

富硒枸杞子对临床常见分离耐药菌体外抑菌活性的研究^{*}

马 锐¹, 杨风琴², 刘俊文¹, 万巧凤¹ (1. 宁夏医科大学高等卫生职业技术学院, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏医科大学检验学院, 宁夏银川 750004)

【摘要】 目的 探讨宁夏富硒枸杞子对 6 种临床常见分离耐药菌(金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、克柔假丝酵母菌、白色假丝酵母菌)体外抑菌活性的影响。**方法** 采用微量稀释法及滤纸片扩散法,测定不同浓度的宁夏枸杞子对几种常见细菌和真菌的抑制效果,设置 1.00、0.75、0.50、0.25 g/mL 4 种枸杞子浓度和空白对照组共 5 组,测定最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。**结果** 不同浓度宁夏枸杞子提取物对耐药菌均有一定的抑菌效果,空白对照组,0.25、0.50、0.75、1.00 g/mL 枸杞子浸出液对大肠埃希菌的抑菌环分别为 0.00、(22.78±0.31)、(23.80±0.29)、(27.57±0.47)、(30.89±0.51)mm;对铜绿假单胞菌的抑菌环分别为 0.00、(23.07±0.45)、(24.16±0.49)、(29.34±0.39)、(35.16±0.34)mm,并对铜绿假单胞菌绘制了生长曲线。不同浓度枸杞子提取物对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的抑菌作用强于其他 4 种细菌。**结论** 枸杞子不同浓度提取物对临床分离耐药菌有明显的体外抑菌效果,为进一步全面开发宁夏富硒枸杞子的药物价值提供了依据。

【关键词】 枸杞子; 抗菌活性; 耐药菌

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.05.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)05-0580-03

Antibacterial activity in vitro ofelenium enriched wolfberry fruit produced in Ningxia on six kinds of drug resistance bacteria^{*} MA Rui¹, YANG Feng-qin², LIU Jun-wen¹, WAN Qiao-feng¹ (1. Higher Health Vocational and Technical College of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Inspection Institute of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

【Abstract】 Objective Discuss the antibacterial activity in vitro of Ningxia selenium enriched wolfberry on 6 kinds of drug resistance bacteria which were common in clinic (Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida krusei, Candida albicans). **Methods** Microdilution method and filter paper dispersion method were used to determinate lixivium of clinically isolated strains of the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC), a total of five different concentration groups include the 1.00, 0.75, 0.50, 0.25 g/mL 4 kinds of medlar concentration and the blank control group were set up **Results** Different concentrations of medlar extracts have bacteriostatic effect on drug resistant bacteria, bacteriostatic ring of e. coli in 0 g/mL, 0.25 g/mL, 0.5 g/mL, 0.75 g/mL and 1 g/mL concentration medlar leaching liquid were respectively 0.00 mm, (22.78±0.31)mm, (23.80±0.29) mm, (27.57±0.47) mm and (30.89±0.51) mm; Bacteriostatic ring of pseudomonas aeruginosa were respectively 0.00 mm, (23.07±0.45) mm, (24.16±0.49)mm, (29.34±0.39) mm and (35.16±0.34)mm, and mapped the growth curve of pseudomonas aeruginosa. Bacteriostasis of different concentration medlar leaching liquid for escherichia coli and pseudomonas aeruginosa bacteriostasis was stronger than that for the other 4 kinds of bacteria. **Conclusion** Different concentration extracts of Wolfberry produced Ningxia have obvious bacteriostatic effect in vitro on clinical isolated drug-resistant bacteria, which provides basis for overall exploitation of medical value in ningxia selenium-rich wolfberry.

【Key words】 wolfberry; antibacterial activity; bacteriostasis

目前,国内外科研机构竞相开展了关于枸杞化学成分分析、药理学、免疫学、抗疲劳、抗肿瘤等基础方面的研究^[1-6],为枸杞的开发利用提供了理论支持。尽管我国对宁夏枸杞进行了大量的研究,但对枸杞的临床耐药菌抗菌机制研究尚鲜见报道。本文以枸杞子为原料,制备不同浓度浸出液,研究其对 6 种常见临床分离耐药菌(金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、克柔假丝酵母菌、白色念珠菌)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),分析抑菌圈直径;并根据结果绘制出铜绿假单胞菌在

提取液中的生长曲线,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 材料来源

1.1.1 枸杞子 富硒枸杞子是宁夏南梁农场科技人员采用生物转化技术培养的富含有机硒与超氧化物歧化酶(SOD)活性的全天然营养性枸杞果实。

1.1.2 实验菌株 金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌均由宁夏

^{*} 基金项目:宁夏自然科学基金(No: NZ11120);宁夏医科大学面上项目(ZC201101)。

作者简介:马锐(回族),女,讲师,硕士,主要从事病原微生物与免疫研究。

医科大学附属医院医学实验中心提供。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 实验仪器 电热恒温培养箱(DNP-9162),杭州汇尔实验设备有限公司生产;生物安全柜 BHC-1300 II A/B3,武汉爱斯佩科学仪器有限公司生产;全自动高压蒸汽灭菌器(YQX-LS50A),青岛海亿特机电科技发展有限公司生产;电子天平(AL-203),上海精科天美仪器有限公司生产。

1.2.2 实验试剂 1 000 μL 加样器、10~50 μL 加样器、加样器枪头、无菌试管、直径 75 mm 无菌培养皿。95%乙醇、无菌生理盐水均购自上海艾测电子专业销售有限公司。

1.3 研究方法

1.3.1 枸杞子浸出液的制备方法 称取全天然营养性枸杞果实 100 g,加水 500 mL,温度 18~20 ℃,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。然后将两次的过滤液,混合加热浓缩至 100 mL,即为 100%原液,其浓度相当于生药量 1 g/mL, -80 ℃保存。实验中再分别用蒸馏水稀释成 0.75、0.50、0.25 g/mL,同时,以蒸馏水作为空白对照组。

1.3.2 培养基的配制 水解酪蛋白液体培养基(批号 OWD-M0202)、水解酪蛋白琼脂培养基(批号 20120726)、沙保罗氏固体培养基(批号 20120921),上海江莱生物制品有限公司生产,使用时按使用说明配制。

1.3.3 菌悬液的配制 挑取冷冻菌种适量,接种于普通肉汤培养基试管中,28 ℃培养 24 h,用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。

1.3.4 微量稀释法进行 MIC 的测定 将全天然营养性枸杞果实原液用无菌蒸馏水溶解,配制为 1 g/mL 药液,用水解酪蛋白双料液体培养基从第 1 管进行倍比稀释至第 7 管,稀释倍数分别为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128,各管对应的药物浓度分别是 0.500、0.250、0.125 g/mL。每管加相应受试标准菌液各 50 μL,充分混匀,放置于 37 ℃培养箱培养 18~24 h。再从每一管中取培养物 10 μL,转种到水解酪蛋白琼脂培养基、沙保罗氏固体培养基上,用 L 棒涂布,置 37 ℃培养箱培养 18~24 h,以不生长菌落的最高药物稀释度为该药物对该种细菌的 MIC。做 3 次,取其平均值并记录实验结果。

表 2 不同浓度枸杞子浸出液对 6 种临床常见细菌的抑菌圈直径($\bar{x}\pm s$,mm)

组别	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	白假丝酵母菌	克柔假丝酵母菌
空白对照	0	0	0	0	0	0
枸杞子浸出液(g/mL)						
0.25	20.82±0.37	20.76±0.41	22.78±0.31	23.07±0.45	16.77±0.41	15.98±0.54
0.50	21.91±0.19	21.81±0.14	23.80±0.29 ^a	24.16±0.49 ^a	17.56±0.29	16.36±0.48
0.75	23.57±0.40 ^a	23.39±0.44 ^a	27.57±0.47 ^b	29.34±0.39 ^b	18.97±0.34	16.97±0.34
1.00	26.48±0.45 ^b	26.36±0.39 ^b	30.89±0.51 ^b	35.16±0.34 ^b	19.16±0.23 ^a	17.86±0.44 ^a

注:与 0.25 g/mL 浓度比较,^a*P*<0.05;^b*P*<0.01。

2.3 枸杞子对铜绿假单胞菌生长曲线的影响 宁夏全天然营养性枸杞子浸出液对铜绿假单胞菌生长曲线的影响结果见图 1。由图可知,枸杞子组中的铜绿假单胞菌在对数生长期明显

1.3.5 MBC 的测定 吸取全天然营养性枸杞不同浓度浸出液的 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。

1.3.6 琼脂扩散法 用无菌棉签蘸取菌液在普通琼脂平板上作均匀密集划线,待菌液干燥后,用外径 5 mm 的打孔器打孔,每孔加药液 200 μL,平放在 37 ℃温箱中培养 24 h 观察结果,测量抑菌圈直径。抑菌圈直径取 3 次实验结果的平均值。

1.3.7 设立对照 阴性对照:培养基不加菌;阳性对照:培养基加相应的菌。

1.3.8 铜绿假单胞菌生长曲线的绘制 将铜绿假单胞菌培养至对数生长期,按 2%的接种量加入到含 0.25 g/mL 全天然营养性枸杞子的牛肉膏蛋白胨液体培养基中,放入 37 ℃、120 r/min 摇床培养,在 0~52 h 中每 4 h 取样一次,用可见分光光度计在波长为 580 nm 下测定其吸光度值(A 值),加入等量无水乙醇为对照组,实验重复 3 次,取平均值。绘制枸杞子作用于铜绿假单胞菌的生长曲线。

2 结果

2.1 枸杞子浸出液对 6 种临床常见细菌的 MIC 和 MBC 不同浓度的枸杞子浸出液对耐药菌均有一定程度抑菌效果,但对铜绿假单胞菌、大肠埃希菌的抑菌作用强;对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌抑菌作用一般;而对克柔假丝酵母菌和白色念珠菌的相对较弱。结果见表 1。

表 1 枸杞子浸出液对 6 种临床常见细菌的 MIC 和 MBC

菌株	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	白假丝酵母菌	克柔假丝酵母菌
MIC	0.50	0.50	>0.50	0.125	>0.50	0.50
MBC	>0.50	0.50	0.50	0.250	>0.50	>0.50

2.2 不同浓度枸杞子浸出液对 6 种临床常见细菌的抑菌圈直径比较 采用稀释法对 4 种不同浓度枸杞子浸出液测定金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、克柔假丝酵母菌、白假丝酵母菌、铜绿假单胞菌的抑菌圈直径,随着浓度的增加,6 种细菌的抑菌圈直径增加,其中铜绿假单胞菌的增加最明显而且抑菌圈直径最大;而白假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌在不同浓度下,抑菌圈直径增加不明显。结果见表 2。

被抑制,8 h 的抑制率最高为 77.41%。24 h 时细菌浓度最高,但 A 值为 2.245,比对照组小 4%,随即二者均进入衰亡期,从图中可以看出,在 28 h 之前,枸杞子提取物严重地抑制了铜绿

假单胞菌的生长。

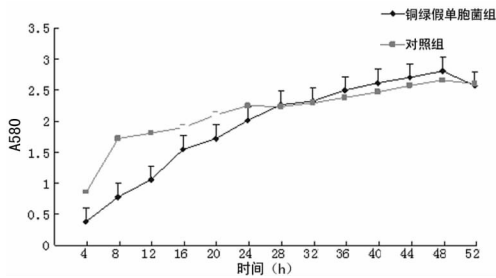


图 1 枸杞子对铜绿假单胞菌生长曲线的影响

3 讨 论

伴随分子生物学、生物化学和免疫学新技术的发展,许多研究者对于祖国传统中医中药的研发力度在逐步加强。宁夏回族自治区中宁县是全国枸杞的最好产地,宁夏地区食物中的含硒量极低,而通过生物技术培育的富硒枸杞,其抗氧化清除自由基的作用得到了强化^[7-8]。本研究初筛的枸杞抗菌活性物质是未知成分,其生物学性状未知,只能根据相关研究资料来设计实验方案。预期经过一步步实验得到比较理想的抗菌肽活性物质,为枸杞抗菌肽药效、药理学和抑菌机制的研究奠定了理论基础。

近年来,由于抗菌药物的广泛应用,耐药菌株逐年增多,据统计对青霉素 G 耐药的金黄色葡萄球菌已达 90% 以上,尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)已成为医院内感染最常见的致病菌^[9-11]。本文通过测定不同枸杞子浸出液对耐药菌的 MIC、MBC 和测量抑菌圈直径发现,不同枸杞子浸出液对耐药菌均有一定程度抑菌效果,其中对铜绿假单胞菌和大肠埃希菌的抑菌作用强,而对葡萄球菌的抑菌作用一般,对白色假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌的抑菌作用相对较弱。初步分析,由于革兰阳性菌和革兰阴性菌细胞壁成分、结构不同,枸杞子对于革兰阴性菌的抑制作用明显好于革兰阳性菌^[12],这对临床治疗选择合适的抗生素带来了便利。

在医源性感染中由铜绿假单胞菌引起者占 10% 左右,在某些特殊病房中,如烧伤和肿瘤病房、各种导管和内镜的治疗与检查室内,铜绿假单胞菌的感染率可高达 30%。同时,铜绿假单胞菌对许多抗生素具有天然或获得性耐药性,甚至多重耐药,给临床治疗带来极大困难。而本研究通过测量 MIC、MBC 和抑菌圈直径发现枸杞子浸出液对铜绿假单胞菌的抑菌作用强,故绘制出铜绿假单胞菌在提取液中的生长曲线,希望能为研究枸杞子作为抗铜绿假单胞菌新药提供了基础理论依据。同时,充分利用枸杞资源,获得抗菌活性成分,有利于宁夏枸杞的生产,进而有利于发展本地经济,增加产区人们的经济收入,

同时减少抗生素的大量使用,保护环境。

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] 黄泰康. 现代本草纲目[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 1891.

[3] Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(1): 5-18.

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

[5] Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, et al. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity[J]. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62 (Suppl 2): ii17-ii21.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 郑英丽, 周子君. 抗生素滥用的根源、危害及合理使用的策略[J]. *医院管理论坛*, 2007, 24(1): 23-27.

[9] Stefani S. WS01 basic mechanisms of resistance to antibiotics[J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2006, 29(1): 23-26.

[10] 刘畅, 樊明文. 针对细菌感染的治疗性疫苗研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(5): 445-448.

[11] 陈彤彤, 宋晓妍, 解树涛, 等. 植物源抗菌肽的研究进展[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(2): 420-426.

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

(收稿日期: 2013-09-17 修回日期: 2013-11-29)

(上接第 579 页)

nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8984-8992.

[12] Molek P, Strukelj B, Bratkovic T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors[J]. *Molecules*, 2011, 16(1): 857-887.

[13] Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(1): 239-247.

(收稿日期: 2013-09-22 修回日期: 2013-11-20)