

微量液基稀释法测定中药活性成分的体外抗曲霉菌活性*

谢小梅¹ 许 杨² 付颖媛³

(江西中医学院基础部 南昌 330006)¹

(江西-OAI 联合研究院 南昌大学食品科学教育部重点实验室 南昌 330047)²

(江西医学院 南昌 330006)³

摘要: 通过测定中药活性成分肉桂醛和柠檬醛对常见深部条件致病性真菌黄曲霉、烟曲霉的抗菌活性, 为建立中药抗曲霉菌药敏试验标准提供参考依据。参照美国国家临床试验标准化委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS)提出的标准, 用微量液基稀释法分别测定肉桂醛和柠檬醛对黄曲霉、烟曲霉的抗菌活性。肉桂醛对黄曲霉、烟曲霉最低抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)分别为: 0.100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 柠檬醛对黄曲霉、烟曲霉的 MIC 分别为: 2.600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.650 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。中药活性成分肉桂醛和柠檬醛具有高效抗曲霉作用。该研究可为制定中药抗曲霉作用评价标准提供参考依据。

关键词: 抗曲霉活性, 微量液基稀释法, 中药活性成分

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 06-0089-04

IN VITRO ANTI-ASPERGILLI ACTIVITY STUDY OF ACTIVE INGREDIENTS OF CHINESE HERBS BY BROTH MICRODILUTION TESTING*

XIE Xiao-Mei¹ XU Yang² FU Ying-Yuan³

(Jiang Xi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006)¹

(Key laboratory of food science of MOE, Jiangxi-OAI joint research institute, Nanchang University, Nanchang 330047)²

(Jiang Xi Medical College, Nanchang 330006)³

Abstract: To develop a method to estimate the anti-Aspergilli activity of active ingredients of Chinese herbs. With the broth microdilution testing procedure proposed by NCCLS, anti-Aspergilli activity of active ingredients (cinnamaldehyde, cinn. and citral) of Chinese herbs was determined. The MIC values of cinn. to *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* were 0.100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The MIC values of citral to *A. flavus*, *A. fumigatus* were 2.600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.650 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These results demonstrate that citral and cinn. have high potency activity against *Aspergillus* spp. The research may provide references to establishing a standard for evaluating the effect of anti-Aspergilli Chinese herbs.

Key words: Anti-Aspergilli activity, Broth microdilution testing, Active ingredients of Chinese herbs

近年来, 深部曲霉菌感染在艾滋病患者及其它原因致免疫功能低下患者中的发病率越来越高^[1]。用于临床的抗生素和化学合成药物极为有限, 抗真菌中药的研究将成为 21 世纪中医药研究热点内容之一。然而各个实验室对中药抗曲霉菌作用的评价方法不一, 实验结果难以进行比较, 有必要建立较稳定可靠的有关中药抗曲霉菌的体外评价方法, 并使其标准化。为此本试验参照 NCCLS 方案, 探讨并建立了中药活性成份抗临床常见曲霉菌的药敏实验方法, 为制订中药抗曲霉菌作用评价标准提供参考依据。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30160099)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30160099)

收稿日期: 2002-12-12, 修回日期: 2003-03-05

1 材料与方法

1.1.1 菌株：均为标准株：黄曲霉 CCCC MID A .2, 烟曲霉 CCCC MID A .1, 购自中国医学真菌中心。

1.1.2 培养液：RPMI1640 培养液：RPMI1640 (Gibco) 10g, NaHCO_3 2.0g, 吗啡啉丙磺酸 (morpholinepropanesulfonic acid, MOPS) 34.5g (0.165mol/L) 加三蒸水 900mL 溶解, 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.0 (25℃), 定容至 1, 000mL, 滤过消毒, 4℃ 保存。蔡氏培养液、药物基质培养液 (pH 5.5 ~ 5.6)。

1.1.3 试验药物：肉桂醛 (cinnamaldehyde)：上海双喜香料制剂厂生产, 分子式： $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}$, 比重 1.047 ~ 1.051, 柠檬醛 (citral)：德国进口, 分子量 152.24g/mol, 比重 0.887 ~ 0.889, 均用 75% 乙醇溶解备用。其他药物均为分析纯。

1.1.4 仪器：酶标仪, 真菌培养箱, 紫外分光光度计, 电子分析天平。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株生长曲线测定：用菌丝干重法^[2]。

1.2.2 菌液制备：将试验菌株接种于蔡氏斜面, 26℃ 培养至快速生长早期, 活化 2 次, 此时菌落覆盖斜面, 加入蔡氏液体或 RPMI1640 培养液, 吸管吹打菌落使孢子游离于培养液中, 用五层纱布过滤, 滤液经血细胞计数板计数及紫外分光光度计测定, 调整浓度为 10^6 CFU/mL (Colony forming unit, CFU)。

1.2.3 药物原液制备：3, 000 μL 75% 乙醇中加入 140.625 μL 柠檬醛, 得浓度为 41.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3, 000 μL 75% 乙醇中加入 18.75 μL 肉桂醛, 得浓度为 6.556 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 作为药物原液。

1.2.4 药敏板制备：取无菌有盖 96 微孔板 2 块, 于每排 1-11 孔分别加入蔡氏培养液或 RPMI1640 培养液各 200 μL , 1 号孔加入上述制备的药物原液 200 μL , 2-10 号孔 10 级倍比稀释, 使各孔的药物最终浓度为：肉桂醛：3.278、1.639、0.820、0.410、0.205、0.102、0.051、0.026、0.013、0.006 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 柠檬醛：20.813、10.406、5.203、2.602、1.301、0.650、0.325、0.163、0.081、0.041 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。11 号孔不加菌液, 其余各孔加上述制备的菌悬液 2 μL , 12 号孔加不含药物的基质培养液作阴性对照。

1.2.5 MIC 值的测定：酶标仪测定 OD 值：MIC 值定为真菌生长 80% 被抑制时的浓度^[3]。上述制备的药敏板于 26.5℃ 霉菌培养箱培养 4 ~ 7d 后, 用酶标仪于 450nm 处测各孔 OD 值, 与阴性对照孔对比, 以 OD 值下降 80% 以上的最低浓度孔中的药物浓度为 MIC_{80} 。上述试验平行操作 2 次, 当 MIC 能准确重复或只差一个浓度时才被接受, 并以较高浓度作为 MIC 值。

肉眼观察法：MIC 值为真菌生长受抑 75% 时的最低药物浓度^[4] (MIC_{75})：将上述药敏板同时连续观察培养两周, 以肉眼观察未见菌生长的最小药物浓度为 MIC_{75} 值。

2 结果

2.1 曲霉菌生长过程

用菌丝干重法测定了曲霉菌培养不同时间后的菌丝干重, 以培养时间为横坐标 (d), 菌丝干重为纵坐标 (mg), 绘出曲霉菌生长曲线。(图 1)

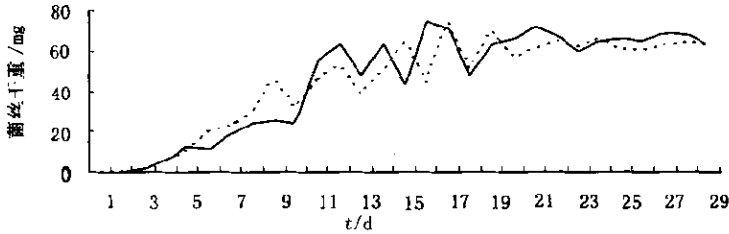


图1 培养不同时间(d)后的菌丝干重(mg)

····· 黄曲霉, — 烟曲霉

2.2 不同培养时间和培养基对 MIC 的影响

取处于快速生长期的菌,接种在不同培养基中,26.5℃培养不同时间后,测定 MIC 值,考察药敏板的不同培养时间和培养基对试验所得 MIC 值的影响,结果表明,用 RP-M11640 液 26.5℃培养 4d 后,药物对曲霉菌的 MIC 值不变(表 1)。

表 1 不同培养时间和培养基对 MIC₇₅的影响 (MIC₇₅, μg/mL)

菌株	肉桂醛			柠檬醛		
	4d	5d	6~11d	4d	5d	6~11d
黄曲霉	0.10	0.10	0.10	1.300	1.300	1.300
	0.051*	0.051*	0.10*	1.300*	1.300*	1.300*
烟曲霉	0.051	0.051	0.051	0.650	0.650	0.650
	0.050*	0.050*	0.051*	0.650*	0.650*	1.300*

*培养基为蔡氏培养液时的 MIC 值

2.3 不同终点判读法对 MIC 的影响

本次试验结果判定分别采用了酶标仪测定和肉眼观察法,发现两者结果非常接近(表 2)。

表 2 不同终点判读法对 MIC 的影响 (MIC, g/mL)

菌株	肉桂醛		柠檬醛	
	肉眼法	酶标仪法	肉眼法	酶标仪法
黄曲霉	0.102	0.102	1.300	2.601
烟曲霉	0.051	0.051	0.650	0.650

2.4 肉桂醛、柠檬醛的抗曲霉菌活性

本试验参照 NCCLS 方案测定了肉桂醛和柠檬醛对黄曲霉、烟曲霉的 MIC,参考郑玮清等^[5]的资料,认为中药活性成份肉桂醛和柠檬醛有良好的体外抗曲霉菌活性。

3 讨论

以往学者们对于抗真菌药敏试验所作的努力主要集中在致病性酵母菌方面,1992 年美国国家临床试验标准化委员会(NCCLS)提出了对两性霉素 B、5-氟胞嘧啶、酮康唑和氟康唑的药敏试验方案即酵母液基稀释法抗真菌药敏试验参考方案,该方案公布后,被多个实验室采用,得到了令人满意的效果。但对于霉菌仍未建立一个标准的药敏试验方案,特别是中药抗曲霉活性试验的标准方案目前仍是一个空白。由于原本罕见的曲霉病在艾滋病患者及其他免疫功能低下患者中发病率越来越高,研究对曲霉菌有效的抗真菌药物和建立标准的抗曲霉药敏试验方法,已成为当前抗真菌药物研究中

的一个突出而亟待解决的问题。

近年来,尽管发展了许多测定药物抗真菌活性的新技术,如流式细胞术^[6]和微机自动控制系统方法^[7]等,因需要昂贵的特殊设备,未能推广应用。本试验参照 NCCLS 方案,进行了抗曲霉菌的微量液基稀释药敏试验,得到了较为满意的结果。

药敏试验中,培养基的选择是影响 MIC 值的因素之一。本试验比较了 RPMI1640 培养液和蔡氏培养液对 MIC 的影响,发现两种培养液得到了一致的药敏试验结果(除肉桂醛对黄曲霉的 MIC 值相差一个浓度级外)。结合表 1 数据,认为 RPMI1640 培养液的结果更稳定。

菌的起始浓度也将影响 MIC 值, Espinel-Ingroff 等^[4,8]曾根据 NCCLS 方案进行了有关丝状真菌药敏试验的多中心研究,认为以 10^4 CFU/mL 作为接种的起始浓度,实验室内的一致性平均高达 90%。因此准确计数菌液起始浓度很重要。有试验报道,将曲霉菌在液体中振荡培养,或将曲霉菌从斜面刮下后,经强烈涡旋成混悬液后,再配成需要浓度,这些方法使菌液中存在大量成团的菌丝,不宜计数,将影响试验结果。本试验直接用 RPMI1640 培养液或蔡氏培养液冲洗培养至快速生长期曲霉菌菌落,并用五层纱布过滤,所得孢子液仅混有少量菌丝,有利于计数。同时,用分光光度计测 OD 值。以此方法制备的孢子液稍作调整即可用于药敏试验。

在以往研究中,对孵育温度和时间未采用统一标准。Schmit 等^[9]对曲霉菌选择了 35℃,培养 2d;张文娟等选择了 26.5℃,培养一周^[10]。考虑到受试药物的性质及大多数霉菌,本试验选择了 26.5℃,并观察了培养不同时间后 MIC 值的变化,表 1 结果显示,用 RPMI1640 培养液培养 4d 后,再延长培养时间其 MIC 值稳定不变。而蔡氏培养液的 MIC 值随着培养时间的延长就不那么稳定了。同时,本试验比较了不同终点判读法对 MIC 的影响,发现酶标仪分析法和肉眼观察法的 MIC 值除柠檬醛对黄曲霉的 MIC 值相差一个浓度级外,其余均相同。由于肉眼法直观简单,且与酶标法的结果非常一致,因此可直接用肉眼法进行终点判读。国外资料也表明,用肉眼观察法,实验室内结果一致性达到 93%~100%^[8]。

本试验参照 NCCLS 方案,用微量液基稀释法考察了不同培养液、不同培养时间、不同终点判读法对曲霉菌 MIC 值的影响,认为可用 RPMI1640 培养液 26.5℃培养 4d 后,以肉眼观察法判读 MIC 值。

综上所述,用 NCCLS 方案来指导中药的体外抗曲霉活性试验,并结合曲霉菌及受试药物的性质,限定培养基成份、pH 值、菌的接种浓度、孵育温度和时间以及终点的判读,这将有利于抗真菌中药的药敏试验标准化,推进中药的抗真菌作用研究。

参考文献

- [1] 陈世平. 真菌感染学, 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2000.
- [2] 李季伦, 张伟心, 许耀才, 等. 微生物生理学, 北京: 北京农业大学出版社, 1993, 442.
- [3] Pfaller M A, Barry A L. J Clin Microbiol, 1994, 32 (8): 1992.
- [4] Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, et al. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39 (2): 314~319.
- [5] 郑玮清, 王文莉, 李若瑜, 等. 中华医学检验杂志, 1999, 22 (6): 377~378.
- [6] Christoph W, Kwn FL, Bernhard P, et al. J Clin Microbiology, 1997, 35 (1): 5~10.
- [7] 陈瑞娥, 田口英绍, 富治诚, 等. 中华皮肤科杂志, 1995, 28 (6): 405~406.
- [8] Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, et al. J. Clin Microbiol, 1997, 35: 139~143.
- [9] Schmitt H J, Bernard E M, Andrade J, et al. Antimicrob Agents Chemother, 1988, 32: 780~781.
- [10] 张文娟. 临床皮肤科杂志, 1995, 4: 219~220.