

## 线叶菊抗菌作用研究

王秋红<sup>1</sup>,刘玉婕<sup>1</sup>,吕邵娃<sup>1</sup>,马旭<sup>2</sup>,匡海学<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学省教育部共建北药基础与应用研究重点实验室,  
黑龙江省中药天然药物药效物质基础研究重点实验室 哈尔滨 150040;  
2. 国家知识产权局专利审查协作中心,北京 100083)

**[摘要]** **目的:** 研究线叶菊体内、外的抗菌作用,并对其作用机制进行初步探讨。**方法:** 体外抗菌实验采用微量稀释法测定线叶菊对 12 种临床常见病原菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。体内抗菌实验采用小鼠 ip 细菌的干酵母混悬液,观察 7 d 内动物的死亡率。利用透射电镜对部分病原菌与线叶菊作用前后的细菌形态学进行考察。**结果:** 线叶菊对 12 种临床常见病原菌有不同程度的抑菌和杀菌作用,特别是对耐药金黄色葡萄球菌的 MIC 为  $0.43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , MBC 为  $0.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。体内实验高剂量组对由金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、耐药金黄色葡萄球菌和耐药肺炎克雷伯氏菌导致的感染动物均具有保护作用,呈量效关系,中剂量组对绿脓杆菌和耐药金黄色葡萄球菌仍有作用。电镜结果显示线叶菊能够消融细菌的细胞壁。**结论:** 线叶菊对 12 种临床常见病原菌的体外抗菌作用均优于双黄连口服液,特别是对头孢阳性对照组无作用的耐药绿脓杆菌仍具有抑菌和杀菌作用。体内抗菌实验结果表明线叶菊对小鼠全身感染动物模型具有保护作用,特别对头孢克肟无作用的耐药金黄色葡萄球菌导致的感染动物依然具有保护作用。同时线叶菊能够破坏细菌的细胞壁。

**[关键词]** 线叶菊;抗菌作用;最低抑菌浓度;最低杀菌浓度;形态学考察

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0141-05

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20110920.1431.009 **[网络出版时间]** 2011-09-20 14:31

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110920.1431.009.html>

## Studies on Antibacterial Activity of *Filifolium sibiricum*

WANG Qiu-hong<sup>1</sup>, LIU Yu-jie<sup>1</sup>, LV Shao-wa<sup>1</sup>, MA Xu<sup>2</sup>, KUANG Hai-xue<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Ministry of Education, Heilongjiang Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacodynamic Material Bases, Harbin 150040, China; 2. Patent Examination Cooperation Center, State Intellectual Property Office, Beijing 100083, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the antibacterial effect of *Filifolium sibiricum* (FS) and its possible mechanism preliminarily. **Method:** *Vitro* experiments using micro dilution method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of 12 species common clinical pathogens. The anti-microbial activity of FS was observed mice mortality within 7 days by injecting dry yeast suspension of bacteria in intraperitoneal. Antibacterial mechanism was investigated by transmission electron microscope. **Result:** FS had different levels of bactericidal effects to 12 species common clinical pathogens. Especially for drug-resistant *Staphylococcus aureus*, MIC is  $0.43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and MBC is  $0.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . *In vivo* high dose can protect animals infected by

**[收稿日期]** 20110418(004)

**[基金项目]** 国家“十一五”重大新药创制项目(2009x09103-358);黑龙江省自然科学基金项目(D2007-40);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11531345);哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(2010RFQXS051)

**[第一作者]** 王秋红,教授,从事中药及天然药物药效物质基础研究,中药炮制研究,Tel:0451-82195994,E-mail:qhwan668@sina.com

**[通讯作者]** \*匡海学,教授,博士生导师,从事中药及复方的药效物质基础研究,中药药性理论研究,Tel:0451-82110803,E-mail:hxkuang@hotmail.com

*S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, drug resistant *S. aureus* and drug resistant *Klebsiella pneumoniae*. The dose group was still effect to *P. aeruginosa* and drug resistant *S. aureus*. Electron microscopy showed that FS can melt bacterial cell wall. **Conclusion:** FS antibacterial activity was superior than Shuanghuanglian oral solution *in vitro* to 12 clinical common pathogens, especially to drug resistant *P. aeruginosa* which the positive control group had no role. The *vivo* experiments results show that it has a protective effect to systemic infected animal model, especially to drug resistant *S. aureus* infections still has a protective effect. It can destroy the cell walls of bacteria at the same time.

[ **Key words** ] *Filifolium sibiricum*; antibacterial effect; minimum inhibitory concentration ( MIC ); minimum bactericidal concentration ( MBC ); morphological study

目前, 抗生素误用与滥用现象严重, 造成耐药菌越来越多, 许多抗生素疗效甚低, 因此, 研发新的抗菌药物至关重要。线叶菊是菊科线叶菊属植物线叶菊的干燥全草, 又名兔毛蒿、兔子毛、疔毒草等, 是我国民间草药, 味苦、性凉、用于清热解毒, 安神镇惊, 调经止血, 外用治肿痛<sup>[1-2]</sup>。有文献报道<sup>[3]</sup>线叶菊在民间用于治疗肿、痛、疮、中耳炎等外科疾病, 提示线叶菊可能有一定的抗菌消炎作用。本文就线叶菊的体内、外抗菌作用进行了研究, 并对抗菌作用机制作初步探讨。

## 1 材料

**1.1 药物及试剂** 线叶菊采自黑龙江省大庆市草原, 经黑龙江中医药大学药学院中药资源教研室王振月教授鉴定为线叶菊属植物线叶菊 *Filifolium sibiricum* (L.) Kitam. 的地上部位。注射用头孢曲松钠注射液, 山西威奇达药业有限公司生产, 批号 20070354。双黄连口服液, 哈药集团三精制药股份有限公司生产, 批号 08041562。头孢克肟胶囊, 哈尔滨三精海灵药业有限公司, 批号 081008。MH 肉汤培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司, 批号 20080326。营养琼脂, 北京奥博星生物技术有限责任公司, 批号 20070822。生理盐水、5% 干酵母混悬液。

**1.2 菌株** 金黄色葡萄球菌 (25923)、大肠杆菌 (25922)、绿脓杆菌 (27853) 购于黑龙江省微生物检验检疫所菌种保藏中心; 葡萄球菌 (26104-6)、变形杆菌 (49103-14)、肺炎克雷伯氏菌 (46114-8)、痢疾志贺氏 (51054-4) 购于中国药品生物制品检定所。耐药金黄色葡萄球菌、耐药大肠杆菌、耐药绿脓杆菌、耐药肺炎克雷伯氏菌, 由黑龙江中医药大学附属第一医院检验科分离并鉴定。

**1.3 仪器** 透射电子显微镜 (TECNAI G2 12, 荷兰

飞利浦), 微量加样器 (上海宙辉生化仪器有限公司), 立式压力蒸气灭菌器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂), DHP-9162 型电热恒温培养箱 (上海一恒科技有限公司), 超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司)。

**1.4 动物** 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 (20 ± 2) g, 由黑龙江中医药大学药物安全性评价中心提供, 合格证号 SCXK (黑) 2008004。

**1.5 线叶菊的制备** 取线叶菊粗粉, 50% 乙醇加热回流提取, 回收溶剂后 50% 乙醇醇沉, 过滤, 回收滤液, 大孔吸附树脂吸附, 水洗后用 30% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 干燥, 即得线叶菊大孔树脂 30% 乙醇洗脱部位。该部位为黄色粉末, 味苦, 总黄酮含量 > 50%, 经前期试验研究确定其为线叶菊抗感染有效部位<sup>[4]</sup>, 本实验所用均为该有效部位, 简称线叶菊 (下同)。

## 2 方法

### 2.1 体外抗菌实验

**2.1.1 分组** 分别设阴性对照组、线叶菊组和阳性对照组, 其中阳性对照组又分为头孢曲松钠注射剂对照组和双黄连口服液对照组。

**2.1.2 最低抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC)<sup>[5]</sup>** 采用微量稀释法, 将药物倍比稀释, 加入菌液, 37 °C 孵育 18 h, 培养板中有混浊的孔即示有细菌生长, 每列最后一个澄清的孔即为该药物的 MIC。将澄清孔的液体各取 10 μL, 加在固体培养基上, 37 °C 培养 18 h, 无细菌生长接种区域所对应的最低药物浓度为 MBC。

**2.1.3 实验菌液的制备** 配制标准比浊管, 复苏菌种。无菌条件下, 挑取单个菌落, 放入生理盐水中, 混匀, 其浊度与 0.5 麦氏比浊管比对, 浊度相同后, 取 10 μL 加 10 mL 液体培养基, 即得密度 1 × 10<sup>8</sup> /L

的试验菌液。

## 2.2 体内抗菌实验

**2.2.1 分组** 取健康昆明小鼠 100 只,雌雄各半,按体重随机分为 5 组,即模型组、线叶菊高、中、低剂量组 ( $576, 288, 144 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 分别相当于生药 8, 4,  $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和阳性对照组(头孢克肟胶囊  $52.68 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 每组 20 只小鼠。线叶菊实验所用剂量主要依据临床常用生药剂量。

**2.2.2 死亡保护率测定**<sup>[5]</sup> 将不同密度的菌悬液分别 ip 于体重 20 g 左右的小鼠, 每密度组 4 只, 每只 0.5 mL, 观察动物在 4 d 内的死亡情况, 选用引起小鼠 80% ~ 100% 死亡的菌液浓度进行药物防治试验。以预试实验时选定的使小鼠死亡率为 90% 左右的菌悬液给各组小鼠 ip 造成感染, 每只 0.5 mL。于注射菌液前两天上午、下午各一次以及注射菌液后 1, 6, 12, 24, 36, 48 h, 治疗组及阳性对照组 ig 给药, 模型组给生理盐水, 观察并统计 7 d 内各组动物死亡率。

**2.2.3 实验菌液的制备** 将菌株接种于液体培养基中,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 16 h 后, 将菌液用生理盐水以 10 倍顺序稀释为  $1 \times 10^{-1}, 1 \times 10^{-2}, 1 \times 10^{-3}$  等不同密度菌液, 选取适当密度的菌液, 用平皿表面活菌计数法

测定实验感染的活菌数。再吸取稀释好的不同密度菌液 1 mL 分别放于灭菌试管内, 分别加入 5% 干酵母混悬液, 即做成密度为  $1 \times 10^{-2}, 1 \times 10^{-3}$  等的细菌悬液备用。

## 2.2.4 数据处理 组间比较用卡方检验。

死亡率 = 死亡动物数/动物总数

死亡保护率 = (模型组死亡率 - 试验组死亡率)/模型组死亡率  $\times 100\%$

**2.3 体外抗菌的菌体形态观察** 分别取革兰阳性金黄色葡萄球菌, 阴性菌为大肠杆菌。将金黄色葡萄球菌传入液体培养基中, 分为阴性组和线叶菊给药组, 阴性组做原菌培养, 给药组加入线叶菊  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 分别于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 18 h 后, 取出离心, HE 染色, 电镜下观察细菌形态结构的变化。大肠杆菌的试验方法与金黄色葡萄球菌相同。

## 3 结果

**3.1 体外抗菌试验** 线叶菊对 12 种常见病原菌均具有抑菌和杀菌作用, 其抗菌作用优于双黄连口服液组, 同时对头孢阳性对照组无作用的耐药绿脓杆菌仍具有抑菌和杀菌作用。重复实验结果一致。见表 1。

表 1 线叶菊体外抗菌试验

菌株	线叶菊/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		双黄连口服液/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		头孢曲松钠注射剂/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
金黄色葡萄球菌	0.43	0.43	5.85	5.85	7.96	31.85
白色葡萄球菌	3.90	15.60	187.50	187.50	8.00	16.00
绿脓杆菌	3.44	6.88	46.87	187.50	3.98	7.96
大肠杆菌	3.44	3.44	46.87	46.87	7.96	7.96
肺炎杆菌	0.43	0.43	5.85	5.85	0.12	0.12
变形杆菌	1.72	1.72	23.43	46.87	3.98	7.96
痢疾杆菌	0.43	0.43	5.85	11.71	0.50	1.99
乙型溶血性链球菌	0.43	0.43	5.86	11.72	3.98	7.96
耐药金黄色葡萄球菌	0.43	0.86	11.72	23.44	31.85	63.70
耐药绿脓杆菌	1.72	3.44	46.88	93.75	-	-
耐药大肠杆菌	6.89	55.10	93.75	187.50	0.12	0.50
耐药肺炎克雷伯氏菌	6.89	55.10	93.75	187.50	63.70	63.70

**3.2 体内抗菌试验** 结果见表 2 ~ 3。线叶菊高剂量组对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、耐药金黄色葡萄球菌、耐药绿脓杆菌和耐药肺炎克雷伯

氏菌感染的动物均具有保护作用, 呈量效关系, 中剂量组对绿脓杆菌、耐药金黄色葡萄球菌和耐药大肠杆菌导致的感染动物具有保护作用。

表 2 线叶菊对细菌感染小鼠的保护作用 (n = 20)

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	金黄色葡萄球菌		大肠杆菌		绿脓杆菌		乙型溶血性链球菌	
		存活数 /只	死亡保护率 /%	存活数 /只	死亡保护率 /%	存活数 /只	死亡保护率 /%	存活数 /只	死亡保护率 /%
模型	-	3	-	3	-	0	-	4	-
线叶菊	576	9 <sup>1)</sup>	35.2	9 <sup>1)</sup>	35.2	7 <sup>1)</sup>	35.0	8	25.0
	288	6	17.6	7	23.5	6 <sup>1)</sup>	30.0	6	12.5
	144	4	11.7	3	-	5	25.0	4	-
头孢克肟	52.68	10 <sup>1)</sup>	41.1	14 <sup>2)</sup>	64.7	16 <sup>2)</sup>	80.0	12 <sup>2)</sup>	50.0

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.01, <sup>2)</sup>P < 0.05(表 3 同)。

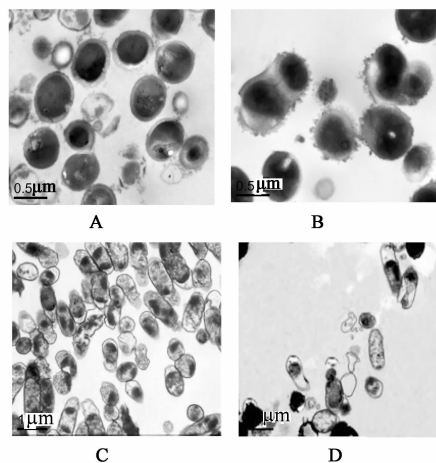
表 3 线叶菊对耐药菌感染小鼠的保护作用 (n = 20)

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	耐药金黄色葡萄球菌		耐药绿脓杆菌		耐药大肠杆菌		耐药肺炎克雷伯氏菌	
		存活数 /只	死亡保护率 /%	存活数 /只	死亡保护率 /%	存活数 /只	死亡保护率 /%	存活数 /只	死亡保护率 /%
模型	-	4	-	2	-	3	-	2	-
线叶菊	576	11 <sup>1)</sup>	43.8	7 <sup>1)</sup>	27.7	6	17.6	9 <sup>1)</sup>	38.9
	288	10 <sup>1)</sup>	37.5	5	16.7	9 <sup>1)</sup>	35.2	6	22.2
	144	7	18.8	3	5.5	5	11.7	4	11.1
头孢克肟	52.68	9 <sup>1)</sup>	31.3	10 <sup>2)</sup>	55.5	16 <sup>2)</sup>	76.4	12 <sup>2)</sup>	44.4

**3.3 体外抗菌的菌体形态观察** (图 1B)金黄色葡萄球菌呈圆球形,细胞壁较厚,为致密的多层结构,且细胞膜结构完整,其内的细胞质均匀(图 1A);而与线叶菊作用后,金黄色葡萄球菌的细胞壁遭到了严重的破坏,变成了锯齿形的缺失状态,细胞质也变得不均匀(图 1B)。图 1C 表明大肠杆菌细胞壁较薄,菌体呈直杆状,细胞质均匀,能观察到明显的核质;与线叶菊作用后,菌体的细胞壁残缺不全,核质消失,且菌密度降低(图 1D)。

#### 4 讨论

线叶菊是传统的清热解毒药,主要用于治疗慢性支气管炎、肾炎、疔疮腿等炎症及外科感染类疾病。经本项目组研究确定线叶菊主要含有黄酮类化合物,大量文献<sup>[6]</sup>研究表明黄酮类化合物具有抗炎、抗菌等多种生物活性。结合传统应用,对线叶菊进行了抗菌作用的研究,结果表明线叶菊对金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、肺炎杆菌、变形杆菌、痢疾杆菌、乙型溶血性链球菌等常见的上呼吸道、肠道和外伤感染的致病菌具有抑菌和杀菌作用,特别对临床常见的耐药金黄色葡萄球菌、耐药绿脓杆菌、耐药大肠杆菌、耐药肺炎克雷伯氏菌仍然具有抑菌和杀菌作用。与文献<sup>[7]</sup>报道比较发现,线叶菊的抗菌谱有了进一步的扩展,为开发临床抗感染新药提供了理论依据。



A. 金黄色葡萄球菌; B. 线叶菊作用后的金黄色葡萄球菌;  
C. 大肠杆菌; D. 线叶菊作用后的大肠杆菌

图 1 线叶菊抗感染有效部位与金黄色葡萄球菌 (×13 000) 及大肠杆菌 (×11 500) 作用后的电镜照片

线叶菊的抗菌作用明显优于双黄连口服液阳性对照组,尤其对耐药金黄色葡萄球菌、耐药大肠杆菌、耐药绿脓杆菌、耐药肺炎克雷伯氏菌显示出较强的抑菌和杀菌作用。特别值得注意的是,线叶菊对头孢曲松钠无效的耐药绿脓杆菌显示出较强的抑菌和杀菌作用,这更体现出线叶菊在抗耐药菌方面的优势。这可能是由于化学药物成分单一,细菌极易产生耐药性,而中药大多是通过多成分、多靶点起作

# 藏党参皂苷对睾丸间质细胞的影响及作用机制

郑娟,赵莹,王丽蕃,胡华刚,徐斯凡\*

(中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院,北京 100081)

**[摘要]** 目的:本研究以藏党参的正品长花党参 *Codonopsis thalictrifolia* Wall. 为研究对象,对藏党参皂苷对睾丸间质细胞功能的影响进行了初步研究。方法:利用不同质量浓度的藏党参皂苷对大鼠睾丸间质细胞进行体外培养,并测定细胞分泌睾酮的含量,cAMP 的含量以及 MTT 吸光度。结果:藏党参皂苷质量浓度为  $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,可以显著升高体外培养的大鼠睾丸间质细胞分泌睾酮的含量( $P < 0.05$ ),提高 cAMP 的含量( $P < 0.01$ ),并降低 MTT 吸光度( $P < 0.01$ )。结论:藏党参皂苷可使单个睾丸间质细胞的分泌能力增强,可能由 PKA 通路介导。

**[关键词]** 藏党参;皂苷;睾丸间质细胞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0145-04

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20110920.1432.015 **[网络出版时间]** 2011-09-20 14:32

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110920.1432.015.html>

## Effect and Mechanism of *Codonopsis thalictrifolia* Saponin on Leydig Cells

ZHENG Juan, ZHAO Ying, WANG Li-fan, HU Hua-gang, XU Si-fan\*

(Chinese Minority Traditional Medical School, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study effects of *Codonopsis thalictrifolia* on leydig cells. **Method:** Leydig cells

**[收稿日期]** 20110420(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30973956)

**[第一作者]** 郑娟,硕士,从事民族药物的基础研究工作,Tel:15210506552,E-mail:zy212007@hotmail.com。

**[通讯作者]** \*徐斯凡,学士,教授,博士生导师,从事民族药物的基础研究工作,Tel:010-68930971,E-mail:sifanxu@126.com

用,从而具有抗菌耐药性的特点,这也是中药抗菌药物开发的一大优势。体内抗菌实验结果表明线叶菊对小鼠全身感染动物模型具有保护作用。特别对头孢克肟无作用的耐药金黄色葡萄球菌导致的感染动物依然具有保护作用。

为进一步探讨线叶菊的抗菌机制,通过电镜对与线叶菊作用前、后的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的形态学进行观察,发现与线叶菊作用后细菌的细胞壁遭到了严重的破坏,而细胞壁对于细菌而言是非常重要的结构,它对细菌起到了很好的保护作用,细胞壁的破损将直接导致细菌的死亡。同时细菌的细胞质也表现出不同程度的破坏。为进一步研究线叶菊的抗菌机制提供了方向和基础。

### [参考文献]

[1] 内蒙古自治区革命委员会卫生局. 内蒙古中草药

[M]. 呼和浩特:内蒙古自治区人民出版社,1972:146.

[2] 傅沛云. 东北植物检索表[M]. 北京:科学出版社,1995:681.

[3] Xie X F, Cai X Q, Zhu S Y, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China[J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1312.

[4] 吕邵娃,刘玉婕,匡海学,等. 线叶菊抗感染有效部位抗炎镇痛作用研究[J]. 中医药学报,2011,2(39),15.

[5] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1658.

[6] 周新,李宏杰. 黄酮类化合物的生物活性及临床应用进展[J]. 中国新药杂志,2007,16(5):350.

[7] 吴景时,姚志国,秦泗军,等. 中草药线叶菊药理初步研究[J]. 药学通报,1979,14(2):87.

[责任编辑 聂淑琴]