

多味中药的抑菌效果研究



李佳丹[#], 廖琦[#], 赵浪, 孙嘉良, 胡海峰, 吴培福^{*}

西南林业大学生命科学学院, 云南昆明 650224

摘要: 目的: 提取枳壳、白头翁、五味子、地榆、黄芩、诃子、大黄、石榴皮、乌梅、黄柏和黄连的有效成分, 检测这些中药对产色葡萄球菌、木糖葡萄球菌、伪中间葡萄球菌、雷金斯堡约克氏菌、嗜水气单胞菌和肺炎克雷伯氏菌的体外最小抑菌浓度, 为中药在临床治疗中的应用和开发奠定理论基础。方法: 采用醇提法提取中药有效成分, 利用试管二倍稀释法测定单味中药的最小抑菌浓度。结果: 五味子、石榴皮、乌梅和诃子对木糖葡萄球菌有最显著的抑菌效果(MIC 均为 62.50 mg/mL); 五味子对产色葡萄球菌的抑菌效果最显著(MIC 为 31.25 mg/mL); 五味子、石榴皮和诃子对伪中间葡萄球菌的抑菌效果最显著(MIC 均为 31.25 mg/mL); 五味子、地榆、诃子、大黄、乌梅和黄连对雷金斯堡约克氏菌的抑菌效果最显著(MIC 均为 15.60 mg/mL); 地榆对嗜水气单胞菌的抑菌效果最显著(MIC 为 1.95 mg/mL); 乌梅对肺炎克雷伯氏菌抑菌效果最显著(MIC 为 0.98 mg/mL)。结论: 五味子、乌梅和诃子等具有较好的抑菌效果, 可为这些中药的临床应用提供依据。

关键词: 中药; 菌株; 最小抑菌浓度; 抑菌效果

DOI: [10.57237/j.life.2022.01.004](https://doi.org/10.57237/j.life.2022.01.004)

The Study on the Antibacterial Effects of Several Traditional Chinese Medicines

Jiadanyang Li[#], Qi Liao[#], Lang Zhao, Jialiang Sun, Haifeng Hu, Peifu Wu^{*}

College of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: Objective: The effective components of *Fructus Aurantii*, *Pulsatilla chinensis*, *Schisandra chinensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Scutellaria baicalensis*, *Terminalia chebula*, *Rheum officinale*, *Punica granatum*, *Fructus Mume*, *Cortex Phellodendri* and *Coptis chinensis* were extracted, and the minimum inhibitory concentrations of components from these Traditional Chinese Medicines were analyzed in vitro against *Staphylococcus chromogenes*, *S. xylosus*, *S. pseudintermedius*, *Yokenella regensburgei*, *Aeromonas hydrophila* and *Klebsiella pneumoniae*, so as to lay a theoretical foundation for the application and development of Traditional Chinese Medicine in clinical treatment. Methods: The effective components of Traditional Chinese Medicines were extracted by alcohol extraction, and the minimal inhibitory concentration of single Traditional Chinese Medicine was determined by tube dilution method. Results: *S. chinensis*, *P. granatum*, *F. Mume* and *T. chebula* showed the most significant bacteriostatic effects on *S. xylosus* (MICs were all 62.50 mg/mL); *S. chinensis* presented the most significant antibacterial effect on *S. chromogenes* (MIC was 31.25 mg/mL); *S. chinensis*, *P. granatum* and *T. chebula* had the most significant bacteriostatic effects on *S. pseudointermedia* (MICs were

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2022J0505).

*通信作者: 吴培福, jed-wu2008@126.com

[#]李佳丹和廖琦为共同一作

收稿日期: 2022-12-08; 接受日期: 2023-03-07; 在线出版日期: 2023-03-28

<http://www.lifescitech.org>

all 31.25 mg/mL); *S. chinensis*, *S. officinalis*, *T. chebula*, *R. officinale*, *F. Mume* and *C. chinensis* had the most significant bacteriostatic effects on *Y. regensburgi* (MICs were all 15.60 mg/mL); The inhibitory effect of *S. officinalis* on *A. hydrophila* was the most significant (MIC was 1.95 mg/mL); *F. Mume* had the most significant antibacterial effect on *K. pneumoniae* (MIC was 0.98 mg/mL). Conclusion: *S. chinensis*, *F. mume* and *T. chebula* et al. have good antibacterial effects, thus providing basis for the clinical application of these Traditional Chinese Medicines.

Keywords: Traditional Chinese Medicine; Strains; Minimum Inhibitory Concentration; Antibacterial Effects

1 引言

抗生素的发现具有里程碑意义, 抗生素在人和动物临床疾病的防治过程中具有举足轻重的作用, 挽救了大量的人和动物的生命, 然而随着抗生素在人和动物临床及农业生产过程中的不断应用或不当使用, 细菌耐药性日益威胁着人和动物的健康, 使临床可选择的药物种类不断减少, 致使因抗生素耐药性引发的死亡率和治疗费用不断增加[1]。现有研究表明了抗生素使用和人类活动致使细菌耐药性的产生和传播。

Menc á-Ares 等[2]对源自 38 个农场的 105 份粪样、环境和污泥样品进行宏基因组, 进而评估了粗放式养猪体系与工业化集约化养猪体系中的耐药组情况, 发现集约化养殖场中耐药基因的丰度显著较高, 抗生素使用与某些类别抗生素耐药基因间存在联系。Munk 等[3]对来自九个欧洲国家的 181 个猪养殖场和 178 个家禽养殖场的获得性耐药基因库进行了定量分析, 发现获得性耐药基因的总水平与相应国家的抗菌药物总使用量有关, 且使用类似抗生素的国家间具有相似的耐药组。基于相关的研究材料不难发现细菌携带耐药基因的类型与抗生素的使用有明显的关联性。多重耐药菌或泛耐药菌的发现给全世界人类敲响了警钟。鉴于此, 国内外许多国家禁止在动物饲养中添加抗生素, 寻求抗生素替代品是当前刻不容缓的任务。

中草药作为我国的传承医药, 含有生物碱、黄酮、多糖、萜类、皂苷、香豆素、醌类、甾类、酯类、酚类、醛类、醇类和有机酸等化合物, 具有抗菌、增强免疫和抗肿瘤等作用, 因其价廉、无毒(或低毒)、不易产生耐药性和易获得等特征, 可作为抗生素的有效替代品[4]。为此, 本研究提取了枳壳、白头翁、五味子、地榆、黄芩、诃子、大黄、石榴皮、乌梅、黄柏和黄连的有效成分, 并测定了这些中药对产色葡萄球菌、木糖葡萄球菌、伪中间葡萄球菌、雷金斯堡约克氏菌、嗜水气单胞菌和肺炎克雷伯氏菌的体外最小抑菌浓度, 以期中药在临床治疗中的应用和开发奠定理论基础。

2 材料与方法

2.1 试验菌株

本研究所用的菌株均来自实验室保存的菌种, 包括产色葡萄球菌 (*Staphylococcus chromogenes*)、木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*)、伪中间葡萄球菌 (*Staphylococcus pseudintermedius*)、雷金斯堡约克氏菌 (*Yokenella regensburgi*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 和肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)。

2.2 研究所用中药

本研究所用的中药均购自昆明市盘龙区白龙寺社区卫生服务站, 包括枳壳 (*Fructus aurantii*)、白头翁 (*Pulsatilla chinensis*)、五味子 (*Schisandra chinensis*)、地榆 (*Sanguisorba officinalis*)、黄芩 (*Scutellaria baicalensis*)、诃子 (*Terminalia chebula*)、大黄 (*Rheum officinale*)、石榴皮 (*Punica granatum*)、乌梅 (*Fructus Mume*)、黄柏 (*Cortex Phellodendri*) 和黄连 (*Coptis Chinensis*)。

2.3 菌株 16S rDNA 测序鉴定

采用溶菌酶和蛋白酶 K 法提取细菌基因组 DNA, 基于 16S rDNA 扩增引物 27F 和 1492R 来扩增研究用菌株的 16S rDNA, 并将扩增产物送往铂尚生物技术(上海)有限公司进行 DNA 测序。利用 NCBI 数据库来比对测序结果, 根据同源性来进一步鉴定保存的菌株。

2.4 中药有效成分的提取

分别称取每种中药各 50g, 浸泡于 500mL 75%乙醇溶液中 12 h 以上, 而后用纱布过滤。在剩余的药渣中加入适量纯水, 温火熬煮 30min, 再用纱布进行过滤, 重复 2 次。合并醇提液与水提液, 在旋转蒸发仪上浓缩至 50 mL, 此时将中药提取液的浓度定义为 1g/mL。

将中药提取液 115 ℃ 高压灭菌 15min, 待冷却后保存于 4 ℃ 冰箱, 以备后期研究使用。

2.5 中药最小抑菌浓度的测定

采用试管二倍稀释法来测定不同中药的最小抑菌浓度, 即采用 10mL 试管和 MH 液体培养基将各中药的提取液分别配置成不同浓度梯度的药液, 最终每种中药提取液的梯度浓度为 1000mg/mL、500mg/mL、250mg/mL、125mg/mL、62.5mg/mL、31.25mg/mL、15.63mg/mL、7.81mg/mL、3.91mg/mL、1.95mg/mL 和 0mg/mL。每个试管中的药液量为 2mL。测定每株菌株的最小抑菌浓度时, 每种浓度梯度的中药提取液均取 3 个重复组。在每个试管中加入等体积的相应培养菌液 (菌液浓度为 5×10^5 CFU/mL), 混匀后置于 37 ℃ 恒温培养箱培养 16h。此时, 培养液中药物的实际工作浓度分别为 500mg/mL、250mg/mL、125mg/mL、62.5mg/mL、31.25mg/mL、15.63mg/mL、7.81mg/mL、3.91mg/mL、1.95mg/mL、0.98mg/mL 和 0mg/mL。本研究中, 最小抑菌浓度是指抑制细菌增殖的最小药物稀释浓度。

3 结果

3.1 保存菌种的 16S rDNA 测序鉴定

基于测序比对发现木糖葡萄球菌 16S rDNA 的序列与 NCBI 数据库中木糖葡萄球菌 16S rDNA 序列的相似度为 100%; 产色葡萄球菌和伪中间葡萄球菌 16S rDNA 的序列与 NCBI 数据库中相应菌种 16S rDNA 序列的相似度均为 99%; 嗜水气单胞菌 16S rDNA 的序列与 NCBI 数据库中嗜水气单胞菌 16S rDNA 序列的相似度为 100%; 雷金斯堡约克氏菌和肺炎克雷伯氏菌与 NCBI 数据库中相应菌种 16S rDNA 序列的相似度均为 99%。由此可见, 本研究所用菌种的 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库中相应菌株的 16S rDNA 均具有很高的相

似性, 可确定所用菌株的鉴定准确性。

3.2 单味中药对 6 株菌株的抑制效果

每种中药对 6 株菌株的抑菌效果见表 1 和图 1。由表中可以看出五味子、石榴皮、乌梅和诃子对木糖葡萄球菌抑菌效果最显著, MIC 均为 62.50mg/mL, 而枳壳、白头翁、黄芩和大黄对其抑菌效果最差, MIC 均为 250.00mg/mL; 五味子对产色葡萄球菌抑菌效果最显著, MIC 为 31.25mg/mL, 白头翁对其抑菌效果最差, MIC 为 500.00mg/mL; 五味子、石榴皮和诃子对伪中间葡萄球菌抑菌效果最显著, MIC 均为 31.25mg/mL, 白头翁对其抑菌效果最差, MIC 为 250.00mg/mL。

五味子、地榆、诃子、大黄、乌梅和黄连对雷金斯堡约克氏菌抑菌效果最显著, MIC 为 15.60mg/mL, 白头翁对其抑菌效果最差, MIC 为 62.50mg/mL; 地榆对嗜水气单胞菌抑菌效果最显著, MIC 为 1.95mg/mL, 白头翁和大黄对其抑菌效果最差, MIC 为 62.50mg/mL; 乌梅对肺炎克雷伯氏菌抑菌效果最显著, MIC 为 0.98mg/mL, 白头翁、大黄和地榆对其抑菌效果最差, MIC 为 62.50mg/mL。

由上述实验结果可知, 单味中药的确具有抑菌作用, 不同中药对不同细菌的抑菌效果存在差异, 同种中药对不同细菌的抑菌效果也存在差异。

对三种革兰氏阳性菌 (葡萄球菌) 来说, 五味子的抑菌效果最显著, 石榴皮和诃子的抑菌效果次之, 白头翁的抑菌效果最差。相对木糖葡萄球菌和产色葡萄球菌来说, 这 11 味中药对于伪中间葡萄球菌的抑菌效果最好。

对于三种革兰氏阴性菌而言, 白头翁对三种菌株的抑菌效果都不显著, 黄柏和枳壳的抑菌效果相近, 五味子和黄连的抑菌效果相近; 而肺炎克雷伯氏菌对乌梅的敏感性最强, 嗜水气单胞菌对地榆的敏感性次之。

表 1 不同中药对 6 株菌株的最小抑菌浓度

Table 1 Minimum inhibitory concentrations of different Traditional Chinese Medicines against 6 strains used in this study

中药名称	木糖葡萄球菌 (mg/mL)	产色葡萄球菌 (mg/mL)	伪中间葡萄球菌 (mg/mL)	雷金斯堡约克氏菌 (mg/mL)	嗜水气单胞菌 (mg/mL)	肺炎克雷伯氏菌 (mg/mL)
枳壳	250.00	125.00	125.00	31.25	31.25	31.25
白头翁	250.00	500.00	250.00	62.50	62.50	62.50
五味子	62.50	31.25	31.25	15.60	15.60	15.60
石榴皮	62.50	125.00	31.25	31.25	15.60	31.25
乌梅	62.50	125.00	62.50	15.60	31.25	0.98

中药名称	木糖葡萄球菌 (mg/mL)	产色葡萄球菌 (mg/mL)	伪中间葡萄球菌 (mg/mL)	雷金斯堡约克氏菌 (mg/mL)	嗜水气单胞菌 (mg/mL)	肺炎克雷伯氏菌 (mg/mL)
黄连	125.00	125.00	125.00	15.60	31.25	15.60
黄柏	125.00	125.00	62.50	31.25	31.25	31.25
地榆	125.00	250.00	125.00	15.60	1.95	62.50
黄芩	250.00	125.00	125.00	31.25	15.60	31.25
大黄	250.00	125.00	125.00	15.60	62.50	62.50
诃子	62.50	62.50	31.25	15.60	15.60	15.60

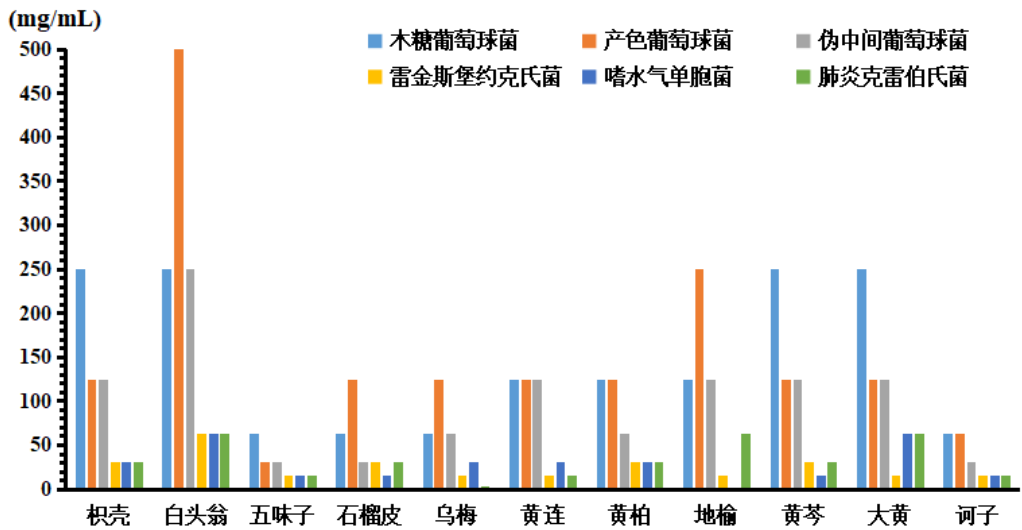


图 1 不同中药对 6 株菌株的最小抑菌浓度

Figure 1 Minimum inhibitory concentrations of different Traditional Chinese Medicines against 6 strains used in this study

4 讨论

抗生素耐药性是当前国际关注的热点问题。多年来的研究表明抗生素的使用与细菌耐药性的产生具有明显关联性[1-3]。临床分离株的研究发现，细菌的耐药性具有如下趋势[5-8]：耐药菌种的分离率不断增加；细菌耐药谱不断增宽，出现多重耐药菌株或泛耐药菌株；不同国家或地区流行的耐药表型或耐药基因型存在一定的差异，且可反映相应国家或地区的抗生素使用习惯。此外，研究还发现细菌耐药性可通过水平基因转移途径发生传播，其中，质粒、整合子、转座子等移动元件是耐药基因发生转移的主要介质[9-12]。鉴于此，国内外积极寻求抗生素的替代品，以应对因耐药性所致治疗率下降问题，或可选择药物量减少的问题。

大量研究表明中药具有抗菌、消炎、清热、解毒等功效，可用于临床疾病的治疗与预防。杨敦校等[13]研究了黄连、白头翁和黄芩等中药对致犊牛腹泻大肠杆菌的体外抑菌效果，结果表明黄芩和地榆对致犊牛腹泻大肠杆菌有一定的体外抑制作用，且具备一定的

临床应用潜力。胡安古丽·努尔别克等[14]研究发现骆驼蓬子、没食子、黄连和小檗实的醇提取物对致犊牛腹泻大肠杆菌的抑菌效果最明显。Nazir 的研究表明千叶蓍 (*Achillea millefolium*)、木棉 (*Bombax ceiba*)、除虫菊 (*Chrysanthemum cinerarifolium*)、神香草 (*Hyssopus officinalis*)、大马士革玫瑰 (*Rosa damascena* Miller)、药蒲公英 (*Taraxacum officinale* Weber) 和虾子花 (*Woodfordia fruticosa*) 具有很强的抗菌活性，可作为潜在的抗菌剂来治疗各种耐药性菌[15]。综上所述，中药有效成分对细菌有抑制或杀灭作用，可替代抗生素用于临床疾病的治疗和预防。本研究采用 11 味中药测定了这些中药对产色葡萄球菌、木糖葡萄球菌、伪中间葡萄球菌、雷金斯堡约克氏菌、嗜水气单胞菌和肺炎克雷伯氏菌的抑菌效果，发现不同的中药对同一菌株的抑菌效果存在差异，且同一中药对不同菌株的抑菌效果也存在差异。对比以往的报道，不同研究中同一种中药对同种菌株的最小抑菌浓度也存在差异，这可能与分离株的遗传背景、所选中药的来源、中药有效成分的提取方法和最小抑菌浓度测定方法等有关，其具体原因还有待进一步的研究。

5 结论

本研究表明,枳壳、白头翁、五味子、地榆、黄芩、诃子、大黄、石榴皮、乌梅、黄柏和黄连的有效提取成分对不同的分离菌株的确具有抑菌作用,但不同中药对不同菌或同种中药对不同菌的抑菌效果存在差异。其中,五味子、石榴皮、乌梅和诃子对木糖葡萄球菌抑菌效果最显著;五味子对产色葡萄球菌抑菌效果最显著;五味子、石榴皮和诃子对伪中间葡萄球菌抑菌效果最显著。五味子、地榆、诃子、大黄、乌梅和黄连对雷金斯堡约克氏菌抑菌效果最显著;地榆对嗜水气单胞菌抑菌效果最显著;乌梅对肺炎克雷伯氏菌抑菌效果最显著。研究结果为中药在临床上的应用奠定了理论基础,且不同感染中可考虑不同的中药制剂。

参考文献

- [1] Barbosa TM, Levy SB. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence [J]. *Drug Resist Updat*, 2000, 3 (5): 303-311. doi: 10.1054/drup.2000.0167.
- [2] Mencía-Ares O, Cabrera-Rubio R, Cobo-Díaz JF, *et al.* Antimicrobial use and production system shape the fecal, environmental, and slurry resistomes of pig farms [J]. *Microbiome*, 2020, 19; 8 (1): 164. doi: 10.1186/s40168-020-00941-7.
- [3] Munk P, Knudsen BE, Lukjancenko O, *et al.* Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries [J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3 (8): 898-908. doi: 10.1038/s41564-018-0192-9.
- [4] 王思思. 选择性抑菌中草药筛选及组方研究 [D]. 河北农业大学, 2012.
- [5] 刘琰, 徐小平. 产 ESBL 菌流行趋势及耐药趋势分析 [J]. *实用临床医学*, 2005, 6 (8): 12-14.
- [6] 卢携弟, 李敏, 钟金成. 2008—2013 年我院主要病原菌流行及耐药趋势调查分析 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2015, 6: 782-784.
- [7] 章琦, 李宝珍, 郑雪梅, 等. 2000—2020 年中国多重耐药菌研究热点的可视化分析 [J]. *中国全科医学*, 2022, 25 (24): 2960-2964.
- [8] Monticelli J, Bella SD, Giacobbe DR, *et al.* Trends in the Incidence and Antibiotic Resistance of Enterococcal Bloodstream Isolates: A 7-Year Retrospective Multicenter Epidemiological Study in Italy [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2021, 27 (4): 529-535.
- [9] 陈慧敏, 陶栓, 王方, 等. 细菌基因水平转移机制研究进展 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2022, 32 (14): 6.
- [10] 顾兵, 童明庆. 整合子与细菌耐药 [J]. *临床检验杂志*, 2005, 23 (3): 226-229.
- [11] 魏述永, 吴邓红, 刘世东. 细菌基因盒-整合子系统研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2008, 29 (1): 53-56.
- [12] 林习, 吕世明, 谭艾娟, 等. 大肠杆菌转座子及整合子携带类型与其多重耐药谱型相关性的研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47 (5): 1547-1559.
- [13] 杨敦校, 唐慕德, 和玉丹, 等. 中药对致犊牛腹泻大肠杆菌体外抑菌效果 [J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58 (2): 102.
- [14] 胡安古丽 努尔别克, 赛福丁 阿不拉, 那尔胡兰 再肯, 等. 11 种中药对致犊牛腹泻大肠杆菌的体外抑菌试验 [J]. *中国兽医杂志*, 2019, 55 (11): 108-111.
- [15] Nazir I. Antibacterial Activity of Medicinal Flowers against Multi Drug Resistant *E. coli* [J]. *Pakistan Veterinary Journal*, 2021, 41 (1): 166-168.