

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.09.005

均匀设计法优选抗雏鸡白痢翁菟颗粒^①

魏 薇, 石 磊, 刘 娟,
黄文鹏, 莫孔源, 陈 晓

西南大学 兽医科学工程研究中心中药创新研究室, 重庆 荣昌 402460

摘要: 利用均匀设计法及回归分析优选抗雏鸡白痢的中药组方翁菟颗粒。结合中兽药组方原则, 将白头翁、马齿苋、苍术、陈皮等中药进行组方配伍, 采用均匀设计法及回归分析, 以不同配比的翁菟颗粒对鸡白痢沙门氏菌的体外抑菌效果作为考察指标, 运用中兽医整体观念及体外抑菌活性评价筛选最优处方。采用腹腔注射鸡白痢沙门氏菌液的方法复制雏鸡白痢的病理模型, 通过在饲料中添加一定比例的翁菟颗粒, 于试验后统计有效率、治愈率。翁菟方 28 的组分配比为最佳处方, 最优处方配比的翁菟颗粒高剂量组对雏鸡白痢的治愈率、有效率均为 91.7%。该试验筛选出的优化复方制备处方翁菟颗粒能够有效防治雏鸡白痢。

关键词: 翁菟颗粒; 均匀设计; 回归分析; 鸡白痢; 抑菌

中图分类号: S858.31

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)09-0029-06

鸡白痢是由鸡白痢沙门氏菌引起的任何日龄的鸡均可发生的一种传染病, 雏鸡发病表现出急性败血性经过, 以发热、拉灰白色粥样或粘性液状粪便为特征^[1]。在集约化、高密度生产条件下, 不仅鸡白痢的发生日益严重, 而且在流行、发生、药敏及用药途径等方面出现了一些新变化^[2]。目前, 抗菌药物的应用仍然是其防治的重要手段。由于大量抗生素的使用, 导致沙门氏菌的耐药性逐渐增加和残留^[3-4]。因此, 寻求防治鸡白痢等细菌性疾病疗效好、无抗药性、低残留的药物是当前防治鸡白痢急待解决的课题之一。中草药不仅具有防病治病, 促进生长发育的作用, 而且还能提高生产性能, 调节机体免疫力, 且对沙门氏菌有明显的抑杀作用^[5-6]。

均匀设计主要通过让试验点在其试验范围内“均匀分散”, 通过计算机运用多元逐步回归统计分析各实验因素对实验结果的影响, 得出理论的最佳优化实验参数^[7]。将中药复方组方划分成多个剂量水平, 运用均匀设计方法进行优化, 使试验样本能够充分反映中药复方不同组分配伍情况, 结合有关药效学模型筛选中药有效组分药物之间的最佳配比^[8]。本次试验按照中兽医整体观念及方剂组成原则, 选用白头翁、苍术、马齿苋、五倍子等 7 味中药组成中药组方翁菟颗粒。运用均匀设计对翁菟颗粒进行中药类组分配伍的初步研究, 筛选出一种抗雏鸡白痢的中药组方最佳配伍, 为临床防治鸡白痢提供新的手段和技术。

1 材料与方法

1.1 试验动物和菌种

120 只健康三黄鸡, 购自四川刘氏种禽场, 雌、雄各半, 体质量为 45.4~46.0 g。鸡白痢沙门氏菌由西

① 收稿日期: 2017-06-08

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201303040-05); 农业部科技基础性工作专项(2013FY110600-03)。

作者简介: 魏 薇(1991-), 女, 硕士研究生, 主要从事中兽医药研究。

通信作者: 刘 娟, 教授。

南大学荣昌校区微生物实验室提供。

1.2 试验药品及试剂

翁菟颗粒,由西南大学荣昌校区兽医科学研究中心中药创新研究室研制;鸡痢灵散,广东省天宝生物制药有限公司,批号:20141101;营养琼脂,北京奥博星生物技术有限责任公司,批号:20150202;营养肉汤,青岛高科园海博生物技术有限公司,批号:20140312;其他试剂均为分析纯。

1.3 牛津杯法测定翁菟颗粒对鸡白痢沙门氏菌的抑菌作用

本试验设计为 7 因素 30 水平。其中,白头翁、马齿苋等 7 味中药为 7 个因素,各药物的不同配比为水平数。用 Uniform Design Version 3.00 软件筛选出 $U_{30}(30^{13})$ 表安排试验,其设计水平见表 1。将各组不同配比的翁菟颗粒用传统煎煮法^[9]提取中药药液,药液经 80 °C 恒温水浴浓缩至生药量 1 g/mL,115 °C 高压灭菌 20 min,4 °C 保存备用。用牛津杯法^[10]做翁菟颗粒对鸡白痢沙门氏菌的体外抑菌试验,用移液枪吸取 0.2 mL 的灭菌药液到牛津杯中,将平皿放入培养箱 37 °C 恒温培养 24 h。用 96 孔板法^[11]测定翁菟颗粒对鸡白痢沙门氏菌的 MIC(最小抑菌浓度)值,每组药做 3 个平行小组。药物和菌液上样完毕后,保鲜膜覆盖表面,置于 37 °C 培养 18~24 h。将每一组药物第 2~10 孔在 SS 琼脂培养基上分区划线接种,37 °C 培养箱中培养 6 h 后取出,观察平皿上细菌生长的情况,判定翁菟颗粒的最小抑菌浓度。

表 1 $U_{30}(30^{13})$ 均匀试验设计

组别	白头翁	苍术	陈皮	厚朴	马齿苋	五倍子	白芍
翁菟方 1	1	4	6	9	11	28	29
翁菟方 2	2	8	12	18	22	25	27
翁菟方 3	3	12	18	27	2	22	25
翁菟方 4	4	16	24	5	13	19	23
翁菟方 5	5	20	30	14	24	16	21
翁菟方 6	6	24	5	23	4	13	19
翁菟方 7	7	28	11	1	15	10	17
翁菟方 8	8	1	17	10	26	7	15
翁菟方 9	9	5	23	19	6	4	13
翁菟方 10	10	9	29	28	17	1	11
翁菟方 11	11	13	4	6	28	29	9
翁菟方 12	12	17	10	15	8	26	7
翁菟方 13	13	21	16	24	19	23	5
翁菟方 14	14	25	22	2	30	20	3
翁菟方 15	15	29	28	11	10	17	1
翁菟方 16	16	2	3	20	21	14	30
翁菟方 17	17	6	9	29	1	11	28
翁菟方 18	18	10	15	7	12	8	26
翁菟方 19	19	14	21	16	23	5	24
翁菟方 20	20	18	27	25	3	2	22
翁菟方 21	21	22	2	3	14	30	20
翁菟方 22	22	26	8	12	25	27	18
翁菟方 23	23	30	14	21	5	24	16
翁菟方 24	24	3	20	30	16	21	14
翁菟方 25	25	7	26	8	27	18	12
翁菟方 26	26	11	1	17	7	15	10
翁菟方 27	27	15	7	26	18	12	8
翁菟方 28	28	19	13	4	29	9	6
翁菟方 29	29	23	19	13	9	6	4
翁菟方 30	30	27	25	22	20	3	2

1.4 翁菟颗粒的制备

向翁菟方 28 的提取液中加入占提取液总量 30% 的玉米淀粉和 1% 的蔗糖, 迅速搅拌至混合均匀, 向混合液中加入少量的水, 将混合物揉搓至干燥的分散体状, 过 12 目筛制成颗粒物, 将颗粒物置烘箱中, 60 °C 烘干 8 h.

1.5 对人工感染鸡白痢雏鸡防治效果试验分组及处理

将 120 只 1 日龄雏鸡随机分为空白组、模型组、阳性药物组、翁菟颗粒高、中、低剂量组, 每组 20 只, 空白组、模型组给予生理盐水, 阳性药物组给予 0.5 g/只鸡痢灵散, 翁菟颗粒高、中、低剂量组分别给予 0.5 g/只、0.3 g/只、0.1 g/只的用量拌料饲喂, 2 次/d, 连续 7 d 后模型组与各药物组雏鸡腹腔注射含 4.9×10^7 CFU 鸡白痢沙门氏菌的菌液. 随后, 各药物组再连续喂药 7 d.

模型建立判定标准^[12-13]: 攻毒后 1 d 雏鸡排出白色粪便, 剖检可见心肌有灰白色粟粒样节, 肝肿大、被膜下有灰白色坏死灶. 细菌学检查: 病料压片镜检为革兰氏阴性小杆菌, 接种于麦康凯培养基上, 37 °C, 24 h, 生长出较密集的圆形、光滑、湿润和半透明无色小菌落. 显微镜下可见粉红色、两端钝圆的小杆菌.

防治效果判定标准^[13]: ① 有效, 在试验期间, 给药后鸡的精神状态好转、食欲恢复; ② 治愈, 在试验期间, 给药后鸡的精神状态和食欲恢复正常, 不再出现白色稀粪等临床症状的均属治愈; ③ 死亡, 在试验期间, 出现鸡白痢病的典型症状并死亡, 剖检有典型的特征性病变, 并从肝脏、脾脏或肺脏中分离培养出鸡白痢沙门杆菌的判断为感染死亡.

1.6 数据处理

试验数据用 Uniform Design Version 3.00 作逐步回归分析, 用 SPSS 20.0 统计软件进行显著性检验和方差分析.

2 结果与分析

2.1 翁菟颗粒对鸡白痢沙门氏菌的抑菌效果

根据药物敏感试验判定标准^[14], 翁菟颗粒对鸡白痢沙门氏菌均极度敏感, 翁菟方 21 的药物配比对鸡白痢沙门氏菌的抑菌效果最佳. 体外抑菌试验结果显示, 翁菟方 11、翁菟方 21 的 MIC 值最小, 试验结果详见表 2. 用均匀设计软件 Uniform Design Version 3.00 对抑菌圈直径试验结果作逐步回归分析, 建立函数模型. 方差分析中 $R^2 = 0.9885$, $F = 2400$, $F_{1,28(0.01)} = 7.636$, $F > F_{1,28(0.01)}$, 回归方程在置信度为 99% 的水平下显著. 拟建的函数模型可行, 组方最佳用量取决于 X6(五倍子) 的值, X6(五倍子) 的用量越大, Y 值(抑菌圈直径) 越大.

2.2 翁菟颗粒对人工感染鸡白痢雏鸡的防治效果

试验结果显示, 模型组雏鸡排白色粪便, 抽取雏鸡病理剖检发现肝肿大、被膜下有灰白色坏死点, 心肌有灰白色粟粒样结节, 细菌学检查符合鸡白痢沙门氏菌判定标准. 翁菟颗粒高、中剂量组和阳性药物组雏鸡精神、食欲无特殊异常状况, 无典型的鸡白痢临床症状; 翁菟颗粒低剂量组有少数雏鸡表现精神抑郁、食欲欠佳, 有轻微腹泻的临床症状. 试验前、攻毒后各组分别取 4 只雏鸡剖检采样, 统计攻毒后至试验后各组雏鸡的治愈率和有效率. 翁菟颗粒高剂量组与阳性药物组治愈率、有效率最高, 均为 91.7%; 翁菟颗粒中剂量组治愈率、有效率均为 83.3%; 翁菟颗粒低剂量组治愈率为 75%, 有效率为 83.3%.

表 2 翁菟颗粒对鸡白痢沙门氏菌的抑菌效果($\bar{x} \pm SD$)

组别	抑菌圈直径/mm	MIC 值/(mg · L ⁻¹)
翁菟方 1	24.47±0.06BCbc	20.83±9.02CDd
翁菟方 2	24.37±0.06CDed	26.04±9.02CDed
翁菟方 3	24.13±0.06EFfg	26.04±9.02CDed
翁菟方 4	23.93±0.06GHij	20.83±9.02CDd
翁菟方 5	23.77±0.06IJKkl	26.04±9.02CDed
翁菟方 6	23.57±0.06LMmn	31.25±0.00BCDed
翁菟方 7	23.37±0.06NOopq	41.67±18.04BCDbcd
翁菟方 8	23.23±0.06OPQRrst	52.08±18.04ABCbc
翁菟方 9	23.13±0.06QRSTtuvw	62.50±0.00ABab
翁菟方 10	23.03±0.06Tw	83.33±36.08Aa
翁菟方 11	24.57±0.06ABab	15.63±0.00Dd
翁菟方 12	24.37±0.06CDed	26.04±9.02CDed
翁菟方 13	24.23±0.06DEef	26.04±9.02CDed
翁菟方 14	23.97±0.06GHhi	20.83±9.02CDd
翁菟方 15	23.83±0.06HIjkl	20.83±9.02CDd
翁菟方 16	23.67±0.06KLlm	26.04±9.02CDed
翁菟方 17	23.43±0.06MNop	31.25±0.00BCDed
翁菟方 18	23.27±0.06OPQqrs	52.08±18.04ABCbc
翁菟方 19	23.17±0.06QRSTstuv	62.50±0.00ABab
翁菟方 20	23.07±0.06STvw	83.33±36.08Aa
翁菟方 21	24.67±0.06Aa	15.63±0.00Dd
翁菟方 22	24.43±0.06BCc	20.83±9.02CDd
翁菟方 23	24.27±0.06DEde	26.04±9.02CDed
翁菟方 24	24.07±0.06FGgh	26.04±9.02CDed
翁菟方 25	23.87±0.06HIijk	20.83±9.02CDd
翁菟方 26	23.70±0.10JKLl	26.04±9.02CDed
翁菟方 27	23.47±0.06MNno	31.25±0.00BCDed
翁菟方 28	23.33±0.06NOPpqr	41.67±18.04BCDbcd
翁菟方 29	23.20±0.10PQRSstu	52.08±18.04ABCbc
翁菟方 30	23.10±0.10RSTuvw	62.50±0.00ABab

注:同一组中同列数据相同字母表示差异不具有统计学意义($p > 0.05$),不同小写字母表示差异具有统计学意义($p < 0.05$),不同大写字母表示差异极具有统计学意义($p < 0.01$).

3 讨 论

均匀设计为中药复方配伍理论及制剂工艺优化展开了一条新的探索思路和方法,并为复方中各味中药的剂量配比优化提供了可能,为研究复方作用于临床疾病的已知途径的效应组分提供理论依据^[7].运用均匀设计方法对经方进行研究,把其所对应的“证”作为考察指标,有助于深入认识“方证”的科学内涵^[15].我们以中医药理论为指导创制了防治雏鸡白痢的翁菟颗粒,在确定药物用量时为了探索更加客观、可靠的药物用量筛选标准和方法,选择了制剂学中常用的均匀设计方法.体外抑菌试验是考查抗细菌性疾病药物常用的简便而灵敏的指标,用来作为药效学判断标准.试验结果表明,翁菟颗粒各药物组合都有不同程度的抑菌效果.运用相关软件进行分析,得出了回归方程,从中可观察出各药对作用效果的贡献大小及优化用量的信息.

鸡白痢沙门杆菌病是危害养殖业的一种主要传染病^[16],按照中兽医理论,该病属湿热注入下焦,引起

气机阻滞,升降失常而致泻下,湿热壅滞大肠,脾虚气滞,治宜清热燥湿,解毒止泻^[17-18]。因此,选用清热解暑,凉血止痢功效^[19-20]的白头翁、马齿苋,清燥湿健脾和消食化积功效^[21-22]的苍术、陈皮,以及清涩肠止泻、止痛、行气消积功效^[23-25]的五倍子、白芍、厚朴。白头翁对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌最敏感,其次对志贺菌、枯草杆菌、伤寒杆菌等亦呈明显的抑制效应,其抗菌的有效成分为原白头翁素^[26]。马齿苋可食用,部分茎、叶中含有多种蛋白质、糖类等营养成分,研究证实马齿苋的根、茎叶提取物均对鸡白痢沙门氏菌有抑菌作用^[27]。苍术的挥发油中主要成分为 β -桉叶油醇、二苯基-4-甲醛、 β -桉叶烯、 α -桉叶油醇和茅术醇等,其挥发油对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、铜绿假单胞等病原菌有显著的抑制和灭活作用^[28]。中药材五倍子的主要化学成分是鞣质,五倍子具有抗菌、抗病毒等作用,五倍子水提物对沙门氏菌抑制效果显著^[23, 29]。厚朴煎剂具有广谱抗菌作用,其煎剂在体外对金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、霍乱弧菌、大肠杆菌、痢疾杆菌等均有抑制作用^[25]。由于五倍子是收敛药,而雏鸡腹泻初期不宜大量使用收敛药,根据中兽医整体观念,选用翁菟方 28 制备颗粒并用于雏鸡白痢的防治试验。

通过体外抑菌试验,结合中兽医整体观念及辨证论治原则,优选出翁菟颗粒的最佳配比,并用该配方进行雏鸡白痢的防治试验,通过统计试验后各组雏鸡的治愈率和有效率,证明该配方有显著的抗腹泻等功效,能有效防治雏鸡白痢。本次试验筛选出的优化复方制备处方翁菟颗粒能够有效防治雏鸡白痢。

参考文献:

- [1] 魏茂颖,朱春英,惠吉香. 鸡白痢的发病特点及防治措施 [J]. 安徽农学通报(下半月刊), 2010, 16(14): 72-73, 93.
- [2] 张洪波,赵明君. 近年来鸡白痢病的发生特点及综合防治措施 [J]. 今日畜牧兽医, 2007(5): 37-39.
- [3] COSTA R G, FESTIVO M L, ARAUJO M S, et al. Antimicrobial Susceptibility and Serovars of Salmonella Circulating in Commercial Poultry Carcasses and Poultry Products in Brazil [J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(12): 2011-2017.
- [4] 陆彦,吕安,赵红玉,等. 鸡源肠炎沙门氏菌对抗菌药物的耐药性分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(1): 17-22.
- [5] 代如意,李莉,殷中琼,等. 5味中药对鸡白痢沙门氏菌的体外联合抑菌研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(2): 34-37, 43.
- [6] 张为民,张彦明,郭抗抗,等. 朱砂七提取物体外抑菌和抗病毒活性部位筛选 [J]. 中国兽医学报, 2011, 31(5): 710-714, 719.
- [7] 徐维佳,周海虹,陈少东. 均匀设计在中药复方研究中的应用分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 236-239.
- [8] 曾真,程翼宇,沈国芳. 一种测定中药复方制剂中活性成分的计算分析方法 [J]. 化学学报, 2003, 61(1): 84-88.
- [9] 张莉,吴润,刘磊. 22种中草药对畜禽常见肠道病原菌的体外抑菌作用 [J]. 甘肃农业大学学报, 2012, 47(5): 7-11, 17.
- [10] 韩亚伟,左婷婷,陈利平,等. 韭菜提取液体外抑菌活性的均匀实验优化 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(2): 163-166.
- [11] 叶忱,王喆,钟青萍. 鱼鳞胶原蛋白基抗菌凝胶的抑菌效果 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(6): 106-111.
- [12] 杨婧,方一臻. 复方中草药对雏鸡感染沙门氏菌的药效学试验 [J]. 北京农业, 2012(24): 79-80.
- [13] 肖永霞,刘焕琦,邹明. 白痢净口服液对人工诱发雏鸡白痢的临床效果观察 [J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2009(23): 117-118.
- [14] 叶倩,左浩江,廖虹瑜,等. 粗壮女贞提取物的体外抑菌作用研究 [J]. 现代预防医学, 2013, 40(7): 1320-1322.
- [15] 马路,刘剑刚,史大卓. 均匀设计在中医药研究中的应用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(3): 278-281.
- [16] 卢斯亮,刘芳萍,王圣思. 中药在鸡白痢沙门杆菌病中的应用 [J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2009(23): 27-28.
- [17] 李锦宇,郑继方,罗超应,等. 金石翁芍散(禽瘟王)对人工感染鸡白痢治疗试验 [J]. 中兽医医药杂志, 2009(6): 53-54.
- [18] 张丁华,王艳丰,许兰菊,等. 中药复方对人工感染雏鸡大肠埃希菌病及沙门菌病的防治效果观察 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(12): 157-160.
- [19] 刘显军,尚丽娟,陈静. 白头翁的药理作用及其在动物医学中的应用 [J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2010(13): 33-35.
- [20] 李鹏飞,苗明三. 马齿苋的现代研究及临床应用 [J]. 中医学报, 2014, 29(9): 1342-1344.
- [21] 宋保兰. 陈皮药理作用 [J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28(8): 132-133, 160.

- [22] 付梅红, 朱东海, 方 婧, 等. 苍术的化学、分子生药学和药理学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2669—2672.
- [23] 周劲光. 五倍子的药理作用与临床研究进展 [J]. 海峡药学, 2010, 22(4): 30—32.
- [24] 张建军, 李 伟, 王丽丽, 等. 赤芍和白芍品种、功效及临床应用述评 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3595—3601.
- [25] 张淑洁, 钟凌云. 厚朴化学成分及其现代药理研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(5): 838—843.
- [26] 姜峰玉, 陈定法, 孙 抒. 白头翁的研究现状和临床应用 [J]. 医学综述, 2009, 15(24): 3785—3787.
- [27] 孙秀超, 王海龙, 杨芳芳, 等. 5 种常见中草药提取液的抑菌试验 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2015(6): 22—23.
- [28] 郭金鹏, 王萍, 孙如宝, 等. 苍术挥发油化学成分及其抗菌活性的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 566—568.
- [29] 杨艾青, 艾启俊, 张德权, 等. 几种中草药提取液对沙门氏菌抑菌效果研究 [J]. 食品科技, 2011, 36(3): 176—179.

Prescription Optimization of the Anti-Pullorosis Traditional Chinese Veterinary Medicine “Weng Xian Granule” with the Uniform Design Method

WEI Wei, SHI Lei, LIU Juan,
HUANG Wen-peng, MO Kong-yuan, CHEN Xiao

Traditional Chinese Medicine Innovation Laboratory, Veterinary Science Engineering Research Center,
Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: Objective: To optimize of the prescription of Weng Xian granule, a traditional Chinese veterinary medical preparation based on *Pulsatilla chinensis* and *Portulaca oleracea* L., for pullorosis resistance. Methods: Weng Xian granules were prepared with *Pulsatilla chinensis*, purslane (*Portulaca oleracea* L.), *Rhizoma atractylodis*, *Pericarpium citri reticulatae* and other traditional Chinese medicine as ingredients with different proportions, and uniform design and regression analysis were used to evaluate the anti-pullorosis effects of different prescriptions with their bacteriostasis in vitro on *Salmonella* bacteria as the indicator. The wholism concept of traditional Chinese medicine and the evaluation of bacteriostasis activity in vitro were used to optimize the best prescription. The pathological model of pullorosis was made by intraperitoneal injection of *Salmonella* bacteria, a certain proportion Weng Xian granule was added in the feed and, finally, the effective rate and cure rate were counted. Results: The experiment showed that the Weng Xian prescription No. 28 was the best ratio, both the effective rate and cure rate of the optimal prescription in the high-dose group being 91.7%. Conclusion: The optimized prescription of Weng Xian granule in this experiment can effectively prevent and control pullorosis.

Key words: Weng Xian granule; uniform design; regression analysis; pullorosis; bacteriostasis

责任编辑 夏 娟