

满药赤雹果不同成分抗菌活性研究

张兴,杨慧波,李亚洲,佟继铭*

(承德医学院中药研究所-河北省中药研究与开发重点实验室,河北承德 067000)

[摘要] 目的:研究赤雹果不同提取物体内、外抗菌活性,筛选抗菌活性提取物。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赤雹果不同提取物的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度。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测定赤雹果不同提取物对该小鼠的保护作用。结果:赤雹果挥发油对标准菌株:金黄色葡萄球菌 26001-26、金黄色葡萄球菌 26002-6、大肠杆菌 44102-3a3、白色葡萄球菌 26069-5、甲型副伤寒杆菌 50001-25、乙型副伤寒杆菌 50076-1、伤寒杆菌 50071-10 的 MIC 分别为 0.17, 0.08, 0.33, 0.17, 0.33, 0.33, 0.66 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, MBC 分别为 0.17, 0.17, 0.33, 0.33, 0.66, 0.66, 1.32 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;对临床分离菌株:金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 0415、大肠杆菌 0416、粪肠球菌 0318、奇异变形杆菌、鲍曼不动杆菌 0207、肺炎链球菌 09030813 的 MIC 分别为 0.66, 0.66, 0.66, 0.66, 0.08, 0.66, 1.32 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, MBC 分别为 1.32, 1.32, 1.32, 1.32, 0.08, 1.32, 2.64 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。赤雹果水提物和赤雹果多糖仅对部分细菌有作用。赤雹果挥发油和赤雹果多糖对金黄色葡萄球菌感染小鼠具有明显保护作用,小鼠平均存活天数为 (5.90 ± 1.79) , (4.89 ± 2.03) d;赤雹果水提物对金黄色葡萄球菌感染小鼠保护作用较弱。结论:赤雹果抗菌活性部位为挥发油及多糖类成分。

[关键词] 赤雹果;抗菌活性;挥发油;多糖

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0188-04

Study on Antibacterial Activity of *Thladianthea dubiea* Fruits

ZHANG Xing, YANG Hui-bo, LI Ya-zhou, TONG Ji-ming*

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

[Abstract] **Objective:** To study the antibacterial activity of *Thladianthea dubia* fruits *in vivo* and *in vitro*, and screen the extracts of antibacterial activity. **Method:** By methods of tube continuous dilution and agar plate diffusions to 14 strains of bacteria, for example *Staphylococcus aureus*, minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of different extracts of *T. dubia* fruits were determined *in vitro*. We chosen mice infected by the type strain of *S. aureus* 26002-6 as models to test the protection of the extracts of *T. dubia* fruits. **Result:** With regard to volatile oil of *T. dubia* fruits (VTDF), the MICs to the type strains of *S. aureus* 26001-26, *Staphylococcus aureus* 26002-6, *Escherichia coli* 44102-3a3, *S. albus* 26069-5, *Salmonella paratyphi* A 50001-25, *S. paratyphi* B 50076-1, *S. typhosa* 50071-10 were respectively 0.17, 0.08, 0.33, 0.17, 0.33, 0.33, 0.66 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the MBCs were 0.17, 0.17, 0.33, 0.33, 0.66, 0.66, 1.32 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; and the MICs to the clinical-separated strains of *S. aureus*, *Escherichia coli* 0415, *E. coli* 0416, *Enterococcus faecalis* 0318, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii* 0207, *S. pneumoniae* 09030813 were respectively 0.66, 0.66, 0.66, 0.66, 0.08, 0.66, 1.32 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the MBCs were 1.32, 1.32, 1.32, 1.32, 0.08, 1.32, 2.64 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. However, water extract and

[收稿日期] 20110512(005)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C200600863);河北省教育厅项目(2005225)

[第一作者] 张兴,硕士研究生,主要从事中药药理及毒理研究,E-mail:zhangxing361@163.com

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

polysaccharides of *T. dubia* fruits (WTDF, PTDF) had antibacterial activity on partial bacteria *in vitro*. VTDF and PTDF might have obvious protective effect on infected mice induced by *S. aureu*, WTDF might have weak protective effect on infected mice induced by *S. aureu*. **Conclusion:** The antibacterial activity parts of *T. dubia* fruits are VTDF and PTDF.

[Key words] *Thladiantha dubia* fruit; Antibacterial activity; volatile oil; polysaccharide

满药赤雹(*Thladiantha dubia* Bunge, 满语:夫乐给颜包努吐比河)为葫芦科多年蔓生草本植物,主要分布于华北、东北、内蒙等地区,赤雹果为赤雹的干燥成熟果实,民间用于治疗瘰疬、黄疸、肠炎、痢疾等感染性疾病^[1]。前期研究证明其有显著的镇痛和抗炎活性^[2-3],但未见关于其抗菌作用及其有效成分研究报道,本课题对赤雹果挥发油、多糖和水提取物进行了体内、外抗菌实验,为临床应用及新药开发提供依据。

1 材料

1.1 药品及试剂 赤雹果经承德医学院中药研究所赵春颖副教授鉴定为葫芦科植物 *Thladiantha dubia* Bunge 的干燥成熟果实。

赤雹果挥发油(VTDF,得油率0.22%)、赤雹果多糖(PTDF,提取率3.426%)均由承德医学院中药研究所药理毒理室制备。将挥发油用体积分数为5%的聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯吐温-80水溶液配制成13.2,6.6,3.3 g·L⁻¹3个质量浓度;将赤雹果水提物用蒸馏水配制成400 g·L⁻¹;赤雹果多糖用蒸馏水配制成8.8,4.4,2.2 g·L⁻¹,灭菌待用。

双黄连口服液(10 mL/支,1.5 g原生药/mL),哈药集团三精制药股份有限公司,批号09112827;吐温-80,化学纯,天津市佳兴化工玻璃仪器工贸有限公司;高活性干酵母,安琪酵母股份有限公司,批号20091228;羧甲基纤维素钠(CMC-Na),分析纯,天津市河东区红岩试剂厂;营养肉汤,杭州天和微生物试剂有限公司,批号081112;营养琼脂,杭州天和微生物试剂有限公司,批号090205;SS琼脂,北京奥博生物技术有限责任公司,批号20070328。

1.2 仪器 AG-245型电子分析天平,瑞士Mettler公司;1815TC型二氧化碳培养箱,美国SHEL-LAB;24孔板,浙江拱东医用塑料厂;YXQG02型电热式蒸气灭菌锅,山东新华医疗器械厂。

1.3 菌种 临床菌株:金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(0415,0416)、粪肠球菌(0318)、奇异变形杆菌、鲍曼不动杆菌(0207)、肺炎链球菌(09030813)均来自

承德医学院附属医院。标准菌株:金黄色葡萄球菌(26001-26,26002-6)、大肠杆菌(44102-3a3)、白色葡萄球菌(26069-5)、乙型副伤寒杆菌(50076-1)、伤寒杆菌(50071-10)、甲型副伤寒杆菌(50001-25)。所有标准株均购自中国药品生物制品检定所。

1.4 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。

2 方法

2.1 体外抗菌

2.1.1 供试菌悬液制备^[4] 供试临床菌种纯化培养后,取一接种环接种于肉汤培养基中37℃继续培养24 h,增菌后的菌液用营养肉汤校正浓度至0.5麦氏比浊标准,约含1×10⁸~2×10⁸ CFU/mL,即得供试菌悬液。

2.1.2 最低抑菌浓度(minimal inhibition concentration, MIC)测定^[5-7] 取24孔板,用肉汤培养基将VTDF,WTDF,PTDF,双黄连口服液(阳性对照)逐孔分别作1:2~512的倍比稀释,每孔含培养液1 mL,微量进样器逐孔加50 μL供试菌悬液,混匀,每个浓度做2个复孔。同法制备试剂对照(不加菌液)、菌株对照(不加药物)、溶剂空白对照(5%吐温-80水溶液)各1孔,37℃恒温培养24 h,观察各稀释孔培养液混浊情况,以抑制实验菌生长的最低浓度为赤雹果挥发油的MIC。

2.1.3 最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)测定 取MIC以上肉眼未见浑浊的稀释孔培养物0.1 mL接种于普通琼脂平板上,奇异变形杆菌接种于SS琼脂培养基上,肺炎链球菌接种于含体积分数为8%的脱纤维羊血琼脂培养基上,37℃恒温培养24 h,观察平板有无细菌生长,以培养基中无菌生长的最低浓度即为赤雹果挥发油的MBC。

2.2 体内抗菌

2.2.1 最小致死量(MLD)的确定 建立细菌感染小鼠模型^[8]:将金黄色葡萄球菌接种于普通琼脂平

板, 37 ℃ 恒温培养 48 h, 同样方法再次接种, 挑取试验用金黄色葡萄球菌单菌落接种于营养肉汤 37 ℃ 培养 18 h, 用质量浓度为 0.5% CMC-Na 配制成的质量浓度为 4% 酵母混悬液做 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^3$ 倍稀释, ip 昆明小鼠 0.5 mL/只, 每个稀释度感染 5 只小鼠, 观察并记录 24 h 内小鼠死亡数, 以引起小鼠 100% 死亡的最低剂量作为 MLD, 用该剂量作为体内保护试验的感染剂量。

2.2.2 金黄色葡萄球菌感染小鼠保护试验^[9] 取昆明小鼠 90 只, 雌雄各半, 随机分为模型组, 赤霉素挥发油高、中、低剂量组, 赤霉素多糖高、中、低剂量组, 水提物组, 双黄连口服液组 9 组, 每组 10 只小鼠。ig 给药容积 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 每日 1 次, 连续 3 d (模型组给予 0.5% CMC-Na)。第 4 天给药后 40 min 按 2.2.1 所述 MLD 做致死性攻击。观察和记录各组动物感染后 7 d 内的反应情况及死亡数, 并计算死亡率, 生命延长率和保护率。

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死亡动物数}}{\text{该组动物总数}} \times 100\%$$

生命延长率 = (给药组小鼠平均存活天数 - 模型组小鼠平均存活天数) / 模型组小鼠平均存活天数 $\times 100\%$

$$\text{保护率} = \frac{\text{模型组小鼠死亡数} - \text{给药组小鼠死亡数}}{\text{模型组小鼠死亡数}} \times 100\%$$

3 结果

3.1 体外抗菌 赤霉素挥发油对所检测 14 种菌种的标准株和临床分离菌株均有不同程度的体外抗菌活性。其抗菌作用强于双黄连口服液, 而赤霉素水提物和赤霉素多糖仅对部分细菌有抗菌活性。见表 1~2。

3.2 体内抗菌 赤霉素挥发油 $66, 33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组小鼠平均存活天数分别为 $(5.90 \pm 1.79, 5.60 \pm 1.84)$ d, 与模型组 (3.10 ± 1.52) d 比较差异有显著意义 ($P < 0.01$), 赤霉素挥发油 $132 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组小鼠平均存活天数为 (3.80 ± 1.81) d, 与模型组比较差异无显著意义; 赤霉素多糖 $176, 88 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组小鼠的平均存活天数为 $(5.43 \pm 1.99), (4.44 \pm 1.94)$ d 与模型组比较差异有显著意义 ($P < 0.05$); 赤霉素多糖 $44 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组及水提物 $8\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组小鼠的平均存活天数为 $(3.50 \pm 1.96), (4.30 \pm 1.89)$ d 与模型组比较差异均无显著意义。双黄连口服液阳性对照组的平均存活天数为 (4.90 ± 1.85) d, 与模型组比较差异有显著意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 赤霉素挥发油和双黄连口服液体外抗菌作用 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

细菌名称	试药	MIC		MBC	
		实际浓度	相当生药	实际浓度	相当生药
金黄色菌(临)	VTDF	0.66	293.30	1.32	586.70
	双黄连		187.50		187.50
白色葡萄球菌	VTDF	0.17	75.60	0.33	146.70
	双黄连		93.75		187.50
大肠杆菌 0415(临)	VTDF	0.66	293.30	1.32	586.70
	双黄连		375.00		375.00
大肠杆菌 44102-3a3	VTDF	0.33	146.70	0.33	146.70
	双黄连		375.00		375.00
乙型副伤寒杆菌	VTDF	0.33	146.70	0.66	293.30
	双黄连		187.50		187.50
大肠杆菌 0416(临)	VTDF	0.66	293.30	1.32	586.70
	双黄连		187.50		375.00
金黄色菌 26001-26	VTDF	0.17	75.60	0.17	75.60
	双黄连		23.44		46.88
金黄色菌 26002-6	VTDF	0.08	36.90	0.17	75.60
	双黄连		23.44		23.44
伤寒杆菌	VTDF	0.66	293.30	1.32	586.70
	双黄连		187.50		187.50
粪肠球菌(临)	VTDF	0.66	293.30	1.32	586.70
	双黄连		375.00		375.00
甲型副伤寒杆菌	VTDF	0.33	146.70	0.66	293.30
	双黄连		187.50		375.00
奇异变形杆菌(临)	VTDF	0.08	36.90	0.08	36.90
	双黄连		46.88		46.88
鲍曼不动杆菌(临)	VTDF	0.66	293.30	1.32	586.70
	双黄连		46.88		46.88
肺炎链球菌(临)	VTDF	1.32	586.70	2.64	1173.30
	双黄连		-		-

注:“-”表示无抗菌作用(表 2 同)。

4 讨论

体外实验研究证明赤霉素挥发油有显著的抗菌活性, 抗菌作用强于双黄连口服液, 而赤霉素水提物和赤霉素多糖仅对部分细菌有作用。体内实验采用金黄色葡萄球菌感染小鼠模型, 观察了赤霉素 3 种提取物或有效部位对体内感染动物的保护作用, 并以双黄连口服液作为阳性对照。结果证明赤霉素挥发油对金黄色葡萄球菌感染小鼠有明显的保护

表2 赤霉素水提取物和赤霉素多糖体外抗菌作用 $g \cdot L^{-1}$

细菌名称	药物	MIC	MBC
金黄色葡萄球菌(临)	WTDF	125.00	-
	PTDF	12.50	12.50
白色葡萄球菌	WTDF	250.00	-
	PTDF	-	-
大肠杆菌 0415(临)	WTDF	250.00	-
	PTDF	-	-
大肠杆菌 44102-3a3	WTDF	250.00	-
	PTDF	-	-
乙型副伤寒杆菌	WTDF	-	-
	PTDF	-	-
大肠杆菌 0416(临)	WTDF	125.00	250.00
	PTDF	-	-
金葡菌 26001-26	WTDF	250.00	-
	PTDF	-	-
金葡菌 26002-6	WTDF	250.00	-
	PTDF	-	-
伤寒杆菌	WTDF	-	-
	PTDF	-	-
粪肠球菌(临)	WTDF	-	-
	PTDF	-	-
甲型副伤寒杆菌	WTDF	-	-
	PTDF	-	-
奇异变形杆菌(临)	WTDF	125.00	250.00
	PTDF	12.50	12.50
鲍曼不动杆菌(临)	WTDF	125.00	250.00
	PTDF	12.50	12.50
肺炎链球菌(临)	WTDF	-	-
	PTDF	-	-

表3 赤霉素各提取物体内抗菌作用($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	死亡数/只	死亡率/%	存活天数/d	生命延长率/%	保护率/%
PTDF	176	6	60	$5.43 \pm 1.99^{1)}$	75.16	25.00
	88	7	70	$4.44 \pm 1.94^{1)}$	43.23	12.50
	44	8	80	3.50 ± 1.96	12.90	0
WTDF	132	8	80	3.80 ± 1.81	22.58	0
	66	3	30	$5.90 \pm 1.79^{2)}$	90.32	62.50
	33	4	40	$5.60 \pm 1.84^{2)}$	80.65	50.00
水提物	8 000	7	70	4.30 ± 1.89	38.71	12.50
模型	-	9	90	3.10 ± 1.52	-	-
双黄连	30 000(生药)	6	60	$4.90 \pm 1.85^{1)}$	58.06	25.00

注:与模型组比较 $^{1)} P < 0.05, ^{2)} P < 0.01$ 。

[参考文献]

- [1] 宋立人,红恂,丁绪亮,等.现代中药大辞典.上册[M].北京:人民卫生出版社,2001:1022.
- [2] 佟继铭,李兰芳,宋丽萍,等.赤霉素镇痛作用的研究[J].承德医学院学报,2006,23(1):1.
- [3] 刘建东.赤霉素乙醇提取物的抗炎作用的实验研究[J].中国医药指南,2009,7(2):40.
- [4] 陈泽慧,田应彪,叶丽红,等.五味子及石榴皮等中药对产与非产 MBL 铜绿假单胞菌的体外抗菌活性研究[J].中华医院感染学杂志,2010,20(2):168.
- [5] 李明远.微生物学与免疫学[M].北京:人民卫生出版社,2002:84.
- [6] 樊明涛,陈锦屏.百里香提取物抑菌特性的研究[J].

作用,使动物存活天数明显延长与模型对照组比较差异显著;赤霉素多糖剂量组、双黄连口服液阳性对照组与模型对照组比较平均存活天数均有显著延长。说明赤霉素挥发油和赤霉素多糖对金黄色葡萄球菌感染小鼠均有一定的保护作用。

赤霉素多糖体外抗菌活性实验未显示抗菌作用,但是在体内实验中有明显的抗菌活性。本课题前期研究证明,赤霉素多糖具有显著提高免疫抑制小鼠免疫功能的作用^[10],从而提示赤霉素多糖对金黄色葡萄球菌感染小鼠保护作用,可能与提高机体免疫力有关,具体机制有待进一步研究。

实验结果显示赤霉素挥发油 $132 mg \cdot kg^{-1}$ 组小鼠平均存活天数 < 挥发油 $66,33 mg \cdot kg^{-1}$ 组,与对照组比较无明显延长,推测可能是由于大剂量的赤霉素挥发油对机体产生一定的毒副作用有关,具体的原因有待进一步研究。

赤霉素水提物组的平均存活天数长于模型组,但无统计学意义,说明赤霉素水提物对金黄色葡萄球菌感染小鼠有一定保护作用,但作用较弱,有待通过增加样本数量或调整给药剂量进行进一步观察。

微生物学报,2001,41(4):499.

- [7] 徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2003:1658.
- [8] Wang J, Soisson S M, Young K, et al. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties [J]. Nature, 2006, 441(7091):358.
- [9] Ismaili H, Milella L, Fkih-Tetouani S, et al. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of Thymus satureioides leaves [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 91(1):31.
- [10] 赵波,张玉玲,佟继铭.赤霉素多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J].时珍国医国药,2010,21(7):1627.

[责任编辑 聂淑琴]