

# 玉米须和花青素联合抑制泌尿系感染的常见菌群生长

蔡洁娜, 胡志明, 惠宏襄\*

(南方医科大学生物治疗学院生物治疗研究所, 南方医科大学国际代谢病中心, 广州 510515)

**[摘要]** **目的:** 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯菌是引起慢性泌尿系感染的主要菌群, 本研究观察玉米须提取物和花青素溶液对其生长的协同抑菌作用。**方法:** 以大肠埃希菌( $1.6 \times 10^6$  cfu/mL)、金黄色葡萄球菌( $5.6 \times 10^6$  cfu/mL)和克雷伯菌( $1.8 \times 10^6$  cfu/mL)为观察对象, 向细菌培养液中分别加入玉米须提取物(0, 35, 70, 140  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、花青素(0.312, 0.625, 1.25  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、玉米须提取物(70  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和花青素(0.625  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )混合液, 采用比浊法(600 nm)测定细菌6 h的生长情况, 并计算其抑制率。**结果:** 在6 h时玉米须提取物和花青素对3种细菌的生长抑制呈现出时间剂量依赖性曲线。在玉米须提取物(70  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和花青素(0.625  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )培养细菌6 h时, 单独成分对大肠埃希菌的抑菌率为(31.3  $\pm$  2.42)%和(21.6  $\pm$  1.89)%, 对金黄色葡萄球菌的抑菌率分别为(25.3  $\pm$  2.85)%和(37.2  $\pm$  1.74)%, 对克雷伯菌的抑菌率分别是(39.7  $\pm$  1.34)%和(15.3  $\pm$  3.67)%, 而联合使用时对3种细菌的的抑菌率分别提高到(76.8  $\pm$  2.53)%, (80.1  $\pm$  1.74)%和(67.3  $\pm$  1.53)%。**结论:** 玉米须提取物对克雷伯菌和大肠埃希菌抑制作用显著, 花青素对金黄色葡萄球菌的抑制作用明显。联合使用既扩大了抗菌谱, 又有协同抑制作用, 能显著提高对3种致病菌的生长抑制。该组合可以用于慢性泌尿道的感染防治。

**[关键词]** 花青素; 玉米须; 泌尿道感染; 抑菌作用; 大肠埃希菌; 金黄色葡萄球菌; 克雷伯菌

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0115-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110115

## Synergistic Anti-bacterial Effects of Corn Silk Extract and Anthocyanin on Urinary Tract Infections

CAI Jie-na, HU Zhi-ming, HUI Hong-xiang\*

(Institute of Biotherapy, School of Biotechnology; International Center for Metabolic Diseases; Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effect of corn silk extract and anthocyanins on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. **Method:** The turbidimetric method (600 nm) was used for determining bacterial growth of *E. coli* ( $1.6 \times 10^6$  cfu/mL), *S. aureus* ( $5.6 \times 10^6$  cfu/mL) and *K. pneumoniae* ( $1.8 \times 10^6$  cfu/mL) by adding corn silk extract (0, 35, 70, 140  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), anthocyanin (0.312, 0.625, 1.25  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and corn silk extract (70  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )-anthocyanin (0.625  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) mixed solutions for 6 h. **Result:** The results showed that a time and dose dependent inhibitory curve of corn silk extract and anthocyanins on three bacteria were observed within 6 h. The inhibitory rates of corn silk extract (70  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and anthocyanins (0.625  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were (31.3  $\pm$  2.42)% and (21.6  $\pm$  1.89)% on *E. coli*, (25.3  $\pm$  2.85)% and (37.2  $\pm$  1.74)% on *S. aureus*, and (39.7  $\pm$  1.34)% and (15.3  $\pm$  3.67)% on *K. pneumoniae*, respectively, while the effect of their combination was (76.8  $\pm$  2.53)% on *E. coli*, (80.1  $\pm$  1.74)% on *S. aureus* and (67.3  $\pm$  1.53)% on *K. pneumoniae*. **Conclusion:** The compatibility of corn silk extract and anthocyanins can not only

**[收稿日期]** 20131205(024)

**[基金项目]** 高等学校博士学科点专项科研基金(20104433110014); 松山湖科技发展专项资金(2010B025, 2010B026)

**[第一作者]** 蔡洁娜, 在读硕士, 从事糖尿病和代谢病研究, Tel: 13728008531

**[通讯作者]** \* 惠宏襄, 博士, 教授, 博士生导师, 从事糖尿病和代谢病防治、以及生物治疗研究工作, Tel: 020-61648753, E-mail: huihongx@gmail.com

expand the antibacterial spectrum, and also has synergistic effects on pathogenic bacteria to prevent and treat chronic urinary tract infection.

[Key words] anthocyanins; corn silks; urinary tract infections; antibacterial; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella trevisan*

泌尿系统感染是指从尿道口到肾脏的泌尿道任何部位发生的细菌感染的总称,发病率约占人口的 2%<sup>[1]</sup>。在其致病菌中,大肠埃希菌占 47.69%,葡萄球菌属占 13.85%,克雷伯菌属占 4.62%<sup>[2-3]</sup>,因此,抑制这 3 类细菌可以有效控制泌尿系统感染。目前头孢菌素等临床常用抗菌药容易产生耐药作用,给临床治疗增加了难度<sup>[4]</sup>。故开发有效的防治产品变得尤其重要。有研究报道玉米须有利尿和抗菌等作用<sup>[5]</sup>;花青素有抗老化和抗菌等作用<sup>[6]</sup>。但尚无将玉米须和花青素应用于防治泌尿道感染的报道。本研究以临床上泌尿道感染常见的致病菌大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯菌为实验菌株,通过体外抗菌活性实验,研究玉米须和花青素的抑菌作用,以期防治泌尿道感染开发出一种新的复方制剂。

## 1 材料

**1.1 试剂和细菌来源** 越橘 *Vaccinium myrtillus* L. 提取物(含 25% 花青素,购于广州日康食用化工有限公司,批号 84082-34-8);玉米须 *Stigma maydis* 由南方医科大学国际代谢病中心提供;大肠埃希菌 *Escherichia coli*、肺炎克雷伯菌 *Klebsiella trevisan* (1885)和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*,由南方医科大学提供。

**1.2 仪器** DHG-9003 型生化培养箱(嘉兴中新),紫外分光光度计(英国 Biochrom 公司),BXM-30R 型压力蒸气灭菌器(上海博迅),电子天平(日本新光公司),生物净化工作(新加坡 Esco 公司),GL-21M 型高速冷冻离心机(上海耐圣卡兰实业有限公司),ZHWHY-200B 型恒温培养摇床(浙江托普仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 药物配制

**2.1.1 玉米须提取物的制备** 称取剪碎后的干重为 25 g 玉米须置于 500 mL 圆底烧瓶中,用 90% 乙醇为溶剂加热回流提取 60,45 min,加醇量为 300,200 mL,分别过滤,合并 2 次滤液,对滤液进行蒸发浓缩(加热温度在 80 °C 左右)。待乙醇蒸发完后,将浓液置于冷冻干燥器中干燥成疏松固体,得终产物。用 PBS 配置成不同质量浓度。放置于 4 °C 冰

箱中保存。

**2.1.2 花青素提取物溶液配制** 按照越橘提取物中含 25% 的花青素配置花青素溶液,用 PBS 配置成不同质量浓度,4 °C 冰箱保存。

**2.2 菌液的制备** 挑取典型单克隆接种于新鲜 LB 培养基中,37 °C 连续培养 3 代,以恢复其活力。采用铺板计数法计算细菌浓度,并依此梯度稀释细菌到需要的浓度,用于后续实验中。

**2.3 细菌生长曲线的测定** 向含有 5 mL LB 培养基的培养瓶中,分别接种不同浓度的大肠埃希菌 ( $1.6 \times 10^6$ ,  $1.6 \times 10^5$ ,  $1.6 \times 10^4$  cfu/mL) 50  $\mu$ L, 37 °C, 200 r·min<sup>-1</sup> 条件下恒温培养至 24 h,分别在 0, 2, 4, 6, 10, 15, 24 h 时测定细菌在 600 nm 处的吸光度(A),绘制大肠埃希菌生长的 A-时间曲线。同理分别绘制出金黄色葡萄球菌和克雷伯菌生长的 A-时间曲线。

**2.4 药物浓度的选择** 向含大肠埃希菌 ( $1.6 \times 10^6$  cfu/mL) 的 LB 培养基中加入不同质量浓度的玉米须提取物(终质量浓度分别为 30, 70, 100, 150, 200 g·L<sup>-1</sup>),培养至 10 h,分别在 6, 8, 10 h 时测定细菌 A;同理向含大肠埃希菌 ( $1.6 \times 10^6$  cfu/mL) 的 LB 培养基中加入不同质量浓度的花青素(终质量浓度分别为 0.2, 0.3, 0.9, 1.5, 2.1 g·L<sup>-1</sup>),培养至 10 h,分别在 6, 8, 10 h 时测定细菌 A。

**2.5 对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯菌抑制作用**

**2.5.1 单用玉米须 3 种的抑制作用** 向 1 mL 含大肠埃希菌 ( $1.6 \times 10^6$  cfu/mL) 的 LB 培养基中加入不同质量浓度的玉米须提取物(终质量浓度分别为 0, 35, 70, 140 g·L<sup>-1</sup>),在 37 °C, 200 r·min<sup>-1</sup> 条件下恒温培养 6 h,测定各组菌液在 600 nm 处的 A,实验设定 3 个平行组。计算不同质量浓度玉米须提取物对大肠埃希菌的抑制率。同理计算不同质量浓度玉米须提取物对金黄色葡萄球菌 ( $5.6 \times 10^6$  cfu/mL) 和克雷伯菌 ( $1.8 \times 10^6$  cfu/mL) 的抑制率。考察玉米须提取物单独使用时对这 3 种菌的抑制作用。

**2.5.2 单用花青素对 3 种菌的抑制作用** 参照 2.5.1 步骤,计算不同质量浓度花青素(终质量浓度分别为 0.312, 0.625, 1.25 g·L<sup>-1</sup>)对大肠埃希菌

( $1.6 \times 10^6$  cfu/mL)、金黄色葡萄球菌( $5.6 \times 10^6$  cfu/mL)和克雷伯菌( $1.8 \times 10^6$  cfu/mL)的抑制率。考察花青素单独使用时对这3种菌的抑制作用。

**2.5.3 玉米须和花青素联合应用对3种菌的抑制作用** 参照2.5.1实验步骤,分别计算玉米须提取物(终质量浓度为 $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和花青素(终质量浓度为 $0.625 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )联合应用时对大肠埃希菌( $1.6 \times 10^6$  cfu/mL)、金黄色葡萄球菌( $5.6 \times 10^6$  cfu/mL)和克雷伯菌( $1.8 \times 10^6$  cfu/mL)的抑制率。考察两者联合应用时的抑制作用。

**2.6 数据处理** 按以下公式计算细菌生长抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

### 3 结果

**3.1 细菌浓度和培养时间的选择** 不同密度大肠埃希菌( $1.6 \times 10^6$ ,  $1.6 \times 10^5$ ,  $1.6 \times 10^4$  cfu/mL)经不同时间培养后的吸光度-时间曲线见图1,结果显示:大肠埃希菌在6 h左右进入对数生长期,约10 h进入稳定期,且菌量为 $1.6 \times 10^6$  cfu/mL 大肠埃希菌组更适合后续药物筛选实验。同理选择金黄色葡萄球菌密度为 $5.6 \times 10^6$  cfu/mL,克雷伯菌密度为 $1.8 \times 10^6$  cfu/mL,培养时间6 h作为后续药物研究的时间点。

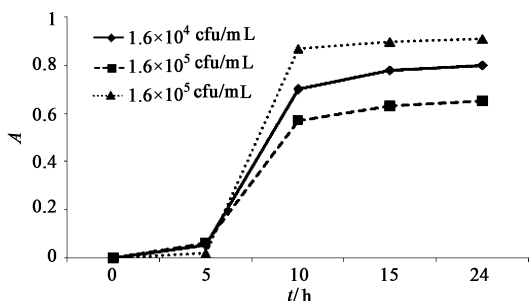


图1 不同浓度大肠埃希菌的细菌生长曲线

**3.2 药物作用浓度的选择** 向大肠埃希菌( $1.6 \times 10^6$  cfu/mL) LB培养基中加入不同质量浓度的玉米须提取物( $30 \sim 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),培养至10 h,分别在6, 8, 10 h时测细菌吸光度。观测到玉米须对细菌的生长具有剂量依赖抑制作用,据此作者选择35, 70,  $140 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  3个质量浓度用于后续实验研究。同理选用花青素0.312, 0.625,  $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  3个质量浓度用于后续实验研究。

**3.3 对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯菌的抑菌作用**

**3.3.1 玉米须提取物单独使用对3种菌的抑菌作用** 玉米须提取物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯菌作用6 h均有抑制作用,且抑菌率随着

药物浓度的增加而提高,具有一定的量-效关系。其中玉米须提取物对克雷伯菌和大肠埃希菌革兰阴性菌抑制作用显著。见表1。

表1 不同质量浓度的玉米须提取物对3种作用6 h的抑制率( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) %

终质量浓度 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率		
	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	克雷伯菌
35	$18.9 \pm 3.41$	$10.6 \pm 2.42$	$17.7 \pm 2.18$
70	$31.3 \pm 1.45$	$25.3 \pm 2.85$	$39.7 \pm 1.21$
140	$75.1 \pm 1.84$	$54.0 \pm 2.12$	$76.1 \pm 1.63$

**3.3.2 花青素单用对3种菌的抑菌作用** 花青素对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯菌作用6 h均有抑制作用,且抑菌率随着药物浓度的增加而提高,具有一定的量-效关系。其中花青素对金黄色葡萄球菌革兰阳性菌的抑制作用明显。见表2。

表2 不同质量浓度的花青素溶液对3种菌作用6 h的抑制率( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) %

终质量浓度 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率		
	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	克雷伯菌
0.312	$11.2 \pm 2.32$	$18.5 \pm 3.53$	$7.4 \pm 1.82$
0.625	$21.6 \pm 1.89$	$37.2 \pm 1.74$	$15.3 \pm 3.67$
1.25	$63.4 \pm 1.42$	$90.5 \pm 1.13$	$41.1 \pm 3.12$

**3.3.3 玉米须提取物-花青素联合使用对3种菌的抑制作用** 玉米须提取物和花青素联合应用对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯菌的抑制率均高于单独使用玉米须提取物及花青素。见表3。

表3 玉米须提取物、花青素溶液单用或混合作用6 h对3种菌的抑制率( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) %

组别	质量浓度 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率		
		大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	克雷伯菌
玉米须提取物	70	$31.3 \pm 2.42$	$25.3 \pm 2.85$	$39.7 \pm 1.34$
花青素	0.625	$21.6 \pm 1.89$	$37.2 \pm 1.74$	$15.3 \pm 3.67$
混合药 <sup>2)</sup>	$70 + 0.625$	$76.8 \pm 2.53^{1)}$	$80.1 \pm 1.74^{1)}$	$67.3 \pm 1.53^{1)}$

注:与同一列单用玉米须提取物组或单用花青素组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>2)</sup> 为玉米须提取物 $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 花青素 $0.625 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 4 讨论

玉米是一种广泛种植农作物。玉米须的来源丰富、价格低廉、易于采集和收集。现代药理研究表明玉米须有降血糖、抗菌和利尿等作用<sup>[5]</sup>。纪丽莲等<sup>[7]</sup>采用平板实验证实玉米须提取物对7种常见引起食品腐败菌具有抑制作用。在泌尿系统疾病的应用报道中,玉米须主要作为一种有效的利尿药,有利

尿消肿作用<sup>[5]</sup>。但在防治泌尿系统感染的应用中,未见明确指出玉米须有抑制引起慢性泌尿系感染常见菌群生长的相关报道。

花青素是一类广泛存在于植物中的水溶性色素。大量研究表明,花青素具有很强的抗氧化作用、有抗变异和抗过敏等多种功能。同时蔓越莓粗提液可以破坏大肠埃希菌 O157:H7、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌的外膜,影响菌体的正常新陈代谢而达到抑菌效果<sup>[6]</sup>,但未见明确指出花青素有抑制引起慢性泌尿系感染常见菌群生长的相关报道。

本实验观察了单独和联合应用玉米须提取物和花青素对泌尿系统感染常见细菌——大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯菌的抑制作用。实验结果显示,玉米须提取物和花青素单独和联合使用都对这 3 种菌有不同程度的抑制作用,且联合使用时的抑菌效应比单独使用时提高了 2~4 倍,即两者联合应用具有增效作用<sup>[8]</sup>。有关其机制研究正在进行中,两者可能分别抑制了细菌生长的不同环节,从而在更多阶段干扰细菌的代谢过程,影响了细菌结构与功能,从而达到协同抑菌的效果<sup>[8]</sup>。实验结果表明,玉米须提取物对克雷伯菌和大肠埃希菌等革兰阴性菌抑制作用显著;花青素对金黄色葡萄球菌等革兰阳性菌的抑制作用明显。两者联合使用扩大了抗菌谱,显著提高了对这 3 种致病菌的生长抑制,起到更好的抑菌效果。该组合可以用于慢性泌尿道的感染防治。

## [参考文献]

- [1] 舒勇,吴金姐,张军校. 老年泌尿系统感染的特点[J]. 中华保健医学杂志, 2012, 14(6):432.
- [2] 李楠,李保平,彭益. 细菌性尿路感染病原菌构成及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(18):2270.
- [3] Ragnarsdottir B, Svanborg C. Susceptibility to acute pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria: host-pathogen interaction in urinary tract infections [J]. *Pediatr Nephrol*, 2012, 27(11):2017.
- [4] 杨静,吴永贵,沈继录,等. 泌尿道感染的菌群分布及耐药性分析[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(2):280.
- [5] Bai H, Hai C, Xi M, et al. Protective effect of maize silks (Maydis stigma) ethanol extract on radiation-induced oxidative stress in mice[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2010, 65(3):271.
- [6] Kocic B, Filipovic S, Nikolic M, et al. Effects of anthocyanins and anthocyanin-rich extracts on the risk for cancers of the gastrointestinal tract[J]. *J BUON*, 2011, 16(4):602.
- [7] 纪丽莲,谭仁祥. 玉米须提取物对食品腐败菌及致病细菌抑制作用的研究[J]. 生命科学研究, 2001, 5(1):68.
- [8] Qiu J, Niu X, Dong J, et al. Baicalin protects mice from *Staphylococcus aureus* pneumonia via inhibition of the cytolytic activity of alpha-hemolysin [J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(2):292.

[责任编辑 聂淑琴]

## 《中国医药导报》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的国家级医药卫生类科技核心期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并被万方数据、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中国期刊全文数据库、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库、中文科技期刊数据库收录。每期定价 20 元,全年 36 期优惠价 540 元。

本刊设有专家论坛、研究进展、论著、临床研究、药理与毒理、中医中药、生物医药、病理分析、药品鉴定、制剂与技术、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、影像与介入、护理研究、教学研究、药物经济学、科研管理、政策研究、医药监管等栏目,是广大医药科研、教育、临床等人员开阔视野、交流经验、增进学术交流的贴身参谋和得力助手,也是发表学术论文的园地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表,来稿注明单位名称、地址、电话、联系人姓名。

社址:北京市朝阳区惠家花园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025

投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533

传真:010-59679056 投稿信箱:yyzx68@vip.163.com

网址:www.yiyaodaobao.com.cn