

芒果苷协同红霉素对痤疮致病菌抑菌作用的实验研究^{*}

农朝赞¹, 黄婵娟², 叶海洪¹, 黄之虎¹, 潘莉莉¹, 农少云¹, 韦仕喻¹, 郭凌霄¹, 吴玉清¹ (1. 广西壮族自治区民族医院临床科研实验室, 南宁 530001; 2. 广西壮族自治区瑞康医院检验科, 南宁 530011)

【摘要】 目的 观察芒果苷的抑菌作用方式, 为深入开发药用植物资源提供实验依据。**方法** 采用液体试管法培养金黄色葡萄球菌及痤疮丙酸杆菌, 按试管稀释法调整细菌浓度; 设置芒果苷组、芒果苷加红霉素组、红霉素组。观察各药物组对金黄色葡萄球菌及痤疮丙酸杆菌的抑菌作用。**结果** 芒果苷单独对金黄色葡萄球菌及痤疮丙酸杆菌的抑菌作用不明显; 但其与红霉素有强烈的协同抑菌作用, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的芒果苷能把红霉素作用于痤疮丙酸杆菌的最小抑菌浓度(MIC)从 117.43 $\mu\text{g/mL}$ 下降至 0.117 $\mu\text{g/mL}$, 有效降低红霉素的 MIC 浓度。**结论** 芒果苷与红霉素具有协同抑菌作用, 两者联合使用可降低红霉素的 MIC。

【关键词】 芒果; 皂苷类; 红霉素; 痤疮丙酸杆菌; 金黄色葡萄球菌; 微生物敏感性试验

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.01.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)01-0006-03

Study on bacteriostatic effect of mangiferin combined with erythromycin on pathogenic organisms of acne^{*} NONG Chao-zan¹, HUANG Chan-juan², YE Hai-hong¹, HUANG Zhi-hu¹, PAN Li-li¹, NONG Shao-yun¹, WEI Shi-yu¹, GUO Ling-xiao¹, WU Yu-qing¹ (1. Department of Laboratory for Clinical Scientific Study, Guangxi National Medical College, Nanning, Guangxi 530001, China; 2. Department of Laboratory, Guangxi Ruikang Hospital, Nanning, Guangxi 530011, China)

【Abstract】 Objective To observe the bacteriostatic effect of mangiferin and to provide the experimental evidence for further exploiting medical herbs. **Methods** The sensitive tests of propionibacterium acnes and Staphylococcus aureus to mangiferin and erythromycin were detected by series tube dilution. **Results** Both propionibacterium acnes and Staphylococcus aureus were not sensitive to mangiferin, while combined with erythromycin, mangiferin can change the minimal inhibitory concentration(MIC) of erythromycin; 100 $\mu\text{mol/L}$ of Mangiferin can reduce the MIC of the erythromycin from 117.43 $\mu\text{g/mL}$ to 0.117 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** Mangiferin and erythromycin have synergic bacteriostatic effect, their combination use can reduce MIC of erythromycin.

【Key words】 mangifera indica; saponins; erythromycin; propionibacterium acnes; Staphylococcus aureus; microbial sensitivity tests

痤疮是皮肤科的常见疾患, 是一种与性腺内分泌功能失调有关的毛囊、皮脂腺慢性炎症反应性皮肤病。其主要致病因素是存在于毛囊皮脂单位中的痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌, 红霉素对上述两种细菌高度敏感, 是目前临床治疗痤疮的首选药物^[1]。文献报道芒果苷有抗炎、抗过敏、抗变态作用的药理功效^[2-3]。近期, 作者运用芒果苷配合红霉素进行药物敏感试验, 发现芒果苷与红霉素具有协同作用, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试菌株 痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)标准菌株 ATCC6919 由广东省微生物研究所菌种保藏中心提供; 金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC29213 由卫生部临床检验中心提供。

1.1.2 试验药物 芒果苷为本实验室自行从芒果树叶中提取纯化, 按文献^[3]进行纯度鉴定, 纯度达 98%。红霉素购自 Sigma 公司, 相对分子质量为 0.734×10^3 , 货号 E 6376。

1.1.3 仪器与试剂 厌氧培养箱 YQX-II 型(上海新苗医疗器械制造有限公司), 光学显微镜为 Olympus 产品, 麦氏比浊管购自温州市康泰生物科技有限公司; 痤疮丙酸杆菌培养基为碎肉培养基。其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基配方 碎肉培养基: 蛋白胨 30 g, K_2HPO_4 5.0 g, 酵母提取物 5.0 g, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g, 碎肉提取浸出液 1 L, 碎肉粒 200 mL, 0.025% 刃天青 4.0 mL。肉汤培养基: 牛肉浸液(1:3) 1 000 mL, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g。

1.2.2 供试验培养基及药液的制备 培养基: 将培养基调节 pH 值为 7.1~7.2, 分装入小试管中, 塞子密封, 经 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30 min 置于冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 中保存备用。芒果苷药液: 称取一定量芒果苷, 用 2% NaHCO_3 溶液热溶解成 100 mmol/L 芒果苷母液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌备用; 红霉素药液: 称取一定量红霉素, 用无水乙醇溶液热溶解成 1 mmol/L 母液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌备用。

1.2.3 菌悬液的制备 将痤疮丙酸杆菌标准菌株转入碎肉培养基中, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养箱中, 厌氧环境增菌 48~72 h。取次代培养 24 h 的菌液用生理盐水稀释调整为 0.5 个麦氏比浊单位(约为 1.0×10^8 cfu/mL), 同法配制金黄色葡萄球菌悬液, 备用。

1.2.4 镜检观察 金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌均为革兰阳性菌, 革兰染色后置于 10 $\times$ 100 油镜镜检, 镜下见紫色球或/杆菌即为有细菌生长。

^{*} 基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(0640043)。

1.2.5 药敏试验管的制备 采用试管稀释法。芒果苷药液试验管:将芒果苷母液用肉汤培养基稀释成 40、20、10、8、4、2、1、0.5 mmol/L;红霉素药液试验管:将红霉素药液用肉汤培养基稀释成 640、320、160、80、40、20、10 $\mu\text{mol/L}$ 。芒果苷加红霉素药液试验管:将 1/1 000 上述红霉素梯度浓度按 1∶1 的体积比例分别加到 20、10、8、4、2、1、0.5 mmol/L 芒果苷梯度浓度中,置于试管(每管 2 mL)中即成。同时设空白对照管、细菌生长对照管、阳性对照管,每组设 4 个复管,观察各管细菌生长情况。

1.2.6 菌悬液的接种 用定量加样枪于上述每个药液管中加入新鲜配制的稀释菌液 200 μL ,摇匀,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温、厌氧环境中培养 72 h,观察结果。

1.2.7 结果判定 所有空白对照管、药物阴性对照管培养基均有细菌生长,说明溶剂对菌株生长无影响,对实验结果无干扰。任取两管中少量菌液涂于载玻片中,经革兰染色镜检可见蓝色的微小短棒状杆菌,未见其他杂菌,证明有痤疮丙酸杆菌生长。药物最小稀释管中细菌不生长者为该菌对药物的敏感度,按照药液含药量报告。

1.2.8 结果记录 “—”表示细菌不生长;“+”表示细菌生

长。“+”表示整张装片中发现 3~9 个细菌/100 个油镜视野;“++”表示 10~99 个细菌/100 个油镜视野;“+++”表示 1~9 个细菌/每个油镜视野;“++++”表示大于或等于 10 个细菌/每个油镜视野。

2 结 果

2.1 红霉素/芒果苷对痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌的抑制作用 为了解红霉素、芒果苷对痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌的抑制作用,本研究将红霉素肠溶片用液体培养基稀释成 640、320、160、80、40、20、10 $\mu\text{mol/L}$ 7 个梯度,将芒果苷母液用液体培养基稀释成 40、20、10、8、4、2、1、0.5 mmol/L 8 个浓度,试图找到两种实验药物的最小抑菌浓度(MIC)。结果显示,在本实验梯度浓度内,红霉素对痤疮丙酸杆菌的 MIC 为 160 $\mu\text{mol/L}$ (相当于 117.43 $\mu\text{g/mL}$);对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 20 $\mu\text{mol/L}$ (相当于 14.678 $\mu\text{g/mL}$),芒果苷对痤疮丙酸杆菌的 MIC 为 8 mmol/L(相当于 3 378.4 $\mu\text{g/mL}$);对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 20 $\mu\text{mol/L}$ (相当于 8 446 $\mu\text{g/mL}$)。提示较低浓度的红霉素对金黄色葡萄球菌及痤疮丙酸杆菌的抑菌作用明显有效,而低浓度的芒果苷对金黄色葡萄球菌及痤疮丙酸杆菌的抑菌作用不明显(表 1~2)。

表 1 红霉素对痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌的抑制作用

菌株	红霉素浓度($\mu\text{mol/L}$)							菌株对照
	640	320	160	80	40	20	10	
痤疮丙酸杆菌	—	—	—	++	++++	++++	++++	++++
金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	—	+++	++++

注:“—”表示细菌不生长;“+”表示细菌生长。

表 2 芒果苷对痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌的抑制作用

菌株	芒果苷浓度($\mu\text{mmol/L}$)								菌株对照
	40	20	10	8	4	2	1	0.5	
痤疮丙酸杆菌	—	—	—	—	+	++	+++	++++	++++
金黄色葡萄球菌	—	—	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

注:“—”表示细菌不生长;“+”表示细菌生长。

表 3 低浓度红霉素对痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌的抑制作用

菌株	红霉素浓度($\mu\text{mol/L}$)							菌株对照
	0.640	0.320	0.160	0.080	0.040	0.020	0.010	
痤疮丙酸杆菌	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
金黄色葡萄球菌	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

注:“—”表示细菌不生长;“+”表示细菌生长。

表 4 红霉素梯度低浓度配合不同芒果苷浓度作用于痤疮丙酸杆菌情况

红霉素浓度($\mu\text{mol/L}$)	芒果苷浓度($\mu\text{mol/L}$)						菌株对照
	200	100	80	40	20	10	
0.010	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.020	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.040	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.080	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.160	—	—	++	+++	++++	++++	++++
0.320	—	—	++	+++	++++	++++	++++
0.640	—	—	++	+++	++++	++++	++++

注:“—”表示细菌不生长;“+”表示细菌生长。

表 5 红霉素梯度低浓度配合不同芒果苷浓度作用于金黄色葡萄球菌情况

芒果苷浓度(μmol/L)	红霉素浓度(μmol/L)						菌株对照
	200	100	80	40	20	10	
0.010	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.020	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.040	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.080	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.160	—	—	+++	++++	++++	++++	++++
0.320	—	—	+++	++++	++++	++++	++++
0.640	—	—	+++	++++	++++	++++	++++

注:“—”表示细菌不生长;“+”表示细菌生长。

2.2 红霉素与芒果苷对痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌的协同抑菌作用 本研究设置了 0.640、0.320、0.160、0.080、0.040、0.020、0.010 μg 7 个红霉素低浓度梯度值,与低浓度的芒果苷梯度浓度 200、100、80、40、20、10 μg 进行相互配伍,观察各配伍方式对痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌的抑制作用。结果显示,低浓度红霉素对痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌无抑制作用,但与低浓度的芒果苷梯度浓度配合后,对痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌的作用明显,0.160 μg 红霉素与 100 μg 芒果苷即有强烈的协同抑菌作用,换言之,100 μg 芒果苷强烈地降低了红霉素对痤疮丙酸杆菌及金黄色葡萄球菌的 MIC,金黄色葡萄球菌为 150 多倍,而痤疮丙酸杆菌则为 1 000 倍(表 3~5)。

3 讨 论

痤疮是一种毛囊皮脂腺的慢性炎症和临床常见皮肤病,大多是因为青春期外周皮肤中雄激素水平过高,皮脂腺分泌旺盛,皮脂腺导管及毛孔角化栓塞,皮脂外流不畅,导致毛囊内寄生的各种微生物伺机大量繁殖,刺激毛囊引起炎症丘疹或脓包。其中以一直存在的痤疮丙酸杆菌的作用最为重要。痤疮丙酸杆菌是丙酸杆菌属的小杆菌,是定居于人类皮肤毛囊皮脂腺滤泡中最主要的微生物,为条件致病菌,常会引起内源性感染。有研究表明,痤疮丙酸杆菌的生长主要是靠分解三酰甘油作为营养,获取其能量,而去酯化的脂肪酸剩留于皮脂中且含量与细菌的数量呈正比^[4],这些游离脂肪酸可以引起粉刺并产生炎症反应刺激。痤疮丙酸杆菌还能产生很多胞外酶,其中有生物活性的酶包括酯酶、蛋白酶、透明质酸酶以及特异的炎前因子等,这些都可以诱发或加重痤疮的炎症反应。因此,用药物抑制或杀灭皮脂及毛囊内的痤疮杆菌,是目前治疗痤疮的重要手段之一。

一直以来,用抗生素治疗痤疮是临床常见的手法,但随着抗生素的不规范使用甚至滥用,导致细菌对药物的耐药现象越来越严重,最终结果将会是治疗失败。因此,开发新的治疗药物是目前迫切的需要。

芒果苷(亦称芒果苷)是一种黄酮类化合物,化学名为氧杂蒽酮 C-葡萄糖苷,系统名为 2-C-β-D-吡喃葡萄糖-1,3,6,7-四羟基氧杂蒽酮,存在于芒果树叶、扁桃叶、石苇、龙胆、知母等多种植物中。有文献报道芒果苷毒性小,具有抗炎、解热、祛痰、止咳等药理作用^[5-6]。芒果苷的抗炎作用机制是通过抑制肥大

细胞释放组胺,抑制机体局部毛细血管扩张,减少其通透性,从而实现其抗炎、抗过敏、抗变态作用的药理效应。

基于此,本研究利用芒果苷进行了痤疮丙酸杆菌的抑菌试验,结果显示,较高浓度的芒果苷对痤疮丙酸杆菌有一定的抑菌作用,但不如红霉素明显,其对痤疮丙酸杆菌的 MIC 为 8 mmol/L(相当于 3 378.4 μg/mL),对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 20 μmol/L(相当于 14.678 μg/mL);而红霉素对痤疮丙酸杆菌的 MIC 为 160 μmol/L(相当于 117.43 μg/mL);对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 20 μmol/L(相当于 14.678 mmol/L);100 μmol/L 的芒果苷能把红霉素对痤疮丙酸杆菌的 MIC 浓度从 117.43 μg/mL 下降至 0.117 μg/mL,由此降低了红霉素的使用量,尤其适用于临床治疗倡导的减少抗生素使用的实际。证实芒果苷与红霉素具有协同抑菌作用,两者联合使用可降低红霉素的 MIC。

参考文献

[1] El-Mahdy TS, Abdalla S, El-Domany R, et al. Systemic antibiotic therapy of acne vulgaris[J]. J Dtsch Dermatol Ges, 2010, 8(Suppl 1): 31-46.

[2] Bock C, Ternes W. The phenolic acids from bacterial degradation of the mangiferin aglycone are quantified in the feces of pigs after oral ingestion of an extract of Cyclopia genistoides(honeybush tea)[J]. Nutr Res, 2010, 30(5): 348-357.

[3] 周志勇,袁丁,黄鹤飞.天然产物抗单纯疱疹病毒的研究进展[J].中国药房,2010,21(3):383-385.

[4] Patel M, Bowe WP, Heughebaert C, et al. The development of antimicrobial resistance due to the antibiotic treatment of acne vulgaris; a review[J]. J Drugs Dermatol, 2010, 9(6): 655-664.

[5] 王志萍,邓家刚,谭珍媛.芒果苷片体外抑菌杀虫作用的实验研究[J].时珍国医国药,2009,20(9):2167-2168.

[6] 邓家刚,郑作文,郝二伟,等.芒果苷片治疗急性支气管炎的药效学研究[J].中成药,2010,32(2):300-303.

(收稿日期:2010-08-12)