

- flammatory myopathies and amyopathic dermatomyositis: experience in a single institute in Japan[J]. J Rheumatol, 2011,38(8):1636
- [8] Saketkoo L A, Ascherman D P, Cottin V, et al . Interstitial Lung Disease in Idiopathic Inflammatory Myopathy[J]. Curr Rheumatol Rev, 2010,6(2):108
- [9] Levine S M, Raben N, Xie D, et al . Novel conformation of Histidyl-transfer RNA synthetase in the lung[J]. Arthritis Rheum, 2007,56(8): 2729
- [10] Chen I J, Jan W Y, Lin C W, et al . Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis[J]. Clin Rheumatol, 2009,28(6):639
- [11] Fujisawa T, Suda T, Nakamura Y, et al . Differences in clinical features and prognosis of interstitial lung diseases between polymyositis and dermatomyositis[J]. J Rheumatol, 2005,32(1):58
- [12] 李虹,林箐,焦红梅,等. 皮肤炎合并间质性肺疾病 20 例临床分析[J]. 中华内科杂志, 2012,51(3):214
- [13] Devreese K M. Antiphospholipid antibodies: evaluation of the thrombotic risk[J]. Thromb Res, 2012, 130(Suppl 1): S37
- [14] Basiri Z, Gholyaf M, Faridnia M, et al . The prevalence of anticardiolipin antibody in patients with systemic lupus erythematosus and its association with clinical manifestations[J]. Acta Med Iran, 2013, 51(1): 35
- [15] Jais X, Launay D, Yaici A, et al . Immunosuppressive therapy in lupus- and mixed connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension: a retrospective analysis of twenty-three cases[J]. Arthritis Rheum, 2008,58(2):521
- [16] 陈宝萍,任绪义,程新定. 抗核抗体阴性标本的抗可提取核抗原谱分析[J]. 浙江临床医学, 2010,12(1):75
- [17] 邢艳,唐中. 抗核抗体的研究进展[J]. 国外医学科学分册, 2006, 33(5):218
- [18] Juarez M, Misischia R, Alarcon G S. Infections in systemic connective tissue diseases: systemic lupus erythematosus, scleroderma, and polymyositis /dermatomyositis[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2003, 29(1): 163
- [19] Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos H M, et al . Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community [J]. Arthritis Rheum, 1993,36(3):340
- [20] Tanimoto K, Nakano K, Kano S, et al . Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis[J]. J Rheumatol, 1995,22(4):668
- (2014-03-27 收稿)

文章编号 1006-8147(2014)05-0399-03

论 著

黄芩中 7 种单体成分对金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌的体外抑菌活性研究

李秀玲^{1,2}, 方步武³

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市南开医院药剂科, 天津 300100; 3.天津医科大学药理学教研室, 天津 300070)

摘要 目的: 研究黄芩主要成分黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、野黄芩苷、白杨素、千层纸素等 7 种单体对易引起细菌性肺炎的致病菌金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌的敏感性。方法: 采用微量稀释法测定 7 种单体的最小抑菌浓度(MIC)。结果: 7 种单体成分中黄芩苷、黄芩素对金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌有较好的抑菌效果, 其最低抑菌浓度分别为 1 mg/mL、0.25 mg/mL、1 mg/mL、0.062 5 mg/mL。结论: 黄芩苷、黄芩素对金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌有一定的抑菌作用, 以黄芩素抑菌效果更好, 其余单体在最高浓度 2 mg/mL 下无抑菌效果。

关键词 黄芩苷; 黄芩素; 金黄色葡萄球菌; 肺炎链球菌; 最低抑菌浓度; 体外抑菌作用

中图分类号 R96

文献标志码 A

肺炎是一种常见疾病, 根据病原菌分类包括细菌性肺炎、病毒性肺炎、支原体肺炎等。其中细菌性肺炎占成人各类病原体肺炎的 80%。肺炎链球菌是引起肺炎、中耳炎、败血症和脑膜炎的常见病原菌, 青霉素等 β -内酰胺类抗生素在很长一段时间内一直是治疗该菌感染的首选而有效的药物。但是由于大量和不恰当使用抗菌药物, 肺炎链球菌逐渐产生了耐药性, 特别是对青霉素及大环内酯类抗菌药物的耐药性倍受国际上的关注。由于中草药具有副作用小、不易残留和较少出现耐药性等优点, 使得从作者简介 李秀玲(1982-), 女, 主管药师, 硕士在读, 研究方向: 药理学; 通信作者: 方步武, E-mail: fangdch@aliyun.com。

中草药中筛选抗菌药物越来越受到国内外学者的广泛重视^[1]。黄芩是中医治疗肺炎的临床常用中药, 具有较广的抗菌谱^[2], 尤其对细菌性肺炎具有良好的疗效^[3]。黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效。黄芩药材主产于河北、山西、内蒙古和东北等地, 药用成分主要为黄酮类化合物, 其中含量较高的成分有黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素等^[4]。黄芩的主要抗菌成分为黄芩苷, 以往都使用黄芩药材或者黄芩苷粗品进行体外抗菌实验^[5-7], 本文除了选用黄芩苷以外, 还选取了黄芩中含量较高的 6 种特征成分, 并且均使

用其标准品(确保了成分的单一性),观察7种单体对易引起细菌性肺炎的致病菌金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌的敏感性,为黄芩的抗菌活性以及其它有效成分的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 肺炎链球菌标准株 31001(中国药品生物制品检定所提供);金黄色葡萄球菌(哈尔滨医科大学提供)。

1.1.2 黄芩7种单体 黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素(批号依次为110715-201016、111595-200905、111514-200403、111701-200501,中国药品生物制品鉴定所);汉黄芩苷(上海融禾医药科技有限公司);野黄芩苷(批号110842-201106,中国食品药品检定研究院);千层纸素(上海源叶生物科技有限公司)。

1.1.3 培养基 绵羊血(批号081008);牛肉粉(批号20080808,北京奥博星生物技术有限责任公司);琼脂;蛋白胨。

1.1.4 主要仪器 生物安全柜 CLASS II TYPE B2(北京东联哈尔仪器制造有限公司);高速冷冻离心机 KDC-160HR(科大创新股份有限公司中佳分公司);振荡培养箱 HZQ-F160(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);电热恒温培养箱 DHP-9162(上海一恒科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养基的制备 (1)液体培养基:取烧杯加适量水,依次加入牛肉浸膏5g,蛋白胨10g,氯化钠5g,加蒸馏水至1000mL,用10%NaOH调节pH7.2~7.4,115℃高压灭菌20min,备用。(2)固体培养基:液体培养基加2%琼脂,其余同(1)。(3)血清培养基:液体培养基中加5%~10%羊血,其余同(1)。

1.2.2 细菌培养 将真空冻干保存的肺炎链球菌标准株用少量液体培养基溶解后,直接接种于10%血琼脂斜面培养基上,37℃培养24h,挑取典型菌落传代,将传代后的菌落接种至10%绵羊血清肉汤

培养基中,置于振荡培养箱中,37℃,120r/min,培养24h。金黄色葡萄球菌直接传代于琼脂斜面培养基上,方法同上。

1.2.3 菌液的制备 将上述培养的带菌液体培养基及血清肉汤培养基离心,3000r/min,15min,弃去上清液,收集细菌沉淀,用少量的生理盐水溶解细菌沉淀,将此菌液做为原菌液,用无菌生理盐水稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 浓度,分别取上述浓度的菌液500μL,分别接种于固体培养基上,37℃培养24h,选取菌落数在30~300个之间者计数,计算原菌液浓度,用生理盐水将原菌液精确配成 1×10^5 CFU/mL~ 1×10^6 CFU/mL浓度。

1.2.4 最低抑菌浓度(MIC)的测定 参考美国临床实验室标准化委员会(CLSI/NCCLS)介绍的方法—稀释法测定。由于本实验使用标准品量小,所以采用微量稀释法。

参考以往文献黄芩苷对金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌的最低抑菌浓度^[5-7]设置初始浓度为2mg/mL。取黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、野黄芩苷、白杨素、千层纸素标准品各1mg,用少量DMSO溶解后加入营养肉汤培养基配制成2mg/mL的溶液。向96孔板第1~12列每孔加入100μL,向1、2列分别对应加入上述所配置的溶液100μL,混合均匀后从第2列吸去100μL至第3列,如此连续倍比稀释至第11列,取100μL弃去,使各孔浓度依次为原液浓度的1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256、1/512、1/1024。向2~12列分别加入金黄色葡萄球菌液100μL。另取96孔板加入血清肉汤培养基以及肺炎链球菌,方法同上。摇匀37℃培养24h,取出观察细菌生长情况,以肉眼观察无细菌生长为最低浓度。

2 结果

7种单体对金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌在96孔板中的细菌生长结果分别见表1、2。结果表明黄芩苷、黄芩素对两种致病菌有不同程度的抑菌作用,黄芩素抑菌效果更好。

表1 7种不同浓度黄芩单体成分对金黄色葡萄球菌生长的抑制情况

黄芩单体成分	稀释浓度/(mg/mL)											
	阳性对照	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062 5	0.031 5	0.015 6	0.007 8	0.003 9	阴性对照
黄芩苷	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
黄芩素	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
汉黄芩苷	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
汉黄芩素	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
野黄芩苷	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
白杨素	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
千层纸素	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“+”表示无细菌生长,“-”表示有细菌生长

表 2 7 种不同浓度黄芩单体成分对肺炎链球菌生长的抑制情况

黄芩单体成分	稀释浓度/(mg/mL)											
	阳性对照	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062 5	0.031 5	0.015 6	0.007 8	0.003 9	阴性对照
黄芩苷	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
黄芩素	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
汉黄芩苷	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
汉黄芩素	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
野黄芩苷	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
白杨素	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
千层纸素	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“+”表示无细菌生长,“-”表示有细菌生长

由于肉眼观察结果可能存在误差,所以分别从每一孔取一环接种在相应的固体培养基中,37 ℃培养 24 h 再次观察,以无细菌生长为最低抑菌浓度。结果见表 3。汉黄芩苷、汉黄芩素、野黄芩苷、白杨素、千层纸素 5 种单体在 2 mg/mL 对金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌无抑菌现象。

表 3 7 种不同黄芩单体成分对金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌的最低抑菌浓度(MIC,mg/mL)

细菌种类	黄芩苷	黄芩素	汉黄芩苷	汉黄芩素	野黄芩苷	白杨素	千层纸素
金黄色葡萄球菌	1	0.062 5	>2	>2	>2	>2	>2
肺炎链球菌	1	0.25	>2	>2	>2	>2	>2

3 讨论

西医治疗肺炎通常使用抗生素,但是随着抗生素的大量使用,细菌的耐药现象日益严重,金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌也逐渐产生了耐药性^[8-9]。由于细菌耐药率增高,所谓“难治性”肺炎屡见不鲜,尤其在儿童、老年人和免疫抑制患者中病死率较高,在抗生素药物使用过程中,多重耐药时有发生,为临床治疗感染带来很多难题,耐药菌感染已严重威胁我们的正常生活。由于多重耐药菌株的大量产生,中药的抑菌作用开始受到人们的关注。中药抑菌机制尚不清楚,有报道通过对中药与抗生素作用后菌落直径大小的比较,提示了中药成分可能具有与一般抗生素不同的抑菌机制。中药抑菌成分较多,可作用于细菌的不同部位和繁殖的不同阶段,并对细菌的多个代谢环节作用,故不易产生耐药性^[8]。因此研究和开发抗菌中药具有重要意义。黄芩是中医在临床上治疗肺炎的常用药,具有较广的抗菌谱,这与黄芩的苦寒药性和“清热燥湿、泻火解毒、凉血止血、除热安胎”的功效有关。黄酮类成分为黄芩药理活性基础,而黄芩苷具有多种药理活性,被

认为在很大程度上代替黄芩的功效^[7],所以黄芩的绝大部分药敏试验都采用药材或者黄芩苷粗品。本研究除了选取常用的黄芩苷以外,对其它含量较高的成分也进行了药理活性的探究,黄芩素为黄芩苷的苷元,在本研究中对金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌的抑菌效果明显强于黄芩苷,这为黄芩中其它成分的开发利用提供了实验依据,也为黄芩素对其它致病菌的抗菌疗效提出了可能性。汉黄芩苷、汉黄芩素、野黄芩苷、白杨素、千层纸素 5 种单体在 2 mg/mL 对金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌无抑菌现象,推测其抑菌浓度大于 2 mg/mL 或对此两种细菌无抑菌活性,有待进一步探讨研究。此外,本实验药品均使用纯品,排除了杂质及其它成分的干扰,避免不同成分间的协同或拮抗作用,为单体成分的抗菌活性提供了理论支持。

参考文献:

- [1] 周锡钦,梁鸿,路新华,等. 中药黄芩主要黄酮类成分及其生物活性研究[J]. 北京大学学报:医学版, 2009,41(5):578
- [2] 杨淑文. 32 种中草药抑菌活性的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(3): 1361
- [3] 刘云波,郭丽华,邱世翠,等. 黄芩体外抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药, 2002,13(10):596
- [4] 黄志华,徐子琴,樊信泽. 单味黄芩治疗细菌性肺炎[J]. 时珍国药研究, 1992,3(3):106
- [5] 孙冬梅,邝枣园,李岩,等. 黄芩苷对耐药性金黄色葡萄球菌的抑菌作用研究[J]. 吉林医学, 2011,32(13):2587
- [6] 乔亚峰,叶振东. 四种中药对耐药肺炎链球菌的抑菌作用[J]. 中国微生态学杂志, 2009,21(11):995
- [7] 王娜. 中药黄芪、黄芩有效成分的体外抑菌作用研究[D]. 秦皇岛:燕山大学,2009
- [8] 王辉,陈民钧. 北京地区肺炎链球菌的耐药性及其分子流行病学调查[J]. 中华医学杂志, 1999,79(4):12
- [9] 高元明,商鸣宇,丁少芳. 常见肺部耐药菌感染治疗进展[J]. 北京医学, 2005,27(11):686

(2014-03-14 收稿)