

徐海瑛,郝红英,陈青阁,等. 鱼腥草活性成分槲皮素及其金属配合物的抗菌活性[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):218-220.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.055

鱼腥草活性成分槲皮素及其金属配合物的抗菌活性

徐海瑛,郝红英,陈青阁,赵优琴,李玉魁,周小漫,马欣,丁燕伟

(黄河科技学院医学院,河南郑州 450063)

摘要:为了对鱼腥草有效成分槲皮素及其金属配合物的抗菌活性进行研究,采用琼脂稀释法和2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色,测定鱼腥草有效成分槲皮素及其金属配合物对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,简称SA)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,简称PA)的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,简称MIC),评价其抗菌活性。结果表明:对于SA标准菌株,SA耐药菌株、PA标准菌株、PA耐药菌株,槲皮素单体的MIC分别为1.88、0.94、0.94、1.88 mg/mL,槲皮素-Zn(锌)配合物的MIC分别为0.31、0.94、0.47、0.63 mg/mL,槲皮素-Mn(锰)配合物的MIC分别为3.75、3.75、5.00、1.88 mg/mL,槲皮素-Cu(铜)配合物的MIC分别为5.00、3.75、1.88、5.00 mg/mL,槲皮素-Mg(镁)配合物的MIC分别为5.00、5.00、1.88、5.00 mg/mL,槲皮素-Fe(铁)配合物的MIC分别为>5.00、>5.00、0.94、5.00 mg/mL。由结果可以看出,槲皮素及其5种金属配合物对SA、PA的标准菌株和耐药菌株均有抑菌活性,其中槲皮素-Zn配合物的抗菌活性最强。而对于耐药菌株,槲皮素单体和槲皮素-Zn配合物的抗菌活性较强。

关键词:鱼腥草;槲皮素;金属配合物;琼脂稀释法;抗菌活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)21-0218-03

鱼腥草(*Houttuynia cordata*)为三白草科蕺菜属植物,主要产于浙江、江苏、安徽、福建、河南等省,作为药食两用的植物,鱼腥草具有清热解毒、消痈排脓、利尿通淋等功能^[1]。现代药理研究表明,鱼腥草具有抗氧化、抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤和提高免疫力等生理功效^[2]。此外,鱼腥草含有多种活性物质成分,主要活性物质有挥发油和黄酮类化合物,如鱼腥草素、槲皮素、槲皮苷等^[3]。槲皮素是植物界分布最广的黄酮类化合物,有抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性^[4-6]。由于槲皮素的水溶性较差,人们通常对槲皮素进行结构修饰。槲皮素对金属离子有很强的螯合作用,可以产生稳定的环状化合物,因此,近年来人们对槲皮素配合物的研究逐渐增多,成为开发利用槲皮素的新途径。

近年来,国内外研究者已经合成了30多种槲皮素金属配合物,有些金属配合物具有显著的抗氧化、抗炎、抗菌活性^[7]。关于鱼腥草有效成分单体及其金属配合物对耐药菌

株抗菌活性的研究较少。在提取鱼腥草中槲皮素及合成槲皮素金属配合物的试验基础上,本试验选择临床上常见的致病菌——金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,简称SA)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,简称PA)的标准菌株和耐药菌株研究槲皮素单体及其金属配合物的抗菌活性,以期开发槲皮素提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 药品 鱼腥草活性成分槲皮素单体,槲皮素-Zn(锌)、槲皮素-Mn(锰)、槲皮素-Cu(铜)、槲皮素-Fe(铁)、槲皮素-Mg(镁)等金属配合物,均由黄河科技学院化学实验室郝红英副教授所在课题组提供。

1.1.2 菌种 铜绿假单胞菌[美国模式培养物集存库(ATCC)保藏编号:ATCC27853]、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)由笔者所在实验室保存。铜绿假单胞菌耐药菌株、金黄色葡萄球菌耐药菌株由黄河科技学院医学院附属医院提供。

1.1.3 试剂与仪器 M-H(A)培养基(即水解酪蛋白琼脂培养基)、M-H(B)培养基(即水解酪蛋白肉汤培养基)、LB培养基,北京奥博星生物技术有限责任公司;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)、二甲基亚砜(DMSO),均为分析纯,国药

收稿日期:2017-07-27

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(编号:15B350003);黄河科技学院大学生创新创业实践训练计划(编号:2015XSCXC012)。

作者简介:徐海瑛(1979—),女,河南周口人,硕士,副教授,从事天然产物抗菌活性研究。E-mail:yingzi3169@163.com。

[12]王娟,李文娟,周丽娟,等. 云南主要烟区初烤烟叶物理特性的稳定性及质量水平分析[J]. 湖南农业科学,2013(17):28-31.

[13]张保占,孟智勇,马浩波,等. 密集烘烤定色阶段不同湿球温度对烤后烟叶品质的影响[J]. 河南农业科学,2012,41(1):56-61.

[14]李文娟,王娟,朱聿振,等. 昆明不同烤烟品种初烤烟叶物理

特性差异研究[J]. 河南农业科学,2014,43(4):43-47.

[15]杜文,谭新良,易建华,等. 用烟叶化学成分进行烟叶质量评价[J]. 中国烟草学报,2007,13(3):25-31.

[16]彭清. 我国烤烟烟叶化学成分特征分析及香型空间分布格局研究[D]. 重庆:西南大学,2013:22-23.

[17]张锦韬. 红大烟叶化学成分与感官评吸质量特征及相互关系研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2011:24-25.

集团化学试剂有限公司;SW-CJ-1FD 超净工作台,上海锦
昱科学仪器有限公司;GH-500BC 隔水恒温培养箱,北京市
永光明医疗仪器有限公司;DRAGONLAB 微量移液枪,深圳良
谊实验室仪器有限公司。

1.2 方法

采用 WHO(世界卫生组织)推荐的琼脂稀释法,通过测
定最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,简称
MIC),评价槲皮素单体及其金属配合物的抗菌活性^[8-10]。

1.2.1 药液制备 分别称取槲皮素单体及其金属配合物各
100 mg,置于 EP(eppendorf)管中,再加入二甲基亚砷
(DMSO)2 mL,轻轻振摇,使得药物充分溶解,配制成浓度为
50 mg/mL 的原液,将原液分别用 DMSO 等倍稀释成浓度为
25、12.5、6.25、3.125、1.562 5、0.781 25 mg/mL 的药液。放
入 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2.2 菌液制备 分别将 SA 和 PA 的标准菌株、耐药菌株
接种在 LB 培养基上,于 37 ℃ 温箱培养 18~24 h。再将培养
良好的上述细菌在无菌条件下接种至 M-H 肉汤培养基中,
于 37 ℃ 温箱培养 4~6 h,将增菌后的菌液用生理盐水校正浓
度至 1.5×10^8 CFU/mL,再用 MH 肉汤将菌悬液进行
1:1 000 稀释后备用,含菌量约为 10^5 CFU/mL。

1.2.3 抑菌试验 配制 M-H(A)培养基,并分装于试管
中,将培养基进行高压蒸汽灭菌(121 ℃、20 min),然后将培
养基置于 70 ℃ 恒温水浴箱中备用。在超净台中将 M-H
(A)培养基倒入无菌塑料培养皿中,加入已制备好的各浓度
药液,充分混匀,静置凝固成含药平板,使药物的终浓度为 5、
2.5、1.25、0.63、0.31、0.17、0.08 mg/mL,DMSO 的体积分数
为 10%。同时设空白对照和溶剂对照平板。每种浓度的药
物和对照均设 3 次重复。在超净台中,取 2 μ L 已制备好的菌
液,点接种于含药平板上的相应位置,标记后置于 37 ℃ 温箱

内培养 18 h。然后通过无菌操作在细菌接种点处加 10 μ L 0.
5% 2,3,5-三苯基氯化四氮唑,置于 37 ℃ 温箱中培养 2~4
h 后观察结果。

1.2.4 结果判定和处理 观察平板中细菌接种处的菌落颜
色变化,细菌接种点显示红色,表示细菌生长,记录为“+”;
细菌接种点不显示红色,表示细菌未生长,记录为“-”。细
菌未生长时的最小药物浓度即为该药物对该细菌的最小抑菌
浓度,计算重复试验 MIC 的平均值。数据以“平均值 \pm 标准
差”表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理分析。

2 结果与分析

TTC 是一种活菌染料,活细菌中的琥珀酸脱氢酶能将
TTC 还原成红色的甲瓞(Formazan),从而使培养物呈现红色,
而死细菌则为无色,因此细菌培养物显示红色表示有细菌生
长,反之则表示无细菌生长。经试验测定,空白对照和 DMSO
溶剂对照中的 4 种菌株接种点处均显示红色,说明空白对照
平板和溶剂对照平板上 4 种菌株生长良好,10% DMSO 对 4
种菌株生长无任何影响,药物浓度是影响细菌生长的因素之
一。MIC 是细菌未生长时的最小药物浓度,MIC 值越小,说明
药物的抑菌作用越强。

2.1 对 SA 的抗菌活性

由表 1、图 1 可以看出,对于 SA 标准菌株 ATCC25923,槲
皮素单体的 MIC 为 1.88 mg/mL,槲皮素-Zn、槲皮素-Mn、
槲皮素-Cu、槲皮素-Mg 的 MIC 分别为 0.31、3.75、5.00、
5.00 mg/mL,而槲皮素-Fe 的 MIC 大于 5.00 mg/mL。槲皮
素-Zn 的抑菌作用强于槲皮素单体($P < 0.01$),而槲皮素-
Mn($P < 0.05$)、槲皮素-Cu($P < 0.01$)、槲皮素-Mg($P < 0.01$)、槲皮素-Fe 的抑菌活性弱于槲皮素单体。

表 1 槲皮素及其金属配合物的最小抑菌浓度

药物	最小抑菌浓度(mg/mL)					
	槲皮素	槲皮素-Zn	槲皮素-Mn	槲皮素-Cu	槲皮素-Mg	槲皮素-Fe
SA 标准菌株	1.88 \pm 0.63	0.31 \pm 0.00**	3.75 \pm 1.25*	5.00 \pm 0.00**	5.00 \pm 0.00**	>5.00
SA 耐药菌株	0.94 \pm 0.34	0.94 \pm 0.34	3.75 \pm 1.25**	3.75 \pm 1.25**	5.00 \pm 0.00**	>5.00
PA 标准菌株	0.94 \pm 0.34	0.47 \pm 0.17*	5.00 \pm 0.00**	1.88 \pm 0.63*	1.88 \pm 0.63*	0.94 \pm 0.34
PA 耐药菌株	1.88 \pm 0.63	0.63 \pm 0.00**	1.88 \pm 0.63	5.00 \pm 0.00**	5.00 \pm 0.00**	5.00 \pm 0.00**

注:“*”表示与槲皮素组相比差异显著($P < 0.05$),“**”表示与槲皮素组相比差异极显著($P < 0.01$)。

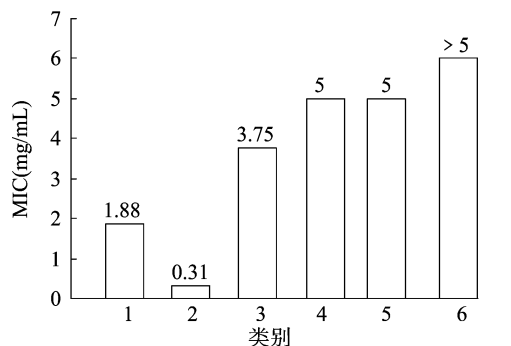


图 1 槲皮素及其金属配合物对 SA 标准菌株的 MIC

MIC 为 0.94 mg/mL,槲皮素-Zn、槲皮素-Mn、槲皮素-Cu、
槲皮素-Mg 的 MIC 分别为 0.94、3.75、3.75、5.00 mg/mL,而
槲皮素-Fe 的 MIC 大于 5 mg/mL。槲皮素-Zn 和槲皮素单
体的抑菌作用相当,而槲皮素-Mn($P < 0.01$)、槲皮素-Cu
($P < 0.01$)、槲皮素-Mg($P < 0.01$)、槲皮素-Fe 的抑菌活
性弱于槲皮素单体。

2.2 对 PA 的抗菌活性

对于 PA 标准菌株 ATCC25893,槲皮素单体的 MIC 为
0.94 mg/mL,槲皮素-Zn、槲皮素-Mn、槲皮素-Cu、槲皮
素-Mg、槲皮素-Fe 的 MIC 分别为 0.47、5.00、1.88、1.88、
0.94 mg/mL。槲皮素-Zn 的抑菌作用强于槲皮素单体($P < 0.05$),
槲皮素-Mn($P < 0.01$)、槲皮素-Cu($P < 0.05$)、槲皮素-
Mg($P < 0.05$)的抑菌活性弱于槲皮素单体,槲皮素-
Fe 和槲皮素单体的抑菌活性相当(表 1 和图 3)。

由表 1、图 2 可以看出,对于 SA 耐药菌株,槲皮素单体的

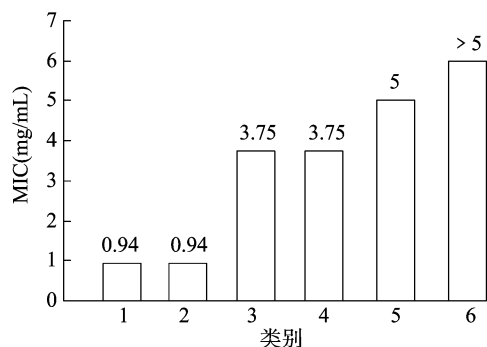


图2 槲皮素单体及其金属配合物对SA耐药菌株的MIC

对于PA耐药菌株,槲皮素单体的MIC为1.88 mg/mL,槲皮素-Zn、槲皮素-Mn、槲皮素-Cu、槲皮素-Mg、槲皮素-Fe的MIC分别为0.63、1.88、5.00、5.00、5.00 mg/mL。槲皮素-Zn的抑菌作用强于槲皮素单体($P < 0.01$),槲皮素-Mn和槲皮素单体的抑菌活性相当,槲皮素-Cu($P < 0.01$)、槲皮素-Mg($P < 0.01$)、槲皮素-Fe($P < 0.01$)的抑菌活性弱于槲皮素单体(表1和图4)。

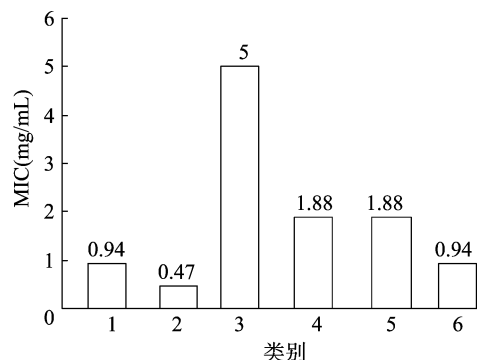


图3 槲皮素单体及其金属配合物对PA标准菌株的MIC

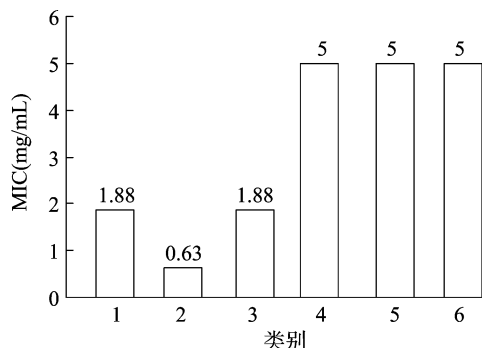


图4 槲皮素单体及其金属配合物对PA耐药菌株的MIC

3 讨论与结论

SA为革兰氏阳性菌(G^+),是引起化脓性感染(如毛囊炎、肺炎、脓毒症、败血症等)的常见致病菌之一^[11]。PA为革兰氏阴性菌(G^-),是引起医院感染的重要条件致病菌之一。近年来,随着抗生素的广泛应用,细菌的耐药性问题愈加突出,如耐药性SA、耐药性PA,这些耐药菌感染对人体健康都构成了极大威胁^[12-13]。中草药因为具有不良反应小、资源丰富、价格低廉、作用靶位多、不易产生耐药性等特点而受到越来越多的关注。作为鱼腥草有效成分之一的槲皮素,具有多

种生物活性,其作为金属离子螯合配体也一直倍受关注^[7]。本试验研究了槲皮素单体及其5种金属配合物对SA和PA的质控菌株、耐药菌株的抗菌活性。

通过研究发现,槲皮素、槲皮素-Zn、槲皮素-Mn、槲皮素-Cu、槲皮素-Mg、槲皮素-Fe对SA、PA的标准菌株和耐药菌株均有抗菌活性。其中,槲皮素-Zn的抗菌活性强于槲皮素单体,而其他金属配合物的抗菌活性要弱于槲皮素。对于SA标准菌株,槲皮素-Zn的抗菌活性最强,其MIC为0.31 mg/mL,其他抗菌活性强弱顺序为槲皮素、槲皮素-Mn、槲皮素-Cu、槲皮素-Mg、槲皮素-Fe;对于PA标准菌株,槲皮素-Zn的抗菌活性最强,其MIC为0.47 mg/mL,其他抗菌活性强弱顺序为槲皮素、槲皮素-Fe、槲皮素-Cu、槲皮素-Mg、槲皮素-Mn;对于SA耐药菌株,槲皮素-Zn和槲皮素抑菌活性相当,而其他金属配合物要弱于槲皮素;对于PA耐药菌株,槲皮素-Zn的抑菌活性要强于槲皮素,槲皮素-Mn和槲皮素的抑菌活性相当,其他金属配合物弱于槲皮素。本研究结果显示,槲皮素及其金属配合物可以抑制SA、PA的标准菌株和耐药菌株生长,从而为临床治疗耐药菌感染提供了试验基础,也为进一步开发利用槲皮素提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 孙谦,胡中海,孙志高,等. 鱼腥草的生物活性及其机理研究进展[J]. 食品科学,2014,35(23):354-356.
- [2] 李秀清. 中药鱼腥草的现代药理研究[J]. 黑龙江医药,2014,27(4):865-868.
- [3] 杨小孟. 中药鱼腥草化学成分和临床应用的研究进展[J]. 天津药学,2013,25(2):58-60.
- [4] 宝贵荣,萨仁高娃,孟和. 不同蒙药中槲皮素和总酚含量与抗氧化相关性研究[J]. 辽宁中医杂志,2016(3):586-589.
- [5] 房伟,李永年,察雪湘,等. 槲皮素和黄芪甲苷对多药耐药铜绿假单胞菌抗菌活性的研究[J]. 河南医学高等专科学校学报,2015(2):119-121.
- [6] Mukhopadhyay P, Prajapati A K. Quercetin in anti-diabetic research and strategies for improved quercetin bioavailability using polymer-based carriers - a review[J]. Rsc Advances,2015,5(118):97547-97562.
- [7] 翟广玉,渠文涛,马海英,等. 槲皮素金属配合物的研究进展[J]. 化学试剂,2013,35(2):140-146.
- [8] 赵凌旭,王蕾. 中药黄槿对金黄色葡萄球菌体外抑菌效果的初步研究[J]. 检验医学,2015,30(9):886-889.
- [9] 吴爱武. 临床微生物学检验实验指导[M]. 人民卫生出版社,2011,12(21):38-45.
- [10] 马建凤,刘华钢,朱丹. 中药体外抑菌研究的方法学进展[J]. 药物评价研究,2010,33(1):42-45.
- [11] 张添菊,李春阳,吴寒,等. 盐蒿提取液抗食源性致病菌活性及其抑菌机理[J]. 江苏农业学报,2017,33(4):932-937.
- [12] 林沛茹,梁志科,陈惠玲,等. 2007—2012年金黄色葡萄球菌的耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(5):975-977.
- [13] 郭小兵,贺小红,曹在秋,等. 临床分离铜绿假单胞菌10662株的分布及耐药性变迁[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(5):627-630.