

艾叶水提物及其发酵物对小鼠白色念珠菌性 阴道炎的治疗作用

白静¹, 胡雷¹, 张丽², 田春雨¹, 庞得全¹, 薄海美¹, 韩淑英^{1*}

(1. 河北联合大学, 河北 唐山 063000; 2. 唐山市工人医院, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 观察艾叶水提物及其发酵物对白色念珠菌性阴道炎的治疗作用。方法: 采用小鼠阴道内接种 1×10^7 cfu/mL 白色念珠菌悬液 20 μ L, 建立白色念珠菌阴道炎模型。将成模小鼠随机分为模型对照组、艾叶水提物组[(生药, 下同) 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]、艾叶发酵物低、中、高剂量组[(生药, 下同) 10, 20, 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]及氟康唑组(2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 另设空白对照组, 每组 15 只。镜检各组小鼠阴道灌洗液白色念珠菌及脱落上皮细胞, 并计算其转阴率, 测定阴道灌洗液菌落形成单位(CFU), HE 染色观察各组小鼠阴道组织病理改变。结果: 模型对照组各小鼠阴道灌洗液均可见白色念珠菌感染, 但空白对照组未见。与模型对照组比较, 给药后第 5, 8 天艾叶发酵物各剂量组及氟康唑组均能显著增加白色念珠菌孢子及脱落细胞转阴率, 降低 CFU 数量, 减轻阴道组织损伤($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且艾叶发酵物于给药第 8 天, 中、高剂量组上述指标结果更显著($P < 0.01$); 而艾叶水提物组与模型对照组比较上述各指标无差异。结论: 艾叶发酵物对白色念珠菌阴道炎小鼠具有显著治疗作用, 艾叶水提物疗效较艾叶发酵物差。

[关键词] 艾叶; 发酵; 白色念珠菌; 阴道炎

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0131-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160131

Therapeutic Effects of Artemisiae Argyi Folium Aqueous Extract and Its Ferment Substance on *Candida albicans* Vaginitis in Mice

BAI Jing¹, HU Lei¹, ZHANG Li², TIAN Chu-yu¹, PANG De-quan¹, BO Hai-mei¹, HAN Shu-ying^{1*}

(1. Hebei United University, Tangshan 063000, China;

2. Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China)

[收稿日期] 20131009(010)

[基金项目] 唐山市科技计划项目(12130208A-2)

[第一作者] 白静, 硕士, 副教授, 从事中药药理学研究, Tel:0315-3725870, E-mail:13513259511@sina.com

[通讯作者] * 韩淑英, 硕士, 教授, 从事中药药理学研究, E-mail:1003214620@qq.com

- [2] 丁涛. 附子的现代药理研究与临床新用[J]. 中医学报, 2012, 27(12):1630.
- [3] 孙凯, 李佳, 张永清. 附子生物碱分布规律研究[J]. 吉林中医药, 2013, 33(3):286.
- [4] 徐菲飞, 彭成, 王拙伉, 等. 参附注射液对戊巴比妥钠致心衰模型心肌细胞膜 ATP 酶和相关离子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7):196.
- [5] 赵驰. 重新认识心衰机制中的心脏舒张期耗能[J]. 新思维与探索, 2013, 34(5):73.
- [6] 胡元会, 车维新, 曹雪滨, 等. 心复康口服液对大鼠实验心衰模型心肌细胞 Ca^{2+} -ATPase 及琥珀酸脱氢酶活性的影响[J]. 中国医药学报, 2000, 15(2):31.
- [7] Simao F, Matte A, Matte C, et al. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na K-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats [J]. Nutr Biochem, 2011, 22:921.
- [8] Hoffmann E K, Lambert I H, Pedersen S F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates [J]. Physiol Rev, 2009, 89:193.
- [9] 钱睿哲, 杨诗春, 张国平, 等. 高龄大鼠心肌 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶与心电图变化的关系 [J]. 中国微循环, 1999, 3(1):24.
- [10] 李舸远, 陈东亚, 蔡美明, 等. 去乙酰毛花苷注射液的杂质研究[J]. 药学与临床, 2011, 19(6):508.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To observe effects of *Artemisiae Argyi Folium* aqueous extract and its ferment substance on candida albicans vaginitis in mice. **Method:** The *Candida albicans* vaginitis model was induced by the vagina in mice which were vaccinated 1×10^7 cfu/mL *C. albicans* suspension 20 μ L. The model mice were randomly divided into control group, model group, *Artemisiae Argyi Folium* aqueous extract group (20 g \cdot L⁻¹), *Artemisiae Argyi Folium* ferment substance (AAFS) groups with different doses (10, 20, 40 g \cdot L⁻¹) and fluconazole group (2 g \cdot L⁻¹), 15 mice each group. The mice in each group were given therapeutic drugs by vagina vaccination for 7 d, once per day. The candida albicans and epithelial cells in vaginal lavage liquid were determined by microscopic examination. HE staining observed pathological changes of vaginal tissue. **Result:** The candida albicans infection was found in model group, but not in blank control group. Compared with the model group, AAFS with different doses and fluconazole could remarkably increase negative-converting rate of candida albicans and epithelial cells, decrease CFU number, and reduce the damage of vaginal tissue at 5 or 8 day after the treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and AAFS with middle and high doses had more remarkable effects at 8 d after administration ($P < 0.01$), but *Artemisia Argyi* aqueous extract group had no difference on above indexes. **Conclusion:** Compared with *Artemisia Argyi* aqueous extract, AAFS had significant therapeutic effects on *C. albicans* vaginitis in mice.

[Key words] *Artemisiae Argyi Folium*; ferment; *Candida albicans*; vaginitis

白色念珠菌性阴道炎是妇科常见病,其发病率呈逐年上升趋势,临床表现为严重外阴瘙痒和白带量增多。目前临床上常用的抗白色念珠菌的药物如氟康唑等虽取得了一定的疗效,但复发率高^[1],且部分病人已出现耐药性,使得念珠菌感染的治疗面临新的挑战^[2]。因此,急需研制出不易产生耐药性的抗白色念珠菌感染的新型药物。艾叶为我国传统中药,具有除湿止痒、抗菌消炎、抗肿瘤等功效^[3-4],但传统的制备工艺如采用水煎法制备的艾叶水提物,其抗菌活性较低。本研究采用中药发酵技术,将艾叶进行生物发酵,得到艾叶发酵物(已获得专利)。研究通过建立小鼠白色念珠菌阴道炎模型,考察艾叶发酵物和艾叶水提物对该模型小鼠的治疗作用,并进行疗效比较,以期得到更为有效的抗白色念珠菌感染的药物。

1 材料

1.1 受试药物制备 艾叶采自内蒙古通辽,经河北联合大学药理教研室韩淑英教授鉴定为菊科植物 *Artemisia argyi* Lévl. et. Vant. 的干燥叶。将艾叶研碎,水浴加热煮沸 2 h 后,4 层纱布过滤,将滤渣继续浸煮 2 h,将两次滤液合并,浓缩成每 100 mL 含生药 100 g,即得艾叶水提物。取高压灭菌后的增菌液体培养基(蛋白胨 40 g,酵母浸粉 20 g,葡萄糖 40 g 于 1 000 mL 蒸馏水中)于无菌容器内,无菌环境下加安琪干酵母 0.1 g \cdot mL⁻¹,置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 6 h。将活化增殖的酵母菌液加入等体积的上述艾叶水提物、6% 蛋白胨、6% 葡萄糖,混合均匀后继续发

酵。发酵条件为:培养温度 37 $^{\circ}$ C,培养时间 72 h。发酵结束后,将发酵物加入无水乙醇,使乙醇终体积分数达到 70%,在 70 $^{\circ}$ C 萃取 4 h,将提取液 2 500 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min。取上清液在旋转蒸发器上回收乙醇,回收乙醇后的剩余液即为醇提后的艾叶发酵物。即每 100 mL 艾叶发酵物含生药 50 g。

1.2 试剂 氟康唑注射液(安徽双鹤药业有限责任公司,批号 1109184A),苯甲酸雌二醇注射液(天津必佳药业集团有限公司,批号 20120101),PBS 粉末(北京雅安达生物技术有限公司,批号 20120101),蛋白胨(北京博星生物技术有限公司,批号 20110826)。

1.3 菌株 白色念珠菌临床新分离菌株,由开滦医院检验科提供。挑取新培养 24 h 白色念珠菌菌落混悬于 PBS 液中,震荡使之充分混匀,应用血细胞计数板调节密度至 1×10^7 cfu/mL。

1.4 动物 SPF 级昆明种小鼠,18 ~ 22 g,雌性,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)2009-0008。

1.5 仪器 MLS-3750 型高压灭菌器(日本 SANYO),HR40-IIA2 型生物安全柜(青岛海尔公司),CoicXDS-1B 型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司),2123TC 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 SHEL-LAB)。

2 方法

2.1 模型建立及分组给药 取小鼠 125 只,随机挑出 15 只作空白对照组,其余 110 只隔日 sc 苯甲酸

雌二醇注射液 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$,使小鼠处于假发情状态,6 d后将密度为 10^7 个孢子/mL的菌悬液 $20 \mu\text{L}$ (即白色念珠菌孢子接种量为 2×10^5),用加样器注入小鼠阴道内,接种后用镊子轻轻捏住小鼠阴道口 30 s 以防菌液外漏^[5]。于接种第 5 天进行阴道分泌物真菌镜检,若镜检有大量脱落细胞和真菌孢子或有菌丝生成,即确定造模成功。将成模的 90 只小鼠随机分组:模型对照组、氟康唑组($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、艾叶水提取物组($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)艾叶发酵物低、中、高剂量组($10, 20, 40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),每组 15 只。各组小鼠经阴道灌注给予相应药物 $30 \mu\text{L}$,空白对照组和模型对照组阴道灌注 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液,各组均连续给药 7 d,每天 1 次。

2.2 阴道灌洗液检测

2.2.1 镜检阴道灌洗液白色念珠菌孢子及脱落细胞

各组小鼠均于给药第 0, 5, 8 天用 $50 \mu\text{L}$ PBS 灌洗阴道 5 次,置灌洗液于清洁无菌管中。阴道灌洗液摇匀后,取 $50 \mu\text{L}$ 于显微镜下。镜下未检出芽生孢子及菌丝者标记为“-”阴性。视野范围内脱落细胞数均 < 30 个者标记为“-”。

转阴率 = 转阴小鼠数/小鼠总数 $\times 100\%$

2.2.2 阴道灌洗液菌落形成单位 (CFU)测定

另取无菌阴道灌洗液进行 200 倍稀释后,用微量加样器取 $20 \mu\text{L}$ 滴种于沙堡培养基平皿上, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养

48 h,观察每个平皿 CFU。计算 $\text{CFU}/\text{mL} = \text{每个平皿 CFU}/0.020 \times \text{稀释度}$ 。

2.3 阴道组织病理学检查

于末次给药次日(给药第 8 天)阴道灌洗后,脱白处死小鼠,解剖分离出每组小鼠阴道组织,常规石蜡包埋,HE 染色,镜下观察病理变化($\times 100$)。切片标本镜下按充血、水肿、出血、浸润 4 项基本指标进行评分,无充血、水肿、出血、浸润评 0 分,轻度评 1 分,中度评 2 分,重度评 3 分^[6],分别用 -, +, ++, +++ 来表示。

2.4 统计方法

采用 SPSS 11.5 统计软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计结果分别采用卡方检验、秩和检验进行数据处理。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 给药后第 5, 8 天各组小鼠白色念珠菌孢子及脱落细胞转阴率及菌落形成单位数

空白组镜检未见白色念珠菌孢子、脱落细胞及菌落形成,模型组各小鼠均出现白色念珠菌感染、脱落细胞,并有大量菌落形成。与模型对照组比较,给药后第 5 天、第 8 天艾叶发酵物各剂量组及氟康唑组均能显著增加孢子及脱落细胞转阴率,并减少菌落形成单位数目($P < 0.01$),艾叶发酵物随着剂量增大,作用越显著。而艾叶水提取物上述作用低于艾叶发酵物各剂量组($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 艾叶水提取物及其发酵物对给药后不同时间各组小鼠阴道灌洗液白色念珠菌孢子、脱落细胞转阴率及菌落形成单位数($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	孢子转阴率/%		脱落细胞转阴率/%		菌落形成单位数/ $\times 10^4$	
		第 5 天	第 8 天	第 5 天	第 8 天	第 5 天	第 8 天
空白	-	100	100	100	100	0	0
模型	-	0 ¹⁾	0 ¹⁾	0 ¹⁾	0 ¹⁾	$38.6 \pm 9.5^{1)}$	$45.7 \pm 10.3^{1)}$
艾叶水提取物	20	13.3	26.7 ²⁾	20.0	20.0	29.4 ± 7.6	28.6 ± 8.1
艾叶发酵物	10	$40.0^{3,4)}$	$53.3^{3,4)}$	$46.7^{3,4)}$	$53.3^{3,5)}$	$19.2 \pm 6.5^{3,4)}$	$18.3 \pm 6.1^{3,4)}$
	20	$66.7^{3,5)}$	$80.0^{3,5)}$	$66.7^{3,5)}$	$80.0^{3,5)}$	$13.5 \pm 5.2^{3,5)}$	$12.8 \pm 4.9^{3,5)}$
	40	$73.3^{3,5)}$	$86.7^{3,5)}$	$80.0^{3,5)}$	$86.7^{3,5)}$	$5.3 \pm 0.4^{3,5)}$	$5.1 \pm 0.3^{3,5)}$
氟康唑	2	$80.0^{3,5)}$	$86.7^{3,5)}$	$86.7^{3,5)}$	$93.3^{3,5)}$	$5.4 \pm 0.4^{3,5)}$	$5.0 \pm 0.3^{3,5)}$

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型对照组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与艾叶水提取物比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

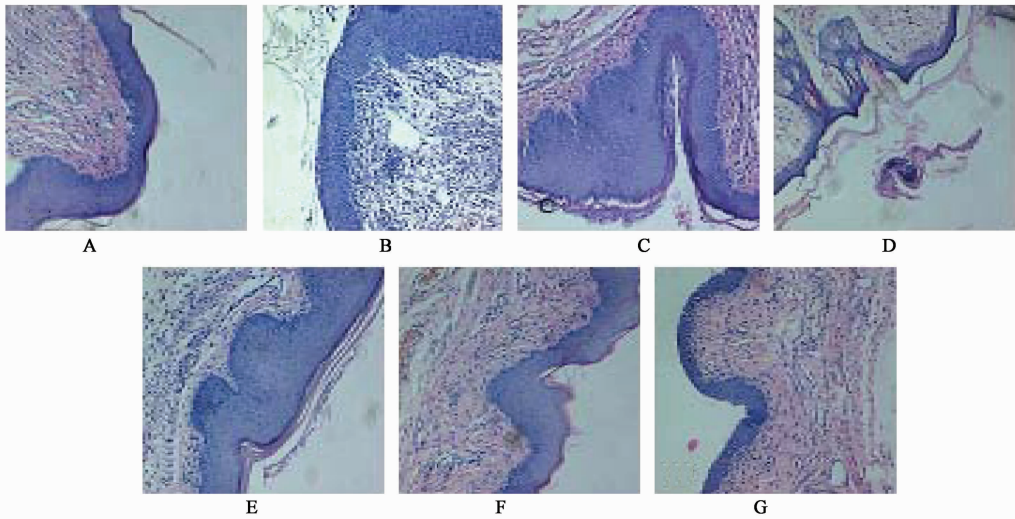
3.2 阴道病理组织检查

与空白组比较,模型组小鼠阴道组织重度充血、水肿、炎性浸润程度严重;与模型组比较,艾叶发酵物各剂量组及氟康唑组病变程度明显减轻,而艾叶水提取物组无显著改善。见图 1,表 2。

4 讨论

中药发酵技术是将发酵技术运用到中药研发

中,它以中药为反应底物,通过微生物发酵过程对其结构进行修饰、转化从而达到提高中药药效、降低毒性、促进吸收、改善口味等目的^[7-8]。目前该技术已成为一种新型的中药研究技术,并取得了一定的成绩。如藏建伟等曾用光和细菌对六味地黄汤进行微生物转化,结果表明药物经发酵后在治疗肾阴虚、抗衰老等方面明显优于发酵前^[9]。用米曲霉将虎杖



A. 正常对照组; B. 模型对照组; C. 艾叶水提取物组 (20 g·L⁻¹); D. 艾叶发酵物组 (10 g·L⁻¹);
E. 艾叶发酵物组 (20 g·L⁻¹); F. 艾叶发酵组 (40 g·L⁻¹); G. 氟康唑组 (2 g·L⁻¹)
图 1 艾叶水提取物及其发酵物对小鼠阴道组织病理变化的影响 (HE, ×100)

表 2 艾叶水提取物及其发酵物对白色念珠菌性
阴道炎小鼠病理组织评分的影响 (n = 15)

组别	剂量 /g·L ⁻¹	病理组织评分/分			
		0	1	2	3
空白对照	-	15	0	0	0
模型对照	-	0	0	3	12 ¹⁾
艾叶水提取物	20	0	3	9	3 ²⁾
艾叶发酵物	10	2	4	8	1 ^{3,4)}
	20	4	6	5	0 ^{3,4)}
	40	9	4	2	0 ^{3,5)}
氟康唑	2	9	3	3	0 ^{3,5)}

中白藜芦醇苷转化为白藜芦醇,解决了白藜芦醇含量偏低的问题^[10]。

艾叶为我国传统中药,具有一定的除湿止痒、抗菌消炎等作用,但疗效较差,临床较少应用。为提高艾叶的药效,本研究采用酵母菌进行艾叶发酵,以期得到更为有效的抗白色念珠治疗药物。结果表明与模型对照组相比,艾叶发酵物中、高剂量组可明显增加模型小鼠白色念珠菌孢子转阴数、降低阴道灌洗液白细胞和脱落上皮细胞数和阴道灌洗液载菌量,减轻阴道组织病理损伤,且上述作用明显优于传统艾叶水提取物。提示艾叶发酵物具有明显的抗白色念珠菌作用,对白色念珠菌性阴道炎具有显著治疗作用。但艾叶发酵物中何种成分发挥了该作用尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 杨仙芳. 356 例念珠菌阴道炎患者病情分析[J]. 现代预防医学, 2005, 32(3): 273.
- [2] 陆少颜, 余连双, 谭忠伟, 等. 念珠菌阴道炎及其耐药性分析[J]. 中国微生物学杂志, 2008, 20(2): 183.
- [3] Hu Y, Yang Y, Ning Y, et al. Facile preparation of artemisia argyi oil-loaded antibacterial microcapsules by hydroxyapatite-stabilized Pickering emulsion templating [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013, 112(13): 96.
- [4] Seo J M, Kang H M, Son K H, et al. Antitumor activity of flavones isolated from Artemisia argyi [J]. Plant Med, 2003, 69(3): 218.
- [5] 陈琢, 孔小锋, 王容, 等. 洁泽 2 号预防白色念珠菌阴道炎的实验研究 [J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(6): 788.
- [6] 张国庆, 冯文茹, 米沙, 等. 地锦草乙醇提取物对白色念珠菌性阴道炎大鼠模型的治疗作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 191.
- [7] 王兴红, 李祺德, 曹秋娥, 等. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容 [J]. 中草药, 2001, 32(3): 267.
- [8] 张丽霞, 高文远, 王海洋, 等. 微生物技术在中药炮制中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3695.
- [9] 曾常青, 曾宇, 黄应起, 等. 经光合细菌作用的六味地黄汤成分变化的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(8): 598.
- [10] 彭浩, 邓百万, 陈文强, 等. 虎杖内生真菌产白藜芦醇苷菌株的分离鉴定 [J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 889.

[责任编辑 聂淑琴]