

DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-9638. 2013. 05. 001

• 论 著 •

20 种清热解毒中草药体外抗金黄色葡萄球菌活性筛选

王 锋^{1,2}, 左国营¹, 韩 峻³, 王根春¹

(1 解放军昆明总医院植化中心, 云南 昆明 650032; 2 云南中医学院研究生处, 云南 昆明 650500; 3 云南中医学院基础医学院, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 测定 20 种清热解毒中草药的 80% 乙醇提取物体外对标准金黄色葡萄球菌(SA)和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的抗菌活性, 筛选出抑菌效果好的药材。**方法** 制备 20 种云南中草药乙醇提取物, 采用常规琼脂扩散法对 SA 及临床分离的 MRSA 菌株(MRSA 82、MRSA 92、MRSA 111、MRSA 135、MRSA 144)进行体外抑菌试验, 倍比稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。**结果** 20 种中草药乙醇提取物的提取率为 5.33%~15.89%, 其中红花提取率(15.89%)最高, 龙葵(12.64%)次之, 菟丝子(5.33%)最低。初筛结果显示, 16 种中草药对 SA 及其耐药菌呈现不同程度的抑制作用, 高度敏感(抑菌圈直径 ≥ 16 mm)的中草药 4 种(十大功劳、夏枯草、香薷草、老鹳草); 中度敏感(抑菌圈直径 > 10 mm, < 16 mm)的中草药 9 种(马鞭草、翻白草、酢浆草、一枝黄花、紫花地丁、茵陈、车前草、金钱草、绣球防风); 轻度敏感(抑菌圈直径 ≤ 10 mm)的中草药 3 种(白头翁、凌霄花、韭菜籽)。多数中草药对耐药菌的抑菌圈大于对标准菌的抑菌圈。13 种抑菌活性较好(中、高度敏感)的中草药提取物, 对标准菌和耐药菌的 MIC 为 64~1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MBC 为 128~2 048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。**结论** 十大功劳、夏枯草、香薷草及老鹳草具有较强的抗金黄色葡萄球菌活性, 且对 MRSA 也有较好的抑制作用。

[关键词] 中草药; 清热解毒; 金黄色葡萄球菌; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 抗菌活性; 最低抑菌浓度; 最低杀菌浓度

[中图分类号] R285.5 R378.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2013)05-0321-05

In vitro screen of anti-*Staphylococcus aureus* activity of 20 kinds of heat-clearing and toxicity-removing Chinese herbal medicines

WANG Feng^{1,2}, ZUO Guo-ying¹, HAN Jun³, WANG Gen-chun¹ (1 Research Center for Natural Medicines, Kunming General Hospital, PLA, Kunming 650032, China; 2 Graduate School, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 3 School of Basic Medical Sciences, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective** To determine antimicrobial activity of 80% ethanol extracts of 20 kinds of heat-clearing and toxicity-removing Chinese herbal medicines (CHM) against *Staphylococcus aureus* (SA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), so as to screen medicines with strong bacterial inhibition. **Methods** Ethanol extracts of 20 kinds of CHM were prepared, in vitro antimicrobial activity against SA and MRSA (MRSA 82, MRSA 92, MRSA 111, MRSA 135, and MRSA 144) were determined by agar-diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by double-dilution method. **Results** The extraction rate of ethanol extracts of 20 kinds of CHM ranged 5.33% - 15.89%, *Flos Carthami* had the highest extraction rate (15.89%), followed by *Solanum nigrum* (12.64%), *Cuscuta chinensis* Lam had the lowest extraction rate (5.33%), 16 kinds of ethanol extracts showed different inhibitory effect on SA and MRSA, 4 kinds of extracts had high antimicrobial activity (inhibition zone diameter [IZD] ≥ 16 mm, including *Mahonia bealei*

[收稿日期] 2012-12-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(NSFC 81073126)

[作者简介] 王锋(1987-),男(汉族),在读硕士,陕西省渭南人,主要从事中药化学研究。

[通讯作者] 左国营 E-mail: zuoguoying@263.net

[Fort.], *Prunella vulgaris*, *Herba moslae*, and *Geranium wilfordii* Maxim), 9 extracts had moderate antimicrobial activity (IZD [>10 mm, <16 mm]), including *Herba Verbenae*, *Potentilla discolor*, *Oxanlis corniculata* L., *Solidago decurrens* Lour, *Viola philippica* Car, *Herba artemisiae Scopariae*, *Plantago asiatica* L. & *Plantago depressa* Willd, *Lysima chiachristinae* Hance, and *Leucas ciliata* Benth), 3 extracts had low antimicrobial activity (IZD ≤ 10 mm, including *Pulsatilla chinensis* [Bunge] Regel, *Campsis grandiflora*, and *Allium tuberosum* Rottler). IZD of most extracts for MRSA were larger than that of standard strain. MIC and MBC of 13 kinds of extracts with better antimicrobial activity against standard and drug-resistant strains were $64 - 1\ 024\ \mu\text{g}/\text{mL}$ and $128 - 2\ 048\ \mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. **Conclusion** Ethanol extracts of *Mahonia bealei* (Fort.), *Prunella vulgaris*, *Herba moslae*, and *Geranium wilfordii* Maxim have strong antimicrobial activity against MRSA.

[Key words] Chinese herbal medicine; heat-clearing and toxicity-removing; *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; antimicrobial activity; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration

[Chin Infect Control, 2013, 12(5): 321 - 325]

由于抗菌药物的不合理使用,近年来病原菌耐药情况日趋严重。常用抗菌药物对耐药菌作用渐弱,而新的化学合成药物的开发难度大、周期长。本研究选取 20 种中国西南产具有清热解毒等功效的中草药^[1],将其 80%乙醇提取物对金黄色葡萄球菌的活性进行筛选,以期发现具有良好抗菌活性的中草药,为新的临床药物研发提供线索。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 标准菌株:金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) ATCC 25923, 购自中国药品生物制品检定所。耐药菌株:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA, MRSA 82, MRSA 92, MRSA 111, MRSA 135, MRSA 144), 由成都军区昆明总医院提供。耐药菌的药敏测试采用头孢西丁纸片法^[2]。

1.2 检测药物 中草药包括:马鞭草 (*Herba Verbenae*)、白头翁 [*Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel]、翻白草 (*Potentilla discolor*)、凌霄花 (*Campsis grandiflora*)、十大功劳 [*Mahonia bealei* (Fort.)]、酢浆草 (*Oxanlis corniculata* L.)、蒲公英 (*Herba Taraxaci*)、一枝黄花 (*Solidago decurrens* Lour)、韭菜籽 (*Allium tuberosum* Rottler)、龙葵 (*Solanum nigrum*)、紫花地丁 (*Viola philippica* Car)、茵陈 (*Herba artemisiae Scopariae*)、红花 (*Flos Carthami*)、车前草 (*Plantago asiatica* L. & *Plantago depressa* Willd)、金钱草 (*Lysima chiachristinae* Hance)、绣球防风 (*Leucas ciliata* Benth)、夏枯草 (*Prunella vulgaris*)、菟丝子 (*Cuscuta chinensis* Lam)、香薷草 (*Herba moslae*)、老鹳草 (*Geranium wilfordii* Maxim)。所有药物均购自云南省昆明市菊花园中药市场。

1.3 试剂与仪器 包括 100%二甲基亚砷(国药集团化学试剂有限公司产品,批号 200911261)、乙醇(湖南尔康制药股份有限公司产品,批号 201000506)、甲醇(云南省昆明福海达玻璃化工厂产品,批号 20120622)、BU-CHIWFH-203 减压旋转蒸发器 (Büchi Labortechnik AG 公司产品,瑞士)、SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司产品)、BP1215 型电子天平 (Sartorius 公司产品,德国)、IV 型微量加样器(上海求精生化仪器有限公司产品)、PYX-PHS-4050 搁水式电热恒温箱(上海市跃进医疗器械一厂产品)、微生物培养皿和 96 孔板。M-H 琼脂培养基(杭州天河微生物试剂有限公司产品,批号 111018)、M-H 肉汤(杭州天河微生物试剂有限公司产品,批号 111128)用于抗金黄色葡萄球菌试验。

1.4 方 法

1.4.1 醇提取物的制备 将 20 种中草药粉碎,各称取 50 g,用 300 mL 80%的乙醇浸泡 3 次,第 1 次浸泡 7 d,第 2、3 次浸泡 3~4 d,过滤合并滤液,并用旋转蒸发器减压于 40℃以下回收至干燥,用结晶刀转移至无菌空安瓿瓶中。所得醇提物在通风橱中将其含有的乙醇挥发尽,避免对抑菌试验产生干扰,然后冷藏备用^[3]。

1.4.2 药液制备 初筛:取 20 种提取物各 50 mg,置于 1.5 mL 离心管中,用微量加样器加 1 000 μL 二甲基亚砷溶解样品,配制成浓度为 50 mg/mL 的溶液作初筛。取 20 种提取物中抑菌圈稍小 (>10 mm, <16 mm) 的 8.2 mg,抑菌圈稍大 (≥ 16 mm) 的 4.1 mg,置于 1.5 mL 离心管中,微量加样器加入 M-H 肉汤培养基 1 000 μL (含 30%二甲基亚砷助溶剂)溶解样品,分别配制成浓度为 8.2 和 4.1 mg/

mL 的溶液,用于测定最低抑菌浓度(MIC)。

1.4.3 菌液的制备 将菌株接种至普通琼脂平板上,置于 37℃ 恒温箱中培养 24 h,用接种环把菌株转移至已高温高压灭菌的干燥试管中,用无菌生理盐水配制成浓度为 1.5×10^8 CFU/mL 的菌液用于初筛,再将菌液稀释成 1.0×10^6 CFU/mL 测定 MIC^[4]。

1.4.4 抑菌试验

1.4.4.1 初筛(测定抑菌圈) 采用琼脂扩散法^[5]。用无菌棉签把标准菌(浓度为 1.5×10^8 CFU/mL)均匀涂布于培养基上,然后用直径为 6 mm 的无菌圆形玻璃管打孔,将各提取物浓度为 50 mg/mL 的药液用微量加样器取出 50 μ L 加入孔中,不得溢出^[6]。二甲基亚砷作为空白对照。再将培养皿置于 37℃ 恒温箱中培养 24 h,取出观察,用卡尺测量抑菌圈直径。

1.4.4.2 测定 MIC/最低杀菌浓度(MBC) 选择对标准菌抑菌圈直径 ≥ 10 mm 的提取物,进一步采用微量稀释法测定其 MIC。试验在 96 孔板中进行,每个菌的各稀释浓度在同一块 96 孔板上设 3 个平行组,细菌浓度为 5×10^5 CFU/mL,样品浓度为 8.2 和 4.1 mg/mL。空白对照孔内只加入肉汤培养基,阳性对照孔内加入肉汤培养基和细菌。加样后于 37℃ 恒温箱中培养 24 h, MIC 为肉眼看不到细菌生长的对应的最低浓度。将无细菌生长的培养基涂在普通琼脂平板上继续培养 24 h,在琼脂板上没有细菌生长的平板对应的最低浓度为 MBC^[7]。

2 结果

2.1 耐药菌株的药敏结果 见表 1。

表 1 耐药菌株对抗菌药物的药敏结果

Table 1 Antimicrobial susceptibility test result of drug-resistant bacteria

Strain	Resistant	Intermediate	Sensitive
MRSA 82	ampicillin, clindamycin, rifampicin, cefazolin, ciprofloxacin, levofloxacin, ceftazidime	fosfomycin	linezolid, vancomycin
MRSA 92	azithromycin, oxacillin, ampicillin, cefoxitin, clindamycin, clarithromycin, levofloxacin	-	compound sulfamethoxazole, rifampicin, piperacillin/sulbactam, vancomycin, gatifloxacin, fosfomycin
MRSA 111	penicillin, oxacillin, cefuroxime, cefazolin, levofloxacin, erythromycin, piperacillin / tazobactam	-	vancomycin, linezolid
MRSA 135	penicillin, oxacillin, ampicillin, azithromycin, cefazolin, cefathiamidine, cefuroxime	-	vancomycin, fosfomycin, linezolid
MRSA 144	penicillin, ampicillin, oxacillin, cefoxitin, cefuroxime, cefazolin, azithromycin, rifampicin, clindamycin, clarithromycin	-	vancomycin, fosfomycin

2.2 初筛结果 20 种中草药醇提取物的提取率为 5.33%~15.89%,其中红花提取率(15.89%)最高,龙葵(12.64%)次之,菟丝子(5.33%)最低。20 种中草药提取物初筛结果(抑菌圈)显示,16 种中草药

对标准金黄色葡萄球菌及其耐药菌呈现不同程度抑制作用:根据药理学试验方法,高度敏感 4 种,中度敏感 9 种,轻度敏感 3 种。多数中草药对耐药菌的抑菌圈大于对标准菌的抑菌圈。见表 2。

表 2 20 种中草药提取物初筛结果(mm)

Table 2 Initial screen result of extracts of 20 kinds of Chinese herbal medicines (mm)

Code	Name of specimen (Concentration 50 mg/mL)	Inhibition zone					
		SA	MRSA 82	MRSA 92	MRSA 111	MRSA 135	MRSA 144
1	Herba Verbenae	7	11	10	10	10	7
2	Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel	-	-	-	7	7	-
3	Potentilla discolor	15	14	14	13	14	14
4	Campsis grandiflora	-	10	-	-	-	-
5	Mahonia bealei(Fort.)	17	20	20	19	17	17
6	Oxanlis corniculata L.	-	12	12	10	10	9
7	Herba Taraxaci	-	-	-	-	-	-
8	Solidago decurrens Lour	11	10	-	11	12	10
9	Allium tuberosum Rottler	-	-	-	-	7	-

续表 2 (Table 2, continued)

Code	Name of specimen (Concentration 50 mg/mL)	Inhibition zone					
		SA	MRSA 82	MRSA 92	MRSA 111	MRSA 135	MRSA 144
10	<i>Solanum nigrum</i>	-	-	-	-	-	-
11	<i>Viola philippica</i> Car	11	11	-	10	10	10
12	<i>Herba artemisiae Scopariae</i>	7	10	10	10	11	8
13	<i>Flos Carthami</i>	-	-	-	-	-	-
14	<i>Plantago asiatica</i> L.& <i>Plantago depressa</i> Willd	13	11	13	13	15	15
15	<i>Lysima chiachristinae</i> Hance	12	12	10	11	10	11
16	<i>Leucas ciliata</i> Benth	11	12	12	12	13	15
17	<i>Prunella vulgaris</i>	12	12	17	15	12	15
18	<i>Cuscuta chinensis</i> Lam	-	-	-	-	-	-
19	<i>Herba moslae</i>	16	15	15	14	13	15
20	<i>Geranium wilfordii</i> Maxim	14	12	13	15	16	18

- :No activity

2.3 测定 MIC 选择初筛时,对标准金黄色葡萄球菌及其耐药菌中、高度敏感的植物提取物(抑菌圈 >10 mm 的提取物),测定其对标准菌和耐药菌的

MIC 和 MBC。13 种抑菌活性较好药物的 MIC 为 64~1 024 $\mu\text{g/mL}$,MBC 为 128~2 048 $\mu\text{g/mL}$ 。见表 3~4。

表 3 中度敏感中草药提取物对标准菌和耐药菌的 MIC/MBC($\mu\text{g/mL}$)

Table 3 MIC/MBC of moderate sensitive Chinese herbal medicines to standard and drug-resistant strains($\mu\text{g/mL}$)

Code/Name of specimen	MIC/MBC	SA	MRSA 82	MRSA 92	MRSA 111	MRSA 135	MRSA 144
1/Herba Verbenae	MIC	512	1 024	512	1 024	1 024	512
	MBC	1 024	1 024	2 018	1 024	2 048	1 024
3/Potentilla discolor	MIC	256	512	512	512	512	512
	MBC	256	512	512	256	512	256
6/Oxanlis corniculata L.	MIC	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024
	MBC	2 048	2 048	2 048	2 048	2 048	2 048
8/Solidago decurrens Lour	MIC	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024
	MBC	1 024	2 048	2 048	2 048	2 048	2 048
11/ <i>Viola philippica</i> Car	MIC	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024
	MBC	2 048	1 024	2 048	2 048	2 048	2 048
12/Herba artemisiae Scopariae	MIC	512	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024
	MBC	1 024	2 048	2 048	1 024	2 048	2 048
14/ <i>Plantago asiatica</i> L.& <i>Plantago depressa</i> Willd	MIC	512	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024
	MBC	1 024	2 048	1 024	2 048	2 048	2 048
15/ <i>Lysima chiachristinae</i> Hance	MIC	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024	1 024
	MBC	2 048	2 048	2 048	2 048	2 048	2 048
16/ <i>Leucas ciliata</i> Benth	MIC	128	256	256	256	512	512
	MBC	256	256	256	256	256	256

Concentration of above specimens were 8.2 mg/mL

表 4 高度敏感中草药提取物对标准菌和耐药菌的 MIC/MBC($\mu\text{g/mL}$)

Table 4 MIC/MBC of high sensitive Chinese herbal medicines to standard and drug-resistant strains($\mu\text{g/mL}$)

Code/Name of specimen	MIC/MBC	SA	MRSA 82	MRSA 92	MRSA 111	MRSA 135	MRSA 144
5/ <i>Mahonia bealei</i> (Fort.)	MIC	64	128	128	128	128	128
	MBC	128	256	256	256	128	256
17/ <i>Prunella vulgaris</i>	MIC	256	512	256	256	512	256
	MBC	512	1 024	512	512	512	1 024
19/ <i>Herba moslae</i>	MIC	256	512	256	256	512	256
	MBC	512	1 024	1 024	512	1 024	512
20/ <i>Geranium wilfordii</i> Maxim	MIC	512	1 024	1 024	1 024	512	1 024
	MBC	1 024	2 048	2 048	2 048	2 048	2 048

Concentration of above specimens were 4.1 mg/mL

3 讨论

万古霉素是目前控制 MRSA 感染首选的抗菌药物。万古霉素的耐药性及其自身的毒副作用,都限制了其在临床的作用。中草药因毒副作用和耐药性较低,为国内外研究者所重视。国内对中草药抗菌效果已有一些报道^[8-11],但仍有大量中草药未见相关研究或研究不够深入。

金黄色葡萄球菌感染中毒症状严重,主要表现为呕吐、发热、腹泻。呕吐常在发热前出现,发热常较高。传统中医认为在一定程度归属于热症,依据“热者寒之”之治病理念,应选取清热解毒药对症治疗。本研究结果表明,20 种清热解毒药初筛时,16 种对 SA 及其耐药菌株有不同的抑菌活性,4 种完全无效果,说明清热解毒药具有较好的抗菌效果,可基于清热解毒药进行优选具抗金黄色葡萄球菌活性的中草药;但由于有药物没有活性或者活性低下,故不能简单地给清热解毒药和抗金黄色葡萄球菌药划等号。对标准菌有抑制作用的中草药提取物,当作用于耐药菌时抑菌活性变化,这可能是由于中草药所含成分复杂,对标准菌和耐药细菌抗菌机制有所不同所致。

未见相关抗菌报道的中草药有翻白草、绣球防风,故本研究为首次报道翻白草和绣球防风的抗菌活性;报道较少或者研究不够深入的有十大功劳、菟丝子、白头翁、凌霄花、老鹳草、金钱草、茵陈、紫花地丁、酢浆草、红花,均有待进一步研究。本研究首次报道翻白草和绣球防风的抗菌活性;共测试了 20 种植物提取物的体外抗菌活性,发现十大功劳抗金黄色葡萄球菌和抗 MRSA 活性较佳。关于十大功劳药理活性研究,涉及抗菌活性部分中仅见王筠默^[12]的综述,Cernakova 等^[13]和 Slobodníková 等^[14]分别提及十大功劳属有抗菌作用的成分为小檗碱、药根碱。综合十大功劳化合物成分众多,具体抗菌成分尚有分离的必要;翻白草未见其成分的相关报道,可作进一步的分离,以确定这两者活性单体及作用机制。

目前抗菌药物的滥用使很多微生物产生耐药性,给临床治疗造成一定的困扰,本研究为发现新的抗菌成分提供了线索。

[参 考 文 献]

- [1] 刘毅,陈曦之. 云南中草药单验方荟萃[M]. 昆明: 云南科学技术出版社,2007:4-150.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests [M]. Approved standard, 9th ed. Document M2-A9. Wayne,PA:CLSI, 2006.
- [3] Zuo G Y, Wang G C, Zhao Y B, *et al.* Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *J Ethnopharmacol*,2008,120(2):287-290.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修,等. 药理实验方法学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社,1982:1067-1071.
- [5] 左国营,余巍,徐贵丽,等. 18 种中草药提取物抗金葡萄菌作用的筛选研究[J]. *中国药师*,2005,8(7):606-608.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Seventeenth informational supplement[S]. M100-S17. Wayne,PA:CLSI,2007.
- [7] Zuo G Y, Meng F Y, Hao X Y, *et al.* Antibacterial Alkaloids from *Chelidonium majus* Linn (Papaveraceae) against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Pharm Pharmaceut Sci*,2008,11(4):90-94.
- [8] 王航,孟春,石贤爱,等. 抗菌中草药的筛选及其有效成分的分离提取和初步鉴定[J]. *中国药业*,2006,15(20):15-16.
- [9] 朱明,熊元君,马秀敏,等. 毛金丝桃提取物的体外抗菌实验[J]. *时珍国医国药*,2006,17(9):1693-1694.
- [10] 张显忠,郭爱军,李艳玲,等. 中草药提取物的体外抑菌活性研究[J]. *中华医院感染学杂志*,2006,16(5):563-565.
- [11] 董燕,王仙园,周红,等. 中草药对 MRSA 临床株的抑菌作用研究[J]. *护理研究(上旬版)*,2008,22(4):863-865.
- [12] 王筠默. 中药十大功劳的研究[J]. *中医药研究*,2002,18(5):45.
- [13] Cernakova M, Kostalove D. Antimicrobial activity of berberine constituent of *Mahonia aquifolium*[J]. *Folia Microbiologica*, 2002,47(4):375-378.
- [14] Slobodníková L, Košťálová D, Labudová D, *et al.* Antimicrobial activity of *Mahonia aquifolium* crude extract and its major isolated alkaloids[J]. *Phytotherapy Research*,2004,18(8):674-676.