

# 白及不同提取部位抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的体内外活性

彭芙<sup>1,2</sup>, 万峰<sup>2,3\*</sup>, 熊亮<sup>2</sup>, 彭成<sup>2\*</sup>, 陈放<sup>1</sup>

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610225; 2. 成都中医药大学 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室, 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 610075; 3. 四川省人民医院新津分院, 成都 611430)

**[摘要]** 目的: 研究白及对“超级细菌”——耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的抑菌作用及活性部位。方法: 规范提取白及乙酸乙酯部位、正丁醇部位、萃取后水部位、醇提后水煎液部位等 4 个部位, 采用琼脂平板二倍稀释法测定以上 4 个部位对金黄色葡萄球菌(MSSA)及 MRSA 共 6 株病原菌的 MIC; 用白及乙酸乙酯部位以两种给药方式对小鼠进行预防给药, 测定白及对 MRSA 感染 SPF 小鼠的保护力。结果: 乙酸乙酯部位和正丁醇部位对受试病原菌均具明显抑菌活性, 4 个部位中尤以乙酸乙酯部位的抑菌活性最强, 其 MIC 为 0.065~0.26 g·L<sup>-1</sup>; 且白及乙酸乙酯部位对 MRSA 感染小鼠有很强的保护作用, 其中尤以 ip 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 的保护达到 100%。结论: 白及对 MSSA 和 MRSA 有明显的抑菌作用, 乙酸乙酯部位是其主要的活性部位。

**[关键词]** 白及; 活性部位; 体内外抑菌活性; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0217-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013170217

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130625.0955.005.html>

**[网络出版时间]** 2013-06-25 9:55

## Research on Antibacterial Active Fraction of *Bletilla striata* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

PENG Fu<sup>1,2</sup>, WAN Feng<sup>2,3\*</sup>, XIONG Liang<sup>2</sup>, PENG Cheng<sup>2\*</sup>, CHEN Fang<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610225, China;  
2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Systematic Research and Exploitation of Traditional Chinese Medicine Resources, Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;  
3. Xinjin Hospital of Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 611430, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study antibacterial active fraction of *Bletilla striata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Method:** Minimum inhibitory concentrations (MICs) of ethyl acetate extract, n-butanol extract, water extract after extraction and water decoction after extracting alcohol from *B. striata* against MRSA and *S. aureus* (MSSA) was assayed. Oral administration and intraperitoneal injection of ethyl acetate extract from *B. striata* were given to mice before they are infected by MRSA. **Result:** Ethyl acetate extract and n-butanol extract showed obvious antibacterial activity. Ethyl acetate extract had the highest activity with MIC 0.065-

**[收稿日期]** 20130123(016)

**[基金项目]** 国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2009BAI84B00)

**[第一作者]** 彭芙, 本科在读, E-mail: fujing126@yeah.net

**[通讯作者]** \* 万峰, 硕士, 从事抗菌中药药效和疾病动物模型研究, Tel: 13678038143, E-mail: wanfengcdzy@126.com;

\* 彭成, 教授, 博士生导师, 从事中药药效和毒理研究, E-mail: pengchengdu@126.com

0.26 g · L<sup>-1</sup>. Ethyl acetate extract could completely protect mice from MRSA through intraperitoneal injection with the concentration of 0.5 g · kg<sup>-1</sup>. **Conclusion:** Ethyl acetate extract is the main active fraction of *B. striata* against MRSA and MSSA.

[ **Key words** ] *Bletilla striata*; antibacterial activity; active fraction; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 俗称“超级细菌”, 自 20 世纪 60 年代在欧美首先发现了以来, 在临床分离的葡萄球菌中的比例不断增加, 且已成为感染的重要病原菌<sup>[1]</sup>, 并常见其流行、暴发的报道<sup>[2-3]</sup>。研发控制 MSRA 的药物势在必行。由于 MRSA 是多药耐药微生物<sup>[4]</sup>, 抗生素使用受到极大限制, 因此, 国内外学者展开了中药控制耐药菌感染的研究。由于中药的特殊性, 使细菌较少对其产生耐药性<sup>[5]</sup>。

白及具消肿生肌、收敛止血之效, 可用于治疗皮肤皲裂、咯血、刀伤跌打、疮疡肿毒等症<sup>[6-7]</sup>。《本草纲目》载白及“苦、平、无毒”, 轻微的烧冻伤亦能适量涂于患部。白及亦具有抑菌作用。本实验旨在探究白及活性部位对 MRSA 的体内外抑菌活性。

## 1 材料

**1.1 药物及制备** 白及购自北京同仁堂成都分店, 经成都中医药大学鉴定教研室的马云桐老师鉴定为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thund.) Reichb. f. 的干燥块茎。注射用盐酸万古霉素 (浙江医药股份有限公司新昌制药厂, 批号 111204), Mucin form Porcine Stomach (Type II, Sigma-Aldrich, 批号 018K0079)。

**1.1.1 白及乙酸乙酯部位的提取** 称取白及药材 250 g, 粉碎, 加 95% 乙醇加热回流, 提取两次, 第 1 次 10 倍量, 第 2 次 8 倍量, 1 h/次。将两次提取液合并, 过滤, 滤液减压回收溶剂, 得粗浸膏 31 g。剩余药渣备用。取粗浸膏, 加水约 250 mL, 超声混悬, 转移至 1 000 mL 分液漏斗中, 加石油醚分别萃取 8 次, 300 mL/次, 减压回收石油醚。水层再用乙酸乙酯萃取 10 次, 250 mL/次, 减压回收乙酸乙酯, 得乙酸乙酯部位 8 g。剩余水层备用。

**1.1.2 白及醇提后水煎液部位** 取 1.1.1 中剩余药渣, 加 8 倍量水 (约 2 000 mL) 煎煮 1 h, 用纱布过滤, 滤液加热到 60 ℃, 减压浓缩, 得醇提后的水煎液部位 95 g。

**1.1.3 正丁醇部位的提取方法** 取 1.1.1 中剩余的水层, 加入正丁醇萃取 10 次, 250 mL/次, 减压回收正

丁醇, 得正丁醇部位提取物 7 g。剩余水层备用。

**1.1.4 白及正丁醇萃取后水部位** 取 1.1.3 中剩余的水层液, 加热至 60 ℃, 减压浓缩, 得萃取后的水部位提取物 12 g。

## 1.2 菌株

**1.2.1 标准菌株** 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC 43300 (MRSA, 购于中国工业微生物菌种保藏中心)、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 (MSSA, 四川抗菌素工业研究所赠送)。

**1.2.2 临床分离菌株** 经 VITEK-60, VITEK-32 自动微生物鉴定分析仪进行鉴定, 再经 Biolog 细菌鉴定仪 (美国) 及 20NE, API 20E, Staph 系列和常规方法鉴定的 1 株 MRSA 临床分离病原菌以及 3 株 MSSA 临床分离病原菌。

**1.3 动物** SPF 级 KM 小鼠, 成都中医药大学实验动物研究中心, 生产许可证号 SCXK (川) 2008-11; 使用合格证号 SCXK (川) 2008-049。

**1.4 试剂及用品** Mueller-Hinton agar (OXOID, 批号 729683), 一次性无菌培养皿 (江苏康健生物有限公司), 营养琼脂培养基 (杭州微生物试剂有限公司, 批号 20100831-02), Mcfarland Standard (bio Meriëux Inc., 批号 821772701) 等。

## 2 方法

**2.1 体外抑菌活性试验** 采用琼脂平板二倍稀释法<sup>[8]</sup> 分别测定白及醇提后水煎液部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和萃取后水部位对受试标准菌株及临床分离病原菌的体外抑菌活性。

**2.1.1 含药平板制备** 4 个不同部位分别用蒸馏水或 DMSO 稀释液进行等倍稀释, 分别稀释成 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 等共 9 个梯度。在一次性使用无菌培养皿中分别加入上述不同浓度的药液稀释液 1 mL 和 14 mL 灭菌 MH 培养基, 充分混匀, 晾干备用。

**2.1.2 菌液配置** 将受试菌株用无菌生理盐水调至菌液密度 1.5 × 10<sup>6</sup> CFU/mL。

**2.1.3 最低抑菌浓度 (MIC) 测定** 使用细菌多点接种仪将受试菌株的菌液加入不同浓度梯度的含药平板及阳性对照平板, 并以生理盐水代替菌液作为阴

性对照。37 ℃ 恒温培养 18 ~ 24 h, 观察不同菌株在含不同浓度药物平板中的生长情况。在阴、阳性对照均成立的情况下, 以培养皿中无细菌生长的最小质量浓度为该试验部位对该菌的 MIC。

## 2.2 体内抗菌活性试验

**2.2.1 预试验** 试验菌株毒力的测定: 37 ℃ 恒温培养受试 MRSA 至对数生长期, 用无菌生理盐水将其稀释成不同密度的菌液。取上述菌液与 10% 胃膜素等量混合, 按 0.5 mL·20 g<sup>-1</sup> 的菌液量 ip 小鼠, 并以 5% 胃膜素做对照。在对照小鼠不死亡的前提下, 记录小鼠 14 d 内的死亡率, 测定小鼠全部死亡的最低细菌量, 即该菌液的最小致死量 (MLD)。体内有效剂量的预试: 设置多个不同剂量组对 MRSA 所引起的急性感染模型小鼠给药, 每组 4 只, 1 次/d, 并提前 2 d 给药, 在第 3 天给药后 0.5 h 攻毒, 观察小鼠 14 d 内的死亡情况, 确定正式试验给药剂量。

**2.2.2 体内抗菌活性** 取 18 ~ 22 g SPF 级 KM 小

鼠, 雌雄各半, 每组 10 只, 分为注射用盐酸万古霉素组, 白及 1, 0.5, 0.25, 0.125 g·kg<sup>-1</sup> 组, 生理盐水空白组, 模型组, 胃膜素对照组。均提前 2 d 给药, 1 次/d, 在第 3 天给药后 0.5 h 攻毒。其中以生理盐水代替药物为模型组; 以既不给药也不攻毒为空白组; 以不给药只注射不含细菌的 5% 胃膜素为胃膜素对照组。观察小鼠攻毒后 14 d 的存活率。

## 3 结果

**3.1 白及不同活性部位的体外抑菌活性** 采用琼脂平板二倍稀释法测定了白及 4 个部位对临床分离病原菌和标准菌株的 MIC, 见表 1。白及醇提后水煎液和萃取后水部位在试验最大浓度时对受试菌株未表现出抑菌活性, 而正丁醇部位和乙酸乙酯部位均表现出较强的抑菌活性, 其中尤以乙酸乙酯部位的抑菌活性明显, 对受试 MRSA 的 MIC 为 0.065 g·L<sup>-1</sup>, 且与正丁醇部位 MIC 为 (33.333 ± 0.000) g·L<sup>-1</sup> 有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

表 1 白及 4 个部位对受试菌株的体外抑菌活性

菌种	菌株数/n	MIC/g·L <sup>-1</sup>			
		乙酸乙酯部位	醇提后水煎液	萃取后水部位	正丁醇部位
ATCC 43300 (MRSA)	1	0.065	≥66.667	≥8.333	33.333
耐甲氧金黄色葡萄球菌 (MRSA)	1	0.065	≥66.667	≥8.333	33.333
金黄色葡萄球菌 (MSSA)	3	0.065 ~ 0.26	≥66.667	≥8.333	33.333
ATCC 25923 (MSSA)	1	0.065	≥66.667	≥8.333	33.333

注: “≥” 表示白及提取部位在试验最大浓度时未表现出抑菌活性。

**3.2 白及乙酸乙酯部位的体内抗菌活性** 白及乙酸乙酯部位对 MRSA 感染小鼠有很强的保护作用, 其中尤以 ip0.5 g·kg<sup>-1</sup> 的保护力强, 对小鼠的保护力达到了 100%, ip 0.25, 0.125 g·kg<sup>-1</sup> 对小鼠的保护力亦达到 90%, 40%; 灌胃 1, 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 对小鼠的保护力达到 50%, 40%, 见表 2。

## 4 讨论

1961 年, MRSA 首先在英国被检出<sup>[9]</sup>, 同期欧洲出现 MRSA 暴发流行, 随后 MRSA 便在全世界广泛传播<sup>[10]</sup>, 虽有万古霉素等药, 但 MRSA 感染的治疗依旧是临床十分棘手的难题之一<sup>[11]</sup>, MRSA 除对甲氧西林耐药外, 对其他所有与甲氧西林结构相似的 β-内酰胺类抗生素均耐药。MRSA 可通过改变抗生素作用靶位, 产生修饰酶, 降低膜通透性, 产生大量对氨基苯甲酸等不同机制产生耐药性。MRSA 对氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类、

表 2 白及乙酸乙酯部位对耐甲氧金黄色葡萄球菌感染模型小鼠的体内保护 (n = 10)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	给药途径	耐甲氧金黄色葡萄球菌 ATCC 43300	
			存活数/只	存活率/%
空白	-	ig/ip	10	100
模型	-	ip	0	0
胃膜素对照	1.25	ig/ip	10	100
盐酸万古霉素 <sup>1)</sup>	40	ip	10	100
白及乙酸乙酯部位	0.5	ip	10	100
	0.25	ip	9	90
	0.125	ip	4	40
	1.0	ig	5	50
	0.5	ig	4	40
	0.25	ig	1	10

注: <sup>1)</sup> 剂量单位为万 U·kg<sup>-1</sup>

磺胺类、利福平均产生不同程度的耐药<sup>[12]</sup>。

以往抗菌中药的筛选方向集中于清热解毒、清热燥湿等药物中,如大黄、黄柏、穿心莲等<sup>[13]</sup>。随着中药的研究取得了较大的进展,发现泻下、止血活血、祛湿、补虚等类药物也具有抗菌、抗病毒功效<sup>[14]</sup>。相关文献报道,白及确有抑菌活性<sup>[15-16]</sup>。本实验选用白及为研究对象,研究其对病原菌的体内外抗菌活性。结果发现,在体外实验中,白及不仅对 MSSA 金黄色葡萄球菌有较为明显的抗菌作用,对 MRSA 金黄色葡萄球菌亦存在很强的抗菌活性。其中,尤以白及乙酸乙酯部位的抗菌作用明显。在体内试验中,以预防给药的实验方法研究发现,白及乙酸乙酯部位对 MRSA 感染小鼠有很明显的保护作用,其中以白及乙酸乙酯对感染小鼠进行腹腔注射  $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  表现最为明显。因此,白及的乙酸乙酯部位通过进一步研究,有望开发为继中药沉香<sup>[16]</sup>以后抗 MRSA 的中药新型药物,并应用于临床。

#### [参考文献]

[1] Edward D Mc Coul, Deya N Jourdy, Madeleine R Schaberg, et al. Methicillin-resistant staphylococcus aureus sinusitis in nonhospitalized patients: A systematic review of prevalence and treatment outcomes [J]. Laryngoscope, 2012, 122(10):2125.

[2] 顾觉奋. 获取抗生素的新途径——沉默基因的激活 [J]. 国外医药:抗生素分册, 2003, 24(5):193.

[3] Hopwood D A, Chater K F. Fresh approaches to antibiotic production [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1980, 290(1040):313.

[4] 张春英, 胡海峰. 新型抗耐甲氧西林金葡萄菌抗生素研究进展 [J]. 世界临床药物, 2011, 32(9):548.

[5] 王一平, 郭世民. 中药抗菌作用研究思路 [J]. 云南中医中药杂志, 2007, 28(6):5.

[6] 周云凯, 李伟平, 田莎莎, 等. 白及须根和块茎总酚含量的测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):161.

[7] 俞林花, 聂绪强, 潘会君, 等. 白及多糖对糖尿病溃疡创面愈合的作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11):1487.

[8] 万峰, 彭成, 代敏, 等. 26 味清热解毒药对奶牛乳腺炎病原菌体外抗菌活性的比较 [J]. 西北农业学报, 2011, 20(11):25.

[9] Sievert D M, Boulton M L, Stoltman G, et al. *Staphylococcus aureus* resistant to Vancomycin-United States [J]. MMWR, 2002, 51(26):565.

[10] Bo Shopsis, Barry N K. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(2):323.

[11] Goyal N, Miller A, Tripathi M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): colonisation and pre-operative screening [J]. Bone Joint J, 2013, 95B(1):4.

[12] Brumfitt W, Miller J H. Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* [J]. N Engl J Med, 1989, 320(18):1188.

[13] 刘华钢, 申庆荣, 刘丽敏. 中药抗菌研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2):463.

[14] 李忠海, 钟海雁, 郑锦星, 等. 槟榔提取物在小白鼠体内的抑菌作用 [J]. 食品与机械, 2007, 23(5):81.

[15] Shuzo Takagi, Masae Yamaki, Keiko Inoue. Antimicrobial agents from *Bletilla striata* [J]. Phytochemistry, 1983, 22(4):1011.

[16] Kubo Michinori, Sato Noriko, Yamazaki Miho, et al. Application studies of *Bletillae Rhizoma* (Rhizomes of *Bletillae striata*) on atopic dermatitis [J]. Nat Med, 2003, 57(2):55.

[责任编辑 聂淑琴]