

枸杞子浸出液对临床分离耐药菌体外抗菌活性的研究^{*}

师志云,李 刚,赵志军,贾 伟,魏 军(宁夏医科大学总医院医学实验中心,银川 750004)

【摘要】 目的 探讨枸杞子浸出液对临床分离耐药菌(金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯菌、白色念珠菌)的体外抑菌作用。**方法** 制备不同浓度枸杞子浸出液,采用稀释法测定浸出液对临床分离耐药菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。**结果** 不同浓度枸杞子浸出液对耐药菌均有一定程度抑菌效果,对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和粪肠球菌的抑菌作用强,对肺炎克雷伯菌和白色念珠菌的相对较弱。**结论** 枸杞子不同浓度浸出液对临床分离耐药菌有明显的体外抑菌效果,为进一步全面开发枸杞子药物价值提供依据。

【关键词】 枸杞子; 抑菌; 最小抑菌浓度; 最小杀菌浓度

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.16.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)16-1923-02

Study on antibacterial activity of wolfberry leaching solution against clinical resistant strains^{*} SHI Zhi-yun, LI Gang, ZHAO Zhi-jun, JIA Wei, WEI Jun (Clinical Laboratory Center, The Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

【Abstract】 Objective To study the antibacterial activity of wolfberry leaching solution against clinical resistant strains(*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicansil*). **Methods** We prepared different concentrations of wolfberry leaching solution, the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of wolfberry leaching solution were tested by dilution method. **Results** The results showed that the different concentrations of wolfberry leaching solution had different antibacterial activities as different degree. It showed that they had a strong inhibitory effort on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, but compared to *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicansil*, they had a weak inhibitory effect. **Conclusion** The wolfberry leaching solution with different concentrations has good antibacterial activity in vitro. It is profitable for the further study and use of wolfberry.

【Key words】 wolfberry; antibacterial activity; MIC; MBC

枸杞子是中国传统的名贵中药材,为茄科植物枸杞(*Lycium barbarum* L.)的成熟果实,其药用成分涉及面广,药用价值高,国内外科研机构开展了关于枸杞化学成分分析、药理学、免疫学、抗衰老、抗疲劳、抗氧化效能、抗肿瘤等基础方面的研究^[1-5],但对临床耐药菌抗菌谱研究尚鲜见报道。本文以枸杞子为原料,制备不同浓度浸出液,研究其对几种常见临床分离耐药菌的体外抑菌作用,并测定其最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC),旨在更好地体现枸杞子的药用价值,同时也为枸杞子的全面开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 枸杞子 市场销售。

1.1.2 供试菌株 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、白色念珠菌(*Candida albicansil*)均由宁夏医科大学总医院医学实验中心微生物实验室分离、鉴定、保存。

1.2 研究方法

1.2.1 枸杞子浸出液的制备方法 用新鲜生枸杞子果实 100 g,加水 500 mL,在 18~20 ℃ 温度中浸泡 24 h,文火煮沸 0.5 h 后过滤。再将其沉渣加水 400 mL 浸泡 4 h,煮沸 0.5 h 后用细菌过滤器过滤。然后将两次的滤液混合加热浓缩至 100 mL,即为 100% 溶液,其浓度相当于生药量 1 g/mL, -80 ℃ 保存。

1.2.2 培养基的配制 M-H(水解酪氨酸)肉汤培养基购自 Oxoid 公司。

1.2.3 菌悬液的制备 挑取冻干菌种适量,接种于普通肉汤培养基试管中,28 ℃ 培养 24 h,以接种环挑取菌液在琼脂平板上划线,培养 24 h,挑取单个菌落接种于普通肉汤培养基培养 16~18 h。取出后用比浊仪测定菌液浓度,用无菌水制成含菌量混浊度为 0.5 McFarland(比浊标准为 10⁸ CFU/mL),再将其稀释至 10⁷ CFU/mL 备用。

1.2.4 微量稀释法对 MIC 的测定 将 1 g/mL 枸杞子浸出液以肉汤倍比稀释成样品浓度分别为 50.0、25.0、12.5、6.25、3.13、1.57、0.79、0.40、0.20 g/L,采用微量稀释法测定 MIC,以能抑制细菌生长的最低浓度为 MIC。第 1 孔为 1 g/mL 枸杞子浸出液不加菌悬液阴性对照组,第 11 孔为肉汤加菌悬液阳性对照组。2~10 孔每孔加入 100 μL 稀释液,加 5 μL 菌悬液,菌液浓度近似为 5×10⁵ CFU/mL,混匀。微孔板在 37 ℃ 下培养 24 h,肉眼观察 MIC 值,以没有微生物生长的最小浓度为枸杞子浸出液对该菌的 MIC 值。重复 3 次,记录实验结果。

1.2.5 MBC 的测定 吸取枸杞子不同浓度浸出液的 MIC 和高于 MIC 浓度的各个梯度的试管中的培养物 0.1 mL,转接于营养琼脂培养基平板,37 ℃ 下培养 18~24 d 后观察有无菌落形成,无菌落形成的相应试管中的最低药物浓度即为该浓度浸出液对供试菌的 MBC。

2 结 果

2.1 MIC 和 MBC 采用稀释法对 7 种不同浓度枸杞浸出液

* 基金项目:宁夏医科大学科技项目资助课题(XQ200975)。

测定金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯菌(ESBL+)和白色念珠菌的 MIC 和 MBC,结果见表 1。不同浓度枸杞子浸出液对耐药菌均有一定程度抑菌效果,对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和粪肠球菌的抑菌作用强, MIC 均为 7.9 g/L, MBC 分别为 12.5、6.25 g/L 和 12.5 g/L;对肺炎克雷伯菌和白色念珠菌的相对较弱, MIC 分别为 31.3 g/L 和 15.7 g/L, MBC 分别为 25.0 g/L 和 12.5 g/L。

表 1 7 种不同浓度枸杞子浸出液的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

菌株	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	粪肠球菌	肺炎克雷伯菌(ESBL+)	白色念珠菌
MIC(g/L)	7.9	7.9	7.9	31.3	15.7
MBC(g/L)	12.5	6.25	12.5	25.0	12.5

3 讨 论

由于近年来抗生素的广泛使用,细菌和真菌的耐药现象越来越普遍,从天然产物中获取新的抗菌成分已成为目前抗菌方面研究的新重点^[6]。本实验采用稀释法对不同浓度枸杞子浸出液对临床分离耐药菌金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯菌和白色念珠菌的抑菌作用进行研究,证明不同枸杞子浸出液对耐药菌均有一定程度抑菌效果,对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和粪肠球菌的抑菌作用强,对肺炎克雷伯菌和白色念珠菌的相对较弱。

因此,本研究为枸杞子抗菌活性和抗菌机制的研究打下基础,为进一步开发枸杞子的药物价值提供了研究数据。由于该实验结果是在体外抑菌实验的研究基础上得到的,生物体内的免疫系统非常复杂,一种药物在机体内的杀菌效果与体外实验

是有差异的,关于枸杞子在机体内的杀菌效果还有待于进一步研究。

参考文献

[1] Sze SC, Song JX, Wong RN, et al. Application of SCAR (sequence characterized amplified region) analysis to authenticate *Lycium barbarum* (wolfberry) and its adulterants[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 51(1): 15-21.

[2] Leung AY. Traditional toxicity documentation of Chinese *Materia medica*-an overview[J]. *Toxicol Pathol*, 2006, 34(4): 319-326.

[3] Chan Z, Huat Tan BK, Chan SH. Activation of T lymphocytes by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(12): 1663-1671.

[4] Chang RC, So KF. Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far? [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(5): 643-652.

[5] Chen R, Moriya J, Yamakawa J, et al. Traditional Chinese medicine for chronic fatigue syndrome [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2010, 7(1): 3-10.

[6] 曾春兰, 钟振国. 中药抗菌作用的研究进展[J]. *广西中医学院学报*, 2006(1): 51-53.

(收稿日期: 2011-04-02)

(上接第 1922 页)
象多态性检测等方法被检测到。

作者运用 PCR-DGGE 分子技术对健康人口腔菌群进行研究,对 8 名健康个体唾液的微生物组成进行了分析,发现不同个体的菌群结构不仅在数量上有较大差异,而且出现了很多特异性条带。这一结果暗示了采用 PCR-DGGE 对口腔微生物多样性的检测是可行的。

口腔是微生物十分活跃的场所,研究人类口腔微生物的多样性及微生物的变化,对于了解人类自身的结构特征,防治人类口腔疾病,诸如龋齿的发生,以及人为控制口腔微生物与其宿主和微生物种群之间的平衡,有着重要意义。目前运用 DGGE 分子生物学技术监测和发现口腔内细菌群落,已作为研究微生物多样性的重要方法,在进一步研究口腔疾病领域必将得到更广泛的应用。

参考文献

[1] Jousset A, Lara E, Nikolausz M, et al. Application of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique as an efficient diagnostic tool for ciliate communities in soil[J]. *Sci Total Environ*. 2010, 408(5): 1221-1225.

[2] Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory [J]. *Proc Nati Acad Sci USA*, 1983, 80(6): 1579-1583.

[3] Li Z, He L, Miao X. Cultivable bacterial community from South China Sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis [J]. *Curr Micro-*

biol, 2007, 55(6): 465-472.

[4] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(11): 5721-5732.

[5] Bonetta S, Bonetta S, Carraro E, et al. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE[J]. *Food Microbiol*, 2008, 25(6): 786-792.

[6] Theunissen J, Britz TJ, Torriani S, et al. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis [J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 98(1): 11-21.

[7] Bruce JP, Sasan K. Boches, et al. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(12): 3770-3783.

[8] Steinum T, Sjøstad K, Falk K, et al. An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation[J]. *Aquaculture*, 2009, 293(3): 172-179.

[9] Prol-García JM, Planas M, Pintado J. Different colonization and residence time of *Listonella anguillarum* and *Vibrio splendidus* in the rotifer *Brachionus plicatilis* determined by real-time PCR and DGGE [J]. *Aquaculture*, 2010, 302(1): 26-35.

[10] Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, et al. Methods of studying soil microbial diversity [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 58(3): 169-188.

(收稿日期: 2011-04-07)