

# 狼紫草水提物抗菌作用的初步实验研究

孙文晓\* 张海港\* 韦 卓\*

体表炎症常常伴随有细菌感染,感染又进一步促进了炎症的发展。多种炎症疼痛动物模型实验已经证明<sup>[1]</sup>,狼紫草能够有效抑制炎症反应时的渗出、肿胀和增生过程,具有明显的抗炎、镇痛作用,而这种作用可能主要通过降低体内的 IL-1 $\beta$ 、升高 IL-2 水平,抑制其他炎症因子的产生等来发挥,彰显出该药具有广泛的临床应用前景。现在已知紫草类植物含有的萜类、多醇酯、黄酮类等类化合物具有广泛的抗菌活性<sup>[2]</sup>;然而目前尚未有研究对狼紫草的水提物体外抗菌活性进行研究报道。本研究拟对不同浓度的狼紫草水提物的抑菌效果进行研究,以探讨狼紫草的抗菌活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

狼紫草全草采集于河南西南部野外,阴凉处自然晒干。取生药 300g,粉碎后加 1000ml 蒸馏水浸泡 2h,文火煮沸 1.5h,过滤。药渣再加水 500ml 继续煎煮,煮沸 30min,过滤并加水重复煎煮 1 次。合并 3 次煎液,4 层纱布过滤后浓缩至 2g/ml,即为狼紫草水提物。高压蒸汽灭菌后,保存于 4℃ 备用<sup>[1]</sup>。供试菌种为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* CVCC249),乙型溶血性链球菌( $\beta$ -hemolytic streptococcus NICBP32210),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CCTCCAB1053),粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*),均由解放军第三军医大学微生物教研室提供。实验药品与试剂为氯化钠(上海化学试剂采购供应站),蛋白胨(上海化学试剂采购供应站)。实验仪器为立式压力蒸汽灭菌器(YXQ-LS-50S1 上海博讯实业有限公司医疗设备厂);摇床(ZHWY200B 上海智城分析仪器制造有限公司);6500 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 NAPCO 公司产品);DL-4000B 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂产品);sartious BP210 0.1mg 电子天平(德国产);SW2CJ21F 型洁净工作台(江苏苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 狼紫草水提物的制备 狼紫草水提物制备同前。高压蒸汽灭菌后,保存于 4℃ 备用。

1.2.2 菌液的制备 分别取 37℃ 条件下培养的新鲜培养菌 1ml,接种于 10ml 普通肉汤培养基内,再取 1ml 到 10ml 普通肉汤培养基中,得到 1:100 菌液。同法制得 1:1000 菌液。后以平板培养,计数法测定其生长浊度,然后将菌液稀释至菌落计数在 10000/ml 左右备用<sup>[3]</sup>。

1.2.3 供药敏用纸片制备 将普通定性滤纸用打孔机打成若干圆形纸片,直径为 6mm,置于干燥洁净的试管内,放入高压蒸汽灭菌器中,经 121℃ 15~20min 高压灭菌后,取出,放入干燥箱内进行干燥备用。

1.2.4 利用平板打孔法测定抑菌效价<sup>[4-5]</sup> 取带塞无

菌试管 4 组,每组 8 支排列在管架上,于每组第 1 管加入无菌药液 2ml,然后用无菌蒸馏水进行倍比稀释,使成 1:1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 浓度。然后应用平皿打孔法,将用肉汤培养 6~8h 的无菌肉汤稀释成 10<sup>-3</sup> 浓度的试验菌液均匀涂布于培养基内,用灭菌的孔径为 5mm 的打孔器打孔,用无菌牙签挑去琼脂块便留下圆形小孔,再用滴管滴融化琼脂培养基于小孔中封底,以防药液从皿底流走,然后用适量加样器将上述不同浓度的被试药物直接加入孔中,盖上事先在皿盖内面粘贴有 1~2 层滤纸灭菌过的培养皿盖,放入 37℃ 孵箱中培养 16~24h 后观察结果,了解抑菌效价,记录结果。

1.2.5 纸片法测定菌株对 AELO 的敏感性试验<sup>[4-5]</sup>

将已高压蒸气灭菌的干燥备用纸片无菌操作放置已均匀涂布菌液的 M-H 平板中,每种菌贴 3 组纸片,每组分别加 0.02ml、0.04ml、0.08ml 药液于纸片上,并以无菌水作为对照,然后将平板置 37℃ 温箱中培养 24h 后测量抑菌圈的大小,记录结果。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度狼紫草水提物对供试菌的抑菌效果

实验结果显示,乙型溶血性链球菌外,药液原液对其他试验菌株均有抑制作用。未见细菌生长。大肠埃希氏菌,金黄色葡萄球菌以及粪肠球菌的 MIC 分别为 1:4、1:2 和 1:2。相对而言狼紫草水提物对大肠埃希氏菌作用最大,最低抑菌浓度为 1:4,而对乙型溶血性链球菌无抑菌作用(表 1)。

表 1 不同浓度狼紫草水提物的最低抑菌浓度(g/ml)

| 供试菌种     | 对<br>照 | 2.0<br>(1:1) | 1.0<br>(1:2) | 0.5<br>(1:4) | 0.25<br>(1:8) | 0.125<br>(1:16) | 0.0625<br>(1:32) |
|----------|--------|--------------|--------------|--------------|---------------|-----------------|------------------|
| 大肠埃希氏菌   | +++    | -            | -            | -            | +             | ++              | +++              |
| 乙型溶血性链球菌 | +++    | +            | ++           | +++          | +++           | +++             | +++              |
| 金黄色葡萄球菌  | +++    | -            | -            | +            | ++            | +++             | +++              |
| 粪肠球菌     | +++    | -            | -            | +            | +             | ++              | +++              |

注:以上数据为 3 次实验重复。-表示无细菌生长,+表示细菌生长弱,++表示细菌生长较强,+++表示细菌生长很弱

### 2.2 不同浓度狼紫草水提物对供试菌的抑菌圈直径及抑菌作用

表 2 不同浓度狼紫草水提物的抑菌圈直径及抑菌作用

| 药液     | 大肠埃希氏菌    | 乙型溶血性<br>链球菌 | 金黄色<br>葡萄球菌 | 粪肠球菌     |
|--------|-----------|--------------|-------------|----------|
| 无菌水    | 6.0(-)    | 6.0(-)       | 6.0(-)      | 6.0(-)   |
| 氨苄青霉素  | 7.1(+)    | 6.0(-)       | 8.5(+++)    | 8.0(+++) |
| 0.01ml | 6.2(+)    | 6.0(-)       | 6.0(-)      | 6.3(+)   |
| 0.02ml | 6.5(+)    | 6.0(-)       | 6.0(-)      | 7.5(+)   |
| 0.04ml | 9.2(+++)  | 6.0(-)       | 6.9(+)      | 8.7(+++) |
| 0.08ml | 10.5(+++) | 6.0(-)       | 7.7(+)      | 9.2(+++) |

注:表中括号内数据为抑菌圈的直径(单位:mm),凡抑菌圈直径大于 10.0mm 者为强抑菌,用“+++”表示;抑菌圈直径为 8.0~10.0 者为

抑菌,用“++”表示;抑菌圈直径为 6.0~8.0mm 者为弱抑菌,用“+”表示;无抑菌作用用“-”表示

从实验结果可以看出,4 个浓度的狼紫草水提取物对乙型溶血性链球菌均无抑制作用(表 2),而对大肠埃希氏菌则有明显的抑制作用,0.04ml 狼紫草水提取物对金黄色葡萄球菌和粪肠球菌也有一定的抑制作用,0.08ml 浓度对大肠埃希氏菌则有明显抑制作用。

### 3 讨论

体表溃疡创面极易感染细菌,溃疡面上大量的细菌生长、繁殖,需要消耗大量的生长因子和各种维生素等营养物质,造成局部甚至全身免疫功能下降,影响溃疡愈合。此外,细菌毒素具有溶解蛋白质和胶原纤维作用,可引起出血和血栓形成;感染细胞的蛋白质合成发生障碍,引起皮肤溶解、坏死,使溃疡进一步扩大;还可抑制成纤维细胞的生长,延缓损伤组织的修复,从而影响溃疡的愈合,造成溃疡迁延难愈。

天然药物是目前发现新药的重要源泉,已经引起世界各国的广泛重视。中医中药是其重要的组成部分,也是我国新药开发的优势领域。早在 20 世纪 50 年代我国医药工作者即开始了中药抑菌作用与抑菌成分研究,并发现许多具有抗菌作用的中药。目前国内研究已经证明,清热药绝大部分具有抑菌作用,其他如止血药、解表药也有一定抑菌作用,而补养药、安神药则极少具有抑菌作用<sup>[6]</sup>。在中药体外抑菌实验的研究中,一方面在进行具有抑菌作用中草药物的筛选工作,另一方面也试图发现其中的有效抑菌成分。但是有关抑菌成分的研究,直到 20 世纪 80 年代以来,由于各种理化手段的使用才更加精细和深入。目前就成分而言,可将其大致分为有机酸、生物碱、黄酮、挥发油、醌类多以及萜类等<sup>[7]</sup>。

大肠埃希氏菌、乙型溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌均为院内感染或交叉感染的重要病原菌群<sup>[8-9]</sup>,根据有关研究结果已知它们均已发展出多药抗药性,许多过去有效的抗生素现在已失去了作用,筛选、开发出有效的抗生素或抑菌活性物质已成为当前面临的

重要工作。基于我们前期对狼紫草水提取物抗炎作用的认知,对其水提取物的体外抑菌作用进行了研究。我们的实验提示,不论是从 MIC 实验还是从纸片法结果都可以看出,狼紫草水提取物原液对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌的生长均具有抑制作用,其中对大肠埃希氏菌的抑制作用最强,对粪肠球菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用其次,但对乙型溶血性链球菌的抑菌作用则不明显。狼紫草对抗大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌感染的良好的抑制作用,彰显出提取狼紫草的有效抑菌活性成分治疗临床感染病菌的极大运用前景。但体外抗菌试验具有抑菌作用只是初步说明药物单纯的抗菌作用,不足以阐明药物对整个机体的影响,其抗菌作用还需进行体内的抗菌实验和最终的临床验证。

### 参考文献

- [1] 孙文晓,张海港,李晓辉,等. 狼紫草水提取物抗皮肤溃疡与镇痛作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 10(19): 1892-1893.
- [2] 吴瑕,陈东辉,雷玲,等. 竹节人参抗炎镇痛作用研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 43-45.
- [3] 王燕燕,陈超,杨洪发. 虎参痛风胶囊对大鼠足肿的抗炎作用[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(3): 206-208.
- [4] 胡成穆,李俊. 非甾体抗炎药的临床应用及不良反应研究进展[J]. 安徽医药, 2001, 5(3): 161-163.
- [5] 罗学娅,李明辉,吕莉,等. 紫草的药理作用与应用研究进展[J]. 大连大学学报, 2004, 25(2): 80-83, 92.
- [6] 山东医学院微生物学教研组. 110 种中药抗菌谱试验的初步结果[J]. 山东医学院学报, 1959, 7(2): 42-45.
- [7] 王嵩. 中草药抗细菌感染研究[J]. 北京中医杂志, 2002, 21(4): 249-250.
- [8] 冯笑峰,郭红琴. 医院感染的调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2000, 10(2): 113-114.
- [9] 刘春蓝. 浅谈院内感染的因素与预防措施[J]. 中华中西医杂志, 2006, 4(3): 109-110.

\* 华中科技大学同济医学院附属梨园医院骨科(430077)

## 蜂房提取物中抗肿瘤成分的活性研究

张 坤\* 魏金荣\* 关一夫\*

中草药蜂房由蜂蜡、蜂胶和蜂房油三种物质组成。其化学成分复杂,以树脂、油脂、色素、鞣质、糖类、有机酸、脂肪酸、苷类、酶和昆虫激素等为主。蜂房不仅具有攻毒疗疮、消肿散结以及祛风通络的药用功效,而且还表现出了抗肿瘤作用<sup>[1]</sup>。已有文献报道蜂房或蜂胶的不同溶剂提取物对荷瘤鼠的 S180 实体瘤及 H22 肝癌细胞均有明显抑制作用<sup>[2]</sup>,并且在与放疗或化疗的配合使用时还表现出了增加疗效的作用。动物实验还证明提取物无毒副作用,不损伤正常组织<sup>[3-5]</sup>。这些实验结果表明,蜂房或蜂胶的不同溶剂提取物中含有多种抗肿瘤的活性成分<sup>[6-10]</sup>。本文报道了蜂房甲醇提取物的抗肿瘤效用的检

测作以简单介绍和论述。本研究对蜂房甲醇提取物的抗肿瘤效用进行了初步的探讨。我们将蜂房甲醇提取物的膏状物溶于 DMSO,制备成不同浓度作用于不同组织来源的肿瘤细胞。结果表明蜂房甲醇提取物具有抗肿瘤活性,并与浓度呈明显的量效关系。

### 1 实验材料与方法

#### 1.1 主要药品及试剂

河北产蜂房购于天士力大药房;RIMPI1640 购于赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司;FBS 购于 TBD;MTT 购于沃宏;PBS 购于北京中杉金桥;胰蛋白酶购于 SIGMA;AnnexinV-FITC 购于欣博盛生物;其他试剂