

金莲花总黄酮抗菌作用的实验研究

刘平, 陈光晖, 邓淑华, 刘玉玲, 佟继铭*

(河北中药研究与开发重点实验室—承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的: 观察金莲花总黄酮(FTLR)体内外的抗菌活性。方法: 体外抗菌实验, 采用营养肉汤对金黄色葡萄球菌等 14 个菌株进行试管连续稀释法和营养琼脂扩散法测定 FTLR 的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。体内实验采用金黄色葡萄球菌 26002-6 标准株感染昆明种小鼠作为模型, 模型小鼠被随机分为 FTLR 440, 220, 110 mg·kg⁻¹ 剂量组, 金莲花片 2 400 mg·kg⁻¹ 对照组(金莲花片 2 400 mg·kg⁻¹ 与 FTLR 440 mg·kg⁻¹ 的生药剂量相等)及模型对照组, 以感染后 24, 48 h 小鼠的死亡率为指标, 观察对金黄色葡萄球菌的体内抗菌活性。结果: 在体外抑菌实验中, FTLR 对 13 个细菌标准菌株和 10 个临床株均有抑制作用, 其 MIC 和 MBC 均低于双黄连口服液; 在体内抑菌实验中, FTLR 各剂量组金黄色葡萄球菌感染小鼠 48 h 死亡率均明显低于模型对照组, 440 mg·kg⁻¹ 组死亡率低于金莲花片 2 400 mg·kg⁻¹ 组。结论: 对多种细菌有明显的抑制作用。相等生药量的总黄酮对金黄色葡萄球菌感染小鼠的保护作用强于金莲花片。

[关键词] 金莲花; 总黄酮; 抗菌活性; 最低抑菌浓度; 最低杀菌浓度; 死亡率

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0207-04

Study on Antibacterial Activity of Flavonoids from *Trollius ledebouri*

LIU Ping, CHEN Guang-hui, DENG Shu-hua, LIU Yu-ling, TONG Ji-ming*

(Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for Traditional Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica of Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antibacterial activity of the flavonoids from *Trollius ledebouri* Reichb (FTLR) were observed *in vivo* and *in vitro*. **Method:** By methods of tube continuous dilution and agar plate diffusions to 14 strains of bacteria, for example *Staphylococcus aureus*, minimal bacteriostatic concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of FTLR were determined *in vitro*. To evaluate antibacterial activity of FTLR *in vivo*, the model of mice infected by the type strain of *S. aureus* 26002-6 was prepared and they were randomly divided into groups of 440, 220, 110 mg·kg⁻¹ of FTLR, 2 400 mg·kg⁻¹ Jinlianhua tablet (2 400 mg·kg⁻¹ of Jinlianhua tablet and 440 mg·kg⁻¹ of FTLR were the same of crude drug

[收稿日期] 20120826(001)

[基金项目] 河北省科技厅重大项目(07276444Z-3)

[第一作者] 刘平, 副主任医师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 0314-2291116

[通讯作者] * 佟继铭, 教授, 研究生导师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 0314-2290076, E-mail: tongjiming@163.com

[8] Walker M J, Curtis M J, Hears D J, et al. The lambeth conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22: 447.

[9] Guo R, Gao X Y, Wang W, et al. Tempol reduces reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized rats [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52: 192.

[10] 程晓莉, 颜学滔, 涂自良, 等. 冠心宁注射液对大鼠缺血再灌注损伤的保护作用以及对热休克蛋白 70 表

达的影响 [J]. *中国医院药学*, 2009, 29(13): 1080.

[11] 刘建勋, 徐立, 尚晓泓, 等. 地奥心血康对犬心肌缺血及血流动力学的影响 [J]. *新药与临床*, 1994, 13(5): 136.

[12] 赵丹, 李杨, 张键, 等. 地奥心血康对犬心肌缺血再灌注的血液过氧化脂质、氧自由基及红细胞超氧化物歧化酶活力的影响 [J]. *新药与临床*, 1997, 16(1): 12.

[责任编辑 聂淑琴]

dose) and model control group and the mortality of mice in different groups was calculate in 24, 48 h mice after infection. **Result:** In bacteriostasis experiment *in vitro*, FTLR shows obvious bacteriostatic activity on the used strains and its MIC and MBC were lower than those of Shuanghuanglian oral liquid. In bacterostasis activity *in vivo*, the mortality of mice in all groups of FTLR was lower than in modle control group in 24, 48 h mice after infection. **Conclusion:** FTLR has obvious inhibition effect on several kinds of bacteria *in vitro* and protective effect on infected mice induced by *S. aureu* 26002-6.

[**Key words**] *Trollius ledebouri*; flavonoids; antibacterial activity; MIC; MBC; mortality

金莲花总黄酮为金莲花主要有效部位。金莲花为毛茛科金莲花属植物金莲花或亚洲金莲花的花。《中药大辞典》:金莲花清热解毒、治上呼吸道感染、扁桃体炎、咽炎、急性中耳炎、急性鼓膜炎、急性淋巴管炎、口疮、疔疮^[1-2]。金莲花质轻升散,味苦清泄,性寒清热,其治疗感冒风热证或上呼吸道感染恰切病机,故疗效颇著^[3-4],毒性低、副作用少,在临床广泛应用。目前临床应用的金莲花制剂多以金莲花为粗提物制剂,其中成分复杂,质量可控性差,用量较大。本项研究的目的是观察金莲花总黄酮的体内外抗菌活性,为将其开发成为质量可控、用药剂量小,疗效稳定,应用方便的金莲花新制剂奠定基础。

1 材料

1.1 金莲花药材 金莲花药材购于承德市围场县坝上草原,经承德医学院中药研究所李守拙教授鉴定,为短瓣金莲花 *Trollius ledebouri* Reichb. 的干燥花或花蕾。

1.2 金莲花总黄酮 由承德医学院中药研究所植物化学研究室提供,批号 20090414,提取率为 5%,总黄酮含量 62%,室温干燥保存。临用时以蒸馏水溶解,NaHCO₃ 调 pH 至 7.4,4 ℃ 保存,体外抑菌试验中,经高压灭菌后使用。

1.3 对照药物 双黄连口服液^[5](成分为金银花 375 g,黄芩 375 g,连翘 750 g,共含生药 1 500 g,制成 1 000 mL,即口服液含生药量为 1 500 g·L⁻¹),哈药集团三精制药股份有限公司生产,每支 10 mL,批号 08120434,密封保存,体外抑菌试验时煮沸 30 min 灭菌后使用。金莲花片(承德颈复康药业集团有限公司生产,批号 080810)。

1.4 细菌菌株 标准菌株:表皮葡萄球菌(26069-5)、金黄色葡萄球菌(26001-26)、金黄色葡萄球菌(26002-6)、大肠埃希氏菌(44113-10)、大肠埃希氏菌(44102-3a3)、甲型副伤寒沙门氏菌(50001-25)、乙型副伤寒沙门氏菌(50076-1)、痢疾志贺氏菌(51054-4a)、变形杆菌(49027-10)、伤寒沙门氏菌(50071-10)、甲型溶血性链球菌(32205-12)、乙型溶

血性链球菌(32204-7a)、肺炎链球菌(31001-9a),均购自中国药品生物制品检定所。临床菌株:肺炎链球菌(090313)、草绿色链球菌(090311)、草绿色链球菌(090312)、绿脓杆菌(090314)、奇异变形杆菌(090319)、金黄色葡萄球菌(090317)、大肠杆菌(090315)、大肠杆菌(090316)、粪肠球菌(090318)、鲍曼不动杆菌(090207),均来自承德医学院附属医院。

1.5 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,体重 20~22 g,由河北医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(冀)2010-08-094。

1.6 试剂 营养肉汤培养基(批号 081112),营养琼脂培养基(批号 090205),S.S 琼脂培养基(批号 090104),均产自杭州天和微生物试剂有限公司;胎牛血清(FBS,北京元亨圣马生物技术研究,批号 070308),甲基纤维素(MC,天津市福晨化学试剂厂,批号 081030),干酵母(安琪酵母股份有限公司生产,批号 20081210)。

1.7 仪器 HH-400 型电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂生产),倒置显微镜(重庆光学仪器厂生产),XQGOI 型电热蒸气消毒器(山东新华医疗器械厂)。

2 方法

2.1 体外抗菌试验

2.1.1 试验菌液的配制 甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌分别以 10% FBS-营养肉汤培养基 37 ℃ 18 h 增菌培养,相同培养基 10⁻¹ 稀释为试验菌液。其他细菌分别以营养肉汤培养基 37 ℃ 18 h 增菌培养,相同培养基 1 × 10⁻³ 稀释为试验菌液^[6]。

2.1.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定^[7-8] 灭菌金莲花总黄酮(原料)25.0 g·L⁻¹(含纯总黄酮 15.5 g·L⁻¹)浓度起始,甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌试验采用 10% FBS-营养肉汤培养基,其他细菌试验采用营养肉汤培养基倍比稀释药液 8 次,各药液质量浓度依次为:12.5,6.25,3.12,

1.56,0.78,0.39,0.20,0.10 g·L⁻¹,每孔 1 mL 加入 24 孔细胞培养板,每稀释度药液设 2 个复孔,分别加入以上试验菌液 50 μL,并设各菌液不加药物的对照孔,37 °C 培养 18 h,肉眼和倒置显微镜下观察有无细菌生长。

灭菌双黄连口服用培养基液稀释 2 倍液为最高浓度(含生药量为 750 g·L⁻¹),再依次用培养基倍比稀释药液 8 次,各质量浓度药液含生药量依次为 375,187.5,93.75,48.66,23.44,11.72,5.86,2.93 g·L⁻¹。以上同样条件加入试验菌液、观察细菌生长情况。以无细菌生长的药物最高稀释度为最小抑菌浓度(MIC)。

2.1.3 最小杀菌浓度(MBC)的测定^[9-10] 以上无细菌生长培养物 100 μL 接种于普通琼脂平板培养基(甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌接种于血液琼脂平板培养基,变形杆菌接种于 SS 琼脂平板培养基),37 °C 培养 18 h,计数菌落。

以菌落数少于 5 个(2 复孔平均值)的药物最高稀释度为药物对该细菌的最小杀菌浓度(MBC)。

2.2 致死性金黄色葡萄球菌感染小鼠的死亡率^[11-12]

2.2.1 细菌感染最小致死量(浓度)的确定 金黄色葡萄球菌(临床)37 °C 18 h 增菌培养,以 0.5% CMC 配制 4% 酵母混悬液,1 × 10⁻¹ ~ 1 × 10⁻³ 稀释,给小鼠 ip 0.5 mL/只,每个稀释度感染 5 只小鼠,观察各组小鼠的死亡情况,连续观察 5 d,确定 3 日内可引起小鼠 80% ~ 100% 死亡的菌液浓度为细菌感染最小致死浓度。4% 酵母 CMC 混悬液 10⁻² 稀释金黄色葡萄球菌(临床)感染小鼠,3 日内死亡率达 80%,确定为本实验细菌感染最小致死浓度。

2.2.2 对致死性金葡萄球菌感染小鼠死亡率的影响^[11-12] 昆明种小鼠 50 只,随机分 5 组,实验组小鼠分为金莲花总黄酮 440,220,110 mg·kg⁻¹ 组,金莲花片 2 400 mg·kg⁻¹ 组,模型对照组和空白对照组,ig 给药,给药容积 20 mL·kg⁻¹,模型对照组和空白对照组 ig 等容积水,每日 1 次,连续 3 d。至第 3 天给药后 40 min 以最小致死浓度金葡萄菌 0.5 mL/只 ip 作致死性攻击,空白对照组小鼠 ip 细菌稀释液。感染小鼠后 1 次/h 观察各组小鼠死亡情况。计算 48 h 小鼠死亡数,计算死亡率(死亡率 = 小鼠死亡数/总数 × 100%)。

2.3 统计分析 χ^2 检验比较组间动物死亡率差异的显著性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 FTLR 体外抑菌作用 在本实验所试菌株条件下,FTLR 的抑菌作用强度排序为:表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌 > 痢疾志贺氏菌、乙型溶血性链球菌 > 甲型副伤寒沙门氏菌、变形杆菌、奇异变形杆菌 > 大肠埃希氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、肺炎链球菌、草绿色链球菌、鲍曼不动杆菌 > 甲型溶血性链球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、粪肠球菌。FTLR 的杀菌作用强度排序为:表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌 > 痢疾志贺氏菌 > 变形杆菌、乙型溶血性链球菌、奇异变形杆菌 > 鲍曼不动杆菌、大肠埃希氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、肺炎链球菌、草绿色链球菌 > 伤寒沙门氏菌、草绿色链球菌、大肠埃希氏菌、大肠杆菌 > 甲型溶血性链球菌、绿脓杆菌、粪肠球菌。见表 1。

3.2 FTLR 对致死性金黄色葡萄球菌感染小鼠死亡率的影响 模型对照组小鼠感染金黄色葡萄球菌后 48 h 死亡率为 90%。FTLR 3 个剂量组和金莲花片组小鼠 48 h 死亡率低于模型对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并有一定剂量依赖关系,见表 2。

4 讨论

本文从体内、体外两个途径探讨了金莲花总黄酮的抗菌作用,体外抑菌实验结果证明,FTLR 对受试的 17 种 23 个菌株表现了不同程度的抑菌作用,抑菌作用强度顺序为表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌 > 痢疾志贺氏菌、乙型溶血性链球菌 > 甲型副伤寒沙门氏菌、变形杆菌、奇异变形杆菌 > 大肠埃希氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、肺炎链球菌、草绿色链球菌、鲍曼不动杆菌 > 甲型溶血性链球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、粪肠球菌。

其中,对临床感染常见的致病表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、痢疾志贺氏菌、乙型溶血性链球菌等抗菌作用较强。

在本实验所试菌株条件下,FTLR 对所试细菌的 MIC 和 MBC(除金黄色葡萄球菌临 090317 的 MBC 略高于双黄连口服液外)均低于双黄连口服液(均以相当于生药量计算),提示 FTLR 抗菌作用强度于双黄连口服液。

体内实验证明 FTLR 灌胃给药可明显降低致死性金黄色葡萄球菌感染小鼠的死亡率,相当于等剂量生药量的条件下,FTLR 组的死亡率低于金莲花片组,提示 FTLR 是金莲花抗菌的活性部位,为用其治疗上呼吸道感染、扁桃体炎、咽炎、急性中耳炎、急性鼓膜炎、急性淋巴管炎、口疮、疔疮^[2] 等感染性

表 1 FTLR 体外抗菌作用的 MIC 和 MBC

g·L⁻¹

菌种	菌号-批号	金莲花总黄酮		双黄连口服液(按生药计)	
		MIC	MBC	MIC	MBC
表皮葡萄球菌	26069-5	0.08(1.60)	0.78(15.6)	2.34	23.45
金黄色葡萄球菌	26001-26	0.08(1.60)	0.78(15.6)	2.34	23.45
	26002-6	0.08(1.60)	0.78(15.6)	4.68	23.45
	临 090317	0.31(6.20)	3.12(62.4)	9.36	46.90
大肠埃希菌	44113-10	1.25(25.0)	12.50(250.0)	75.0	375
	44102-3a3	0.62(12.4)	6.25(36.13)	37.50	187.50
甲型副伤寒沙门菌	50001-25	0.62(12.4)	3.12(62.4)	18.72	93.75
乙型副伤寒沙门菌	50076-1	0.62(12.4)	3.12(62.4)	18.72	187.50
痢疾志贺菌	51054-4a	0.16(3.20)	1.56(31.2)	2.34	23.45
变形杆菌	49027-10	0.31(6.20)	3.12(62.4)	9.36	93.75
伤寒沙门菌	50071-10	1.25(25.0)	6.25(36.13)	18.72	187.50
甲型溶血性链球菌	32205-12	2.50(50.0)	12.50(250.0)	75.0	375
乙型溶血性链球菌	32204-7a	0.31(6.20)	1.56(31.2)	4.68	46.90
肺炎链球菌	31001-9a	0.62(12.4)	3.12(62.4)	18.72	187.50
	临 090313	0.62(12.4)	6.25(36.13)	37.50	187.50
	临 090311	0.62(12.4)	6.25(36.13)	18.72	93.75
草绿色链球菌	临 090312	1.25(25.0)	12.50(250.0)	75.00	750
	临 090314	2.50(50.0)	12.50(250.0)	37.50	375
绿脓杆菌	临 090319	0.31(6.20)	3.12(62.4)	9.36	93.75
奇异变形杆菌	临 090315	2.50(50.0)	6.25(36.13)	75.00	375
	临 090316	1.25(25.0)	6.25(36.13)	37.50	375
粪肠球菌	临 090318	2.50(50.0)	6.25(36.13)	37.50	750
鲍曼不动杆菌	临 090207	0.62(12.4)	6.25(36.13)	37.50	187.50

注:括号内为相当于金莲花原药材剂量。

表 2 FTLR 对致死性金黄色葡萄球菌
感染小鼠死亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	死亡数/只		死亡率 /%
		感染 24 h	感染 48 h	
模型对照	-	7	2	90
FTLR	440	4	1	50 ²⁾
	220	5	2	70 ¹⁾
	110	6	2	80
金莲花片	2 400	5	1	60 ¹⁾
空白对照	-	0	0	0 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

疾病提供了初步的试验依据。

[参考文献]

[1] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京:人民卫生出版社,1983:256.
 [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海人民出版社,1997:1398.
 [3] 刘静,刘建中,郭金甲,等. 金莲花片治疗上呼吸道感染临床观察[J]. 湖北中医杂志,2007,29(10):29
 [4] 王颖,王和平. 金莲花片对上呼吸道感染 100 例临床观察[J]. 中国中医基础医学杂志,2008,14(6):449.
 [5] 田乐,周伟,狄留庆,等. 双黄连口服液中主要活性成

分体外抗菌效应相关性研究[J]. 南京中医药大学学报,2012,8(1):89.

[6] 徐叔云,卞如濂,陈修,等. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1647.
 [7] Fu Y J,Zu Y G,Chen L Y,et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination [J]. Phytotherapy Research, 2007, 21(10):989.
 [8] F Oroojalian, R Kasra Kermanshahi, M Azizi, et al. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens [J]. Food Chemistry, 2010, 120:765.
 [9] 张兴,杨慧波,李亚洲,等. 满药赤莓果不同成分抗菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):188.
 [10] 王秋红,刘玉婕,吕邵娃,等. 线叶菊抗菌作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):141.
 [11] 方伟,刘之光,鲍玲红,等. 五淋丸体内抗菌作用研究[J]. 中国药理与临床,2007,23(4):13.
 [12] 张洪利,刘瑶,成金乐,等. 玄参破壁粉粒体内抗菌实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):178.

[责任编辑 聂淑琴]