

线叶菊总黄酮抗菌性感染实验研究

杨丽敏¹, 马睿婷³, 乔俊缠^{2*}, 沈晓玲^{1*}

1. 内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古 呼和浩特 010059

2. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010059

3. 内蒙古精神卫生中心, 内蒙古 呼和浩特 010010

摘要:目的 探讨线叶菊总黄酮抗菌性感染的作用。方法 采用管碟法进行体外抑菌试验, 检测线叶菊总黄酮对临床常见致病细菌的抑菌效果; 采用耐青霉素金黄色葡萄球菌腹腔感染小鼠模型, 以保护率为指标, 观察线叶菊总黄酮的体内抗菌活性; 采用小鼠体内淋巴细胞转化实验及小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能实验, 检测线叶菊总黄酮对小鼠免疫功能的影响; 检测线叶菊总黄酮的急性毒性。结果 线叶菊总黄酮对多种实验菌均有抑制作用, 尤其对耐青霉素金黄色葡萄球菌有明显抑菌作用, 剂量为 442 mg/kg 时, 明显降低感染耐青霉素金黄色葡萄球菌小鼠的死亡率; 还可促进淋巴细胞的转化和增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。毒性实验未见小鼠死亡, 属实际无毒级。结论 线叶菊总黄酮毒性低, 体外对多种细菌有抑制作用, 且体内、外对耐青霉素金黄色葡萄球菌均有良好的抑菌作用, 并可提高小鼠的免疫功能。

关键词: 线叶菊总黄酮; 细菌感染; 抑菌试验; 耐青霉素金黄色葡萄球菌; 免疫功能

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2471-03

Inhibition of total flavonoids from *Filifolium sibiricum* on bacterial infection

YANG Li-min¹, MA Rui-ting³, QIAO Jun-chan², SHEN Xiao-ling¹

1. School of Basic Medical Sciences, Inner Mongolian Medical University, Hohhot 010059, China

2. Department of Pharmacy, Inner Mongolian Medical University, Hohhot 010059, China

3. Mental Health Center of Inner Mongolian, Hohhot 010010, China

Key words: total flavonoids from *Filifolium sibiricum* (L.) Kitam (TFFS); bacteria infections; bacteriostatic test; Penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; immunofunction

对耐抗生素细菌株的研究及开发新的抗菌药物, 已成为当今抗细菌感染药物研究的热点。中药以其剂型简便、效果良好、不良反应小等优势受到药物研究人员的关注和广大患者的青睐。但中药对一些耐药细菌株的研究还较少^[1]。

线叶菊 *Filifolium sibiricum* (L.) Kitam., 又名兔毛蒿, 是菊科线叶菊属植物, 主产于黑龙江、辽宁、吉林、内蒙古等地, 资源极为丰富, 全草入药, 临床上可治疗传染病高热、疮痍肿痛、血瘀刺痛等症, 其膏剂外敷治疗各种化脓性感染, 效果显著^[2-3]。从线叶菊中分离出的兔毛蒿素、北美圣草素和万寿菊黄素 3, 6-二甲醚 3 个黄酮类化合物, 均对几种革兰阳性菌有不同程度的抑制作用^[4], 有望成为研发新

抗菌药物的先导化合物。本实验进一步研究线叶菊总黄酮 (TFFS) 抗菌性感染的作用。

1 材料

1.1 药品及试剂

线叶菊总黄酮浸膏 (含总黄酮 80%), 由内蒙古医科大学药学院实验中心提供; 植物血凝素, 美国 Sigma 公司; 胃膜素, 重庆格瑞林药业有限公司; 姬姆萨染色液, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 菌种

大肠杆菌 (44101)、福氏志贺菌 (51285)、表皮葡萄球菌 (26101)、金黄色葡萄球菌 (26003)、甲型副伤寒沙门菌 (50073)、变形杆菌 (49101)、乙型溶血性链球菌 (32210), 购自中国食品药品检

收稿日期: 2012-03-20

基金项目: 内蒙古医学院科学技术研究重大项目 (NY2005ZD004)

作者简介: 杨丽敏 (1959—), 女, 实验师。E-mail: yanglm18@163.com

*通讯作者 乔俊缠 E-mail: qiaojunchan@163.com

沈晓玲 E-mail: shenxl1@yahoo.com.cn

定研究院;耐青霉素金黄色葡萄球菌,由内蒙古医科大学第一附属医院检验科提供,密封保存。

1.3 动物

清洁级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量(20 ± 2) g,由内蒙古大学实验动物研究中心提供,动物合格证号:SCXK(蒙)2002-001。

1.4 仪器

Motic 生物显微镜,麦克奥迪实验有限公司显微镜广州分公司;TDZ4—WS 型离心机,湘仪离心机仪器有限公司。

2 方法

2.1 体外抑菌试验

取线叶菊总黄酮浸膏 0.2 g 溶于 7 mL 超纯水中,备用。按文献方法^[5]配制普通营养琼脂平板培养基和血琼脂培养基,采用密集划线的方法分别将大肠杆菌、福氏志贺菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、甲型副伤寒沙门菌、变形杆菌、乙型溶血性链球菌、耐青霉素金黄色葡萄球菌均匀涂抹于培养基表面,灭菌钢管放置平皿菌层上。耐青霉素金黄色葡萄球菌每管加线叶菊总黄酮药液($30 \mu\text{g/mL}$,对不同质量浓度进行筛选后确定的最佳抑菌质量浓度) $100 \mu\text{L}$,其余各管内加上述药液 $80 \mu\text{L}$,置恒温培养箱中, 37°C 培养 24 h。分别观察并测量抑菌圈直径(mm):无抑菌圈为耐药;抑菌圈直径为 7~9 mm,对药物低度敏感,用“+”表示;9~16 mm 为中度敏感,用“++”表示;16 mm 以上为高度敏感,用“+++”表示^[6]。

2.2 对耐青霉素金黄色葡萄球菌致小鼠死亡的保护作用

小鼠 20 只随机分成细菌感染组和线叶菊总黄酮组,每组 10 只,雌雄各半。每鼠 ip 用 5%胃膜素稀释的耐青霉素金黄色葡萄球菌液($1.0 \times 10^9/\text{mL}$) 0.5 mL ,给药组同时 ig 线叶菊总黄酮(442 mg/kg ,实验筛选获得的体内最佳抑菌质量浓度)药液,12 h 后再次 ig 给药 1 次。观察并记录感染后 72 h 内小鼠的死亡数,计算死亡保护率。

死亡保护率=(细菌感染组死亡率—线叶菊总黄酮组死亡率)/细菌感染组死亡率

2.3 对小鼠淋巴细胞增殖的影响

小鼠 40 只随机分为对照组,线叶菊总黄酮高、中、低剂量(2 210、442、 44.2 mg/kg)组,每组 10 只,雌雄各半。各给药组小鼠均 ig 给药,每天给药 1 次,连续给药 16 d,对照组自由进食。停药

后,各组小鼠 im 植物血凝素 0.4 mg/只 ,连续注射 3 d。末次注射植物血凝素后 24 h,小鼠尾静脉取血,制备 T 淋巴细胞的染色涂片,姬姆萨染色法染色后油浸镜下观察 200 个淋巴细胞,计算 T 淋巴细胞的转化率。

$\text{T 淋巴细胞转化率} = \text{转化淋巴细胞数} / \text{淋巴细胞总数}$

2.4 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

小鼠 40 只,分组及给药方法同“2.3”项。给药结束后,各组小鼠 ip 2%淀粉肉汤 1 mL/只 ,24 h 后 ip 1%鸡红细胞悬液 1 mL ,1 h 后小鼠颈椎脱位处死,腹腔注入 Hank's 液 3 mL ,按摩腹腔数分钟后吸取腹腔液,置小试管内, 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀涂片,晾干,姬姆萨染色。油镜下观察($\times 1000$),计数 100 个巨噬细胞,计算吞噬率(100 个巨噬细胞中吞有鸡红细胞的巨噬细胞数)。

2.5 急性毒性试验^[7]

18 只小鼠随机分为 3 组,每组 6 只,雌雄各半,分别为线叶菊总黄酮 10.6 g/kg (24 h 内分多次给药)组、25%聚山梨酯-80 溶剂对照组及对照组。禁食 12 h 后各组小鼠 ig 相应物质 25 mL/kg 。给药后观察小鼠中毒症状和死亡数,连续观察 14 d,计算 LD_{50} 。

2.6 数据处理

用 SPSS 13.0 软件包进行方差分析。

3 结果

3.1 线叶菊总黄酮的体外抑菌作用

线叶菊总黄酮对耐青霉素金黄色葡萄球菌、福氏志贺菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、甲型副伤寒沙门菌、变形杆菌、乙型溶血性链球菌均有明显的抑制作用,抑菌圈直径(敏感度)分别为 17(高)、14(中)、12(中)、19(高)、16(高)、12(中)、18(高) mm;而对大肠杆菌抑菌圈直径则为 0。

3.2 对耐青霉素金黄色葡萄球菌致小鼠死亡的保护作用

细菌感染组小鼠感染耐青霉素金黄色葡萄球菌后 24 h 内全部死亡。线叶菊总黄酮给药组 48 h 内未见小鼠死亡,48 h 后 4 只小鼠死亡,死亡保护率为 60% ($P < 0.01$)。提示线叶菊总黄酮能明显抑制耐青霉素金黄色葡萄球菌所致小鼠死亡。

3.3 对小鼠淋巴细胞增殖的影响

与对照组比较,线叶菊总黄酮各剂量组小鼠 T 淋巴细胞的转化率均显著升高 ($P < 0.01$),表明线叶菊总黄酮在体内能显著增加 T 淋巴细胞增殖。结

果见表 1。

3.4 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

与对照组比较, 线叶菊总黄酮各剂量组均可明显增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 1 线叶菊总黄酮对小鼠淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of TFFS on lymphocyte proliferation in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	T 淋巴细胞转化率 / %
对照	0	20.30 ± 4.00
线叶菊总黄酮	44.2	27.00 ± 2.40**
	442	33.00 ± 3.68**
	2 210	28.20 ± 3.01**

与对照组比较: ** $P < 0.01$, 下表同

** $P < 0.01$ vs control group, same as below

表 2 线叶菊总黄酮对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of TFFS on phagocytosis function of macrophagocytes in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	吞噬率 / %
对照	0	18.00 ± 2.31
线叶菊总黄酮	44.2	25.40 ± 2.41**
	442	31.60 ± 5.04**
	2 210	27.40 ± 4.99**

3.5 急性毒性

小鼠多次 ig 线叶菊总黄酮达 10.6 g/kg 时仍未见死亡, 属实际无毒类。

4 讨论

金黄色葡萄球菌是最重要的化脓性球菌, 近年来由于抗生素广泛应用和不合理使用, 其耐药菌株迅速增多, 对青霉素 G、红霉素、氨苄西林、复方新诺明、苯唑西林等常用的抗菌药物耐药率均 > 60%^[8]。本实验结果显示, 线叶菊总黄酮对革兰阴性菌福氏志贺菌、甲型副伤寒沙门菌、变形杆菌, 革兰阳性菌表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌均有较强的抑菌活性, 剂量为 442

mg/kg 时, 明显降低感染耐青霉素金黄色葡萄球菌小鼠的死亡率, 显示良好的抗耐药金黄色葡萄球菌感染的作用。

机体对入侵病原体的清除, 依赖于机体的非特异性免疫和特异性免疫功能。巨噬细胞可以直接吞噬、杀伤病原体, 是非特异性免疫中最有效的防御部分, 此外巨噬细胞也是机体重要的抗原提呈细胞, 参与机体的特异性免疫反应, 是两种免疫反应联系的“桥梁细胞”。T 淋巴细胞的功能状态, 在很大程度上反映机体的细胞免疫水平。本实验结果显示, 线叶菊总黄酮可增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 促进机体的非特异性免疫功能, 显著促进 T 淋巴细胞的增殖。

综上所述, 线叶菊总黄酮既可通过直接抗菌作用治疗耐药金黄色葡萄球菌的感染, 又能通过调节免疫功能、增强机体免疫力, 达到治疗细菌感染的目的。由于线叶菊分布广泛, 来源经济, 且不良反应小, 因而在当前耐抗生素菌株越来越多的情况下, 对线叶菊总黄酮抗感染作用及其机制研究值得进一步深入进行。

参考文献

- [1] 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, 2008, 22(4): 863-865.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [3] 黑龙江中医学院中药系. 兔毛蒿的抗菌作用与临床应用 [J]. 中草药通讯, 1976, 7(6): 33.
- [4] 王 栋. 兔毛蒿有效成分的研究 [J]. 药学学报, 1984, 19(6): 441.
- [5] 张均田. 现代药理实验方法 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [6] 付秀花, 王 恬. 中草药对奶牛乳房炎病原菌的体外抑菌试验 [J]. 动物科学与动物医学, 2002, 19(5): 16-18.
- [7] 肖创清, 胡 捷, 陈 敏. 一种中药复方洗液抑菌效果及毒性试验观察 [J]. 中国消毒学杂志, 2005, 22(3): 303-305.
- [8] 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.