

# 宝铎草提取物体外抗菌活性的研究

江滢<sup>1</sup>, 马莹<sup>2</sup>, 茅向军<sup>2</sup>, 沈祥春<sup>1\*</sup>

(1. 贵阳医学院, 贵阳 550004; 2. 贵州省食品药品药检所, 贵阳 550004)

**[摘要]** **目的:**研究宝铎草提取物的体外抗菌作用。**方法:**运用平板打孔法分析宝铎草提取物对常见病原性细菌和单细胞真菌的敏感性。采用微量液体稀释法检测宝铎草各提取物对常见病原性细菌和单细胞真菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。**结果:**宝铎草提取物,除水层外,对不同病原性细菌具有不同的抑制作用,其中水洗脱部分对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌均有抑菌作用,95%乙醇总提物(1:40)和95%乙醇洗脱部分(1:40)对金黄色葡萄球菌具有杀菌作用。而宝铎草水层提取物对细菌和单细胞真菌均未见明显抑制或杀灭作用,所有提取物对单细胞真菌亦均未见显著性作用。**结论:**宝铎草的部分提取物对所试菌株有抑菌作用,而对单细胞真菌均未见明显的抑菌或杀灭作用。

**[关键词]** 宝铎草; 抑菌; 杀菌; 最小抑菌浓度; 最小杀菌浓度

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0203-03

## Effects of Radix et Rhizoma Dispori Extracts on Bacteria and Fungi *in vitro*

JIANG Yan<sup>1</sup>, MA Ying<sup>2</sup>, MAO Xiang-jun<sup>2</sup>, SHEN Xiang-chun<sup>1\*</sup>

(1. Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China;

2. Guizhou Institute for Food and Drug Control, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the *in vitro* effects of Radix et Rhizoma Dispori extracts on bacteria and fungi. **Method:** The effects on bacteria and fungi of Radix et Rhizoma Dispori extracts were measured by inhibition zone diameters. The minimal inhibitory concentrations (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of Radix et Rhizoma Dispori extract was determined by micro-liquid dilution method. **Result:** Radix et Rhizoma Dispori extracts, except for the water layer, have apparent inhibitory effect to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*. The 95% alcohol extract (1:40) and the 95% alcohol elution part (1:40) could kill *S. aureus*. All extracts of Radix et Rhizoma Dispori showed no inhibitory effect to *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Conclusion:** Some extracts of Radix et Rhizoma Dispori have bacteriostatic activities, but no inhibitory effect to single-celled fungi *in vitro*.

**[Key words]** Radix et Rhizoma Dispori; bacteriostatic effect; bactericidal activity; minimal inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration

呼吸道感染是导致慢性咳嗽的主要原因之一,

常引起痰液增多,导致呼吸急促、呼吸不畅甚至呼吸道堵塞,严重者可能因痰液排出机制的缺陷引起窒息或肺部病菌沉积,引发二次感染。抑制呼吸系统细菌感染是防治呼吸系统疾患的重要治疗措施<sup>[1-2]</sup>。

《贵州省中药材、民族药材质量标准(2003年版)》中“百尾参”项下收录宝铎草,为百合科植物宝铎草的干燥根及根茎,具润肺止咳、健脾消积之功效,用于虚损咳喘,痰中带血,肠风下血,食积胀满<sup>[3]</sup>。宝铎草现代药理研究未见相关报道,根据临床及传统文献提示,该药主要用于呼吸系统感染,因

**[收稿日期]** 20120406(009)

**[基金项目]** 贵州省中药现代化与产业化资助项目(黔科合社字[2009]5003)

**[第一作者]** 江滢,博士,副教授,从事病原微生物及其防治研究, Tel: 0851-6908585, E-mail: jiangyan3313@sina.com

**[通讯作者]** \* 沈祥春,博士,教授,从事心血管系统药物药理及中药民族药活性研究, Tel: 0851-6908108, E-mail: shenxiangchun@126.com

此,本研究采用系统分离分析指标宝铎草不同提取部分,采用平板打孔法分析提取物对常见病原性细菌和单细胞真菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC),为宝铎草临床应用及进一步的研究开发提供实验基础。

## 1 材料

**1.1 宝铎草及宝铎草提取物制备** 宝铎草药材购自贵阳三桥药材市场,经贵阳中医学院陈德媛研究员鉴定为百合科植物宝铎草 *Disporum sessile* (Thunb.) D. Don. 的干燥根及根茎,存证标本放置于贵州省药检所中药室。按照系统分离制备方法,获得下列提取物见表 1。

表 1 宝铎草提取物分离制备方法

编号	提取部位	浸膏质量/提取物体积
1	95% 乙醇总提物	1.8 L
2	乙酸乙酯层	120.6 g
3	水层	2.0 L
4	水洗脱部分	300 mL
5	20% 乙醇洗脱部分	200 mL
6	40% 乙醇洗脱部分	52 g
7	60% 乙醇洗脱部分	25 g
8	95% 乙醇洗脱部分	150 mL

注:药材质量均为 18 kg。

**1.2 菌种** 金黄色葡萄球菌(ATCC26112-5)、大肠埃希菌(ATCC25922)、白念珠菌(ATCC10231)均由中国药品生物制品检定所提供,贵阳医学院微生物教研室保存;铜绿假单胞菌(临床分离菌株)、肺炎克雷伯菌(临床分离菌株)、新生隐球菌(临床分离菌株),贵阳医学院微生物教研室鉴定、保存。

**1.3 培养基** 水解酪蛋白琼脂培养基(MH 琼脂培养基),杭州天和微生物试剂有限公司,批号 20080305。按  $3.8\text{ g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$  配制,121 °C 20 min 灭菌,贮于 4 °C 备用。水解酪蛋白培养基(MH 液体培养基),杭州天和微生物试剂有限公司,批号 20080707。按  $2.5\text{ g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$  配制,121 °C 20 min 灭菌,贮于 4 °C 备用。沙保弱琼脂培养基和沙保弱培养基,按蛋白胨 1%,葡萄糖 2%,(琼脂粉 1.5%)配制,115 °C 10 min 灭菌,贮于 4 °C 备用。

**1.4 试剂及对照用抗菌药物** 注射用头孢曲松钠,中诺药业有限公司,批号 110345015;氟康唑,Sigma 公司,批号 060M47071;二甲亚砜,上海润捷化学试剂有限公司,批号 200305122。

**1.5 实验设备** 303A-4 型数显电热培养箱(武汉

精华科教仪器有限公司),202AV-2 型不锈钢立式电热干燥箱(武汉精华科教仪器有限公司),TD10002 型电子天平(余姚市金诺天平仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 对不同菌株抑菌圈直径的测定**<sup>[4-5]</sup> 取 MH 琼脂培养基和沙保弱培养基分别倾注在直径 7.5 cm 的平皿内(10 mL/平板),制备成 MH 琼脂平板和沙保弱琼脂平板备用。将金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌的 18 h 培养物和白色念珠菌、新生隐球菌的 24 h 培养物分别用灭菌生理盐水配制成  $1\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  的菌液。取 100  $\mu\text{L}$  菌液加于相应平板表面,用 L 棒涂布均匀。用打孔器在各平板上打孔,直径 5 mm/孔。将各提取物 20  $\mu\text{L}$  分别加于各平板的孔内,1, 3, 4, 5, 8 号提取物加入 20  $\mu\text{L}$  原液,2, 6, 7 号提取物加入的量为 0.1 mg,每药做 3 个复孔。并以双蒸水和 0.1% DMSO 作为阴性对照,以 40  $\mu\text{g}$  头孢曲松钠和 20  $\mu\text{g}$  氟康唑作为阳性对照。各培养基平板置恒温孵育箱内,37 °C 培养,24 h 后观察抗细菌作用结果,48 h 后观察抗真菌作用结果。测量各孔周围的抑菌圈直径,结果以 3 个抑菌圈直径的平均值表示,以判断提取物对该菌种的抑菌作用。

**2.2 最低抑菌浓度(MIC)试验**<sup>[4-5]</sup> 将提取物分别用无菌 MH 液体培养基和沙保弱液体培养基稀释,使 2, 6, 7 号提取物在培养基内的终质量浓度 5, 2.5, 1.25, 0.625  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,使 1, 3, 4, 5, 8 号提取物在培养基内的终浓度 1:10, 1:20, 1:40, 1:80。将不同浓度提取物加入 96 孔板中,90  $\mu\text{L}$ /孔。用无菌生理盐水稀释各菌种的 24 h 培养物,各加 10  $\mu\text{L}$  于含不同浓度提取物的肉汤以及不含提取物的培养基中,菌细胞为  $1\times 10^5\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。置孔板于恒温孵育箱内,37 °C 培养,24 h 后观察抗细菌作用结果,48 h 后观察抗真菌作用结果。观察培养基中细菌或真菌的生长情况判断提取物对该菌种的抑菌作用,以完全无菌生长的提取物最高稀释度作为该提取物的最低抑菌浓度。

**2.3 最低杀菌浓度(MBC)试验**<sup>[4-5]</sup> 取 MIC 试验中无菌生长的培养物 10  $\mu\text{L}$ ,接种于不含提取物的相应琼脂培养基上。各培养基平板置恒温孵育箱内,37 °C 培养,24 h 后观察抗细菌作用结果,48 h 后观察抗真菌作用结果。观察培养基上细菌的生长情况判断提取物对该菌种的杀菌作用,以完全无菌生长的提取物最高稀释度作为该提取物的最低杀菌浓度。

### 3 结果

#### 3.1 对不同菌株的抑菌作用(抑菌圈直径的测定)

实验结果显示宝铎草提取物 2,4,8 对不同病原性细菌具有抑制作用,各提取物对单细胞真菌均无作用(表 2)。

表 2 宝铎草提取物对常见病原菌的抑制作用( $n=3$ )

提取物	提取物抑菌圈直径/mm					
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	肺炎克雷伯菌	铜绿假单胞菌	白念珠菌	新生隐球菌
1	0	0	0	0	0	0
2	7	0	7.6	8.2	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	11	7	10.5	10.5	0	6
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	9.6	10.5	0	0
双蒸水	0	0	0	0	0	0
0.1% DMSO	0	0	0	0	0	0
头孢曲松	27.7	26.5	12	21	-	-
氟康唑	-	-	-	-	22	20

3.2 MIC 实验结果 实验结果显示,宝铎草提取物 1, 2, 4, 5, 6, 7 和 8 对不同病原性细菌具有一定抑菌作用,各提取物对单细胞真菌均无作用(表 3)。

表 3 宝铎草提取物对常见病原菌 MIC 的影响

提取物	MIC					
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	肺炎克雷伯菌	白念珠菌	新生隐球菌
1	1:40	>1:10	>1:10	1:10	>1:10	>1:10
2	2.5	2.5	>5	2.5	>5	>5
3	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10
4	1:40	1:40	1:20	1:20	>1:10	>1:10
5	1:40	1:40	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10
6	1.25	1.25	>5	>5	>5	>5
7	1.25	>5	>5	>5	>5	>5
8	1:80	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10

3.3 MBC 实验结果 实验结果显示,仅宝铎草提取物 1 稀释度为 1:40 时可杀灭金黄色葡萄球菌;提取物 4 对金黄色葡萄球菌的 MBC 为 1:40,对铜绿假单胞菌的 MBC 为 1:20(表 4)。

### 4 讨论

中草药几千年来为人类的健康作出了重大贡献,在现代预防和控制细菌性感染疾病方面也发挥了积极作用。由于中药的特殊性,细菌较少对中药产生耐药性,因此,研究和开发抗菌中药对解决耐药菌株的产生和抗生素短缺问题具有重要意义<sup>[3]</sup>。

表 4 宝铎草提取物对常见病原菌的 MBC 的影响

提取物	MBC					
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	肺炎克雷伯菌	白念珠菌	新生隐球菌
1	1:40	>1:10	>1:10	1:10	>1:10	>1:10
2	>5	>5	>5	>5	>5	>5
3	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10
4	1:40	>1:10	1:20	>1:10	>1:10	>1:10
5	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10
6	>5	>5	>5	>5	>5	>5
7	>5	>5	>5	>5	>5	>5
8	1:40	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10	>1:10

民族药宝铎草临床广泛应用于呼吸、消化等系统疾患,具有润肺止咳、健脾消积功效。本研究证实,宝铎草提取物,除水层外,均对金黄色葡萄球菌具有一定的抑菌作用,其中 95% 乙醇总提物和 95% 乙醇洗脱部分对金黄色葡萄球菌具有杀菌作用;这些提取物对不同病原性细菌具有不同的抑制作用,其中水洗脱部分对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌均有一定的抑制作用。宝铎草的某些提取物对革兰阳性菌和革兰阴性菌均具有抑菌作用,中药直接杀菌作用弱于西药抗生素,而中药复方具有配伍协同,整体调节的作用特点,抗细菌耐药性方面具有自身的优势,为开发其广泛用途奠定了实验基础。

### [参考文献]

- [1] 陆权,陈慧中,江澜,等. 急性呼吸道感染抗生素合理使用指南(试行)(下部分)[J]. 中国实用儿科杂志,2001,16(12):755.
- [2] 许浦生,许建邦,王艳明. 综合医院下呼吸道感染病原菌分离及动态变化[J]. 广东医学,2010,5:623.
- [3] 贵州省药品监督局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:162.
- [4] 杨丽平,孔焕宇,朱嘉,等. 银黄煎液多级膜分离物有效成分的含量及其体外抑菌作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):5.
- [5] 李仪奎,金若敏,王钦茂,等. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2006:755.
- [6] 曾春兰,钟振国. 中药抗菌作用的研究进展[J]. 广西中医学院学报,2006,5(1):51.
- [7] 杨均,张淑文,阴宏,等. 中药复方清热颗粒剂抗急性耐药菌感染的药效作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,15(10):58.

[责任编辑 李玉洁]