

## 金银花体外抗结核活性研究

□邱 葵\* (首都医科大学附属北京朝阳医院药事部 北京 100020)

刘宇红 (北京市结核病胸部肿瘤研究所 北京 101149)

孔繁翠 (首都医科大学附属北京朝阳医院药事部 北京 100020)

赵 兵 (北京市结核病胸部肿瘤研究所 北京 101149)

顾 昊 徐佳佳 王鹤尧 (首都医科大学附属北京朝阳医院药事部 北京 100020)

**摘要:**目的:探讨金银花体外抗结核活性。方法:使用试管倍比稀释法测定金银花、绿原酸、异烟肼对结核分支杆菌标准株和金色分支杆菌的最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)及最小杀菌浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)。结果:金银花对金色分支杆菌的 MIC 为  $0.83\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , MBC 为  $1.75\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 对 H37Rv 的 MIC、MBC 均为  $0.18\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 绿原酸对两种分支杆菌的 MIC、MBC 均为  $0.18\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 异烟肼对两种分支杆菌的 MIC、MBC 均为  $10.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 异烟肼配伍金银花使用, 异烟肼对两种分支杆菌的 MIC、MBC 为  $5.25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论:金银花有抗结核活性。同异烟肼联合使用能显著降低异烟肼的 MIC 和 MBC。

**关键词:**金银花 结核分支杆菌 金色分支杆菌 最小抑菌浓度(MIC) 最小杀菌浓度(MBC)

结核病(TB)是由结核分支杆菌引起的慢性传染病,是人类的主要传染病之一。目前,全球结核病呈上升趋势,每年新发病例约 800 万,死亡人数达 200 万,由于耐药及多重耐药菌株(Multiple Drugs Resistant-bacillus, MDR-TB)的出现,使得结核病的治疗难度加大,开发新的抗结核药物已成为一项紧迫的任务。我国传统中医药在治疗慢性病、疑难病方面所表现出的优势,愈来愈引起研究人员的重视,从中药中寻找抗结核药物已成为一个新的研究思路。金银花为忍冬科植物忍冬的花蕾,又名忍冬花。现代药理研究证明<sup>[1]</sup>:金银花中的绿原酸、异绿原酸、白果酸、咖啡酸、木犀草素等均有较强的抗菌作用;王清等<sup>[2]</sup>

实验研究证实金银花对金黄色葡萄球菌、短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和临床分离菌均具有较强的抑菌作用;宗玉英等<sup>[3]</sup>通过对常用中藏药进行体外抗结核分支杆菌活性筛选,发现金银花和绿原酸均有一定程度的抗结核活性。由于金银花具有的广泛的抗菌活性,而且所含的绿原酸类化合物具有显著的利胆保肝作用,使其在抗结核药物研究中更具有吸引力,笔者采用结核分支杆菌标准株和金色分支杆菌对金银花提取物进行了初步研究。现将实验过程报道如下:

### 一、材 料

#### 1. 试剂与药物

甲醇(色谱纯, Fisher 公司); 甲酸(色谱纯); 改

收稿日期: 2009-08-06

修回日期: 2009-12-04

\* 联系人:邱葵,主管药师,硕士,主要研究方向:中药活性成分的研究, Tel: 010-85231788, E-mail: bjquikui@126.com。

良罗氏培养基、7H11 琼脂培养基、苏通半流体培养基(均由北京结核病研究所国家参比实验室提供)。

药物:金银花(由本院中药房提供),绿原酸对照品(中国药品生物制品鉴定所),异烟肼(中国药品生物制品鉴定所)。

### 2. 液相色谱材料及主要仪器

日本岛津 CBM-20A 高效液相色谱仪(LC-20AT),Milli-Q 纯水仪,Ⅱ级生物安全柜,BP211D 电子天平,MCO-15AC CO<sub>2</sub> 培养箱。

### 3. 实验菌株

结核分枝杆菌标准株 H37Rv(ATCC 27294),金色分枝杆菌(ATCC 23366,均由北京结核病研究所国家参比实验室提供)。

## 二、方法

### 1. 金银花提取物的制备

准确称取金银花干花 200g,用均质机破碎,加入 1000mL 石油醚室温浸提,磁力搅拌器搅拌 6h,过滤,再以 1000mL 新鲜石油醚重复提取 1 次,过滤,合并滤液。经石油醚处理后的金银花在通风厨中挥去醚味,用 600mL 75%乙醇常温避光浸泡,磁力搅拌 24h,滤过,收集滤液,如此反复提取 3 次,合并 3 次滤液得滤液 I,4℃冰箱静置。经乙醇处理的金银花继续用 75%乙醇 300mL 索氏回流提取 10h,收集提取液,放凉后同滤液 I 合并,混匀,减压回收乙醇至浸膏无醇味,浸膏为金银花提取物,-20℃冰箱保存,以供药敏试验使用。

### 2. 金银花提取物中绿原酸的含量测定

#### (1) 色谱条件。

流动相:乙腈:0.1%甲酸(10:90);检测波长:330nm;流速:0.5mL·min<sup>-1</sup>;色谱柱:Waters Symmetry C<sub>18</sub>(50mm×4.6mm,5μm)柱;进样量:10μL。

#### (2) 供试品溶液的制备。

精密称取浸膏 2g,加入 20mL 50%甲醇超声提取 30min 后,4000r·min<sup>-1</sup> 离心 5min,取上清液,沉淀再用 20mL 50%甲醇超声提取 30min,如此提取 2 次,合并上清液滤入 50mL 容量瓶中,用 50%甲醇洗涤沉淀数次,洗液滤入容量瓶中,定容至 50mL。

#### (3) 绿原酸对照品溶液的配制。

精密称取绿原酸对照品约 10mg,置 10mL 容量瓶中,加 50%甲醇适量,溶解定容至刻度,得到 1mg·mL<sup>-1</sup> 的储备液。

#### (4) 样品含量。

在该色谱条件下,测定绿原酸对照品溶液,在 0.5~50μg·mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好;取供试品溶液,精密量取 10μL,注入液相色谱仪,记录色谱峰面积;另取绿原酸对照品溶液,同法测定,按外标法以峰面积计算,得绿原酸的含量。

### 4. 体外药敏试验

#### (1) 菌液的稀释制备。

刮取在固体改良罗氏培养基上 37℃恒温培养的分枝杆菌菌落,加 0.5%Tween-80 生理盐水磨菌稀释,与 1 号麦氏比浊管比浊,制成 1mg·mL<sup>-1</sup> 菌液,用生理盐水稀释成 10<sup>-3</sup>mg·mL<sup>-1</sup> 菌液,每管培养基接种 0.1mL。最终接种量为 10<sup>-4</sup>mg。

#### (2) 金银花提取物供试液的制备。

精密称取金银花提取物浸膏 0.2g,用 DMSO 20mL 溶解,并用苏通培养基稀释至含 DMSO 35% 时,对该溶液依次做倍比稀释,得最终浸膏药物浓度为 0.21~3.5mg·mL<sup>-1</sup>。

#### (3) 绿原酸对照品供试液的配制。

精密称取绿原酸对照品 7.2mg,置 10mL 容量瓶中,加苏通培养基溶解并稀释至浓度为 0.72mg·mL<sup>-1</sup> 的储备液,依次倍比稀释得最终浓度为 0.045~0.36mg·mL<sup>-1</sup>。

#### (4) 异烟肼供试液的配制。

精密称取异烟肼并配制成终浓度为 21.0mg·mL<sup>-1</sup>、10.5mg·mL<sup>-1</sup>、5.25mg·mL<sup>-1</sup>、2.63mg·mL<sup>-1</sup>、1.37mg·mL<sup>-1</sup>。

#### (5) 药敏试验。

试验采用试管二倍稀释法,测定药物最小抑菌浓度(MIC)。培养基为苏通培养基,上述药物均用 0.22μm 滤膜过滤除菌。分别测试上述 3 种供试液以及 1.75mg·mL<sup>-1</sup> 金银花提取物联合异烟肼对分支杆菌的效果,每种浓度平行操作 2 管,每支试管盛装培养基 3mL,加入药液 3mL。接种金色分支杆菌培养 1w 观察结果,接种结核分枝杆菌标准株培养 4w 观察结果。肉眼观察液体混浊为有菌落生长,液体澄清的最低浓度管确定为该药物的 MIC,将上述 MIC 测定中未见菌落生长的各管取 100μL 接种于 7H11 琼脂板上,做好标记,37℃培养,观察时间同上,以菌落数<3 个的最小药物浓度管的药物浓度(mg·mL<sup>-1</sup>)为最小杀菌浓度(MBC)<sup>[4-6]</sup>。

## 三、结果

### 1. 金银花提取物中绿原酸的含量

取金银花干花 200g,经石油醚脱脂预处理后,用 75%乙醇提取得金银花提取物 20.6541g。经高效液相色谱仪检测,绿原酸保留时间为 2.4min,以原药材来计算,每 100g 金银花干花含 2.0448g 绿原酸。

## 2. 药敏试验

实验药物对 2 种分支杆菌的 MIC、MBC 测定见表 1:金银花提取物对金色分支杆菌的 MIC 为  $0.83\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,MBC 为  $1.75\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对 H37Rv 的 MIC、MBC 均为  $0.18\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;绿原酸对 2 种分支杆菌的 MIC、MBC 均为  $0.18\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;异烟肼对 2 种分支杆菌的 MIC、MBC 均为  $10.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,异烟肼配伍金银花提取物组:异烟肼对 2 种分支杆菌的 MIC、MBC 为  $5.25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

## 四、讨论

本研究主要采用传统的试管二倍稀释法测试金银花提取物对两种分支杆菌的活性,操作简单、经济、结果直观。在国外文献<sup>[7-8]</sup>中多有用 Alamar Blue 法或 MTT 法测定结核药物最低抑菌浓度,陆宇等人<sup>[9]</sup>应用 Alamar Blue 和 MTT 法测定 12 种抗结核药物最低抑菌浓度,并与传统的试管二倍稀释法进行比较,具有较好一致性。这种快速显色法多采用 96 孔板进行操作,不便于观察,如某种原因引起的杂菌的生长同样产生颜色的变化,从而导致假阳性结果出现,同时这些指示剂比较贵,所以我们选择了最经济有效的传统方法进行体外药效试验。

本实验为检测金银花提取物对分支杆菌的活性使用了金色分支杆菌和结核分支杆菌标准株。H37Rv 是一种强致病菌,且生长缓慢,试验周期长,而金色分支杆菌是一种快速生长的非病原性分支杆菌,Chung 等人证实了金色分支杆菌在分支杆菌属中其敏感性最接近于结核分支杆菌,Mitscher 等人进一步证实了金色分支杆菌和结核分支杆菌对药物有

相似的敏感性,因此,金色分支杆菌被用作结核分支杆菌的实验模型<sup>[10-12]</sup>。本实验结果表明两种菌株对药物的反应具有一致性,故在此后的研究中可考虑将金色分支杆菌作为药物筛查的结核分支杆菌菌株模型,加速药物筛选进程。

在体外药敏试验药物设计中,绿原酸对照品的浓度与金银花提取物中绿原酸浓度是对应的,从结果看出二者体外抗菌效果也基本一致,说明绿原酸是金银花提取物中体外抗分支杆菌活性的物质基础。金银花提取物与异烟肼配伍使用时显著降低异烟肼对分支杆菌的 MIC 和 MBC,提示使用异烟肼时联合应用中药金银花,其抑菌和杀菌效果增强,而且绿原酸有利胆保肝作用,在一定程度上减少异烟肼的副作用。

本研究的不足之处:实验药物的最低抑菌和杀菌浓度同其它抗结核药物浓度相比值偏高,考虑可能有如下 3 个原因:一是由本研究的药敏试验方法决定的,试管二倍稀释法中的药敏结果主要靠肉眼观察,肉眼能观察到的无菌落的生长管要求的药物浓度必定较高;二是绿原酸的抗分支杆菌活性不及异烟肼;三是金银花提取物中杂质较多,需要在下一步研究中进行分离纯化。

## 参考文献

- 1 陈奇.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,2000:251-275.
- 2 王清,朱萱萱,张赤兵,等.金银花提取物抗菌作用实验研究.中国医药导刊,2008,10(9):1428-1430.
- 3 宗玉英,欧阳嘉惠,陈超杨,等.常用中藏药体外抗结核分支杆菌的筛选实验.中国中药杂志,2008,33(24):2973-2979.
- 4 徐叔云.药理实验方法学.第三版.北京:人民卫生出版社,2005:1647-1719.
- 5 张均田.现代药理实验方法学.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版,1998:1409-1470.
- 6 Sean T. B, Steven M. D, Peihua Gu, et al. Activity of ketoconazole against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in the mouse model. *Journal of Medical Microbiology*, 2007,56:1047-1051.
- 7 G.M. Molina-Salinas a,b, A. P'erez-L'opez a, P. Becerril-Montes b, et al. Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 109:435-441.
- 8 Deb C, Lee CM, Dubey VS, et al. A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *Plos one*, 2009, 4 (6):e6077.
- 9 陆宇,王彬,郑梅琴,等.应用 Alamar Blue 和 MTT 测定

表 1 实验药物对两种分支杆菌的 MIC 及 MBC( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

实验药物	MIC( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		MBC( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
	金色分支杆菌	H37Rv	金色分支杆菌	H37Rv
金银花提取物	0.83	1.75	1.75	1.75
绿原酸	0.18	0.18	0.18	0.18
异烟肼	0.0105	0.0105	0.0105	0.0105
$1.75\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 金银花 提取物+异烟肼	0.00525	0.00525	0.00525	0.00525

- 抗结核药物最低抑菌浓度的测定. 中国防痨杂志,2007,29 (6):499-501.
- 10 Veronique Seidel<sup>1</sup>, Peter W. Taylor. In vitro activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 23:613-619.
- 11 I.M.S. Eldeen, J. Van Staden Antimycobacterial activity of some trees used in South African traditional medicine. *South African Journal of Botany*, 2006, 10:1-4.
- 12 Sandra M.. Newton a, Clara Lual, Sudagar S. Gurcha b, et al. Wright The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria Canadensis*. *Journal of Ethnopharmacology*,2002,79: 57-67.

### Antituberculosis Activities in Vitro of Flos *Lonicerae*

Qiu Kui<sup>1</sup>, Liu Yuhong<sup>2</sup>, Kong Fancui<sup>1</sup>, Zhao Bing<sup>2</sup>, Gu Hao<sup>1</sup>, Xu Jijia<sup>1</sup>, Wang Heyao<sup>1</sup>

(1.Department of Pharmacology, Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020, China ; 2. Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China)

**Abstract:** This work aimed to explore the bioactivities in vitro of Flos *Lonicerae* against *Mycobacterium tuberculosis* (TB). Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of Flos *Lonicerae*, chlorogenic acid and INH against *M. tuberculosis* and *M. aurum* were determined by the serial tube dilution method. The MIC of Flos *Lonicerae* to *Mycobacterium aurum* was determined to be  $0.83\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , and the corresponding MBC was  $1.75\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; for chlorogenic acid, the MIC and MBC were both  $0.18\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; for INH, the MIC and MBC were both  $10.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . When INH and Flos *Lonicerae* were used in combination, INH had the MIC and MBC of  $5.25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The results showed that Flos *Lonicerae* exhibited antituberculosis activities in vitro, and the combined usage of INH and Flos *Lonicerae* could significantly reduce the MIC and MBC.

**Keywords:** Flos *Lonicerae*; *M. tuberculosis*; *M. aurum*; MIC; MBC

(责任编辑:王 瑀,责任译审:张立崑)

#### 国内首例智能型植物工厂研发成功

日前,我国设施农业高技术研究取得新的重大突破——国内第一例以智能控制为核心的植物工厂由中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所率先研发成功,并在长春农博园投入运行。该植物工厂的研发成功,使我国成为世界上少数几个掌握植物工厂核心技术的国家之一,同时,也将对我国现代农业的发展产生深远的影响。

据悉,植物工厂是国际上公认的设施农业最高级发展阶段,是一种技术高度密集、不受或很少受自然条件制约的全新生产方式。由于植物工厂不占用农用耕地,产品安全无污染,操作省力,机械化程度高,单位面积产量可达露地的几十倍至上百倍,因此被认为是 21 世纪解决人口、资源、环境问题的重要途径,也是未来航天工程、月球和其他星球探索过程中实现食物自给的重要手段。目前,仅有日本、美国、荷兰等少数发达国家掌握这项技术。

据介绍,中国农业科学院环发所研发成功的长春智能型植物工厂由植物苗工厂和蔬菜工厂两部分组成,以节能植物生长灯和 LED 为人工光源,采用制冷-加热双向调温控湿、光照-CO<sub>2</sub> 耦联光合调控、营养液(EC、pH、DO 和液温等)在线检测与控制、环境数据采集与自动控制等 13 个相互关联的控制子系统,可实时对植物工厂的温度、湿度、光照、CO<sub>2</sub> 浓度以及营养液等环境要素进行自动监控,实现智能化管理。其中的植物苗工厂由双列五层育苗架组成,种苗均匀健壮,品质好,单位面积育苗效率可达常规育苗的 40 倍以上;蔬菜工厂采用五层栽培床立体种植,所栽培的叶用莴苣从定植到采收仅用 16-18 天时间,比常规栽培周期缩短 40%,单位面积产量为露地栽培的 25 倍以上,产品清洁无污染,商品价值高。

(文 摘)