

# 白头翁提取物体外抗结核杆菌作用的实验研究\*

★ 王淑英<sup>1\*\*</sup> 刘萌萌<sup>2</sup> 吴银萍<sup>1</sup> 岳苏华<sup>1</sup> (1. 河南科技大学医学院药理教研室 洛阳 471000; 2. 洛阳疾病控制预防中心结研所 洛阳 471003)

**摘要:**目的:观察白头翁提取物体外对结核杆菌的作用。方法:采用新鲜的人型结核分枝杆菌标准菌株(H37RV)、多药耐药以及速生结核菌株,分别接种于含有不同浓度白头翁正丁醇提取物、空白对照和阳性对照的结核菌培养基,观察结核分枝杆菌的生长情况。结果:空白对照组菌落生长情况正常,白头翁提取物组(1:10~1:20)均对新鲜结核菌和速生菌生长有抑制作用,其中白头翁提取物1:10对多药耐药菌株到培养终止期(40 d)仍无细菌生长。经恢复培养40 d均无结核菌生长。结论:一定浓度的白头翁提取物在体外有抗结核菌的作用,且有不可恢复的杀灭作用。

**关键词:**白头翁提取物;结核分枝杆菌;体外试验

中图分类号:R 285.5 文献标识码:A

## Experimental study of effects of Chinese bulbul extracts againsting Mycobacterium Tuberculosis in Vitro

WANG Shu-ying<sup>1</sup>, LIU Meng-meng<sup>2</sup>, WU Yin-ping<sup>1</sup>, YUE Su-hua<sup>1</sup>

1. Department of pharmacology in medical college of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000;  
2. Luoyang centers for disease control and prevention, Luoyang 471003

**Abstract: Objective:** To observe Chinese bulbul extract againsting Mycobacterium Tuberculosis in Vitro. Method: Mycobacterium Tuberculosis(H37RV), multidrug-resistant Tuberculosis and burgeoning Tuberculosis were respectively incubated in culture media with various content of the Chinese bulbul extract, blank control and positive control of TB medium. The results of growth of M. Tuberculosis

化学法只能作为一种定性方法,不能用于红花的质量考察;分光光度法是测定药材中总黄色素和总红色素;薄层层析法因各种因素的影响误差较大,其准确度和精密度难以令人满意,而且其中所得到的斑点并非单体化合物的特征斑点。并且2005版《中国药典》对于红花黄色素A的测定方法用的就是高效液相色谱法,所以参照药典决定用高效液相色谱法对于发酵后红花进行含量测定。

(3)羟基红花黄色素A虽具有较高的安全性、着色时色调比较自然等优点,但其稳定性较差不易在高温条件下提取或保存,在低温下具有一定的稳定性使其应用受到很大限制,因此必须采取有效措施来提高其稳定性。目前除了采用上述的提取方法对色素进行提取以提高色素稳定性外,主要的措施还有:加入稳定剂、抗氧化剂、金属离子封锁剂或天

然色素的改性。为了使红花黄色素在医药以及食品工业中得到更广泛的应用,我们在前人研究的基础上还需对其稳定性进行进一步研究。

### 参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:992.
- [2] 张贵君,徐国君. 常用中药鉴定大全[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1993:378.
- [3] 李中原,涂秀华. 红花黄色素的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(2):153-156.
- [4] 杨志福,梅其柄,蒋永培. 红花有效成分及药理作用[J]. 西北药学杂志,2001,16(3):131-133.
- [5] 张戈,郭美丽,等. 红花的化学成分研究[J]. 第二军医大学学报,2002,23(1):109-110.

(收稿日期:2008-11-19)

\* 基金项目:河南省科技攻关项目(62530007)

\*\* 作者简介:王淑英(女),1965-,学士,药理学副教授。E-mail:ylwsy@126.com。Tel:13693790490

were observed. Result: M. Tuberculosis was repressed in the culture medium with persisting to the end of the culture (40 d). The grain on the medium surface of 1:10 ~ 1:20 of Chinese bulbul extract can not be developed into bacterium. Conclusion: M. Tuberculosis could be killed in certain concentration of Chinese bulbul extract in vitro. it is unrecoverable exterminate action.

**Key Words:** Chinese bulbul extract; M. Tuberculosis; in vitro study

结核病是一慢性传染病,近20年来,由于艾滋病以及耐药等因素的影响,全球结核发病率呈上升趋势。国际上针对结核病已开发出近二十种药物,但均存在明显肝毒性,易产生耐药性等缺点。特别是耐药及多重耐药菌株的出现,更是对现有抗结核药物的挑战。为此寻找和开发新的抗结核药物是目前临床研究的重要课题。从化学合成物中寻找有效药物的难度日益增大,因此近年来从我国中药资源中寻找有效抗结核药物,受到越来越广泛的重视。资料报道白头翁有清热解毒,凉血止痢。能不同程度地抑制多种细菌、真菌、阿米巴原虫、阴道滴虫、流感病毒等;还有镇静、镇痛、抗痉挛以及清除自由基、抗衰老的作用。也有报道白头翁具有抑制结核杆菌又增强免疫的作用,可以对抗异烟肼和利福平引起的ALT升高及肝细胞死亡,同时对CCl<sub>4</sub>型肝损害有保护作用<sup>[1]</sup>。临床研究表明中药白头翁治疗淋巴结核有效<sup>[2]</sup>。而白头翁提取物对分枝杆菌的作用尚未见报道。为更好的指导临床,进一步开发新药,我们对白头翁中的成分进行了初步分离。本课题旨在探讨其有效成分的抗结核作用,对其抗结核有效部位及活性成分做进一步深入研究,为该药的临床应用提供可靠的理论依据。

## 1 材料

1.1 药物 白头翁正丁醇提取物,取白头翁500g,75%乙醇回流提取,提取物回收溶剂至无醇味,加适量蒸馏水溶解,用正丁醇萃取即得。由化工与制药研究所提供;在4℃条件下保存。配置浓度为60%(6g/10ml浸膏,相当于生药188.28g/10ml)。

1.2 培养基 改良罗氏培养基,由洛阳市疾病预防控制中心结核病研究所提供。试验中所用培养基有四种,分别为:空白对照组;阳性对照组(利福平5mg/ml);含不同浓度白头翁提取物(v/v制成1:10,1:20,1:40,1:80,1:60,1:320结核分枝杆菌培养基(实验组)<sup>[3,4]</sup>。各组培养基每试管10ml,摆斜面。

1.3 结核分枝杆菌 新鲜的人型结核分枝杆菌标准菌株(H37RV)、多药耐药菌株(INH/R, SM/R, RFP/R, EMB/R)、速生菌(培养12天就有菌生长),为本室(结核病研究所)保储菌株。

## 2 方法

2.1 白头翁提取物对抗结核标准菌株、多药耐药菌

株、速生菌株试验<sup>[5,6]</sup> 新鲜的人型结核分枝杆菌标准菌株(H37RV)、多药耐药菌株、速生菌株,经无药结核分枝杆菌培养基培养20~30d后,用生理盐水稀释结核分枝杆菌标准菌株(H37RV)为30亿菌/ml~60亿菌/ml的菌悬液;取上述菌悬液0.1ml接种于各组培养基表面。各组每个浓度设3个重复试验管。37℃条件下培养,每5d观察1次,培养40d后,以空白对照组结核分枝杆菌长满培养基斜面作为终止培养标准。每种菌做2个药液浓度(高浓度10<sup>-4</sup>mg/ml,低浓度10<sup>-6</sup>mg/ml)。

2.2 白头翁提取物抑制培养后结核杆菌恢复培养试验<sup>[7]</sup> 经含白头翁提取物培养基培养40d后,无肉眼可见菌落生长的培养基表面物进行结核分枝杆菌恢复培养。用生理盐水洗下无菌落生长的培养基表面颗粒状物,离心沉淀后接种于空白对照结核分枝杆菌培养基,37℃条件下培养,每5d观察1次,40d后终止培养,并以结核分枝杆菌标准菌株(H37RV)为对照。

2.3 结果观察和判断<sup>[8]</sup> 每5d观察1次培养基表面有无菌落形成情况。40d后若肉眼未见培养基表面菌落,取表面物进行抗酸染色,观察细菌抗酸染色情况和形态学变化。

## 3 结果

3.1 药物抗结核杆菌标准菌株(H37RV)试验结果见表1、表2、表3。

表1 白头翁提取物对新鲜结核标准菌株培养试验菌落生长结果

天数	空白对照		白头翁药物稀释度				性对照 利福平	
	高	低	1:10	1:20	1:40	1:80		1:160
10	+	+	+	+	+++	+++	+++	-
15	+	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-
20	+	+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-
25	+	+	-/-	-/-	+ + +	+ + +	+ + +	-
30	+++	+++	-/-	-/-	+ / +	+ + +	+ + +	-
35	+++	+++	-/-	-/-	+ + +	+ + +	+ + +	-
40	+++	+++	-/-	-/-	+ + +	+ + +	+ + +	-

注:“-”表示无结核杆菌生长;“\*/\*”表示低浓度药物结果/高浓度药物结果;“+”表示肉眼可见菌落面积小于培养基斜面的1/3;“+++”表示肉眼可见菌落面积占培养基斜面的1/3~2/3;“+++”表示肉眼可见菌落面积大于培养基斜面的2/3。

由表1可见,空白对照组的培养基表面30d后即长满结核杆菌,阳性对照组利福平5mg/ml连续40d的培养,培养基表面仍光滑,无结核菌生长。药物组在1:10、1:20时40d内无结核菌生长,其他稀释度在20d时可见结核菌生长。提示在40d培

养时间内,含有1:10~1:20白头翁提取物有明显抗结核杆菌的生长作用。

表2 白头翁提取物对多药耐药结核杆菌培养试验菌落生长观察结果

天数	空白对照	稀释度				
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
10	++++	-	-	-	-	-
15	++++	-	-	-	-	+
20	++++	-	-	+	+	+
25	++++	-	+	+	+	+
30	++++	-	+	++	++	++
35	++++	-	++	++	++	++
40	++++	-	++	++	+++	+++

由表2可见,空白对照组的培养基表面10d后即长满结核杆菌,药物组在1:10时40d内无结核菌生长,其他稀释度分别在20、15、10d时可见结核菌生长。实验结果显示白头翁提取物在1:10时对多药耐药菌有抑制作用。

表3 药物对速生结核杆菌培养试验菌落生长观察结果

天数	空白对照	稀释度					阳性对照 利福平
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	
10	++	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-
15	++	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-
20	++	-/-	-/-	+/-	+/+/+	+/+/+	-
25	+++	-/-	-/-	+/-	+/+/+	+/+/+	-
30	+++	-/-	-/-	+/-	+/+/+	+/+/+	-
35	+++	-/-	-/-	+/-	+/+/+	+/+/+	-
40	+++	-/-	-/-	+/-	+/+/+	+/+/+	-

由表3可见,空白对照组的培养基表面10d后即长满结核杆菌,药物组在1:10、1:20时40d内无结核菌生长;1:40时低浓度在20d可见结核菌生长,但高浓度40d内无结核菌生长;其他稀释度在20d即见结核菌生长。显示该提取物对速生菌有一定作用。

### 3.2 白头翁提取物抗结核杆菌培养后的恢复培养试验

抗结核杆菌培养试验40d后,含白头翁提取物1:10-1:20培养管仍无结核分枝杆菌生长,培养基表面物经抗酸染色,显微镜观察未见杆状菌体。对肉眼观察无可见菌落生长的表面颗粒状物进行恢复培养,1:10时40d无结核菌生长。1:20在35d见少

量菌。

## 4 讨论

开辟中医中药的抗结核病的研究,是一个有无限广阔前景的研究领域,临床报道中药白头翁治疗淋巴结核有效,通过对白头翁中的各种单体成分的分离提取,对其在体外的抑菌活性的研究作初步筛选,找出真正在抗结核治疗中发挥作用的成分,将有利于药物开发以及指导临床用药。

通过观察白头翁提取物对标准菌株、多药耐药菌株以及速生菌株的影响,探讨白头翁提取物对结核分枝杆菌的作用,实验结果表明,白头翁提取物(1:10、1:20v/v)40d内无结核标准菌株和速生菌株生长;药物组在1:10时40d内无多药耐药菌株生长。恢复培养实验显示药物组1:10时40d无结核菌生长。而且不能通过恢复培养而逆转。据此初步推测白头翁正丁醇提取物中有抗结核分枝杆菌作用。另有实验研究证实该提取物对CCl<sub>4</sub>所致肝损害有保护作用,因此对于结核病的合理治疗以及减少肝毒性具有重要意义。至于其他提取物的作用有待进一步探讨。

### 参考文献

- [1]王单,王淑英,吴银萍等.白头翁提取物对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用[J].现代中药研究与实践,2008,22(5):34-37.
- [2]路西明,王建刚,王建军.中药白头翁治疗淋巴结核52例[J].北京中医药大学学报,1995,3:52.
- [3]陈伟光,林霞,睢凤英.葎草抗结核分枝杆菌研究[J].时珍国医国药,2008,19(1):58-59.
- [4]宋文刚,孔翔宇,韩中波.茜草素在体外抗菌活性的研究[J].中国地方病防治杂志,2007,22(1):69-70.
- [5]赵奎君,刘锁兰,李洪敏.狼毒大戟中不同组分和成分抗结核杆菌作用的研究[J].中国药师,2007,10(11):1063-1065.
- [6]卢润生,郑德福,李定越.某中药抗结核菌药物效果实验研究[J].现代预防医学,2007,34(5):878-882.
- [7]赵中夫,刘明社,武延隽.巴豆油体外抗结核分枝杆菌作用实验研究[J].长治医学院学报,2004,18(1):1-3.
- [8]张家敏,张小贤,蒋锦琴.脱乙酰基利福喷丁抗结核杆菌生长活性的研究[J].现代中西医结合杂志,2004,13(19):2537-2538.

(收稿日期:2009-05-30)

## 专题征稿

《江西中医药》为中医药核心期刊,新设重点栏目《明医心鉴》,以介绍名老中医经验和中医临证心得为主,重点刊载中医关于疑难病的诊疗经验,要求观点、方法新,经验独到。涉及的病种主要有:小儿麻疹后遗症、红斑狼疮、类风湿性关节炎、慢性肾炎、哮喘、糖尿病、老年痴呆、高血压、中风、盆腔炎、萎缩性胃炎、癌症疼痛。欢迎广大中西医临床工作者不吝赐稿。