论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1286-05

23种中药对皮肤浅部真菌感染的体外抗真菌活性研究

周 汛,李桂明
(重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察23种中药对石膏样小孢子菌和红色毛癣菌的体外抗真菌作用,并对其中抑菌效果明显的中药进行抗真菌药敏试验。方法:半固体药基混合法,微量稀释法。结果:部分中药对1种或几种真菌显示较强的抑制作用。结论:射干、菟丝子、黄连、黄柏、黄芩有较强的抗真菌活性。

【关键词】抗真菌活性;中药
【中国图书分类法分类号】R541 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-03

Studies on antifungal activity of 23 kinds of traditional Chinese medicines in extro-experiments

ZHOU Xun, et al
(*Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To research the in vitro antifungal activity of 23 kinds of TCM against microsponrm gypseum and trichophyton ncbrum, the main causes of superficial dermatophyte. *Methods*:Semisolid agar dilution method was applied. *Results*:Some kinds of TCM showed strong antifungal activity against one or several kinds of fungi. *Conclusion*:Belamcandae, cuscuta seed, coptis chinensis, phellodendri and scutellaria are active in fungistasis in the extro-experiment.

【Key words】 Antifungal activity;Traditional Chinese medicines(TCM)

随着高效广谱抗生素的广泛应用,抗肿瘤治疗的深入开展,器官移植和外科其他介入性治疗的不断应用,皮质类固醇激素的广泛应用,糖尿病以及获得性免疫缺陷综合征(Acquired immune deficiency syndrome,AIDS)患者的不断增多,真菌感染的发病率呈现上升趋势,因此医学界一直致力于寻找有效、安全的抗真菌药,中草药是祖国医学宝库中的珍贵财富之一,中药中存在很多活性强、毒性低的有效成分,对常见致病菌有一定的抑菌、杀菌作用,对治疗和预防疾病起着重要作用,本试验研究了23种中药对常见皮肤癣菌的体外抗真菌活性,为临床治疗真菌感染性皮肤病,选择具有抗真菌活性的中药提供参考。现将结果报告如下。

1 材料

1.1 药物的选择

根据文献报道具有抑制真菌作用的药物,如射干、菟丝子、黄连、黄柏、黄芩、知母、藿香、大黄等。

中医治疗感染性皮肤病常用的药物,如蛇床子、白癣皮等。

某些对病毒有抑制作用的药物,如菌陈、山豆根、板蓝根等。

1.2 药物的制备

中药材50 g研成粉末,过20目筛,加水500 ml,浸泡0.5 h以上,微火煮沸1 h,倾出药液,再加水煎熬,将两次熬出的药液浓缩至50 ml,即质量浓度为100%(1 g/ml)的药液,放冰箱备用。

1.3 培养基

改良沙氏培养基(蛋白胨 1%,葡萄糖 2%);改良沙氏半固体培养基(蛋白胨 1%,葡萄糖 2%,琼脂0.3%)。

1.4 菌液制备

实验菌种(红色毛癣菌和石膏样小孢子菌)均由我院临床分离、鉴定及保存。将受试菌株于SDA上活化2次后划线接种于SDA平皿,35℃培养1周, 挑直径≥1 mm的菌落5个溶入生理盐水中,混匀成真菌混悬液,麦氏比浊至0.5,使菌液浓度为(1~5)×10^6 cfu/ml。

作者介绍: 周 汛(1970-),女,副教授,博士,
研究方向:真菌致病力及耐药性研究。

2 方法与结果

2.1 方法

半固体培养基以每管体积 4 ml分装于试管中,在121℃高压灭菌 20 min。当灭菌培养基冷却至40~50℃时,以无菌操作加入100%浓度的中药药液 2 ml,即为50%的药液培养基,混匀制成斜面。同时用不加药液的培养基作对照。取受试菌液1白金耳划线接种于斜面上。放于28℃温箱中于 72 h开始观察菌生长状态,持续观察 21 d。以不加菌的空白对照为标准,目测并以下列标准记录[1]:菌完全无生长"-";菌发育迟缓,形成的菌落较小"+";菌发育不旺盛 "++"(2+); 菌发育较旺盛, 但菌落比正常较小"+++"(3+);菌发育迅速旺盛 "++++"(4+)。每次试验中,每种药物接种3管,如果3管所得结果相同作为观察结果,否则必须重做试验。

2.2 23种中药的抑菌结果

射干、菟丝子、黄连、黄柏、黄芩都有较强的抑菌作用,知母、藿香、大黄、菌陈、蛇床子、白癣皮也有一定的抑菌作用。同一种药物对不同菌株作用不同,藿香、知母、蛇床子对红色毛癣菌有较强的抑制作用,但对石膏样小孢子菌无抑制作用(见表1)。

2.3 微量稀释法测定药敏试验

选择有抑菌作用的8种药物:射干、菟丝子、黄连、黄柏、黄芩、藿香、蛇床子、知母以微量稀释法测定药物MIC值。将8种药液吸取1 ml加入含1 ml沙氏液体培养基试管中,均匀混合后吸出1 ml加入第二管,倍比稀释至13管,使其药物浓度分别为(mg/ml):500、250、125、62.5、31.25、16、8、4、2、1、0.5、0.25 和0.125。将已制备好的悬液稀释50倍,使其浓度介于$(0.5\sim5)\times10^4$ cfu/ml之间。96孔板内依次加入0.1 ml已配置好的各梯度药物浓度溶液,第11孔为阴性对照,12孔为阳性对照,各孔加入菌悬液 0.1 ml(阴性对照孔不加),振荡5 min使各液充分混匀,28℃温箱培养(湿盒)72 h观察。丝状真菌的50%生长抑制浓度为其MIC值。

表 1 23 种中药提取物对 2 种真菌的抑制作用

	红色毛癣菌							石膏样小孢子菌						
	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
射干	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
菟丝子	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
黄连	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
黄芩	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
黄柏	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
藿香	-	-	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	3+	3+
知母	-	-	-	-	-	-	-	2+	3+	4+	4+	4+	4+	4+
蛇床子	-	-	-	-	-	-	-	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
大黄	-	+	2+	2+	2+	2+	2+	-	3+	3+	3+	3+	3+	3+
菌陈	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
白癣皮	-	-	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
好本	-	-	-	+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
白芷	-	-	-	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
柴胡	-	-	+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
白术	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
荆芥	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
百部	-	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
薄荷	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
紫草皮	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
山豆根	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
板蓝根	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
夏枯草	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
木通	4+	4+	以后污染					4+	4+	以后污染				

<0.062,0.062 mg/l和0.062,0.25,<0.062 mg/l。射干、菟丝子、蛇床子对石膏样小孢子菌及红色毛癣菌也有较强的抗菌活性,其MIC_{50}值分别为0.25,2,0.5和0.125,0.5,0.5 mg/l。藿香、知母对红色毛癣菌有较强的抑制作用,其MIC_{50}值分别为0.5,2 mg/l,但对石膏样小孢子菌无明显抑菌活性,其MIC_{50}值分别为4,8 mg/l。说明同一种药物对不同菌株的作用不同(见表2、3)。

表 2 8 种中药对 20 株石膏样小孢子菌的 MIC 值及 MIC_{50}(mg/L)

石膏样小孢子菌	射干	藿香	黄连	黄柏	黄芩	菟丝子	蛇床子	知母
菌株 1	0.25	4	<0.062	<0.062	0.062	0.5	1	8
菌株 2	0.25	4	<0.062	<0.062	0.062	1	4	2
菌株 3	0.5	16	0.062	<0.062	<0.062	1	0.5	8
菌株 4	0.25	2	<0.062	<0.062	0.062	2	0.25	4
菌株 5	0.5	4	0.062	<0.062	<0.062	0.5	0.5	8
菌株 6	0.5	8	0.125	0.062	0.125	4	1	8
菌株 7	1	4	0.25	0.125	0.125	8	2	2
菌株 8	2	2	<0.062	0.125	0.125	1	0.25	4
菌株 9	0.5	4	0.062	<0.062	<0.062	4	0.5	8
菌株 10	1	2	0.25	0.125	0.062	2	1	2
菌株 11	0.25	4	0.125	0.125	0.125	1	2	16
菌株 12	0.25	2	<0.062	<0.062	0.062	2	0.5	8
菌株 13	0.5	4	<0.062	<0.062	0.25	4	0.5	2
菌株 14	0.25	8	<0.062	<0.062	0.125	1	4	8
菌株 15	0.25	4	0.062	<0.062	0.125	2	0.5	4
菌株 16	0.25	4	<0.062	0.25	0.062	4	0.5	8
菌株 17	0.5	2	<0.062	<0.062	<0.062	8	2	8
菌株 18	0.5	4	<0.062	<0.062	<0.062	1	2	4
菌株 19	0.25	8	0.25	0.062	0.5	2	0.25	8
菌株 20	0.25	8	0.125	0.125	0.25	1	4	2
MIC_{50}	0.25	4	<0.062	<0.062	0.062	2	0.5	8

2.4 8种中药的抑菌结果

黄连、黄柏、黄芩对石膏样小孢子菌及红色毛癣菌均有很强的抗菌活性，其 MIC_{50} 值分别为<0.062,

3 讨 论

本实验应用体外液体药基法筛选具有抗菌活性的中药及微量稀释法测定不同中药的药物敏感试验,并采用MIC_{50}值作为药物敏感试验的判定标准,避免单一测定MIC值可能造成的试验误差，具有方法简便,结果可靠的特点。抗真菌药物筛选试验结果受外界的影响因素复杂,例如,药物的种类,制备方法,药物浓度,试验菌的种类,菌液浓度,培养的温度和时间,以及结果判读标准[2]等。本次试验观察到蛇床子对红色毛癣菌有较强的抗真菌活性,与文献报道[3]防风、蛇床子等中药对絮状表皮癣菌、石膏样小孢子菌和红色毛癣菌无抑制作用不相符合,考虑与结果判读及菌种有关。本实验参考美国国家标准委员会推荐的M-27A、M-38P标准制备菌悬液、配制96孔板，以丝状真菌的50%生长抑制浓度读取MIC值,同时选用我科临床分离活化的菌株,考虑到单一测定MIC值可能造成判读上的误差,我们分别测定了8种中药对20株石膏样小孢子菌和红色毛癣菌的MIC值,并取MIC_{50}值作为判断药物敏感的标准。

同一种药物对不同菌株作用不同,黄连、黄柏、

表 3 8 种中药对 20 株红色毛癣菌的 MIC 值及 MIC_{50}(mg/L)

石膏样小孢子菌	射干	藿香	黄连	黄柏	黄芩	菟丝子	蛇床子	知母
菌株 1	0.125	0.5	<0.062	0.125	0.062	0.5	0.25	1
菌株 2	0.125	0.5	0.062	0.125	0.062	0.5	0.5	2
菌株 3	0.062	1	0.125	0.25	<0.062	0.25	1	4
菌株 4	0.125	0.25	0.25	<0.062	<0.062	1	0.5	0.5
菌株 5	<0.062	0.25	0.125	0.062	<0.062	0.5	0.5	4
菌株 6	0.125	2	0.125	0.25	0.125	2	2	2
菌株 7	1	0.5	0.25	0.125	0.125	1	0.5	1
菌株 8	0.25	0.25	0.125	0.125	0.125	1	1	1
菌株 9	0.5	4	0.062	0.062	<0.062	0.5	4	8
菌株 10	0.125	0.125	0.25	0.125	0.062	0.25	0.5	2
菌株 11	0.062	1	0.125	0.125	0.125	1	2	0.5
菌株 12	0.5	0.5	<0.062	0.5	<0.062	1	0.5	4
菌株 13	0.5	0.5	0.25	1	0.25	0.5	1	4
菌株 14	0.25	1	0.062	0.5	0.125	1	0.5	2
菌株 15	0.25	4	1	0.062	<0.062	2	0.5	1
菌株 16	0.125	0.5	0.125	0.25	0.062	0.5	2	0.5
菌株 17	<0.062	1	0.062	0.25	<0.062	0.5	2	1
菌株 18	<0.062	4	0.062	0.125	<0.062	1	0.5	4
菌株 19	0.125	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	1	2
菌株 20	0.25	0.5	0.125	0.125	0.25	1	0.25	2
MIC_{50}	0.125	0.5	0.125	0.125	0.062	0.5	0.5	2

黄芩对石膏样小孢子菌及红色毛癣菌均有很强的抗菌活性,射干、菟丝子、蛇床子也有较强的抗菌活性,而藿香、知母只对红色毛癣菌有较强的抑制作用,对石膏样小孢子菌无明显抑菌活性。说明同一种药物对不同菌株的作用不同,提示药物的作用靶点可能不同。由于提取溶剂不同使某些中药抑菌结果的报道有显著差异[1,4],说明提取出的有效成分不同,体现的药效也不同。

中药副作用小、来源广、价格低廉,较少出现耐药性等,使研究开发抗真菌中药具备良好前景[5]。但因中药的种类繁多,现在的研究大多处于初步阶段,筛选抗真菌药物,通过扫描、透射电镜观察形态变化,缺乏对于作用机制与毒性的进一步探讨,目前可以通过微阵列 DNA芯片技术并行分析成千上万个基因的表达情况,它为研究药物的作用机制提供了一个新的高效技术平台[6]。对微阵列DNA芯片产生的基因表达谱进行聚类分析,由于作用机制相似的药物会被聚类在一起,因此根据未知药物和已知药物的聚类关系,可以了解未知药物的作用机制,这对于加速新药开发的步伐具有十分重要的意义。今后应从已发现的具有抗真菌活性的中药中提取有效成分,进行抗真菌机制研究,同时根据高效低毒原则,设计选择性作用靶点减少用药量,建立相关生物信息库,为合成新的抗真菌药物提供理论基础。

参 考 文 献

[1] 宫毓静,安汝国,虞 慧,等. 64种中药乙醇提取物抗真菌作用研究[J]. 中草药,2002,33(1):42-47.

[2] 关洪全.抗真菌中药研究方法学的几点思考[J]. 中国中医基础医学杂志,2000,6(6):54-56.

[3] 叶其馨,林 吉,桂蜀华,等.防风等11种中药体外抗真菌活性研究[J]. 海南医学,2005,16(9):161-184.

[4] 费尚芬,朱义广,马珣玻,等.11种中药乙醇提取物抗甲真菌作用研究[J]. 河北大学学报(自然科学版),2005,25(4):408-411.

[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):200-202.

[6] 张 亮,张 岩,周一鸣,等.用聚类法分析受抗真菌物质处理后的酵母细胞全基因表达谱 [J]. 生物化学与生物物理进展,2002,29(4):538-541.

(责任编辑:冉明会)