

50 种中药提取物体外抗菌活性研究

李 哲¹, 杨寒淞¹, 曹应葵¹, 范青飞², 李玉叶¹

(1. 昆明医科大学第一附属医院皮肤科, 云南 昆明 650032; 2. 中国科学院西双版纳热带植物园, 热带植物资源可持续利用重点实验室, 云南 勐腊 666303)

【摘要】 目的 研究紫草、肉桂、清明花、白钩藤、两面针、云南红豆杉、青牛胆、倭百解、定心藤、黑皮跌打、断肠草、茶、花椒等 50 种中药提取物的体外抗菌作用, 为临床治疗提供新思路和方法。**方法** 用 K-B 纸片法筛选 50 种中药提取物对淋球菌、金黄色葡萄球菌、白念珠菌、光滑念珠菌、新型隐球菌的体外抗菌活性, 用肉汤倍比稀释法和琼脂稀释法测出有抗菌活性的中药提取物对以上几种菌的最小抑菌浓度 (MIC)。**结果** 在 1mg/ml 浓度下, 紫草素、桂皮醛表现出抗菌活性, 其他提取物无抗菌活性。紫草素对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 7.81 μ g/ml, 对白念珠菌、光滑念珠菌、新型隐球菌的 MIC 均为 15.63 μ g/ml, 对淋球菌 MIC 为 1 mg/ml。桂皮醛对金黄色葡萄球菌 MIC 为 160 μ g/ml, 对白念珠菌、光滑念珠菌最小抑菌浓度均为 250 μ g/ml, 对淋球菌、新型隐球菌无抗菌作用。**结论** 紫草素和桂皮醛具有体外抗菌活性, 为药物开发提供参考。

【关键词】 中药提取物; 抗菌; 紫草素; 桂皮醛

中图分类号: R965.1 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1002-1310.2022.03.002

The antibacterial activity of fifty traditional Chinese medicine extracts in vitro

LI Zhe¹, YAHG Hansong¹, CAO Yingkui¹, FAN Qingfei², LI Yuye¹

(1. The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. CAS Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 650223, China.)

【Abstract】 Objective To study the antibacterial effect of fifty extracts from Chinese medicines such as Lithospermum erythrorhizon, Cinnamomum cassia Presl, Beaumontia grandiflora, Uncaria sessilifructus, Zanthoxylum nitidum, Taxus Chinensis, Tinosporasinensis, Dregea sinensis Hemsl, Mappianthus iodoies, Fissistigma polyanthum, Gelsemium elegans Benth, Camellia sinensis (L.) O. Ktze, Zanyhoxylum bungeanum maxim, and to provide new ideas and methods for clinical treatment. **Methods** The antibacterial activities of fifty traditional Chinese herbal extracts against Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae, Candida albicans, Candida glabrata and Cryptococcus neoformans in vitro were detected by K-B disk method. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the Chinese medicines with antibacterial activity was measured by agar diffusion method and broth dilution method. **Results** At the concentration of 1 mg/mL, shikonin and cinnamaldehyde showed antibacterial activity, while other extracts showed no antibacterial activity. The MIC of shikonin was 7.81 μ g/ml for S. aureus, 15.63 μ g/ml for C. albicans, C. glabrata and C. parapsilosis, and 1 mg/ml for N. gonorrhoeae. The MIC of cinnamaldehyde to S. aureus was 160 μ g/ml, and the MIC of C. albicans, C. glabrata, C. neoformans and Cryptococcus were 250 μ g/ml. Cinnamaldehyde had no antibacterial effect on Neisseria gonorrhoeae and Cryptococcus neoformans. **Conclusion** Shikonin and cinnamaldehyde show antibacterial activity in vitro, providing a reference for drug development.

【Key words】 Chinese herbal extracts; Antibacterial effect; Shikonin; Cinnamaldehyde

我国是抗生素使用大国, 世卫组织一项研究表明, 我国住院病人抗生素使用率高达 80.00%^[1], 中国细菌耐药率高达 45.00%, 远高于欧美国家, 而抗生素滥用带给人体的伤害也是不可估量的^[2]。鉴于全国各地如此严重的抗生素耐药状况, 并且抗生素存在多重耐药以及交叉耐药的情况下, 亟需寻找不同靶点、不同作用机制的抗菌药物。大量研究表明中药

的天然产物具有良好的抗菌活性, 并可以逆转耐药, 因此我们应充分利用中医药宝藏, 研究具有抗菌作用的中药及提取物, 为新药研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 淋球菌 ATCC-49226 来源于云南省疾病预防控制中心; 金黄色葡萄球菌 ATCC-12228、光

【通信作者】 李玉叶, E-mail: yyeli2000@126.com

【基金项目】 云南省防治艾滋病项目; 云南省“万人计划”名医专项 (YNWR-MY-2018-039); 云南省卫生和计划生育委员会医学领军人才 (L-201613); 云南省皮肤免疫疾病临床医学研究中心 (2019ZF012); 云南省皮肤与免疫性疾病临床医学中心 (ZX2019-03-02)

【收稿日期】 2021-12-21

滑念珠菌 ATCC-66032、白念珠菌 ATCC-14053 来源于昆明医科大学；新型隐球菌 ATCC-32045 来源于昆明医科大学第一附属医院。

1.1.2 主要仪器、设备 二氧化碳恒温培养箱购自美国 Forma Scientific 公司；比浊仪、麦氏管购自中国珠海迪尔生物工程有限公司；移液器购自美国 Eppendorf 公司；生物安全柜购自美国 Labconco 公司。

1.1.3 中药提取物及其制备

1.1.3.1 提取物 ① 乙醇提取物：紫草素、桂皮醛、巴西苏木素、竹叶椒、贵州花椒、刺异叶椒、异叶花椒、毛刺花椒、菱叶花椒、滇丹参叶。以上由中国科学院西双版纳热带植物园提供。② 其他提取物：云南红豆杉、清明花、白钩藤、两面针、定心藤、青牛胆、傣百解、黑皮跌打、鸦胆子，以上由中国科学院西双版纳热带植物园提供。③ 茶提取物：茶黄素类、茶褐素类、茶红素类、咖啡碱类由云南汉德生物技术有限公司提供。

1.1.3.2 中药提取物制备方法 ① 乙醇提取物：分别将 10 种中药（紫草、桂皮、苏木、竹叶椒、贵州花椒、刺异叶椒、异叶花椒、毛刺花椒、菱叶花椒、滇丹参叶）粉碎成粗粉，用 95 % 的乙醇浸泡 3 次，过滤，合并滤液，用旋转蒸发仪减压，回收溶剂，得到提取物。上述提取物以无菌生理盐水（含 5% 二甲基亚砷助溶剂）配成浓度为 1 mg/ml 的溶液作 K-B 纸片法初筛用。② 其他提取物：分别将 9 种中药（云南红豆杉、清明花、白钩藤、两面针、定心藤、青牛胆、傣百解、黑皮跌打、鸦胆子）粉碎后，用甲醇提取，然后将甲醇提取物溶解在甲醇和水（9：1）的混合溶剂中，用石油醚萃取，得到石油醚提取物。甲醇和水层脱溶后，加水溶解，然后依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取，上述中药就得到石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水四个部位提取物。上述提取物用无菌生理盐水（含 5% 二甲基亚砷助溶剂）配成浓度为 1 mg/ml 的溶液作 K-B 纸片法初筛用。③ 茶提取物：将普洱茶粉碎成粗粉，加入蒸馏水浸提回流，滤液进行一次萃取，得到的有机相加入氯仿萃取、浓缩，得到咖啡碱类；将水相进行二次萃取，得到的有机相加入正丁醇萃取、浓缩，得到茶红素类、茶黄素类；将二次萃取得到的水相进行三次萃取，得到的水相浓缩蒸干，得到茶褐素类。上述提取物用无菌生理盐水（含 5% 二甲基亚砷助溶剂）配成浓度为 1 mg/ml 的溶液作 K-B 纸片法初筛用。

1.1.4 培养基 沙氏培养基、LB 培养基、琼脂粉购于北京酷来博科技有限公司；淋球菌 GC 培养基及 Isoviatale X 增菌剂、抑菌剂购自广东环凯微生物科技

有限公司；10% 脱纤维新鲜羊血购自南京便诊生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 K-B 纸片法抑菌实验

1.2.1.1 制备菌悬液 从固体培养基中挑取菌落于液体培养基，置于 35℃ 摇床 250 r/min 摇速下培养至对数生长期，离心去上清，加入无菌生理盐水混匀，校正细菌悬液浓度至 1×10^8 个 /ml。

1.2.1.2 菌液接种 每个平板各加载菌液 250 μ l，用无菌棉拭子涂板，用镊子加载直径为 6 mm 的无菌滤纸片。用移液器吸取 10 μ l 中药提取物分别滴入 2 个滤纸片的正中心，生理盐水组为空白对照，细菌用氨苄西林为阳性对照，真菌用氟康唑为阳性对照。

1.2.1.3 观察结果 在 37℃ 培养箱孵育（20 ~ 24）h，读取抑菌圈的直径，抑菌圈直径包括纸片的直径。

1.2.2 肉汤稀释法检测最小抑菌浓度（MIC）通过 K-B 纸片法筛选出对上述有较强抗菌活性的中药提取物后，根据 CCLSI M27-A3 用肉汤稀释法测定植物提取物对除淋球菌外其他几种菌的最小抑菌浓度。

1.2.2.1 待测样品溶液配制 取 100 mg/ml 中药提取物储存液，用液体培养基稀释成 8 mg/ml；氨苄西林、氟康唑均用培养基稀释为 8 mg/ml（DMSO 占最终体积的浓度 $\leq 2\%$ ）。

1.2.2.2 菌悬液制备 取培养基上 37℃ 培养（2-3）代的纯菌落制成菌悬液，浓度调整至 $1 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ CFU/ml。在血球计数板上计出真菌浓度，浓度调整为 $2 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ CFU/ml。

1.2.2.3 倍比稀释药物浓度 取 96 孔板，在每行（1-12）号孔分别加入 100 μ l 液体培养基，在 1 号孔加入待测样品溶液 100 μ l，混匀后取 100 μ l 加入 2 号孔，2 号孔混匀后取 100 μ l 加入 3 号孔…直至 10 号孔。在（1-11）号孔分别加入 80 μ l 配置好的菌悬液，再加 20 μ l Alamar Blue。第 11 号孔只加菌悬液，第 12 号孔只加培养基。

1.2.2.4 结果判读 将 96 孔板置于 37℃ 恒温箱孵育（16-48）h，观察孔里颜色变化，当孔中有菌生长时，Alamar Blue 会由蓝色变为红色，因此最小抑菌浓度应为最后一个颜色为蓝色孔的浓度。

1.3 琼脂稀释法检测淋球菌 MIC 通过 K-B 纸片法筛选出对淋球菌有较强抗菌活性的中药提取物后，再通过琼脂稀释法检测提取物对淋球菌的 MIC。提取物用无菌 GC 培养基稀释，每种提取物的浓度梯度设置为 32 mg/ml、16 mg/ml、8 mg/ml……0.25 mg/ml，在每个平皿中加入 1×10^7 CFU/ml 的细菌 10 μ l，试验设空白对照。37℃ 培养 24h，分别转种 GC 琼脂平板

培养基, 24 小时后无细菌生长的平皿则为药物最低浓度。

2 结果

2.1 K-B 纸片法 检测 50 种中药提取物的抗菌活性, 发现紫草素、桂皮醛在 1mg/ml 浓度下有抑菌活性, 其余提取物无抑菌活性 (见表 1)。判断标准依据美国临床实验室标准化委员会 M27-A3 方案^[3]。

表 1 50 种中药提取物抗菌活性

样品名称	金黄色葡萄球菌	淋球菌	白念珠菌	光滑念珠菌	新型隐球菌
紫草素	+	+	+	+	+
桂皮醛	+	-	+	+	-
巴西苏木素	-	-	-	-	-
竹叶椒	-	-	-	-	-
菱叶花椒	-	-	-	-	-
毛刺花椒	-	-	-	-	-
刺异叶椒	-	-	-	-	-
异叶花椒	-	-	-	-	-
贵州花椒	-	-	-	-	-
滇丹参叶	-	-	-	-	-
云南红豆杉 -T	-	-	-	-	-
云南红豆杉 -B	-	-	-	-	-
云南红豆杉 -E	-	-	-	-	-
云南红豆杉 -P	-	-	-	-	-
清明花 -P	-	-	-	-	-
清明花 -B	-	-	-	-	-
清明花 -T	-	-	-	-	-
清明花 -氯	-	-	-	-	-
白钩藤 -T	-	-	-	-	-
白钩藤 -B	-	-	-	-	-
白钩藤 -E	-	-	-	-	-
青牛胆 -T	-	-	-	-	-
青牛胆 -P	-	-	-	-	-
青牛胆 -B	-	-	-	-	-
青牛胆 -E1	-	-	-	-	-
青牛胆 -E2	-	-	-	-	-
傣百解 -B	-	-	-	-	-
傣百解 -E	-	-	-	-	-
傣百解 -W	-	-	-	-	-
定心藤 -P	-	-	-	-	-
定心藤 -B	-	-	-	-	-
定心藤 -E	-	-	-	-	-
定心藤 -T	-	-	-	-	-

样品名称	金黄色葡萄球菌	淋球菌	白念珠菌	光滑念珠菌	新型隐球菌
黑皮跌打 -P	-	-	-	-	-
黑皮跌打 -B	-	-	-	-	-
黑皮跌打 -E	-	-	-	-	-
黑皮跌打 -T	-	-	-	-	-
两面针 -P	-	-	-	-	-
两面针 -B	-	-	-	-	-
两面针 -E	-	-	-	-	-
两面针 -W	-	-	-	-	-
两面针 -T	-	-	-	-	-
鸦胆子 -P	-	-	-	-	-
鸦胆子 -B	-	-	-	-	-
鸦胆子 -E	-	-	-	-	-
鸦胆子 -T	-	-	-	-	-
茶黄素类	-	-	-	-	-
茶褐素类	-	-	-	-	-
茶红素类	-	-	-	-	-
咖啡碱类	-	-	-	-	-

注: T 表示总提取物, P 表示石油醚萃取物, E 表示乙酸乙酯提取物, B 表示正丁醇提取物, W 表示水提物

2.2 肉汤稀释法测 MIC 用肉汤倍比稀释法测紫草素和桂皮醛对金黄色葡萄球菌、白念珠菌、光滑念珠菌、新型隐球菌的 MIC 值, 结果为: 紫草素对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度为 7.81 $\mu\text{g/ml}$, 对白念珠菌、光滑念珠菌、新型隐球菌最小抑菌浓度均为 15.625 $\mu\text{g/ml}$ 。桂皮醛对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度为 160 $\mu\text{g/ml}$, 对白念珠菌、光滑念珠菌最小抑菌浓度为 250 $\mu\text{g/ml}$, 对新型隐球菌无抑制作用。

2.3 琼脂稀释法测 MIC 用琼脂稀释法测紫草素对淋球菌的最小抑菌浓度为 1mg/ml, 桂皮醛对淋球菌无抗菌作用。

3 讨论

近年来, 随着各类抗生素在临床上的广泛应用, 细菌、真菌对常用抗生素的耐药性也逐年攀升。我们课题组已发现云南地区淋球菌耐药现状为: 环丙沙星耐药率 100%、四环素耐药率 89.9%、青霉素耐药率 89.3%、阿奇霉素耐药率 14.5%, 其中多重耐药株占比 73.6%^[4]。因此, 在现有抗生素对耐药菌的治疗效果不佳, 且研发新型抗菌药物难度大、周期长的背景下, 加强对中药抗菌活性的研究和开发, 对解决细菌耐药问题具有重要意义。中药是中华民族瑰宝, 目前, 已有大量研究证实中药单体、复方或中药提取物中的活性成分具有明显抗菌作用, 并已

广泛应用于临床。已被证实的中草药抗耐药菌的作用机制主要包括消除耐药质粒、影响细菌细胞膜的通透性、抑制细菌体内酶的活性、影响蛋白质和核酸的合成、抑制耐药菌外排泵等^[5]。中药配伍也由于其通过多靶点、多途径抗菌而具有毒性低、不易诱导耐药等特点。

紫草是紫草科紫草属植物,在我国有悠久的药用历史,有凉血活血、清热解毒等功效,民间将其外用于外生殖器部位来治疗感染。紫草中脂溶性的醌类化合物为其主要活性成分,包括紫草素类及其二聚体、紫草呋喃类、苯醌类等混源萜类化合物。紫草素是 1, 4 - 萘醌的烷基化衍生物,化学式为 $C_{16}H_{16}O_5$ 。近年来随着对紫草研究的不断深入,发现紫草素具有抗菌、抗炎^[6]、抗肿瘤活性^[7],还有抗氧化损伤^[8]以及抗病毒^[9]作用。本次研究中,我们发现紫草素对金黄色葡萄球菌、淋球菌、白念珠菌、光滑念珠菌、新型隐球菌均具有抑制作用。先前的研究表明紫草素通过改变白念珠菌的细胞膜通透性,使细胞内 Ca^{2+} 外流,从而发挥抗白念珠菌的作用。也有研究者发现紫草素可以改变耐甲氧西林金黄色葡萄球菌肽聚糖的亲合力、细胞质膜的渗透性和 ATP 结合转运蛋白的活性,从而抑制其生长^[10]。桂皮醛又名肉桂醛、苯丙烯醛、桂醛,来源于天然植物桂枝或肉桂中,是从肉桂树中提取的烯醛类有机化合物,其化学分子式 C_9H_8O 。国内外对桂皮醛的大量药理研究表明,其具有抗菌、抗炎、解热镇痛、抗肿瘤、降糖、抗肥胖等多种药理活性^[11]。本次研究证明了桂皮醛对金黄色葡萄球菌、白念珠菌、光滑念珠菌有抑制作用,有研究者发现桂皮醛直接作用于真菌细胞膜表面的中药成分麦角甾醇,改变细胞的膜完整性、流动性、细胞活力等,从而抑制真菌生长,除此之外,还发现桂皮醛对耐氟康唑的白念珠菌仍有抑制作用^[12]。有研究表明亚抑菌浓度的桂皮醛能够抑制金黄色葡萄球菌的 α -溶血素、肠毒素 A 和 B 的产量,从而抑制金黄色葡萄球菌的生长^[13]。本研究中傣百解、定心藤、白钩藤、黑皮跌打等药物是我国傣族医药的常用药材,在本次研究中并未发现其具有抗菌活性,

但其药用价值仍不可忽视。

紫草素、桂皮醛对金黄色葡萄球菌、白念珠菌、光滑念珠菌均有抗菌活性,紫草素对淋球菌和新型隐球菌也有抗菌作用,可对药物研发提供参考。

参考文献:

- [1] 曾冠军, 柳娟, 马满英. 水体中抗生素污染研究进展 [J]. 安徽农业学, 2017, 45 (3): 72-74.
- [2] 沈海英. 合理使用中药将减少抗生素滥用 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20 (24): 66+69.
- [3] 卜晓琳, 范娟, 胡晓莉, 等. CLSI M38-A2 及 M27-A3 方案分析足癣 36 株真菌的药敏特征 [J]. 中国真菌学杂志, 2016, 11 (3): 169-173.
- [4] 杨寒淞, 曹应葵, 曾志君, 等. 159 株淋球菌对 7 种抗生素的耐药性实验研究 [J]. 皮肤病与性病, 2021, 43 (3): 317-319.
- [5] 程成, 张薇, 朱波, 等. 中药抗常见耐药菌的作用及其机制研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35 (2): 229-233.
- [6] Lu L, Qin A, Huang H, et al. Shikonin extracted from medicinal Chinese herbs exerts anti-inflammatory effect via proteasome inhibition [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 658 (2-3): 242-247.
- [7] 蒋英丽, 宋今丹. 新疆紫草素诱导人大肠癌细胞的凋亡 [J]. 癌症, 2001 (12): 1355-1358.
- [8] Esmailzadeh E, Gardaneh M, Gharib E, et al. Shikonin protects dopaminergic cell line PC12 against 6-hydroxydopamine-mediated neurotoxicity via both glutathione-dependent and independent pathways and by inhibiting apoptosis [J]. Neurochem Res, 2013, 38 (8): 1590-1604.
- [9] Gao H, Liu L, Qu ZY, et al. Anti-adenovirus activities of shikonin, a component of Chinese herbal medicine in vitro [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34 (2): 197-202.
- [10] 袁曦玉. 新疆紫草对主要致病菌及生物膜作用的实验研究 [D]. 新疆医科大学, 2020.
- [11] 张利青, 张占刚, 付岩, 等. 桂皮醛药理作用的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (23): 4568-4572.
- [12] 王晓明. 桂皮醛、丹皮酚对根管内白色念珠菌抑菌效果的实验研究 [D]. 河北医科大学 2015.
- [13] 夏礼杰, 于录, 姜游帅, 等. 亚抑菌质量浓度的桂皮醛对金黄色葡萄球菌毒力因子的抑制作用 [J]. 中国兽医学报, 2010, 30 (11): 1460-1463+1467.