

· 论 著 ·

滇东南 26 种中草药体外抗菌活性研究

张新娟¹, 左国营^{1*}, 孙菱², 余巍¹, 王根春¹

摘要:目的 测定 26 种采自滇东南红河州原始森林中草药的 80%乙醇提取物体外抗菌活性及对 MRSA 活性, 筛选出抑菌效果好的药材进一步提取分离并追踪其有效成分。方法 制备 26 种云南中草药乙醇提取物, 采用常规琼脂扩散法对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白假丝酵母菌、铜绿假单胞菌以及临床分离得到的 MRSA 菌株进行体外抑菌试验, 倍比稀释法测定 MIC(最小抑菌浓度)、MBC(最低杀菌浓度)。结果 26 种云南中草药的醇提取物中有 16 种对标准金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 25923)、大肠埃希菌标准菌株(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌标准菌株(ATCC 27853)、白假丝酵母菌标准菌株(ATCC Y0109)均有不同程度的抑制活性, 其中野梧桐、乔木茵芋等 8 种中草药对标准金黄色葡萄球菌的抑制作用较好, 对标准金黄色葡萄球菌的抑菌圈大小在 11~24mm 之间, 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株抑菌活性在 9~26mm 之间, MIC 在 8~512 μ g/mL 之间。结论 野梧桐、乔木茵芋等 8 种中药具有广谱的抗菌活性, 且对 MRSA 菌株也有一定的抑制作用。

关键词: 滇产中草药; 抗菌活性; MRSA; MIC; MBC

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)4-413-06

Antibacterial activity of 26 Chinese herbal medicine in vitro in southeastern Yunnan Province. ZHANG Xin-juan, ZUO Guo-ying, SUN Ling et al. (1. Clinical School of Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, Yunnan, P. R. China; Corresponding author: ZUO Guo-ying, E-mail: zuoguoying@263.net)

Abstract: Objective To determine the antibacterial activity of 80% ethanol extracts from 26 Chinese herbal medicine collected in Southeastern forests of Yunnan. The active extracts against MRSA (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) for further isolation. Methods 26 ethanol extract from the Chinese herbs in Yunnan, were prepared. Using agar-diffusion method for primary in vitro antibacterial test, double-dilution method for MIC (Minimum inhibitory concentration) and MBC (Minimum Bactericidal concentration) assays. Results 16 of the 26 ethanol extracts showed inhibition effects on Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans at varied extent and 8 of out of the 16 extracts including Mallotus japonicus and Skimmia arborescens Anders etc. showed better inhibition activity against Staphylococcus aureus. The diameter of inhibition zone against Staphylococcus aureus ranged 11~24 mm and 9~26 mm against MRSA. Both of their MIC among 8~512 μ g/mL. Conclusion Ethanol extract of Mallotus japonicus and Skimmia arborescens spectacular etc. show a broad-spectrum antimicrobial properties and an inhibition effect against MRSA.

Key words: Yunnan herbal products; Antimicrobial activity; MRSA activity; MIC; MBC

近年来抗生素的滥用导致了诸多细菌产生耐药性, 尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的感染问题日趋严重。单一使用抗生素已不能满足临床需求, 从纯天然中草药中寻找抗菌成分为新抗菌药研发提供了新的路径, 云南自然植物资源丰富, 药材种类繁多、不良反应小、来源广、价格低廉的特性也显示了其进一步开发的优势, 因此, 从传统天然药物中找寻抗微生物感染的新药越来越受到关注^[1,2]。为了进一步发现更多的具有抗感染作用的中草药, 探索其抗菌作用的物质基础, 本实验就采自滇东南红河地区的 26 种中草

药的醇提取物做了初步的抗菌活性筛选。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验药材 野梧桐 (*Mallotus japonicus* (Thunb.) Muell.-Arg); 乔木茵芋 (*Skimmia arborescens* Anders); 青冈 (*Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst); 红河木莲 (*Manglietia hongheensis* Y.M. Shui et W.H. Chen); 滇白珠 (*Gaultheria leucocarpa* Bl. var. *crenulata* (Kurz) T.Z. Hsu); 绿樟 (*Meliosma squamulata* Hance); 仙茅 (*Curculigo orchoides* Gaertn.); 扶芳藤 (*Euonymus fortunei* (Turcz.) Hand.-Mazz); 野八角 (*Illicium simonsii* Maxim); 10) 杯

基金项目: 国家自然科学基金(No.N9FC81073126)

作者单位: 1. 解放军昆明总医院, 云南 昆明 650032; 2. 任丘市华北油田总医院, 河北 任丘 062552

作者简介: 张新娟(1985~), 女, 在读研究生, 主要从事临床药理学研究。

* 通讯作者: E-mail: zuoguoying@263.net

状栲 (*Castanopsis calathiformis*); 肋果茶 (*Sladenia celastriifolia* Kurz); 绿叶五味子 (*Schisandra viridis* AC Smith); 柳叶润楠 (*Machilus salicina* Hance); 大山龙眼 (*Helicia grandis* Hemsl); 南蛇藤 (*Celastrus orbiculatus* Thunb) 红河鹅掌柴 (*Schefflera hoi* (Dunn) Viguier); 中华楸木 (*Aralia elata* (Miq) Seem); 绞股兰 (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino); 棕叶芦 (*Thysanolaena maxima* (Roxb.) O. Kuntze); 草寇 (*Alpinia blepharocalyx* K. Schum. var. *blepharocalyx* *Alpinia bracteata* Roxb); 毛茛 (*Ranunculus japonicus* Thunb); 尼泊尔水东哥 (*Saurauia napaulensis* DC. var. *napaulensis*); 鞘花苦刺 (*Sophora davidii* (Franch) Skeels.); 疏花卫茅 (*Euonymus laxiflorus* Champ. ex Benth) 红花寄生 (*Scurrulaparasitica* Linn. var. *parasitica*); 油葫芦 (*Pyrularia edulis* (Wall) A. DC.) 药材均采自云南省红河州金平县, 由中科院昆明植物研究所税玉民副研究员鉴定^[3]。

1.1.2 实验菌株 标准菌株: 金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923)、大肠埃希菌 (ATCC 25922)、铜绿假单胞菌 (ATCC 27853)、白假丝酵母菌 (ATCC Y0109) 由云南省临床检验中心提供; 临床分离耐药菌株: 金黄色葡萄球菌有 MRSA 8、MRSA 82、MRSA 92、MRSA 123、MRSA 144、MRSA 189、MRSA 321, 由成都军区昆明总医院临床分离的到。耐药菌的药敏测试为头孢西丁纸片法。

1.1.3 培养基 M-H 琼脂培养基 (Mueller-Hinton's Agar) 用于金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌药敏试验; 沙氏琼脂培养基 (Sabouraud's Agar) 用于白假丝酵母菌药敏试验。

1.2 方法

1.2.1 乙醇提取物的制备 26 种云南中草药干燥枝叶用小型粉碎机分别粉碎成粗粉, 分别用托盘天平称取 50g 装于 500mL 锥形瓶中, 用 80% 乙醇冷浸 (第一次 1 周, 第 2 次 3d, 第 3 次 2d), 共提取 3 次, 合并提取液, 在 40℃ 以下用旋转蒸发仪减压蒸馏, 回收溶剂, 用结晶刀把所得浸膏转移至空安瓿中备用^[4]。

1.2.2 药液制备 琼脂扩散法药液: 用电子天平称取样品浸膏各 50mg, 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解至 1mL 备用。测 MIC 药液: 称取 4.1mg 样品浸膏用 MH 肉汤将其溶解至 1mL, 若不易溶解可加入不超过总体积 300g/L 的 DMSO 助溶^[5]。

1.2.3 体外药物敏感性试验

1.2.3.1 菌悬液的制备 试验前一天, 把所需菌株接种到普通琼脂平板上, 置于 35℃ 恒温箱中培养 24h,

实验前用接种环把细菌转移至试管, 再用无菌生理盐水配置成细菌 1.5×10^9 CFU/mL 菌液作初筛用 (白假丝酵母菌为 1×10^6 CFU/mL), 测定 MIC 和 MBC 的应稀释成 1.0×10^6 CFU/mL (白假丝酵母菌为 1×10^4 CFU/mL)。

1.2.3.2 琼脂打孔法 (初筛) 药液的制备: 取 26 种样品各 50mg 分别置于 1.5mL 小离心管中, 用微量加样器分别加 1000μL 二甲基亚砜作溶媒, 配成 50mg/mL 的药液备用。取无菌培养皿, 将 4℃ 保存的培养基加热溶解后, 冷却至 45℃, 在超净化工作台中, 用无菌量筒量取 20mL 培养基倾注于培养皿内, 待其冷却凝固后倒置, 再用 6mm 孔径无菌玻璃管在厚度为 4mm 的 MH 培养基上进行打孔。以无菌棉签试子蘸取已制备好的 4 株标准细菌 (ATCC 25923、ATCC 25922、ATCC 27853 浓度为 1.5×10^9 CFU/mL、ATCC Y0109 浓度为 1×10^6 CFU/mL) 均匀涂布于相应的培养基上, 再用进样枪将已配好的药液按编号加入孔中约 50μL, 然后将培养皿置于 35℃ 恒温箱中培养 18~24h (对白假丝酵母菌试验用沙氏琼脂培养基, 于 28℃ 下培养 48h), 取出观察, 用直尺测量抑菌圈直径, 记录实验结果。根据 CLSI 标准^[6]抑菌圈 <10mm 的为耐药, 11~15mm 为中介, >16mm 的为敏感。由初筛结果选出对标准菌抑菌圈 >10mm 的样品测定其对耐药菌的抑菌圈, 方法同上, 测定并记录耐药菌药敏实验结果, 见表 1。

1.2.3.3 倍比稀释法测定 MIC、MBC 值 根据打孔法得到的实验结果及样品的量, 采用微量稀释法测定活性较好的药物 (抑菌圈 >10mm) 对标准金黄色葡萄球菌和临床分离耐药菌的 MIC 和 MBC, 其具体如下: 从打孔法得到的结果并查阅文献估算测定 MIC 时的首孔浓度, 计算所需的样品量组分的量并称取, 用 1mL 1000g/L DMSO 溶解, 混匀, 配成相应浓度的溶液^[7]。在超净化工作台上, 取无菌 96 孔板, 在每个板的第 1 列 (即最左边一列) 用加样枪加入 200μL 培养液作为阴性对照, 最后一列加入 100μL 培养液和 100μL 菌液作为阳性对照; 从第二列到第十一列采用微量稀释法加入药液 (每列先各加 100μL 培养液, 然后在第二列每孔加入 100μL 4.1mg/mL 的药液混匀后吸出 100μL 加入下一孔, 依次倍比稀释, 弃去最后的稀释液体 100μL), 然后每孔加入 100μL 菌液, 混匀。最后放置于 35℃ 恒温箱中培养 18~24 h 取出进行观察, 显微镜下观察以无细菌生长的最低药物浓度为其最低抑菌浓度 (MIC)。确定 MIC 后, 把上述每排 MIC

前的各孔用接种环移种于普通琼脂平板作为次代培养。经 35℃ 培养 18~24h 后观察最低药物浓度能杀死 99.9%原始种入的细菌即为最低杀菌浓度(MBC)^[8]。

1.2.4 耐药菌株鉴定 耐药菌株分离自本院临床感染性标本,常法增菌培养。金葡菌株耐药性按抗菌素药敏常规测试方法(K-B 纸片法)进行,以 CLSI 2007 版(第 17 版)推荐的头孢西丁药敏纸片操作方法及判据确认:抑菌圈直径≤ 19mm,判定为 MRSA,抑菌圈直径≥ 20mm,判定为敏感菌株 MSSA。

2 结果

对所提取的各种药物进行体外抑菌实验(打孔法),初筛结果显示:有 15 种对金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 25923)抑菌圈直径在 10~24mm 之间;其中野梧桐、青冈、红河木莲、乔木茵芋对金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 25923)抑菌圈直径在 20mm 以上,扶芳藤、仙茅、绿樟、中华木荷、滇白珠、臭檀、藤黄抑菌圈在 15~20mm 之间,其余的 16 种在 10~15mm 之间。

表 1 耐药菌株对抗生素的药敏实验结果

Table 1 The antibiotics- susceptibility test results of resistant strains

| 菌株 Strain | 耐药 Resistance | 中介 Intermediate | 敏感 Sensitivity |
|--------------|--|--|---|
| MRSA 8 | 青霉素 Penicillin、苯唑西林 Oxacillin、氨苄西林 Ampicillin、左氧氟沙星 Lefloxacin、先锋霉素 V Cephlorindnum V、哌拉西林 / 舒巴坦 Ppericillin/sulbactam、红霉素 Erytocin、头孢西丁 cefoxitin、克林霉素 Clindamycin、阿奇霉素 Azithromycin、利福平 Rifampicin | 无 | 万古霉素 Vaconmycin、替考拉宁 Teicoplanin、利奈唑胺 Linezolid、磷霉素 Fosfamyacin、 |
| MRSA 82 | 氨苄西林、克林霉素 Clidamycin、利福平 Rifampicin、先锋霉素 V Cephlorindnum V、环丙沙星 Cyprofloxacin、左氧氟沙星 Lefofloxacin、头孢他啶 Ceftazidine、头孢西丁 Cefoxitin | 磷霉素 Fosfamyacin | 利奈唑胺 Linezolid,万古霉素 vancomycin |
| MRSA 92 | 阿奇霉素 Azithromycin、苯唑西林 Oxacillin、氨苄西林 Ampicillin、头孢西丁 Cefoxitin、克林霉素 Clindamycin、左氧氟沙星 Lefofloxacin | 无 | 复方新诺明 co- SMZ、利福平 Rifampicin、万古霉素 vancomycin、加替沙星 Caretixacin、磷霉素 clindamycin |
| MRSA 123 | 青霉素 Penicillin、苯唑西林 Oxacillin、头孢西丁 Cefoxitin、亚胺培南 Imipenem、西司他丁钠 Cilosatin | 无 | 利奈唑胺 Linezolid、万古霉素 Vancomycin、莫西沙星 Moxifloxacin、磷霉素 fosfamyacin |
| MRSA 189 | 青霉素 Penicillin、苯唑西林、氨苄西林 Ampicillin、头孢西丁 Cefoxitin、头孢呋辛 Cefruoxime、先锋霉素 V,cephlorindnum V、复方新诺明 co- SMZ、环丙沙星 Cyproxacin、左氧氟沙星 Lefofloxacin | 磷霉素 Fosfamyacin | 万古霉素 vancomycin、利奈唑胺 Linezolid、莫西沙星 Moxifloxacin |
| MRSA 144 | 青霉素 Penicillin、氨苄西林 Ampicillin、苯唑西林 Oxacillin、头孢西丁 Cefoxitin、头孢呋辛 Cefruoxime、头孢唑林,阿奇霉素 Azothromycin、利福平 Rifampicin、克林霉素 clindamycin、克拉霉素 Clinthromycin | 无 | 万古霉素 Vancomycin、磷霉素 Fosfamyacin |
| MRSA 321 | 克拉霉素、克林霉素 Clindamycin、阿奇霉素 Azithromycin、青霉素 Penicillin、苯唑西林 oxacillin、氨苄西林 Ampicillin、头孢西丁 Cefoxitin、红霉素 Erythromycin。先锋霉素 V cephalorindnum V、头孢呋辛 Cefuroxime、左氧氟沙星 Lefofloxacin | 头孢硫脒 Cefathiamidine Cephathia mnidine | 万古霉素 Vancomycin、加替沙星 Gatifloxacin |

对初筛结果中活性较好的 15 种中草药进一步进行耐药菌体外抑菌实验(打孔法),其结果显示,有 21 种药物对 4 株 MRSA 有较好的抑制作用,抑菌圈均≥ 10 mm,见表 2。

选取对金葡的抑菌圈大于 16mm(敏感)和大于 10 mm(中介)的药物做 MIC、MBC 实验,见表 3、表 4。

3 讨论

本次实验从所测 26 种云南中草药中,筛选出 18

表 2 对标准菌抑菌圈 ≥ 10 mm 的药物对临床分离金黄色葡萄球菌的耐药菌抑菌试验结果Table 2 Antibacterial test results of the zone of inhibition of *Staphylococcus aureus* ≥ 10 mm of drugs on the drug-resistant *Staphylococcus aureus*

| 样品名 | ATCC 25923(mm) | MRSA 8(mm) | MRSA 92(mm) | MRSA 123(mm) | MRSA 321(mm) |
|----------|----------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| 1.野梧桐 | 24 | 17 | 15 | 18 | 20 |
| 2.乔木茵芋 | 24 | 14 | 18 | 24 | 19 |
| 3.青冈 | 23 | 14 | 18 | 23 | 19 |
| 4.红河木莲 | 21 | 12 | 14 | 19 | 18 |
| 5.滇白珠 | 18 | 10 | 16 | 18 | 20 |
| 6.中华木荷 | 18 | 13 | 12 | 18 | 14 |
| 7.臭檀 | 18 | 10 | 14 | 16 | 15 |
| 8.绿樟 | 17 | 12 | 15 | 16 | 15 |
| 9.仙茅 | 16 | 16 | 17 | 20 | 16 |
| 10.扶芳藤 | 15 | 14 | 12 | 17 | 19 |
| 11.野八角 | 13 | 14 | 15 | 12 | 10 |
| 12.苹果榕 | 13 | 8 | 16 | 14 | 15 |
| 13.杯状栲 | 12 | 14 | 15 | 13 | 13 |
| 14.肋果茶 | 12 | 9 | 13 | 13 | 15 |
| 15.绿叶五味子 | 12 | 10 | 9 | 16 | 9 |
| 16.柳叶润楠 | 12 | - | 10 | 10 | 9 |
| 17.大山龙眼 | 11 | 8 | 10 | 11 | 10 |
| 18.南蛇藤 | 11 | 10 | 10 | 10 | 8 |

注：抑菌用药浓度为 50mg/mL、细菌菌液浓度为 1.5 亿 CFU/mL, Note Inhibition concentration was 50mg/mL, the bacterial concentration was 1.5×10^9 /mL

表 3 对标准菌抑菌圈 ≥ 16 mm 的药物(敏感)对金黄色葡萄球菌标准菌株及 MRSA 菌株的 MIC 和 MBCTable 3 MIC and MBC to the zone of inhibition of *Staphylococcus aureus* ≥ 16 mm (sensitive) drugs on *Staphylococcus aureus* and MRSA strains

| 样品名 | | ATCC 25923 (μ g/mL) | MRSA 82 (μ g/mL) | MRSA 92 (μ g/mL) | MRSA 189 (μ g/mL) | MRSA 144 (μ g/mL) | MRSA 321 (μ g/mL) |
|---------|-----|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1.野梧桐 | MIC | 32 | 8 | 32 | 64 | 16 | 32 |
| | MBC | 128 | 64 | 256 | 128 | 64 | 256 |
| 3.千果榄仁 | MIC | 64 | 64 | 16 | 32 | 32 | 32 |
| | MBC | 256 | 256 | 128 | 128 | 128 | 128 |
| 4.青冈 | MIC | 64 | 64 | 64 | 64 | 32 | 16 |
| | MBC | 256 | 128 | 512 | 256 | 128 | 256 |
| 5.红河木莲 | MIC | 32 | 128 | 8 | 32 | 16 | 16 |
| | MBC | 128 | 512 | 32 | 128 | 64 | 64 |
| 6.壮丽含笑 | MIC | 64 | 128 | 64 | 64 | 16 | 32 |
| | MBC | 256 | 512 | 128 | 256 | 64 | 256 |
| 7.乔木茵芋 | MIC | 64 | 64 | 64 | 64 | 16 | 32 |
| | MBC | 256 | 256 | 256 | 256 | 128 | 128 |
| 8.滇白珠 | MIC | 32 | 64 | 64 | 32 | 64 | 64 |
| | MBC | 128 | 256 | 256 | 256 | 256 | 256 |
| 9.绿樟 | MIC | 64 | 32 | 64 | 32 | 64 | 32 |
| | MBC | 256 | 128 | 256 | 128 | 256 | 128 |
| 10.中华木荷 | MIC | 32 | 64 | 32 | 32 | 32 | 16 |
| | MBC | 128 | 256 | 256 | 64 | 128 | 64 |
| 11.来江藤 | MIC | 64 | 64 | 32 | 64 | 32 | 64 |
| | MBC | 128 | 256 | 256 | 128 | 128 | 256 |
| 12.臭檀 | MIC | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 64 |
| | MBC | 64 | 256 | 128 | 256 | 256 | 256 |
| 13.藤黄 | MIC | 32 | 32 | 64 | 32 | 16 | 32 |
| | MBC | 256 | 256 | 256 | 128 | 64 | 128 |

注：抑菌用药浓度为 4.1mg/mL、细菌菌液浓度为 1.5 亿 CFU/mL, Note Inhibition concentration was 4.1mg/mL, the bacterial concentration was 1.5×10^9 cfu/mL

种中草药对金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)的抑菌圈在 10~24mm 之间,同时对其它的标准菌也呈现出不

同强度的抑制作用;有 9 种对标准铜绿假单胞菌(ATCC 27853)抑菌圈直径在 10~15mm 之间;有 15

表 4 对标准菌抑菌圈≥ 10mm(中介)的药物对金黄色葡萄球菌标准菌株及 MRSA 菌株的 MIC 和 MBC

Table 4 MIC and MBC to the zone of inhibition of Staphylococcus aureus≥ 10mm drugs (moderately sensitive) on Staphylococcus aureus and MRSA strains

| 样品名 | | ATCC 25923 (μ g/mL) | MRSA 82 (μ g/mL) | MRSA 92 (μ g/mL) | MRSA 189 (μ g/mL) | MRSA 144 (μ g/mL) | MRSA 321 (μ g/mL) |
|---------|-----|------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1.野八角 | MIC | 512 | 512 | 512 | 1 024 | 1 024 | 1 024 |
| | MBC | 1 024 | >1 024 | >1 024 | >1 024 | >1 024 | >1 024 |
| 2.杯状栲 | MIC | 128 | 512 | 512 | 512 | 1 024 | 512 |
| | MBC | 512 | >1 024 | 1 024 | 1 024 | >1 024 | >1 024 |
| 3.扶芳藤 | MIC | 512 | 512 | 512 | 512 | 512 | 512 |
| | MBC | >1 024 | >1 024 | 1 024 | >1 024 | >1 024 | >1 024 |
| 4.肋果茶 | MIC | 64 | 256 | 128 | 128 | 256 | 128 |
| | MBC | 256 | 1 024 | 512 | 512 | 1 024 | 512 |
| 5.仙茅 | MIC | 512 | 256 | 512 | 512 | 512 | 256 |
| | MBC | 1 024 | 1 024 | >1 024 | >1 024 | 512 | 1 024 |
| 6.绿叶五味子 | MIC | 256 | 128 | 64 | 128 | 128 | 128 |
| | MBC | 1 024 | 512 | 256 | 512 | 512 | 512 |
| 7.柳叶润楠 | MIC | 512 | 512 | 1 024 | 512 | 512 | 512 |
| | MBC | 1 024 | >1 024 | >1 024 | >1 024 | 1 024 | >1 024 |
| 8.苹果榕 | MIC | 1 024 | 512 | 512 | 512 | 512 | 1 024 |
| | MBC | >1 024 | >1 024 | 1 024 | >1 024 | >1 024 | >1 024 |
| 9.大山龙眼 | MIC | 512 | 1 024 | 1 024 | 1 024 | 512 | 1 024 |
| | MBC | 1 024 | >1 024 | >1 024 | >1 024 | 1 024 | >1 024 |
| 10.南蛇藤 | MIC | 1 024 | 1 024 | 512 | 512 | 1 024 | 512 |
| | MBC | >1 024 | >1 024 | 1 024 | 1 024 | >1 024 | 1 024 |

注：抑菌用药浓度为 8.2 mg/mL、细菌菌液浓度为 1.5 亿 CFU/mL Note Inhibition concentration was 8.2mg/mL,the bacterial concentration was1.5×10⁹CFU/mL

种对标准大肠埃希菌(ATCC 25922) 抑菌圈直径在 10~14mm 之间;有 10 种对标准白假丝酵母菌(ATCC Y0109)抑菌圈直径在 10~13mm 之间,显示了广谱抗菌活性。

本次实验所用耐药菌株,都是从临床感染患者中分离的对抗生素有不同程度耐药的菌株。对大量长期应用抗生素和久治不愈的重症感染患者具有很大的威胁,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌已成为造成感染的首要原因,众多医务工作者和研究学者正致力于寻找有效低毒的抗菌药物^[9]。而本次实验筛选出野梧桐、乔木茵芋等植物对这些耐药菌株表现出较好的抑制作用。乔木茵芋的对各类菌均有抑制作用,其活性成分还有待于进一步追踪报道。红河木莲对 MRSA 菌株抑菌效果显著,其活性成分未见报道。这些活性较好的植物粗提物可进一步用活性追踪的方法确定其有效成分^[10,11]。对单用抗生素难以治疗和对抗生素耐药的致病菌,可尝试联合用药,并进行体外、体内抗菌实验,进一步开发疗效好且副作用小的抗菌药物应用于临床。

参考文献：

[1] Song SP,Xie XZ,Xi DY,et al. Surveillance and analysis of 158 drug-resistant Staphylococcus aureus [J]. Chin J Hospital Inf, 2003,13(4): 384-385.(In Chinese)

(宋世平,解晓珍,席道友,等. 158 株金黄色葡萄球菌的耐药性监测与分析[J]. 中华医院感染学杂志,2003,13(4): 384-385.)

[2] Wang S. Study on Chinese herbal medicines against bacterial infections [J]. Beijing Med J, 2008,28(4): 249-251.(In Chinese)

(王嵩. 中草药抗细菌感染研究[J]. 北京中医杂志,2008,28(4): 249-251.)

[3] Shui YM. Seed plants in Honghe area of Yunnan[M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2003. (In Chinese)

(税玉民. 滇东南红河地区种子植物[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003.)

[4] Xue XL. Chinese medicine effective component extraction method[J]. Chin J Modern Distance Edu, 2010,8(11): 86-87. (In Chinese)

(薛晓丽. 中药有效成分的提取方法[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010,8(11): 86-87.)

[5] Li W, Song XB, Xi LP. Comparison of different methods in drug sensitivity tests and screening of flux sensitivity [J]. J Shizhen Sinopharm Med, 2010,21(8): 2062-2064. (In Chinese)

(李薇,宋新波,习利平. 药物敏感性试验中不同方法灵敏度的比较及助溶剂的筛选[J]. 时珍国医国药, 2010,21(8): 2062-2064.)

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Seventeenth informational supplement. M100-S17. CLSI, 2007. Wayne, PA.

[7] RICE LB. Antimicrobial resistance in gram positive bacteria [J]. Am J Infect Control, 2006,34(5Suppl 1): S11-9; discussion S64-73.

[8] Zhou BJ. Determination of the antibacterial effect of commonly used traditional Chinese medicine [M]. Chongqing Science and Technology Press, Chongqing Branch, 1987. (In Chinese)

(下转第 420 页)

p53 基因是一种促凋亡基因,与细胞的生长、分化和死亡密切相关。在睾丸中 p53 也介导生精细胞的分裂和凋亡 p53 蛋白对温度敏感,温度改变时易发生点突变^[3]。p53 主要表达在各级生精细胞胞质中,尤其是在精母细胞胞质。

据许多文献报道,NO 诱导各种细胞产生凋亡的实验中 p53、Bcl-2 及 caspase-3 均显示变化。在 SNAP 与血管平滑肌细胞共同培养并导致凋亡的实验中发现 p53 的表达迅速升高并在 24h 后达到峰值,Bcl-2 的表达则在 12h 后开始降低。有研究表明在 NO 调节 p53 表达的过程中,谷胱甘肽发挥了中介作用,谷胱甘肽—主要是还原型谷胱甘肽,是细胞内的抗氧化剂,可保护细胞不受氧自由基的伤害,有研究者用 LPS 和 SNP 提供内源性和外源性 NO,并在它对血管平滑肌(VSM)影响的研究中发现,NO 在诱导血管平滑肌细胞凋亡的同时,还显著降低细胞内的还原型谷胱甘肽浓度(下降约 40%),但 p53 的 mRNA 水平升高。当加入谷胱甘肽单乙酯—一种可自由进入细胞的还原型谷胱甘肽,则胞内 GSH 水平升高(比对照组高 1 倍以上),并且能阻止 NO 对 p53 表达的诱导和 VSM 的凋亡^[4]。Wakulich 等用多种方法诱导 NO 并与小鼠胃粘膜共培养,发现 NO 引起的细胞死亡伴随着 GSH 的消耗和活性氧代谢物的增加,而在小鼠体内用 Buthionine sulfoximine 处理或在体外用 Diethylmaleate 处理则减少 GSH 存储进而加剧 NO 导致的细胞死亡并提高了氧化产物的量^[5]。从实验中似乎可以得到这样一种模式:NO 消耗胞内 GSH,而 GSH 的减少又导致 p53 的激活。NO 活泼的化学性质在这种模式中发挥了作用—它和它的代谢产物都是较强的氧化剂,正是它们耗尽了还原型的 GSH。

本实验研究结果发现:隐睾固定+生理盐水及隐睾固定组血清中 NO 浓度、NOS 活性以及生精细胞凋亡率最高,隐睾固定+L-NAME 组则高于假手术组而低于隐睾固定+生理盐水及隐睾固定组。免疫组化检测发现 p53 表达在生精细胞胞质中,在隐睾固定+L-NAME 组中的表达比隐睾固定+生理盐水及隐睾固定组弱,在假手术组中最弱。说明隐睾下降固定后 NOS 活性降低但仍比正常高,局部高浓度的 NO 刺激 p53 的表达,引起生精细胞凋亡增加。L-NAME 能通过减少 NO 的产生降低 p53 的表达,减少生精细胞的凋亡。p53 的高表达是导致生精细胞仍然过度凋亡的重要原因。这为临床隐睾患者术后生育力的研究提供了新的实验依据。

参考文献:

- [1] Yutaka K, Tomomoto I, Kohei Y, et al. Oral Administration of Tetrahydrobiopterin Attenuates Testicular Damage by Reducing Nitric Oxide Synthase Activity in a Cryptorchid Mouse Model [J]. Androl, Mar 2008 (29): 153–163.
- [2] Burnett AL, Ricker DD, Tillman SL, et al. Localization of Nitric Oxide Synthase in the reproductive organs of the male rat [J]. Biol Reprod, 1995, 52(1): 1–7.
- [3] Lin M, Andreas S, Dawid W, et al. Hsp90 Regulates the Activity of Wild Type p53 under Physiological and Elevated Temperatures [J]. Biol. Chem, Nov 2004 (279): 48846–48854.
- [4] Cook T, Wang ZF, Alber S, et al. Nitric Oxide and Ionizing Radiation Synergistically Promote Apoptosis and Growth Inhibition of Cancer by Activating p53 [J]. Cancer Res, Nov 2004 (64): 8015–8021.
- [5] Aquilano K, Baldelli S, Cardaci S, et al. Nitric oxide is the primary mediator of cytotoxicity induced by GSH depletion in neuronal cells [J]. Cell Sci, Apr 2011 (124): 1043–1054.

收稿日期: 2011-12-06 编辑: 谢永慧

(上接第 417 页)

(周邦靖. 常用中药的抗菌作用及其测定方法[M]. 重庆: 科学技术出版社重庆分社, 1987.)

- [9] Lu YM, He L, Wu WY, et al. Surveillance and analysis of drug-resistant Staphylococcus aureus in Shenzhen [J]. Journal of Guangdong Medical college, 2004, 20(5): 463–465. (In Chinese). (卢月梅, 何林, 吴伟元, 等. 深圳地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性监测与分析[J]. 广东医学院学报, 2004, 20(5): 463–465.)
- [10] Li HY, Pan KY, Wu XQ, et al. Change and treatment strategies of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Chin Physician, 2005, 7(9): 1272–1273. (In Chinese) (李红玉, 潘昆贻, 伍锡泉, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药变

迁及治疗对策[J]. 中国医师杂志, 2005 (9): 1272–1273.)

- [11] Zuo GY, Wang LJ, Zhao JF, et al. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) [J]. J Ethnopharmacology, 2008, (120): 287–290.
- [12] Zuo GY, Meng FY, Hao XY, et al. Antibacterial Alkaloids from Chelidonium majus Linn (Papaveraceae) against clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. J Pharm Pharmacol Sci, 2008, 11(4): 90–94.

收稿日期: 2012-02-15 编辑: 邢翀