

三丫苦茎总提取物及分段样品抗菌活性研究*

高英, 师冰, 颜宏, 詹易, 查雨锋, 张雪梅, 李续宏[△]

(云南省药物研究所/云南白药集团创新研发中心/云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111)

摘要: **目的** 考查三丫苦茎提取物体内、外抗菌活性。**方法** 体外实验采用肉汤连续二倍微孔稀释法测定三丫苦茎总提取物(SYK)对常见致病菌如金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌最小抑菌浓度(MIC);体内,采用对三丫苦茎总提取物敏感细菌尾静脉注射小鼠(亚致死剂量),复制细菌性脓毒症模型,考查三丫苦茎总提取物(SYK)及分段样品对细菌感染小鼠保护作用。**结果** 在所检测细菌中,SYK对两株金黄色葡萄球菌 ATCC29213、ATCC43300 的 MIC 值均为 12.5mg/mL (折算为 206.3mg 生药/mL),对其他细菌未检测出 MIC 值;与模型组比较,提前给予 SYK(2g/kg,折算为 33.0g 生药/kg)明显增加脓毒症小鼠 168h 生存率,差异具有统计学差异($P<0.01$);与模型组比较,SYK 20%、90%两个醇洗脱部位 SYK20、SYK90 明显提高脓毒症小鼠动物生存率(33.3% vs 16.7%, $P<0.05$;50% vs 16.7%, $P<0.01$)。SYK90 对脓毒症小鼠保护率最高,但与 SYK 比较,其动物保护率稍有降低。**结论** 体外,SYK 对金黄色葡萄球菌具有明显抑制作用;体内,SYK 及其分段样品 SYK20、90 对金黄色葡萄球菌感染小鼠具有明显保护作用。

关键词: 三丫苦; 细菌; 小鼠; 脓毒症

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)03-0028-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.03.007

三丫苦又名三叉苦,为芸香科植物 *Evodia lepta* (Spreng.) Merr. 的根、茎、叶,全年采收,分布我国南方诸省。本品性苦,寒,归心、肝经。具有清热解毒,祛风除湿,消肿止痛等功效。临床应用于疮痈肿痛、外感疫气诸症、风湿痹痛、跌打损伤^[1]。目前,该药已应用于三九感冒灵、三九胃泰等中成药中。

三丫苦中所含化学成分主要为黄酮类、生物碱类、挥发油、色烯^[2]等。研究表明,三丫苦提取物具有明显抗炎作用^[3-5]。钟希文发现,三丫苦水提取物明显抑制 0.6%醋酸所致小鼠扭体反应以及二甲苯所致小鼠耳廓肿胀度^[6]。Yoon 等研究证实,三丫苦乙醇提取物明显减少 LPS 刺激 RAW264.7 细胞产生 NO 和 PGE2 的水平,并且三丫苦乙醇提取物明显减轻乙醇/盐酸所致小鼠胃炎症状^[5]。到目前为止,国内外文献尚未见三丫苦抗细菌性脓毒症的基础或临床报道。

在本研究中,我们采用三丫苦茎总提取物及其分段样品,考查对常见致病菌体内、外抗菌活性,以期在

三丫苦茎中找到抗细菌性脓毒症物质。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 受试样品

三丫苦茎总提取物(SYK)、20%、40%、60%、80%、90%乙醇分段提取样品(SYK20、40、60、80、90),为褐色至绿色浸膏,提取率分别为 6.06%、62.14%、6.77%、10.16%、7.90%、5.53%,以上样品均由云南省药物研究所天然药物化学研究室李续宏制备。

1.1.2 剂量设定依据

前期急性毒性试验结果表明,SYK 小鼠灌胃给药最小致死量为 20g/kg(折算为 330.0g 生药/kg),最大耐受量为 16g/kg(折算为 264.0g 生药/kg)。取小鼠灌胃给药最小致死量的 1/20 为 SYK 药效实验灌胃给药低剂量,取小鼠灌胃给药最小致死量的 1/10 为 SYK 药效实验灌胃给药高剂量。SYK 分段样品药效实验给药剂量参照 SYK 给药剂量。

* 基金项目: 云南省中药和民族药创新重点实验室项目(20151G043)

收稿日期: 2017-04-26

作者简介: 高英(1982-),女,陕西合阳人,助理工程师,研究方向:抗感染药物筛选研究。

[△]通信作者: 李续宏, E-mail: 290404711@qq.com

1.1.3 菌株

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC29213、ATCC43300、大肠埃希菌 ATCC25922、ATCC35218、铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯菌 ATCC10031、粪肠球菌 ATCC29212、ATCC51299 均购自美国特种物品贮藏中心(ATCC),保存于云南省药物研究所药理研究室。

1.1.4 培养基

液体培养基配制:Luria-Bertani (LB)液体培养基(1L)配制:取 5g 酵母提取物(Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)(批号:LP0021)、10g 胰蛋白胨(Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)(批号:LP0042)、5g 氯化钠(上海试四赫维化工有限公司,批号:1306101),溶于纯水定容至 1L,121℃高压灭菌 15min;MUELLER-HINTON (MH)液体培养基(1L)配制:取 21g MUELLER-HINTON (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)(批号:CM0405)粉末溶于纯水定容至 1L,121℃高压灭菌 15min。

固体培养基配制:LB 固体培养基配制:将 LB 液体培养基与 10.0g 琼脂粉(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号:20091102)混合,定容至 500mL,使琼脂浓度达到 2%,121℃高压灭菌 15min,当溶液温度达到 50℃左右时倾倒入灭菌培养皿(直径=90mm)中,待其凝固后倒置放入 4℃冰箱保存备用;MH 固体培养基配制:将 19.0g MUELLER-HINTON AGAR 粉末(Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)(批号:CM0337)溶于纯水,定容至 500mL,121℃高压灭菌 15min,当溶液温度达到 50℃左右时倾倒入无菌培养皿(直径=90mm)中,待其凝固后倒置放入 4℃冰箱保存备用。

1.1.5 实验动物

SPF 级 ICR 种小鼠(18~22g)(雌雄各半),由辽宁长生生物科技有限公司提供,生产许可证号:SCXK(辽)2010-0001。动物饲养管理:塑料盒群养,雌雄分笼,每日喂饲鼠用配合饲料,自由饮水,视情况每周更换 2~3 次垫料。饲料来源于北京科澳协力饲料有限公司,许可证号:SCXK(京)2014-0010,发证机关:云南省科学技术厅。

1.1.6 仪器

JJ-2000 型电子天平,江苏常熟市双杰测试仪器厂;THZ-D 型台式恒温振荡器,江苏太仓实验设备

厂;Thermo Multiskan GO 全波长酶标仪,美国 BIO-RAD 公司;GNP-9270 隔水式恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 体外 SYK 对常见病原致病菌 MIC 值测定^[7]

分别从菌落平板上挑选金黄色葡萄球菌 ATCC29213、ATCC43300、大肠埃希菌 ATCC25922、ATCC35218、铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯菌 ATCC10031、粪肠球菌 ATCC29212、ATCC51299 分别接种于 MH、LB 液体培养基中,活化温度分别为 35℃、37℃100r/min 分别振荡培养 24h。待细菌活化后,再以 200r/min 振荡培养 6h。各菌活化后,制成菌悬液,采用紫外分光光度法测定细菌 OD600 值。

采用连续二倍微孔稀释法测定所有受试样品的 MIC 值,具体如下:将各菌浓度调整为 1×10^5 CFU/mL,96 孔培养板每排第 1 孔内加入 190μL 菌液,第 2 至第 12 孔内均加入 100μL 菌液。分别将受试样品 10μL 加入第 1 孔中,混匀后吸取 100μL 菌液加入第 2 孔中,继续混匀后再吸取 100μL 菌液加入第 3 孔。依次操作,最后,第 12 孔内溶液混匀后吸取 100μL 弃去。重复两次上述操作。同时,设立阳性对照(菌液)、阴性对照(液体培养基)、溶媒对照(生理盐水)。其中,溶媒对照加入方法和步骤同受试样品。

将盛有细菌的培养板分别置于 35℃、37℃培养箱中培养 18~24h。溶液清亮表示阴性(-),溶液混浊表示阳性(+);读出抑制细菌生长的最低样品浓度(minimal inhibition concentration, MIC)即为最小抑菌浓度。

1.2.2 SYK 系列样品对金黄色葡萄球菌感染小鼠保护作用^[7-8]

根据体外 MIC 检测结果,确定金黄色葡萄球菌 ATCC29213 为小鼠感染细菌。小鼠感染剂量选取亚致死攻击剂量,即 2.0×10^{10} CFU/kg。从金黄色葡萄球菌 ATCC29213 菌落平板上挑取单克隆,接种于 MH 液体培养基中,100 转 35℃振荡过夜活化。第 2 天取 1 次活化细菌按 1:200 比例 200 转 35℃快速振荡活化 6h。细菌悬液经 4 000r、4℃离心后弃上清,用生理盐水重悬,读取 OD600,调整细菌浓度至 1.0×10^{10} CFU/mL。选取 SPF 级 ICR 小鼠(18~22g),随机分为溶媒组、头孢呋辛组(200mg/kg)、SYK 各受试样品组,每组 12~15 只动物,雌雄各半。动物按体重分

别从尾静脉注射细菌,注射完毕立即给药 1 次,每天观察动物死亡情况,连续 7d。于实验结束时绘制动物生存曲线,并比较各组动物生存数量差异。

1.2.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行统计分析。计数资料 (生存率分析) 采用 Kaplan-Meier 法, Log-rank 检验, 取 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为检验水准。

2 实验结果

2.1 SYK 体外抗菌作用

体外抗菌结果表明, 在所检测细菌中, SYK 对两株金黄色葡萄球菌 ATCC29213、ATCC43300 MIC 值均为 12.5mg/mL (折算为 206.3mg 生药/mL), 对其他细菌均无明显抑菌作用 (表 1)。

表 1 SYK 对常见病原菌 MIC 值

菌株	MIC/(mg·mL ⁻¹)	
	SYK/(mg·mL ⁻¹)	头孢呋辛/(μ g·mL ⁻¹)
ATCC25922	>12.5	1
ATCC35218	>12.5	2
ATCC27853	>12.5	8
ATCC43300	12.5	2
ATCC29213	12.5	2
ATCC10031	>12.5	2
ATCC29212	>12.5	2
ATCC51299	>12.5	1

2.2 SYK 分段样品对金黄色葡萄球菌感染小鼠保护作用

与模型组比较, 提前给予 SYK (2g/kg, 折算为 33.0g 生药/kg) 明显增加脓毒症小鼠 168h 生存率, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$) (图 1);

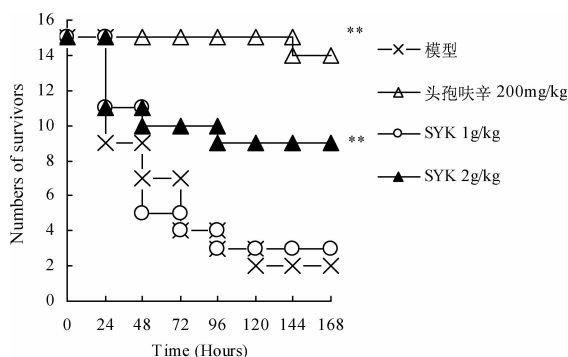
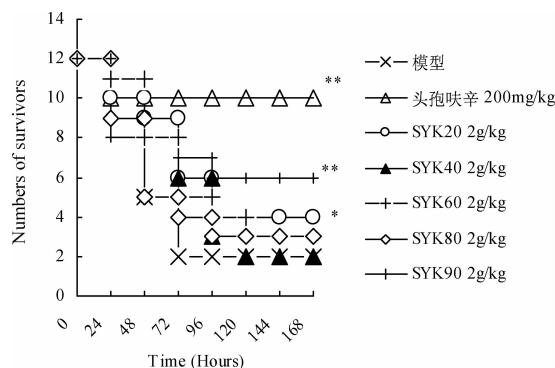


图 1 提前给予 SYK 对金黄色葡萄球菌 ATCC29213 攻击脓毒症小鼠生存数量影响

与模型组比较, 三丫苦茎总提取物 20%、90% 两个醇洗脱部位 SYK20、SYK90 明显提高脓毒症小鼠动物生存率 (33.3% vs 16.7%, $P<0.05$; 50% vs 16.7%, $P<0.01$)。SYK90 对脓毒症小鼠保护率最高, 但与 SYK 比较, 其动物保护率稍有降低 (图 2)。



注: 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 2 提前给予 SYK 分段部位对金黄色葡萄球菌 ATCC29213 攻击脓毒症小鼠生存率影响

3 讨论

临床上, 革兰阴性细菌严重感染通常会导致全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 的发生, 并最终发展为脓毒症 (sepsis)、脓毒性休克 (septic shock) 和多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) [19-20]。研究同样证实, 革兰阳性细菌 DNA 成分也是脓毒症发生的诱因之一, 它们通过激活哺乳动物单核-巨噬细胞、树突状细胞等多种免疫细胞, 诱导 TNF- α 、IL-1、IL-6 等致炎细胞因子释放, 引起 SIRS 和脓毒症 [21]。

据报道, 全球每年脓毒症的发病率高达 0.3%, 死亡率达 28~50% 甚至更高, 每年脓毒症发病人数超过 1 800 万人, 并且以每年 1.5%~9% 的速度增长, 十年来增长了 139% [22]。在美国, 脓毒症是前十位的死亡原因, 年死亡约为 23 万 6 千人, 年治疗费用高达 170 亿美元 [23]。

细菌导致机体出现感染性疾病的原因, 其一是细菌大量繁殖释放毒素导致组织器官的损伤; 其二是细菌成分通过激活免疫细胞, 诱导 TNF- α [24-25]、IL-1 [26-27]、IL-6 [24, 28]、NO [29] 等致炎细胞因子释放, 引起脓毒症的发生。

脓毒症的治疗包括常规治疗及附加治疗。前者主要为恰当的抗菌治疗、感染病灶的正确处理以及早

期积极复苏。早期经验性抗感染治疗对重症感染患者的预后非常关键。脓毒症的附加治疗目的在于试图阻断炎症级联反应从而改善机体对炎症反应的控制,但目前未能证明其有效性,仍然处在继续的研究与争论之中。

在本研究中,我们发现,提前给予 SYK 及其两个醇洗脱部位 SYK20、SYK90 明显增加脓毒症小鼠 168h 内生存率,差异具有统计学意义。相关文献报道,三丫苦提取物具有明显抗炎、镇痛作用^[5-6]。同时,三丫苦乙醇提取物明显减少 LPS 刺激 RAW264.7 细胞产生 NO 和 PGE2 的水平。因此,我们认为 SYK 及其分段洗脱部位 SYK20、SYK90 具有明显拮抗细菌性脓毒症效应可能与其较强的抗炎活性相关。后续研究中,我们将对 SYK 及其分段洗脱样品中的活性成分进行研究,明确其抗细菌性脓毒症物质基础。

参考文献:

- [1] 陈蔚文,高学敏. 中药学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012, 92.
- [2] 李斯达,褚晨亮,崔婷,等. 三丫苦茎枝化学成分的研究[J]. 中草药, 2017, 48(6): 1076-1079.
- [3] 林紫微,赵智萍,林志军,等. 海南三丫苦抗炎作用及机制研究[J]. 海南医学, 2016, 27(13): 2079-2081.
- [4] 魏荷琳,曾邦国,肖隆祥,等. 三丫苦叶中三个黄酮类化合物的体外抗炎症活性研究[J]. 产业与科技论坛, 2015, 14(12): 46-47.
- [5] Yoon JY, Jeong HY, Kim SH, et al. Methanol extract of *Evodia lepta* displays Syk/Src-targeted anti-inflammatory activity[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(3): 999-1007.
- [6] 钟希文,梅全喜,高玉桥,等. 三丫苦泡茶的抗炎、镇痛及解热作用[J]. 中药材, 2001, 24(9): 664-665.
- [7] Li B, Yao Q, Pan XC, et al. Artesunate enhances the antibacterial effect of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* by increasing antibiotic accumulation via inhibition of the multidrug efflux pump system AcrAB-ToIC. *J Antimicrob Chemother*[J]. 2011, 66(4): 769-777.
- [8] 杨景程. 脓毒症模型动物体内内毒素释放规律及其干预的实验研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2012.
- [9] Johansen ME. Hemostasis and endothelial damage during sepsis[J]. *Dan Med J*, 2015, 62(8): B5135.
- [10] Johnson K, Messier S. Early Onset Sepsis [J]. *S D Med*, 2016, 69(1): 29-33.
- [11] Liu HH, Zhang MW, Guo JB, et al. Procalcitonin and C-reactive protein in early diagnosis of sepsis caused by either Gram-negative or Gram-positive bacteria[J]. *Ir J Med Sci*, 2017, 186(1): 207-212.
- [12] Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock [J]. *Intensive Care Med*, 2008; 34(4): 783-785.
- [13] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care [J]. *Crit Care*, 2001, 29(7): 1303-1310.
- [14] Marton A, Kolozsi C, Kusz E, et al. Propylene-glycol aggravates LPS-induced sepsis through production of TNF- α and IL-6 [J]. *Iran J Immunol*, 2014, 11(12): 113-122.
- [15] Zhang M, Wang X, Bai B, et al. Oxymatrine protects against sepsis-induced myocardial injury via inhibition of the TNF- α /p38-MAPK/caspase-3 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1): 551-559.
- [16] Lang Y, Jiang Y, Gao M, et al. Interleukin-1 Receptor 2: a New Biomarker for Sepsis Diagnosis and Gram-negative/gram-positive Bacterial Differentiation [J]. *Shock*, 2017, 47(1): 119-124.
- [17] Grimaldi D, Goicoechea Turcott EW, Taccone FS. IL-1 receptor antagonist in sepsis: new findings with old data [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(9): 2379-2382.
- [18] Ríos-Toro JJ, Márquez-Coello M, García-Álvarez JM, et al. Soluble membrane receptors, interleukin 6, procalcitonin and C reactive protein as prognostic markers in patients with severe sepsis and septic shock [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175254.
- [19] Kumar D, Kumar A, Singh S, et al. Candidemia-induced pediatric sepsis and its association with free radicals, nitric oxide, and cytokine level in host [J]. *J Crit Care*, 2015, 30(2): 296-303.

(编辑:徐建平)

Antibacterial Properties of Total Extract and Ethanol Segments from Stem of *Evodia leptota* (Spreng.) Merr. against Common Pathogenic Bacteria in Vivo and in Vitro

GAO Ying, SHI Bing, YAN Hong, ZHAN Yi, ZHA Yufeng, ZHANG Xuemei, LI Xuhong

(Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming/Innovation and R&D Center, Yunnan Bai Yao Group, Kunming/
Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** Antibacterial properties of total extract and ethanol segments from stem of *Evodia leptota* (Spreng.) Merr. in vivo and in vitro. **Methods** In vitro, minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by using the serial 2-fold broth dilution methods. In vivo, a sepsis mouse model challenged with sublethal *Staphylococcus aureus* was established to evaluate the anti-infective effect of these samples. **Results** Except the MICs of the total extract for two *Staphylococcus aureus* strains ATCC29213, ATCC43300 were both 12.5 mg/ml (206.3 mg crude drug/ml), the total extract had no significant inhibition on other pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterococcus faecalis*. In vivo, compared with the model group, the total extract of *Evodia leptota* (Spreng.) Merr. significantly increased survival rate of the septic mice within 168 hours ($P < 0.01$). The survival rates were markedly higher in the segments (SYK20, 90)-treated groups than that in the model group ($P < 0.05$; $P < 0.01$). The survival rate was highest in the SYK90, but it was slightly lower than the total extract. **Conclusion** Taken together, in vitro, the total extract from *Evodia leptota* (Spreng.) Merr. significantly inhibits the growth of *Staphylococcus aureus*. In vivo, the total extract total extract and ethanol segments (SYK20, 90) significantly protects the sepsis mice challenged with sublethal *Staphylococcus aureus*.

KEY WORDS: *Evodia leptota* (Spreng.) Merr.; bacteria; mice; sepsis

(原文见第 15 页)

Effect of Juanbilijieqing Decoction on Joint Swelling Index and Inflammatory Factors in Synovial Tissues of Rats with Gouty Arthritis

ZHOU Biao^{1,3}, GUO Yuxing², LU Xiaolong², ZHOU Youliang¹, ZENG Peng², QI Xinyu¹, XIONG Hui¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The Second Hospital Affiliated to Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China;

3. The First People's Hospital of Xiangtan, Xiangtan 411101, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the effects of Juanbilijieqingfang on Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β), cyclooxygenase-2 (COX-2) and Transforming growth factor (TGF- β) expression levels in the knee joint synovium tissues, and explore the therapeutic mechanism of Juanbilijieqingfang in rats with monosodiumurate (MSU) crystals-induced gouty arthritis. **Methods** The rats were divided into normal group, model group, Juanbilijieqingfang group, Eloricoxib group. Each group of 12. In addition to the control group, the remaining 3 groups were given on Local intra-articular injection of sodium urate gouty arthritis rat model knee, The normal group and model group were ig administered with normal saline; various treatment groups were ig administered with corresponding doses for continuous 2 days. The knee circumference was measured at different time points before and after modeling, and the knee swelling index was calculated. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 and TGF- β in synovial tissue of rat knee were detected by ELISA. **Results** Data from our study showed that Compared with control group, The rat with gouty arthritis induced by MSU crystal demonstrated an elevation in TNF- α , IL-6, IL-1 β , COX-2 in synovium tissues ($P < 0.05$). While the content of TGF- β was significantly decreased ($P < 0.05$). And compared to Juanbilijieqingfang group, the rat knee swelling index in the model group was significantly lower ($P < 0.05$), and synovial tissue of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and COX-2) were significantly lower than those in Juanbilijieqingfang group ($P < 0.05$), while the levels of anti-inflammatory factor TGF- β were significantly higher than those of Juanbilijieqingfang group ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of Juanbilijieqingfang can effectively eliminate the inflammatory swelling of knee joint in gouty arthritis rats. The mechanism may be related to the inhibition of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and COX-2 in local tissue, while increasing the local tissue anti-inflammatory factor TGF- β content.

KEY WORDS: Juanbilijieqing Formula; gout arthritis; joint swelling index; inflammatory cytokines