

3 种中药对分枝杆菌抗菌作用的研究

李 国 利 庄 玉 辉

(解放军 309 医院结核病室,北京)

那学明 曾修超 张敦铨

(解放军 309 医院结核科,北京)

摘要 本文介绍野菊花、鱼腥草及鬼针草对强毒人型结核分枝杆菌 (H_3R_v)、堪萨斯分枝杆菌和胞内分枝杆菌的抗菌作用。结果表明,对 H_3R_v 野菊花水煎剂的最低抑菌浓度为 2.5mg/ml , 鱼腥草水煎剂为 10mg/ml , 鬼针草水煎剂未见明显作用;对堪萨斯分枝杆菌野菊花和鱼腥草水煎剂的最低抑菌浓度均为 10mg/ml , 鬼针草水煎剂为 5mg/ml ;对胞内分枝杆菌 3 种中药水煎剂均未显示出抗菌作用。选用有抗菌作用的中药,以超薄切片技术,电镜观察细胞超微结构变化特点。野菊花作用后的 H_3R_v 主要是细胞壁发生改变,破坏或消失,而鱼腥草使整个细胞超微结构破坏。野菊花和鱼腥草使堪萨斯分枝杆菌细胞的超微结构明显破坏。临床疗效有待观察。

关键词 野菊花;鱼腥草;鬼针草;分枝杆菌;抗菌作用

分枝杆菌尤其是非典型分枝杆菌对常用的抗结核菌药物存在着明显的耐药性。这是肺结核患者在化疗过程中常遭失败和非典型分枝杆菌病难治的一个主要原因。多年来,国内有的研究者^[1]筛选了大量的中草药,试图从中找到抗结核菌的有效药物及其成份。迄今为止,实验证明约有四、五十种中草药在试管内显示了

对人型结核分枝杆菌,十几种中草药对牛型结核分枝杆菌有抗菌作用^[2]。野菊花,鱼腥草和鬼针草是 3 种常用的,具有广谱抗菌作用的中草药,对致病性非典型分枝杆菌的抗菌作用及

中国科学院微生物研究所电镜室谢家仪等同志协助电镜检查;空军总医院检验科马复先主任医师审查电镜资料,在此一并致谢。

其可能作用的部位,目前未见报道。本文对野菊花、鱼腥草和鬼针草在试管内对强毒人型结核分枝杆菌($H_{37}Rv$)、堪萨斯分枝杆菌以及胞内分枝杆菌的抗菌效力,和可能的作用部位,进行了观察和研究。

材 料 和 方 法

(一) 中药样品来源

野菊花(*Chrysanthemum indie* Cum, L)和鬼针草(*Bidens bipinnata*, L)均采自北京市西郊黑山沪山上。鱼腥草(*Houttuynia Cordata* Thunb)购自北京市药品公司。前者使用干燥的头状花序,后两种使用全草。

(二) 中草药水煎剂和酒精浸剂的制备

参照文献[3]分别制备 100mg/ml 的 3 种中草药水煎剂和 10mg/ml 的 3 种中草药酒精浸剂。4℃ 冰箱保存备用。对照用的抗结核菌药品: PAS 为北京第三制药厂生产(批号 870519); RFP 为四川制药厂生产(批号 870403)。

(三) 培养基

改良苏通半流体培养基: 味精 8g, 枸橼酸 2g, 磷酸氢二钾 0.5g, 硫酸镁 0.5g, 枸橼酸铁铵 0.05g, 甘油 10ml, 加蒸馏水至 1000ml, 调 pH 至 7.2, 然后加琼脂 0.25g, 1kg/cm² 灭菌 20 分钟。分装试管, 每管 2.7ml。用无菌蒸馏水分别递倍连续稀释 3 种中草药 100mg/ml 水煎剂和 10mg/ml 酒精浸剂。3 种中草药水煎剂浓度均 100, 50, 25, 12.5, 6.25mg/ml, 3 种中草药酒精浸剂浓度均为 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625mg/ml。每管培养基内分别加入 0.3ml 已稀释好的 3 种中草药不同浓度的水煎剂和酒精浸剂。3 种中草药水煎剂在培养基内的终浓度为 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625mg/ml, 酒精浸剂终浓度为 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625mg/ml。RFP 在培养基内终浓度为 1.25, 0.63, 0.32, 0.16, 0.08μg/ml, PAS 终浓度为 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.315μg/ml。培养基不加药物作为对照。

(四) 供试菌种和菌悬液制备及接种

强毒人型结核分枝杆菌($H_{37}Rv$), 堪萨斯

分枝杆菌和胞内分枝杆菌均由中国药品生物制品检定所提供。取在改良罗氏培养基上生长 2—3 周龄的 $H_{37}Rv$, 堪萨斯分枝杆菌和胞内分枝杆菌培养物, 分别用生理盐水磨菌制备 3mg/ml (湿重) 菌悬液, 稀释至 3×10^{-2} mg/ml。每管含药与不含药对照培养基内加 0.1ml 3×10^{-2} mg/ml 菌悬液, 细菌在培养基内终浓度为 1×10^{-3} mg/ml。37℃ 培养, 4 周观察结果。表面呈菌膜状, 深部呈颗粒状生长者为(+); 不生长者为(-)。

(五) 超薄切片电镜标本的制备及透射电镜检查

取在改良罗氏培养基上生长 2—3 周龄的 $H_{37}Rv$ 和堪萨斯分枝杆菌, 分别磨菌后转种于 Dubos 培养基内, 每日上、下午各振摇一次, 使细菌均匀分散生长, 37℃ 培养 5 日后, 3000 r/min 离心 20 分钟。弃上清, 沉淀物重新悬浮于新鲜的 Dubos 培养基内, 制备 5mg/ml 菌悬液, 分装试管内, 每管再加入以各种中药的最低抑菌浓度的水煎剂。 $H_{37}Rv$ 加野菊花的终浓度为 2.5mg/ml, 鱼腥草为 10mg/ml。堪萨斯分枝杆菌加野菊花和鱼腥草的终浓度均为 10mg/ml。同时设不加药为对照组。上述各试管置 37℃ 培养 48 小时, 3000r/min 离心 20 分钟, 用生理盐水洗 2 遍。细菌沉淀物用 2.5% 戊二醛-锇酸双固定, 乙醇逐级脱水。Epon 812 树脂包埋, LKB-III 型切片机超薄切片。醋酸铅-柠檬酸铅双染色, 每份标本制备 2—3 个铜网。日立 H-600 透射电子显微镜观察菌体超微结构, 取能反应大部份细菌形态变化特点的视野照像。

结 果 和 讨 论

(一) 野菊花、鱼腥草及鬼针草水煎剂对分枝杆菌的抗菌作用(表 1)

从表 1 看出, 野菊花和鱼腥草对 $H_{37}Rv$ 有抗菌作用, 其最低抑菌浓度分别为 2.5 和 10mg/ml。鬼针草在所试范围内无明显抗菌作用。野菊花和鱼腥草对堪萨斯分枝杆菌的最低抑菌浓度均为 10mg/ml, 鬼针草为 5mg/ml。

表 1 3 种中草药水煎剂对分枝杆菌试管内抗菌作用

菌 种		加 入 的 药 物 与 浓 度																														
		野菊花 (mg/ml)						鱼腥草 (mg/ml)						鬼针草 (mg/ml)						RFP (μg/ml)						PAS (μg/ml)						不含药对照
		10	5.0		2.5		1.25		0.625		10	5.0		2.5		1.25		0.625		10	5.0		2.5		1.25		0.63		0.315			
			5.0	2.5	1.25	0.625	5.0	2.5	1.25	0.625		5.0	2.5	1.25	0.625	5.0	2.5	1.25	0.32		0.16	5.0	2.5	1.25	0.63	0.315						
强毒人型结核分枝杆菌		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
堪萨斯分枝杆菌		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+			
胞内分枝杆菌		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			

注：“-”：未见生长；“+”：生长；试验重复3次

表 2 3 种中草药酒精浸剂对分枝杆菌试管内抗菌作用

菌 种	加 入 的 药 物 与 浓 度																			
	野菊花 (mg/ml)					鱼腥草 (mg/ml)				鬼针草 (mg/ml)				95% 酒精 (ml/ml)					不含药 对照	
	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0005	0.00025	0.000125		0.0000625
强毒人型结核分枝杆菌	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	
堪萨斯分枝杆菌	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
胞内分枝杆菌	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	

注：同表 1



图1 中药作用后强毒人型结核菌超微结构图

- a. 未加药($\times 15000$) b. 加 2.5mg/ml 野菊花水煎剂作用后($\times 15000$)
c. 加 10mg/ml 鱼腥草水煎剂作用后($\times 15000$)

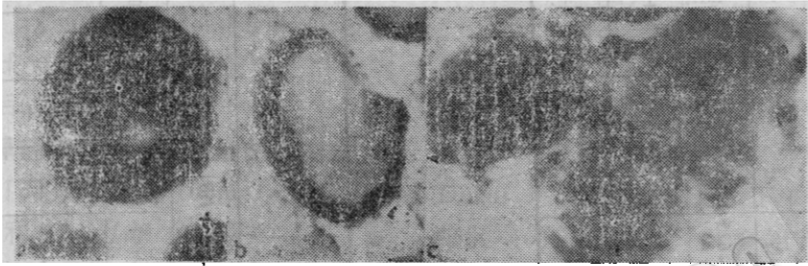


图2 中药作用后堪萨斯分枝杆菌超微结构图 a. 未加药($\times 25000$)
b. 加 10mg/ml 野菊花水煎剂作用后($\times 25000$) c. 加 10mg/ml
鱼腥草水煎剂作用后($\times 25000$)

3种中药对胞内分枝杆菌都未显示出抗菌作用。

(二) 野菊花、鱼腥草及鬼针草酒精浸剂对分枝杆菌的抗菌作用(表2)

在表2所列3种中草药酒精浸剂的浓度范围内,对 $H_{37}Rv$ 、堪萨斯分枝杆菌和胞内分枝杆菌均无抗菌作用。

上述结果表明,3种中草药的不同制剂对分枝杆菌的抗菌作用不同。水煎剂对 $H_{37}Rv$ 和堪萨斯分枝杆菌(鬼针草除外)均有一定的抗菌作用。

(三) 中药作用后的 $H_{37}Rv$ 和堪萨斯分枝杆菌细胞超微结构的变化特点

1. 强毒人型结核分枝杆菌 ($H_{37}Rv$): 未加药对照菌(图1-a),细胞壁光滑,由3层组成,2层深染,一层疏松浅染。下面为染色良好的细胞膜。质膜内陷形成间体,核区清晰,核糖体明显。经 2.5mg/ml 野菊花水煎剂作用后,该菌细胞超微结构发生变化(图1-b),特点是细胞壁粗糙,有的细胞壁与细胞膜破坏或消失,结构模糊。结果表明,野菊花水煎剂作用于 $H_{37}Rv$ 后,主要是细胞壁及膜发生变化。10

mg/ml 鱼腥草水煎剂作用后(图1-c),该菌细胞壁和细胞膜模糊、破坏、结构不清。间体结构模糊,呈雾散状。核区不清或消失。细胞质电子密度降低且不均匀,核糖体消失。该菌细胞的这些超微结构变化,说明鱼腥草水煎剂的作用明显强于野菊花。

2. 堪萨斯分枝杆菌: 未加药对照菌(图2-a),细胞壁粗糙有皱折,由三层组成,染色较深,细胞膜清晰可见,核区清晰,核糖体明显。该菌经 10mg/ml 野菊花水煎剂作用后(图2-b),细胞壁模糊不清,大部分消失,细胞质电子密度降低,而细胞周围电子密度明显增高,胞浆内容物外漏而消失。经 10mg/ml 鱼腥草水煎剂作用后(图2-c),该菌细胞壁和细胞膜破坏,菌细胞结构不清,核区模糊,胞浆内容物外漏。结果表明,堪萨斯分枝杆菌经野菊花或鱼腥草作用后,整个细胞的超微结构发生明显的变化。

参 考 文 献

- [1] 郭均等: 中国防痨杂志, 5: 481, 1984。
- [2] 周帮清编著: 常用中药的抗菌作用及其测定方法, 科学技术文献出版社重庆分社出版, 183—233 页, 1987

年。

1980。

[3] 阎邦首: 中华结核和呼吸系疾病杂志, 3(2): 123,