

核桃楸树皮提取物对志贺氏菌抑菌效果研究

黄余龙 饶燕 黄山 黄妙婵

(东莞市人民医院药剂科 广东 东莞 523018)

摘要 目的 观察核桃楸树皮提取物对志贺氏菌的抑菌效果。方法 采用两倍稀释法和纸片琼脂扩散法考察核桃楸树皮提取物对志贺氏菌的抑菌作用。结果 核桃楸树皮提取物对痢疾志贺氏 I 型菌、痢疾志贺氏 II 型菌、鲍氏志贺 I 型菌、宋内氏志贺菌均为 0.0313g/mL,福氏志贺 II 型菌为 0.0625g/mL。结论 核桃楸树皮提取物对志贺氏菌均有良好的抑菌作用,各菌对药物的敏感强弱顺序为 宋内氏志贺菌 > 鲍氏志贺 I 型菌 > 痢疾志贺 I 型菌 > 痢疾志贺菌 II 型菌 > 福氏志贺 II 型菌。

关键词 核桃楸树皮 志贺氏菌 最低抑菌浓度 (MIC)

中图分类号 R285.5 R378.25 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 10-1921-03

Antibacterial Effect of Extract from Bark of Juglans Mandshurica on Shigella

HUANG Yu-long, RAO Yan, HUANG Shan, HUANG Miao-chan

(Department of Pharmacy Dongguan People's Hospital, Dongguan Guangdong 523018)

ABSTRACT Objective: Observation the antibacterial of Shigella by the juglans mandshurica maxim bark extraction. **Methods:** Using double dilution and disc agar diffusion method to study inhibition of Shigella bacteria in juglans mandshurica maxim bark extraction. **Results:** MIC of the juglans mandshurica maxim bark extraction on Shigella dysenteriae type I strain, Shigella dysenteriae type II strain, Shigella boydii type I and Shigella sonnei strain are 0.0313g/mL, Shigella bacteria type II strain is 0.0625g/mL type. **Conclusion:** The juglans mandshurica maxim bark extraction have good antimicrobial effect on Shigella, The order of drug-sensitive strains of the strength: Shigella sonnei strain > Shigella boydii type I strain > Shigella dysenteriae type I strain > Shigella dysenteriae type II strain > Shigella bacteria type II strain.

Key words: Cortex Juglandis Mandshuricae; Shigella; Minimum inhibitory concentration (MIC)

Chinese Library Classification (CLC): R285.5 R378.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 10-1921-03

核桃楸 (*Juglans MsndshuricaMaxim*) 为胡桃科 (*Juglandaceae*) 胡桃属植物,别名胡桃楸、山核桃,其种子、青果、皮均可入药^[1-4]。主要分布于我国东北地区,甘肃、四川等地也有少量分布。核桃楸是我国重要的药源植物,树皮又名楸树皮 (*Cortex Juglandis Mandshuricae*),味苦、辛,性寒,有清热解毒、明目之功效^[5]。楸树皮主要含黄酮类、萜类及其衍生物、二芳基庚酸类化合物和大量鞣质^[6-10]。现代研究表明,核桃楸具有抗菌、消炎、抗癌等作用,特别是抗肿瘤作用尤为显著^[11-13]。可用于治疗泄泻、痢疾、白带、目赤等。目前国内外对核桃楸树皮的研究,大部分集中在抗肿瘤作用的方面,对核桃楸树皮提取物抑菌作用的研究尚未见报道。临床上能引起痢疾症状的病原生物很多,有志贺氏菌、沙门氏菌、变形杆菌、大肠杆菌等,还有阿米巴原虫、鞭毛虫、以及病毒等均可引起人类痢疾,其中以志贺氏菌引起的细菌性痢疾最为常见。人类对志贺氏菌属 (*Shigella*) 的细菌有很高的易感性。在幼儿可引起急性中毒性菌痢,死亡率甚高。根据志贺氏菌抗原构造的不同,可分为四群 48 个血清型。本文以核桃楸树皮提取物对 A 群 (痢疾志贺氏 I 型、II 型菌)、B 群 (福氏志贺氏 II 型菌)、C 群 (鲍氏志贺氏 I 型)、D 群 (宋内氏志贺氏菌) 进行抑菌作用研究,以期为核桃楸树皮提取物的临床治疗细菌性痢疾提供基础。

1 实验材料

作者简介 黄余龙 (1974.9), 本科,主管药师,主要研究方面 医院药学。

电话 13686623766。 **电子邮箱** 1ghuangyulong@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-02-04 接受日期 2011-02-28)

1.1 原料

核桃楸树皮采购自黑龙江省伊里嘎山,为晒干后天然制品,经广东省药材公司鉴定符合《中国药典》2005 版一部规定。

1.2 药液制备

称取核桃楸树皮 100g,加水 400ml 浸泡 24h 后,加热 100℃ 30min,过滤,将滤渣再加 400ml 水,加热 100℃ 30min,过滤,将两次滤液混合并加热浓缩至 100 ml,生药含量为 1g·ml⁻¹,用 0.22μm 微孔滤器过滤除菌,按二倍法稀释成 0.5g·ml⁻¹、0.25g·ml⁻¹、0.125g·ml⁻¹、0.065g·ml⁻¹、0.0313g·ml⁻¹、0.0156g·ml⁻¹ 浓度,放入 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 药敏纸片的制备

将普通定性滤纸用打孔机打成若干圆形纸片,直径为 6.0 mm,置于干燥洁净的试管内,放入高压锅中经 121.3℃、15 min 高压灭菌后,取出放入恒温干燥箱内进行干燥。取经干燥后的纸片一定数量,每片吸取不同浓度的桃楸树皮提取物溶液 20μL,置于 37℃ 恒温箱中,待干,备用。

1.4 菌种

购自广东省疾病预防控制中心。痢疾志贺菌 I 型 (00518-2)、痢疾志贺菌 II 型 (00519)、福氏志贺菌 II 型 (00540-2)、宋氏志贺菌 (00503-3)、鲍氏志贺菌 I 型 (00575-2)。

1.5 菌液制备

宋氏志贺菌的增菌培养 无菌称取样品 25g 放入事先加有 0.5μg/mL 新生霉素的 50mL 志贺氏菌肉汤中,将此混悬液于室温中静置 10min 并时时振摇之。将浸液倾入灭菌的 500mL 锥形瓶中,调整 pH 至 7.2±0.2,再将此锥形瓶置于加有新鲜催化剂的厌氧缸中,厌氧罐置于 44.0℃ 水浴中培养 20h,振摇混悬

液后划线接种于麦康凯氏琼脂平板。于 35℃培养 20h。

对其他三种志贺氏菌的增菌培养亦按上述方法进行,但加入新生霉素量为 3μg/mL,并在厌氧环境下置 42.0℃水浴培养。取出作原菌液,再用无菌生理盐水稀释至 10⁻⁴,备用。

2 方法

2.1 核桃楸树皮提取物最低抑菌浓度(MIC)的测定

最低抑菌浓度(MIC)的测定用试管连续二倍稀释法。

将 10 支灭菌试管排成一行、编号,各加入灭菌普通肉汤 1mL,在第 1 管内加入 1g/mL 的提取物 1mL,混匀后吸取 1mL 到第 2 管,混匀再取 1mL 到第 3 管,依次类推到第 9 管,弃去 1mL,第 10 管不加提取物,然后每管加入菌液 0.1mL(菌悬液 106fu/mL),混匀,置 37℃恒温培养 24h。

结果判定 肉汤清亮透明表示无细菌生长(-),肉汤浑浊表示有细菌生长(+),以能抑制细菌生长的核桃楸树皮提取物最高稀释度作为其最低抑菌浓度(MIC)。以肉汤作阳性对照。

2.2 核桃楸树皮提取物的抑菌环直径测定。

MIC 的测定采用纸片琼脂扩散法^[14-15],取直径 12 cm 平

皿,倾入营养琼脂培养基 15 mL,冷凝后用灭菌的棉拭子蘸取供试菌液均匀涂抹在培养基表面,室温放置 2~3 min,用无菌镊子将在不同浓度的药液 (0.0625、0.0313、0.0156g/mL) 中浸润的纸片均匀间隔贴于各琼脂培养基表面,轻压纸片使接触良好,放入 37℃恒温培养箱中,24 h 后取出,观察抑菌圈,测量抑菌圈直径,并记录结果。每个菌种做 3 组平行,以无菌生理盐水为对照。判定标准 抑菌圈直径小于 9 mm 为低度敏感,9.1~11mm 为中度敏感,11.1~15 mm 为高度敏感。

3 结果

3.1 核桃楸树皮提取物最低抑菌浓度(MIC)的测定

与生理盐水空白对照试管相比较,可以明显看出试管内肉汤培养基的浑浊度,随着核桃楸树皮提取物浓度的增加,抑菌能力也增加,核桃楸树皮提取物对各菌株的最低抑菌浓度分别为 痢疾志贺氏 I 型菌、痢疾志贺氏 II 型菌、鲍氏志贺 I 型菌、宋内氏志贺菌均为 0.0313g/mL,福氏志贺 II 型菌为 0.0625g/mL,结果见表 1。

表 1 核桃楸树皮提取物的最低抑菌浓度(MIC)
Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) of the juglans mandshurica maxim bark extraction

菌株 Strain	稀 释 度 Dilution									生理盐水空白对照 Saline control
	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078	0.0039	0.00195	
痢疾志贺菌 I 型 Shigella dysenteriae type I strain	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
痢疾志贺菌 II 型 Shigella dysenteriae type II strain	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
福氏志贺菌 II 型 Shigella bacteria type II strain	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
宋内氏志贺菌 Shigella sonnei strain	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
鲍氏志贺菌 I 型 Shigella boydii type I strain	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-

注：“+”表示肉汤培养基呈浑浊现象,有细菌生长。“-”表示肉汤培养基呈澄清透明现象,无细菌生长
Note: “+” denotation broth was turbidity , bacteria growth. “-” denotation broth was clear and transparent, no bacterial growth

3.2 核桃楸树皮提取物的抑菌环直径测定

其结果见表 2。

表 2 不同浓度核桃楸树皮提取物的抑菌环直径测定 (n=3; x± s)
Table 2 The effect of inhibition zone measurement for different concentrations of the the juglans mandshurica maxim bark extraction (n = 3; x ± s)

药液浓度 (g/mL) Liquid concentration(g/mL)	痢疾志贺菌 I 型 Shigella dysenteriae type I strain	痢疾志贺菌 II 型 Shigella dysenteriae type II strain	福氏志贺菌 II 型 Shigella bacteria type II strain	宋内氏志贺菌 Shigella sonnei strain	鲍氏志贺菌 I 型 Shigella boydii type I strain
0.0625	15.56± 0.42	15.13 ± 0.46	14.25± 0.63	16.45± 0.49	15.78± 0.71
0.0313	13.25± 0.53	14.01± 0.37	13.25± 0.31	14.14± 0.76	13.24± 0.38
0.0156	12.21± 0.56	12.78± 0.48	7.37± 0.36	12.86± 0.63	11.59± 0.65

表 2 表明,核桃楸树皮提取物对志贺氏菌均有良好的抑菌作用,抑菌圈大小 宋内氏志贺菌 > 鲍氏志贺 I 型菌 > 痢疾志贺 I 型菌 > 痢疾志贺菌 II 型菌 > 福氏志贺 II 型菌

Table 2 shows .The juglans mandshurica maxim bark extraction have good antimicrobial effect on Shigella, The order of drug-sensitive strains of the strength : Shigella sonnei strain > Shigella boydii type I strain> Shigella dysenteriae type I strain> Shigella dysenteriae type II strain > Shigella bacteria type II strain

4 讨论

自然界中的病原体,如细菌的某一株可存在天然耐药性。当长期应用抗生素时,占多数的敏感菌株不断被杀灭,耐药菌株就大量繁殖,代替敏感菌株,而使细菌对该种药物的耐药率不断升高。目前认为后一种方式是产生耐药菌的主要原因。细菌性痢疾是由痢疾杆菌引起的常见肠道传染病。近年来,痢疾杆菌不断对某些抗菌药物产生耐药性。细菌耐药的出现,给疾病的治疗带来了很大的困难,痢疾杆菌可出现多重耐药,治疗颇为棘手,易造成病程迁延,甚至形成慢性细菌性痢疾,既给病人增加了经济负担,又给病人造成了精神痛苦。作为首选用药的复方新诺明、氨苄青霉素的耐药率已分别达到 86.2%和 90.7%,治疗往往难以起效。氨基糖苷类药对小儿耳、肾毒性的副作用,特别是对有对耳神经的不可逆损害引起耳聋的潜在危险,已不再作为 6 岁以内菌痢患儿的首选用药。氟喹酸为喹诺酮类药,在成人肠道感染治疗中已被广泛应用,但在儿科临床使用目前仍有争议,特别是对幼儿长骨发育可能有影响。国内部分地区报道 (1972-1974),志贺氏菌对四环素的耐药率达 74%、氯霉素 73.6-97%、链霉素 84-98%、合霉素 75-100%、磺胺类 97-100%,可见国内对常用几种抗菌素的耐药率相当高。本研究结果表明,核桃楸树皮提取物对志贺氏菌具有较好的抑菌作用,可为治疗由志贺氏菌引起的疾病提供参考。但究竟是哪一种成分在起作用,其作用机制如何,有待于进一步研究

参考文献 (References)

- [1] 石建辉,王金辉,车东,等.核桃楸树皮化学成分研究[J].中药研究与信息 2005,7 (1) :7-8
Shi Jian-hui, Wang Jin-hui, Che Dong, et al. Analysis of chemical components of the skin of Juglans Mandshurica Maxim [J]. Research & Information on Traditional Chinese Medicine 2005,7 (1) :7-8
- [2] 朱有昌.东北药用植物[M].黑龙江省科技出版社,1989,207-209
Zhu You-chang. Northeastern medicinal plants [M]. Heilongjiang Provincial Science and Technology Press, 1989: 207-209
- [3] 李敬芬,王建农,谷艳玲,等.核桃楸树皮化学成分的研究[J].佳木斯医学院学报,1994,17(6):1-3
Li Jingfen, Wang Jiannong, Gu Yan-ling, et al. Analysis of chemical components of the skin of Juglans Mandshurica Maxim [J]. Journal of Jiamusi Medical College, 1994,17 (6):1-3
- [4] 吴静娟.核桃楸皮等有效成分的药理与临床应用[J].中成药,2004,26 (3):230-232
Wu Jingjuan. Walnut skin and other active ingredients of Pharmacology and Clinical Application [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2004,26(3):230-232
- [5] 胡旭姣,赵肖君,周奋,等.山核桃提取物体外抗肿瘤作用研究[J].中华中医药学刊,2007,2(25):369-370
HU Xu-jiao, ZHAO Xiao-jun, ZHOU Fen, et al. The Anti-tumor Effects of Carya Cathayensis Sarg. Extracts in Vitro [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2007, 2 (25) : 369- 370
- [6] 王淑萍,孟祥颖,齐晓丽,等.核桃楸皮挥发油化学成分分析[J].

分析化学研究简报,2005,7(33) 961-964

- Wang Shu-ping, Meng Xiang-ying, Qi Xiao-li, et al. J. Analysis of chemical components in the volatile oil of the skin of Juglans Mandshurica Maxim [J]. Analytical Chemistry Bulletin, 2005,7 (33) :961 -964
- [7] 汤树良,摘译,桃楸茎皮中的抗补体活性成分[J].国外医学中医中药分册,2004,26(3) :177
Tang Shu-liang, Excerpt, The anti-complement activity ingredient in the bark of Juglans Mandshurica Maxim [J]. Foreign Medical Sciences, Chinese medicine volumes, 2004,26 (3): 177
 - [8] 孙墨琰,袁海舰,宋湛谦,等.分光光度法测定核桃楸树皮中胡桃醌的含量[J].东北林业大学学报,2007,35(6) 37-38
Sun Mo-long, Yuan Hai-jian Zhan Zhan-qian, et al. Determination of juglone content in the bark of Juglans Mandshurica Maxim by Spectrophotometry [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2007,35 (6) : 37-38
 - [9] Kyung-Seon L, Gao L, Sung Hwan K, et al. Cytotoxic Diaryl-hetanoids from the Roots of Juglans mandshurica [J]. Nat. Prod. 2002,65:1708-1717
 - [10] 张野平,杨志博,肃静洲,等.胡桃醌抗肿瘤作用研究[J].沈阳药学院学报,1987,4(3),166-169
Zhang Yeping Yang Zhibo Su Jingzhou, et al. Studies on antitumor action of Juglone [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 1987,4(3),166-169
 - [11] 程力惠,潘育方,卢丽霞.核桃楸树皮总黄酮提取方法及工艺研究[J].亚热带植物科学,2009,38 (4) :41-43
Cheng Li-hui, Pan Yu-fang, Lu Li-xia. Extraction methods and technology of total flavonoids in bark of Juglans Mandshurica Maxim [J]. Subtropical Plant Science, 2009,38 (4) :41-43
 - [12] 于晓红,胡艳文,于洋,等.山核桃树枝水煎剂对 s 80 荷瘤小鼠抗肿瘤作用的免疫机制研究[J].天津中医药,2006,23(5) :420-422
Yu Xiao-hong, Hu Yan-wen, Yu Yang, et al. The immune mechanism anti-tumor effect of s 80 tumor-bearing mice by the water decoction of Juglans Mandshurica Maxim bark. [J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2006,23(5) :420-422
 - [13] 王金兰,田孝平,郭洪利,等.山核桃树皮中生理活性成分的研究[J].齐齐哈尔大学学报,2004,20(3) :7-9
Wang Jin-lan, Tian Xiao-ping, Guo Hong-li, et al. Analysis of physiological activity constituents in Pecan bark. [J]. Journal of Qiqihar University, 2004,20 (3) :7-9
 - [14] 时维静,路振香,李立顺.白头翁不同提取物及复方体外抑菌作用的研究[J].中国中医药科技,2006,5 (13) :167
Shi Wei-jing, Lu Zhen-xiang, Li Li-shun. Research of antimicrobial effect in vitro of different extracts and compound of Pulsatilla [J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2006,5 (13): 167
 - [15] 卢芳国,朱应武,田道法,等.12 个中药复方体外抗菌作用的研究[J].湖南中医学院学报,2004,24 (4) :9-11
Lu Fang-guo, Zhu Ying-wu, Tian Dao-fa, etc. 12 Research of antimicrobial effect in vitro of 12 Chinese herbal Formulas [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan, 2004,24 (4) :9-11