

# 30种中草药提取物体外抗 MRSA的筛选研究

左国营<sup>1</sup>,王根春<sup>1</sup>,徐贵丽<sup>1</sup>,余巍<sup>1</sup>,彭虎<sup>2</sup>,邝文喜<sup>2</sup>(1.成都军区昆明总医院药剂科,昆明 650032;2.昆明医学院药理学系 2004届实习生,昆明 650031)

**摘要:**目的 测定中草药提取物体外抗 MRSA活性,比较 30种常用中草药对金葡菌的抑菌作用。方法 琼脂扩散法。结果 地榆、苏木和黄芩抑制 MRSA的活性较高,平均 MIC (抑菌圈直径 =10mm) 分别为 3.1、3.1 和 4.1 mg/mL;对标准菌活性较大的提取物对耐药菌也具有较大的活性。结论 30种抗金葡菌的中草药中有 7种对 MRSA敏感。

**关键词:**中草药;金黄色葡萄球菌;MRSA;体外抑菌实验

中图分类号:R285.2 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2006)04-0293-03

## Screen of anti-MRSA activity from 30 Chinese herbage medicine extracts

ZUO Guo-ying, WANG Gen-chun, XU Gui-li, et al (Department of Pharmacy, Kunming General Hospital of PLA, Kunming 650032, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To assay the *in vitro* inhibitory activity of 30 Chinese herbage medicine extracts on MRSA and compare their bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus*. **METHODS** Agar spread method was used. **RESULTS** Among the 30 Chinese herbage medicines tested, *Sanguisorba officinalis* L., *Caesalpinia sappan* Linn. and *Scutellaria baicalensis* Georgi. showed inhibitory effect, the MIC on MRSA (bacteriostatic diameter =10mm) were 3.1, 3.1 and 4.1 mg/mL, respectively. **CONCLUSION** 7 of the 30 Chinese herbage medicines are sensitive to MRSA.

**KEY WORDS:** chinese herbage medicine; *Staphylococcus aureus*; MRSA; antimicrobial tests *in vitro*

随着抗生素的广泛应用,越来越多的细菌对常用抗生素产生耐药性,且耐药程度日益加重。目前耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 感染已与 HBV、AIDS 并列世界范围内三大最难解决的感染性疾病<sup>[1]</sup>。MRSA 对多种抗生素耐药,致病力强且治疗效果差,为引起医院感染的主要病原菌之一。建国以来,我国对中草药抗金黄色葡萄球菌等感染的作用进行过筛选研究<sup>[2]</sup>,但是针对 MRSA 感染的报道较少,只是在近年来才得到关注<sup>[3-4]</sup>。为了进一步发现更多的抗 MRSA 中草药品种,探索其抗 MRSA 感染的物质基础,我们对 30 种中草药的 80% 醇提取物进行了抑制 MRSA 的活性的筛选研究并测定了有关中草药提取物的 MIC 值,对这些中草药抗标准金黄色葡萄球菌和耐药金黄色葡萄球菌的活性进行了比较研究。

### 1 实验材料

1.1 标准菌:金黄色葡萄球菌 (ATCC25923) 和各种抗菌素药敏纸片均购自中国药物制品检定所。

1.2 耐药菌:MRSA 菌株 (44, 72, 85 号) 由本院呼吸系统患者痰液标本分离得到。

1.3 中草药:由云南药材有限公司延寿堂连锁经营公司和本院中药房提供。

### 2 实验方法

#### 2.1 耐药菌的药敏测试

按抗菌素药敏常规测试方法 (纸片法) 进行。

#### 2.2 醇提取物的制备

将 30 种中草药粉碎成粗粉,各称取粉末 30g,用 150mL 80% 的乙醇浸泡 3 次,第一次浸泡一周,第二、三次浸泡 3~4d,过滤,合并滤液用旋转蒸发器减压于 40℃ 以下回收至干,用结晶刀转移至无菌安瓿瓶中备用。

#### 2.3 药液制备

用电子分析天平称提取物各 100mg,用无菌蒸馏水 (含 5% DMSO) 配成 100mg/mL 溶液作初筛用;以浓度 100mg/mL 为原溶液,采用二倍稀释法<sup>[5]</sup>,每种待测药液用 10 支无菌试

管,每支无菌试管加入 0.5mL蒸馏水,编号,取 0.5mL原药液于第一支试管中,均匀混合,继而吸取 0.5mL加入第 2支试管内。依次类推稀释至第 9管,弃去 0.5mL,第 10管作为对照管,以观察无药下细菌的活力。这样得到不同浓度的药液用于测定 MIC。

2.4 菌液的制备<sup>[5]</sup>

把菌株接种在普通琼脂平板上,置于 35℃恒温箱中培养 24h,用接种环把菌株转移至试管中,用无菌生理盐水配成 1.5亿/mL菌液作初筛用,再稀释成 10<sup>6</sup>/mL作测定 MIC用。

2.5 抑菌试验

测定方法为琼脂扩散法<sup>[6]</sup>。

2.5.1 初筛:用无菌棉签把浓度为 1.5亿/mL的标准金黄色葡萄球菌均匀涂布于培养基上然后用直径为 6mm的无菌圆形玻璃管打孔,将含有各提取物浓度为 100mg/mL的药液加入孔中,加满为止,不得溢出。再将培养皿置于 35℃恒温箱中培养 24h,取出观察,用卡尺测量抑菌圈的直径。

2.5.2 测定 MIC:方法同初筛,选择对标准菌的抑菌圈直径 ≥10mm的提取物,分别将不同浓度的药液加入孔中进行带菌培养,无菌生长的最低药液浓度为其 MIC值。进而择抑制标准菌的 MIC ≤12.5mg/mL的提取物同法测定耐药菌的 MIC值。

3 结果和讨论

三株耐药金黄色葡萄球菌具有 MRSA的特性,见表 1。

表 1 MRSA 菌株对抗生素的药敏实验结果

Tab 1 The antibiotics-susceptibility test results of MRSA strains

| 菌株 | 耐药                                                       | 中介    | 敏感                       |
|----|----------------------------------------------------------|-------|--------------------------|
| 44 | 青霉素、苯唑青霉素、氨苄青霉素、头孢唑林、头孢呋辛、哌拉西林 / 舒巴坦、红霉素、克林霉素            | 左氧氟沙星 | 利氟霉素、万古霉素                |
| 72 | 青霉素、苯唑青霉素、氨苄青霉素、头孢唑林、头孢呋辛、哌拉西林 / 舒巴坦、红霉素、克林霉素、左氧氟沙星、加替沙星 | 磷霉素   | 利氟霉素、万古霉素                |
| 85 | 青霉素、苯唑青霉素、氨苄青霉素、哌拉西林 / 舒巴坦、红霉素、克林霉素                      | 磷霉素   | 头孢唑林、头孢呋辛、利氟霉素、加替沙星、万古霉素 |

30种不同科属中草药的提取物用标准金葡菌初筛结果,有 22种的抑菌圈大于 10mm,呈现不同强度的抑制活性:根据药理学实验方法<sup>[1]</sup>,抑菌圈直径 16mm 以上的为高度敏感(10种),11~15mm 的为中度敏感(10种),10mm 的为轻度敏感(2种),<10mm 的为抗药或无抑制活性(有 8种,分别是:茯苓、黄芪、栀子、板蓝根、巴戟天、茵陈、重楼和肉桂)。接着测定了活性提取物对标准菌的最低抑菌浓度。其中,以苏木、黄芩、地榆和甘草的活性较高,MIC分别为 1.6、3.1、3.1、3.1mg/mL;进一步测定了对标准菌有较大抑制活性提取物对三株耐药菌(MRSA)的 MIC值,以地榆、苏木和黄芩的活性较高,平均 MIC分别为 3.1、3.1 和 4.1mg/mL。见表 2,表 3。

表 2 对标准菌和耐药菌均有抑制活性的中草药

Tab 2 Inhibition of tested Chinese herbal medicines against both SA and MRSA

| 编号 | 药名  | 提取率 (%) | 抑菌圈 (mm) | MIC <sub>S</sub> <sup>*</sup> (mg/mL) | MIC <sub>R</sub> <sup>**</sup> (mg/mL) |      |     |      |
|----|-----|---------|----------|---------------------------------------|----------------------------------------|------|-----|------|
|    |     |         |          |                                       | 44                                     | 72   | 85  | 平均   |
| 1  | 黄芩  | 9.9     | 33       | 3.1                                   | 3.1                                    | 6.2  | 3.1 | 4.1  |
| 2  | 苏木  | 5.9     | 30       | 1.6                                   | 3.1                                    | 3.1  | 6.2 | 4.1  |
| 3  | 荔枝核 | 12.5    | 28       | 12.5                                  | 50                                     | 3.1  | 6.2 | 19.7 |
| 4  | 桑寄生 | 6.1     | 22       | 12.5                                  | 12.5                                   | 25   | 6.2 | 14.6 |
| 5  | 生大黄 | 21.6    | 20       | 6.2                                   | 6.2                                    | 6.2  | 6.2 | 6.2  |
| 6  | 地榆  | 22.0    | 17       | 3.1                                   | 3.1                                    | 3.1  | 3.1 | 3.1  |
| 7  | 甘草  | 6.3     | 16       | 3.1                                   | 6.2                                    | 12.5 | 6.2 | 8.3  |

注: \* MIC<sub>S</sub>为标准菌的最低抑菌浓度(抑菌圈直径 = 10mm);

\*\* MIC<sub>R</sub>为耐药菌的最低抑菌浓度(抑菌圈直径 = 10mm)

Note: MIC<sub>S</sub> represents MIC of SA (bacteriostatic diameter = 10mm);

MIC<sub>R</sub> represents MIC of MRSA (bacteriostatic diameter = 10mm)

表 3 仅对标准菌有抑制活性的中草药

Tab 3 Inhibition of tested Chinese herbal medicines against only SA

| 编号 | 药名   | 提取率 (%) | 抑菌圈 (mm) | MIC <sub>S</sub> <sup>*</sup> (mg/mL) |
|----|------|---------|----------|---------------------------------------|
| 1  | 旱莲草  | 4.1     | 22       | 25                                    |
| 2  | 胡黄连  | 29.8    | 19       | 50                                    |
| 3  | 吴茱萸  | 14.2    | 17       | 50                                    |
| 4  | 败酱草  | 3.7     | 15       | 50                                    |
| 5  | 半枝莲  | 3.6     | 15       | 25                                    |
| 6  | 楮实子  | 3.9     | 15       | 50                                    |
| 7  | 灵芝   | 1.0     | 15       | 100                                   |
| 8  | 山豆根  | 13.8    | 14       | 50                                    |
| 9  | 钩藤   | 3.9     | 14       | 50                                    |
| 10 | 紫花地丁 | 10.3    | 14       | 50                                    |
| 11 | 知母   | 24.1    | 12       | 100                                   |
| 12 | 马齿苋  | 12.5    | 12       | 100                                   |
| 13 | 田基黄  | 3.8     | 11       | 50                                    |
| 14 | 黄药子  | 2.6     | 10       | 25                                    |
| 15 | 北山楂  | 26.4    | 10       | 100                                   |

注: \* MIC<sub>S</sub>为标准菌的最低抑菌浓度

Note: MIC<sub>S</sub> represents MIC of SA (bacteriostatic diameter = 10mm)

测定 MIC的常规方法应该是试管法或琼脂平板稀释法,在本实验中尝试用打孔法考察不同浓度药液的抑菌效果,以产生轻度敏感(抑菌圈直径为 10mm)的浓度作为最低抑菌浓度。这样,便于操作和结果观察,一个平板可以试验多个药液浓度,有利于进行大批量筛选,也节约了培养基。类似测定方法参见文献<sup>[7]</sup>。

本研究结果表明,提取物的抑菌圈大小与其相应的 MIC值不一定成平行关系,这可能是由于中草药提取物含有多种成分,各成分的活性强度不同所致。以往进行中草药提取物抗菌作用的研究,提取溶剂多用水煎提后浓缩为每毫升含 1g 药材的溶液。不同成分的水溶性不同,加之在热水中稳定性亦不一样;相比之下,含水醇提法在室温下进行,有利于保持原药材的有效成分并易于溶剂的去除,还可进一步跟踪研究提取物中各成分的活性大小。有人曾比较过药材醇和水

的提取物活性,以前者的活性较为明显<sup>[8]</sup>。乙醇提取法是中草药提取的常用方法,含水醇提取既能溶出极性较大的水溶性成分,也能溶出极性较小的成分。我们正进一步用不同极性的有机溶剂将高活性提物作分配处理及跟踪分离有效部位的成分。

比较相同提取物对标准菌和耐药菌的活性强度发现,对标准菌活性较大的提取物对耐药菌也具有较大的活性,说明中草药的抗菌机制可能与现有抗生素不同。有研究者认为中草药除直接抗菌外,还可增强机体的免疫力,这可能是中草药不易产生耐药性的原因之一。至于这些中草药提取物在体内的抗菌活性如何,尚需进一步研究。

## 参考文献

[1] 马翔宇,易龙,宋治远. 医源性 MRSA 感染及其防治研究进展 [J]. 临床医学, 2003, 23(5): 53.

- [2] 王嵩. 中草药抗细菌感染研究 [J]. 北京中医杂志, 2002, 21(4): 249.
- [3] 肖丽英, 黄焯坡. 23 种中草药对耐药金葡菌的敏感性探讨 [J]. 时珍国医国药, 2001, 12(10): 878.
- [4] 黄通旺, 杨灏强, 庞珊. 抑制  $\beta$ -内酰胺酶的草药的筛选研究 [J]. 汕头大学学报 (自然科学版), 2000, 15(2): 46.
- [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, 1982: 106-1071.
- [6] 钟有添, 马廉兰. 中草药和常用抗生素对绿脓杆菌的抑菌实验 [J]. 赣南医学院学报, 2001, 21(3): 244.
- [7] 蒋丹, 王关林. 22 种中草药抑菌活性的研究 [J]. 辽宁高职学报, 2003, 5(4): 140.
- [8] 马廉兰, 张文平, 曾祥凤, 等. 116 种中草药对白念珠菌的抑菌实验 [J]. 赣南医学院学报, 1998, 18(3): 189.

收稿日期: 2005-03-14