该中药的最小抑菌浓度(MIC)。

[收稿日期] 2013-10-17, 修回日期: 2013-12-03

[基金项目] 上海农林职业技术学院科研资助项目(091024)

[作者简介] 王金福(1977-), 男, 河南民权人, 硕士, 副教授, 主要从事动物临床疾病的诊疗与教学工作。E-mail: wjf3027@126.com

2 结 果

衣原体经 Vero 细胞培养 120 h 后,抗衣原体活性检测结果表明:中药组具有抗衣原体作用,具体见

表 1。在光镜下观察到随着中药浓度升高,包涵体的体积缩小、数量减少,直至消失。而阳性对照则每孔均有包涵体出现,试验中未发现中药制剂对 Vero 细胞的生长有影响。

表 1 复方中药制剂体外抗衣原体活性(MIC)
Table 1 Anti-chlamydial activity of compound Chinese medicine in vitro(MIC)

重复 Times	浓度 Concentration/(mg/mL)								
	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95
1	—	—	—	—	—	+	++	++	++++
2	—	—	—	—	—	+	++	++	+++
3	—	—	—	—	—	+	++	++	+++
4	—	—	—	—	+	+	++	++	++++
5	—	—	—	—	—	+	++	++	++++
6	—	—	—	—	—	+	++	++	++++
7	—	—	—	—	+	+	++	++	++++
8	—	—	—	—	—	+	++	++	++++

备注:“—”代表无包涵体,“+”代表有包涵体。
Notes:“—”means no inclusion;“+”means inclusion.

3 小 结

在动物临床上可用于治疗猪衣原体病的药物种类相对较少,加之耐药性问题在动物临床日益严峻,导致抗菌药物的使用受限^[5]。选择中药制剂来治疗猪衣原体病是一个方向,尽管中药制剂在猪衣原体治疗上尚不够成熟,但通过体外抗猪衣原体活性实验,将为筛选有效中药和研究其作用机理提供理论依据。

本研究表明,试验所设计的中药复方制剂具有体外抗猪衣原体活性,而且未发现对 Vero 细胞生长有影响,说明应用 Vero 细胞培养法检测复方中药制剂的体外抗猪衣原体活性是可行的。这为兽医临床筛选具有抗猪衣原体活性的中药制剂提供了一

个有效的手段和途径。

参考文献:

[1] 邱昌庆,程淑敏,周继章,等. 规模化猪场猪衣原体病的检测[J]. 中国兽医杂志,2000,26(3):23-24.
[2] 白挨泉,冯国金. 广东部分地区猪衣原体病的血清学调查[J]. 中国畜牧兽医,2004,31(12):37-39.
[3] 李建军,涂裕英,佟 菊. 泌尿生殖道沙眼衣原体清热中药的药敏试验[J]. 中国性病艾滋病防治,2001,7(1):31-32.
[4] Hinton D G, Shipley A, Galvin J. W, et al. Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant[J]. Austrlian Veterinary Journal, 1993, 70 (5):174-176.
[5] Nagy B, Fekete P Z. Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals[J]. Veterinary Research, 1999, 30 (223): 259-284.

Study on Anti-swine Chlamydia Activity of Compound
Traditional Chinese Medicine in Vitro

WANG Jin-fu, ZHANG Yong-xia, GU Jian-xin, WANG Tong-guang, SUN Wei-ping, CAO Cai-qin
(Shanghai Vocational College of Agriculture and Forestry, Shanghai 201600, China)

Abstract: Micro-scale Vero cell culture method was employed to detect the anti-Chlamydia activity of compound traditional Chinese medicine so as to hopefully provide prescription reference for veterinary clinic treatment. The results showed that the MIC value of compound Chinese medicine was 39.06 mg/mL. And as the concentration of Chinese medicine rose, the size and number of inclusion bodies reduced and decreased till it totally disappeared. In the control group, no toxic effect of traditional Chinese medicine on Vero cells was observed. According to the experiment results, compound traditional Chinese medicine had anti-swine Chlamydia activity in vitro.

Key words: compound traditional Chinese medicine; chlamydia; antibacterial activity