

• 基础实验研究论著 •

甘肃黄芩中提取物黄芩苷元体外抑制假丝酵母菌研究*

张美玲¹, 魏莲花², 王宏伟¹, 张兆芳³, 田 涸¹

(1. 甘肃中医学院附属医院检验科, 甘肃兰州 730020; 2. 甘肃省临床检验中心, 甘肃兰州 730000; 3. 甘肃中医学院附属医院制剂室, 甘肃兰州 730020)

摘要:目的 找出甘肃黄芩中提取物黄芩苷元体外抑制假丝酵母菌的抗菌谱。方法 将甘肃黄芩先制成黄芩苷,再用强酸加热水解,提取其中有效活性成分黄芩苷元,用甲醇溶解,制成黄芩苷元制剂。收集临床分离深部感染假丝酵母菌 134 株,传代 2~3 次保持其活力,制成 0.5 麦氏单位($1\times 10^6\sim 5\times 10^6$ CFU/mL)菌悬液,将菌悬液接种于沙保弱药物平板上,35℃培养 24~48 h,观察被检菌生长情况,找出药物最低抑菌浓度(MIC)。结果 黄芩苷元 MIC 试验确定,MIC 分别为:白色假丝酵母菌 0.956 μg/mL,光滑假丝酵母菌 1.047 μg/mL,热带假丝酵母菌和葡萄牙假丝酵母菌 1.138 μg/mL,克柔假丝酵母菌和丛生丝孢假丝酵母菌 1.411 μg/mL。结论 黄芩苷元在体外对白色假丝酵母菌抑制效果最好,光滑假丝酵母菌次之,热带假丝酵母菌和葡萄牙假丝酵母菌较差,克柔假丝酵母菌和丛生丝孢假丝酵母菌最差。

关键词:黄芩苷元; 最低抑菌浓度; 甘肃; 酵母菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.008 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2013)07-0780-02

Inhibitory effects in vitro of baicalein in Radix Scutellariae of Gansu on candida*

Zhang Meiling¹, Wei Lianhua², Wang Hongwei¹, Zhang Zhao Fang³, Tian Yuan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730020, China; 2. Center of Clinical Experiment in Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China; 3. Manufacturing Laboratory, Affiliated Hospital of Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730020, China)

Abstract: **Objective** To seek the antibacterial spectrum of baicalein in Radix Scutellariae of Gansu on inhibitory effects in vitro for Candida. **Methods** The baicalin in Radix Scutellariae of Gansu was prepared, and used strong acid to conduct by heating hydrolysis, the baicalein that is effective active component of Radix Scutellariae was extracted, and it was dissolved by methanol to make baicalein reagent. 134 strains Candida from deep fungal infection focus in clinic were isolated and collected, and were cultured in vitro 2 to 3 times to maintain vitality, and were made of 0.5 wheat 's unit(1×10^6 to 5×10^6) of bacterial suspension. The bacterial suspension was spread on Sabouraud drug plate. Under 35℃, the Candida was cultured for 24 to 48 hours, and observed growth situation of the bacteria and found the minimum inhibitory concentration(MIC) of drug. **Results** MIC test of baicalein showed that Candida albicans of MIC was 0.956 μg/mL, Candida glabrata of MIC was 1.047 μg/mL, Candida tropicalis and Portugal Candida of MIC were 1.138 μg/mL, Candida krusei and Trichosporon yeast of MIC were 1.411 μg/mL. **Conclusion** Inhibitory effect in vitro of baicalein on Candida albicans was best, and the second was Candida glabrata, Candida tropicalis and Portugal Candida were bad, Candida krusei and Trichosporon yeast were worst.

Key words: baicalin; minimum inhibitory concentration; Gansu; yeasts

假丝酵母菌目前已成为临床深部感染真菌中最常见的条件致病菌之一。黄芩苷元为黄芩苷水解产物,文献报道其具有抗菌作用。本研究选用了从甘肃黄芩中提取的黄芩苷元进行体外抑菌实验研究,目的是找出黄芩苷元抗假丝酵母菌的抗菌谱,为中药治疗临床深部真菌感染提供量化参考标准。

1 材料与方法

1.1 药物来源 甘肃黄芩,本品为唇形科植物、甘肃黄芩的干燥根和根茎,产自甘肃陇西。

1.2 菌株来源及培养基 134 株假丝酵母菌是从临床深部真菌感染患者的标本中分离,由甘肃省临床检验中心微生物实验室及甘肃中医学院附属医院检验科微生物室提供,2 株标准菌株由甘肃省临床检验中心微生物实验室提供。科玛嘉平板采用法国 CHROMagar 公司干粉(郑州博塞生物技术研究所提供)配制;沙保弱平板采用杭州天和微生物实验有限公司的干

粉配制。

1.3 方法

1.3.1 检测方法 用无菌棉拭子蘸取配制好的菌液,按 3 个方向密涂于含有黄芩苷元药物沙保弱平板上,同时做含有甲醇的空白对照平板,室温静置 15 min 待菌液浸透培养基后,将平板置于真菌培养箱中,35℃孵育,分别于 24、48、72 h 后观察结果。

1.3.2 菌液配制 将标准菌株和收集到的病原菌菌株接种于沙保弱琼脂斜面上,35℃生长 24~48 h,经 2~3 次的传种后,收集幼龄菌,用无菌生理盐水冲洗斜面,调至 0.5 个麦氏单位。

1.3.3 药物制备 利用甘肃陇西产的黄芩制成黄芩苷,在强酸、加热条件下不稳定易水解生成黄芩素和葡萄糖醛酸的性质,建立了由黄芩制备高纯度黄芩素的方法。

1.3.4 培养基制备及贮存 采用琼脂稀释法^[1],培养基为沙

* 基金项目:甘肃省科技攻关计划项目(2GS064-A43-020-28)。 作者简介:张美玲,女,副主任检验师,主要从事条件致病菌耐药性研究。

保弱琼脂,按厂家规定进行配置时加水量要减少 1/10,以备留给补充稀释好的药物用,将融化并冷却至 50~55 ℃ 的定量沙保弱琼脂培养基与浓度为 18.2 μg/mL 黄芩苷元药物按比例配置(药物以 0.5 mL 开始,每次逐增 0.05 mL 至 0.9 mL;沙保弱琼脂以 9.5 mL 开始,每次递减 0.05 mL 至 9.1 mL),充分混匀,倾注成平板,即为含有药物浓度递增的培养基。放在塑料袋内密封,4~8 ℃ 中保存。同时制备含有甲醇的空白对照平板(甲醇以 0.5 mL 开始,每次逐增 0.05 mL 至 0.9 mL;沙保弱琼脂以 9.5 mL 开始,每次递减 0.05 mL 至 9.1 mL)。

1.4 结果判断标准 接种幼龄菌于该培养基上,经培养 24、48、72 h 后观察被检菌的生长情况,抑制真菌生长的最低药物浓度为该菌最低抑菌浓度(MIC)。

2 结 果

2.1 药物用量 在深部感染假丝酵母菌中,黄芩苷元对白色假丝酵母菌抑菌效果最好,药物用量 0.50~0.55 mL;光滑假丝酵母菌次之,药物用量 0.55~0.60 mL;热带假丝酵母菌和葡萄牙假丝酵母菌较差,药物用量 0.60~0.65 mL;克柔假丝酵母菌和丛生丝孢假丝酵母菌最差,药物用量 0.75~0.80 mL。

2.2 黄芩苷元 MIC 检测结果 白色假丝酵母菌 0.956 μg/mL,光滑假丝酵母菌 1.047 μg/mL,热带假丝酵母菌和葡萄牙假丝酵母菌 1.138 μg/mL,克柔假丝酵母菌和丛生丝孢假丝酵母菌 1.411 μg/mL;标准菌株 MIC 为 0.956 μg/mL。

3 讨 论

假丝酵母菌在自然界广泛分布^[2]。在医院假丝酵母菌菌血症的病死率高达 40%~80%,深部白色假丝酵母菌感染病死率为 68.9%^[3-4]。本研究选用了从临床深部感染标本中分离的 134 株假丝酵母菌,其中白色假丝酵母菌 69 株(51.5%),克柔假丝酵母菌 20 株(14.9%),光滑假丝酵母菌 16 株(11.9%),热带假丝酵母菌 11 株(8.2%),丛生丝孢假丝酵母菌 10 株(7.5%),葡萄牙假丝酵母菌 8 株(6.0%),采用 MIC 的实验方法进行了体外抑菌观察,目的是观察单味中药黄芩中有效成分黄芩苷元对假丝酵母菌的抑制效果。

大量文献报道黄芩中有效活性成分是黄酮类化合物,其中抗假丝酵母菌的有效活性成分是黄芩苷元,体外抗菌实验已经证明黄芩苷元对皮肤感染假丝酵母菌有很好的抑制作用,另外黄芩苷元对人大肠癌细胞 WiDr 的增殖有抑制作用,能选择性

诱导人白血病 K562 细胞凋亡^[5-9];黄芩苷元对大鼠心肌缺血再灌注损伤、对小鼠四氯化碳肝损伤和对大鼠角叉菜胶所致炎症反应均有保护作用,且评价了浓度为 1 μg/mL 的黄芩甲醇提取物以及黄芩苷、黄芩苷元和汉黄芩素无细胞毒性^[10-12]。

本研究选用了深部感染酵母样病原菌菌株 134 株,用 MIC 方法对黄芩苷元体外抑菌进行了试验观察,发现黄芩苷元对白色假丝酵母菌抑菌效果最好,证明黄芩中的黄芩苷元对深部感染假丝酵母菌在体外有较强的抑制作用,为临床找到无不良反应的抗真菌药物提供依据及思路。

参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:905-906.
- [2] 王小丽,况花荣,钟有添,等.黄芩不同提取物对两种深部真菌的体外抑菌效果比较[J].赣南医学院学报,2010,30(4):507-508.
- [3] 吴绍熙,郭宁如.中国的机会性真菌感染[J].中国人兽共患病杂志,2005,21(9):812-815.
- [4] 秦启贤.临床真菌学[M].上海:复旦大学出版社,2001:58-59.
- [5] 谢小梅,许杨.抗真菌中药的作用机理研究进展[J].中国中药杂志,2004,29(3):200-201.
- [6] 张曦,李宏,侯茂君,等.黄芩及其有效成分的药理学研究进展[J].天津药学,2000,12(4):8-10.
- [7] 杨得坡,胡海燕,黄世亮,等.黄芩甙元和黄芩甙对皮肤真菌与细菌抑制作用的研究[J].中药材,2000,23(5):272-274.
- [8] 西井奈绪美.198 黄芩苷元对人大肠癌细胞 WiDr 的作用[J].国外医学:中医中药分册,2004,26(3):185.
- [9] 董庆华,郑树,徐荣臻,等.黄芩苷元选择性诱导人白血病 K562 细胞凋亡[J].药学报,2003,38(11):817-820.
- [10] 黄贤华,贺方兴,郑建锋,等.黄芩苷元对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2008,24(5):20-22.
- [11] 刘建新,谢水祥,周俐,等.黄芩苷元对小鼠四氯化碳肝损伤的保护作用[J].时珍国医国药,2007,18(4):798-799.
- [12] 刘建新,何珏,周俐,等.黄芩苷元对大鼠角叉菜胶所致炎症反应的影响[J].中药药理与临床,2008,24(5):26-27.

(收稿日期:2012-12-18)

(上接第 779 页)

参考文献

- [1] 曹泽毅.中华妇产科学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2004:2602-2603.
- [2] 浦天益,浦文英.不孕不育患者抗精子抗体和抗子宫内膜抗体检测分析[J].中国优生与遗传杂志,2001,9(1):106-105.
- [3] 陈桂冰,黄绍坤,赵香生,等.免疫不孕患者自身抗体检测结果分析[J].职业与健康,2008,24(16):1725-1726.
- [4] 王金锋,王巧莲.免疫性抗体在不孕不育妇女诊治中的作用[J].中国优生与遗传杂志,2009,17(1):96.
- [5] 陈家坚,项有科,姜邦蓉,等.血清抗精子抗体亚型分析及精液有关参数的临床研究[J].白求恩医学院学报,2003,1(4):209-

210.

- [6] 王晓威,张利.抗精子抗体的研究进展[J].中国性科学,2012,,2(7):14-15.
- [7] 王启凤,谢晓东,江平.不孕不育患者的抗精子抗体分析[J].中国优生与遗传杂志,2006,14(6):110.
- [8] 杨丹彤,贾颐舫,邱毅,等.7410 例不孕不育患者血清抗精子抗体检测分析[J].检验医学与临床,2011,8(4):441-442.
- [9] 李兰元,姜之春,翟春玺.检验医学与临床[M].山东:济南出版社,2002:312.
- [10] 王一飞.生殖医学[M].北京:人民卫生出版社,2002:94-106.

(收稿日期:2012-11-07)