

# 贯叶连翘总提取物对致病细菌的抗菌作用

李宏<sup>1</sup>, 姜怀春<sup>2</sup>

(1. 重庆教育学院 生命科学和化学系, 重庆 400067; 2. 重庆工商大学, 重庆 400067)

**摘要:** 用平板抑菌法检测了贯叶连翘总提取物对细菌的抗菌谱范围, 用最低抑菌浓度(MIC)检测法、最低杀菌浓度(MBC)检测法检测了其抗菌作用的强弱。结果表明提取物对供试革兰氏阳性菌菌株均有较强的抑菌和杀菌作用, 对极少数革兰氏阴性菌菌株有较弱的抑菌作用, 无杀菌作用。该结果提示提取物抗菌作用可能与细菌细胞壁的结构与组成相关。

**关键词:** 贯叶连翘总提取物; 致病细菌; 抗菌作用

中图分类号: Q949.96 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)03-0466-03

## Antibacterial effects of the total extract of *Hypericum perforatum* on clinically isolated bacteria

LI Hong<sup>1</sup>, JIANG Huai-Chun<sup>2</sup>

(1. Department of Life Sciences and Chemistry, Chongqing College of Education, Chongqing 400067, China; 2. Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

**Abstract:** The antibacterial spectrum of the total extract of *Hypericum perforatum* L. and the extents of its antibacterial effects on clinically isolated bacteria were investigated. Inhibition zones, minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) were tested. The results showed that the total extract had strong inhibitory and bactericidal effects on the clinically isolated Gram-positive bacteria but had weak inhibitory effects on a few Gram-negative bacteria. These results indicate that its antibacterial effects might be mainly relevant to the structure and constituents of bacterial cell wall.

**Key words:** total extract of *Hypericum perforatum*; clinically isolated bacteria; antibacterial effect

贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L., HPL)总提取物(total extract of *Hypericum perforatum* L., TEHPL)已被西方国家用作临床抗抑郁药, 用于治疗中度和轻度抑郁症(Hubner等, 1994; Hippus, 1998), 因此其安全性已得到认可。光照时 HPL 还可抗病毒和肿瘤(Ebermann等, 1996; Weller等, 1997; Miccoli等, 1998; Prince等, 2000), 但因在光照时 HPL 可能产生光敏化副作用(Gulick等, 1999; Jacobson等, 2001), 使这两种作用的应用受到限制。笔者以非致病性细菌菌株为代表研究了 TEHPL 的抗菌作用和抗菌条件, 证明了其抗菌作

用不需光照(李宏等, 2002, 2005), 因此证明了其抗菌作用的安全性。但临床致病菌株与非致病菌株的生理、生化特征不同。因此为探讨 TEHPL 对临床分离致病菌的实际抗菌效果, 笔者探讨了其对致病菌株的抗菌作用, 以期为 HPL 临床抗菌的可行性提供一些实验数据。现将结果报道如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料

1.1.1 TEHPL 的制备 按李宏等(2005)的方法提

收稿日期: 2005-10-10 修回日期: 2006-10-22

基金项目: 重庆市教委科研基金(021501)[Supported by Research Foundation of Education Commission of Chongqing City(021501)]

作者简介: 李宏(1963-), 女, 重庆市人, 在读博士, 副教授, 研究方向: 微生物学、生物化学与分子生物学。

取 TEHPL, 用 40% 乙醇作溶剂将其配成不同浓度储备液。

1.1.2 供试菌种 临床分离致病细菌源于第三军医大学, 包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。其中革兰氏阳性菌菌株和革兰氏阴性菌中的非发酵菌菌株的耐药性见表 1。此外供试革兰氏阴性致病菌还有洛非氏不动杆菌(*Acinetobacter lwof fi*), 肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*), 普通变形杆菌(*Proteus*

*vulgaris*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*), 产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*), 嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilis*), 阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*), 卡他莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*), 食酸丛毛单胞菌(*Comamonas acidovorans*), 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)。

1.1.3 培养基、试剂和仪器 用 LB 培养基, 其余同

表 1 供试革兰氏阳性菌菌株和非发酵菌菌株的耐药性

Table 1 The resistance of clinically isolated Gram-positive and Non-fermentive bacteria

菌种名称 Strain names	菌株号 No.	耐抗生素种类 Resisted antibiotics	菌种名称 Strain names	菌株号 No.	耐抗生素种类 Resisted antibiotics
表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1642403	SXT, OX, E, DA	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	38857401	
	1658276	OX, E		1656227	
	1467321			091	
	1630982			1678644	
	393964	MEM, , CAZ, CXM, CTX		262	OX, VA, P, SXT, DA, AZM
	394784	TZP, KZ, CAZ, CXM, CTX, MEM, IPM		1658739	OX, E, DA
	3044401		木糖葡萄球菌 <i>S. xylosus</i>	995	SXT, VA, AZM
类白喉杆菌 <i>Corynebacterium diphtheroides</i>	400146	KZ, CFP, CAZ, CXM, CTX	非发酵菌 Non-fermentive bacteria	1647523	
	391406	TZP, FEP, KZ, CFP, CAZ, CXM, CTX, MEM, IPM		1703934	CN, SXT

SXT: 复方新诺明; OX: 苯唑西林; E: 红霉素; DA: 克林霉素; MEM: 美罗培南; CAZ: 头孢他定; CXM: 头孢呋新; CTX: 头孢噻肟; TZP: 哌拉西林/他唑巴坦; KZ: 头孢唑啉; IPM: 亚胺培南; VA: 万古霉素; P: 青霉素; AZM: 阿齐霉素; CFP: 头孢哌酮; CN: 庆大霉素。

李宏等(2005)。

## 1.2 TEHPL 抗菌作用的检测方法

(1) TEHPL 对供试菌株的平板抑菌检测: 活化各菌株至对数期, 用液体培养基调整 CFU 为  $1 \times 10^5$ /mL 后, 取 0.5 mL 涂平板。每株菌涂 6 个平板, 3 个点接 TEHPL 浸膏(每板点接 2 点, 每点 20 mg), 另 3 板不点接 TEHPL 作对照。将所有平板置 4 °C 过夜, 然后于 37 °C 培养 24 h, 检测抑菌圈有无并测量抑菌圈直径。出现抑菌圈的菌株才作 MIC 和 MBC 检测。

(2) MIC 检测: 参照祖若夫等(1993)的方法。在 14 支分别盛 3.8 mL 无菌液体培养基的试管中分别加不同浓度 TEHPL 储备液、40% 乙醇(作溶剂对照)、液体培养基(作空白对照)各 100  $\mu$ L, 使加 TEHPL 的各管中 TEHPL 终浓度分别为: 6.400、3.200、1.600、0.800、0.400、0.200、0.100、0.050、0.025、0.012、0.006、0.003 mg/mL。再在各管中分别加 100  $\mu$ L 菌悬液( $1 \times 10^5$  CFU/mL), 每株菌按此操作做 5 组重复。另取 14 支分别盛 3.9 mL 无菌液体培养基的试管, 除不加菌悬液外, 其余加样量同上, 这 14 管作为判定加菌悬液、且含相同浓度 TEHPL 的试管中菌株是否生长的比色对照标准。

所有试管于 37 °C (60 r/min) 培养 24 h, 以加菌悬液管中澄清度与未加菌悬液管中澄清度一致(通过检测 OD<sub>640</sub> nm 值确定)的试管中 TEHPL 最低浓度为 MIC 浓度。

(3) MBC 检测: 先用二倍稀释法(刘健等, 2000), 在 15 支分别盛 1.9 mL 对数期菌悬液( $1 \times 10^5$  CFU)的试管中分别加不同浓度 TEHPL 储备液、40% 乙醇(作溶剂对照)、液体培养基(作空白对照)各 100  $\mu$ L, 使加 TEHPL 的各管中 TEHPL 终浓度分别为: 12.800、6.400、3.200、1.600、0.800、0.400、0.200、0.100、0.050、0.025、0.012、0.006、0.003 mg/mL, 每株菌按此操作重复 5 组。将所有试管置 37 °C (60 r/min) 培养 24h, 取 25  $\mu$ L 菌悬液涂布于不含 TEHPL 的平板上培养 24 h, 无菌生长的平板所对应的最低 TEHPL 浓度即分别为 TEHPL 对各株菌的大致最低杀菌浓度。再按浓度梯度法检测 1 次, 此时各管中 TEHPL 的终浓度不是二倍稀释, 而是每次递增 0.05 mg/mL, 最低为 0.10 mg/mL, 最高浓度为已测出的 TEHPL 对各株菌的大致最低杀菌浓度, 以检测 TEHPL 对每株菌的较准确最低杀菌浓度(mg/mL)。每次检测时, 每株菌做 5 组重复。

## 2 结果

### 2.1 TEHPL 对供试细菌平板抑菌检测结果

从表 2 可知 TEHPL 对各供试革兰氏阳性菌菌株以及革兰氏阴性菌中非发酵菌菌株有抑菌作用。但 TEHPL 对其余供试革兰氏阴性菌菌株无抗菌作用, 抑菌圈直径为零。

### 2.2 MIC 和 MBC 的检测结果

从表 2 可知, MIC 的检测结果: 对于供试革兰氏阳性菌菌株和革兰氏阴性菌中的非发酵菌菌株, TEHPL 均在 MIC 浓度以及高于 MIC 浓度时完全抑制这些菌株生长。MBC 的检测结果: TEHPL 在一定浓度时, 均对各供试革兰氏阳性菌菌株有杀菌作用。对于非发酵菌菌株 1647523、1703934, 由于在 TEHPL 浓度高达 12.80 mg/mL 时, 试管中仍有

表 2 TEHPL 对革兰氏阳性菌菌株和非发酵菌菌株的平板抑菌、MIC 和 MBC 的检测结果

Table 2 The results of inhibition zones, MIC and MBC of TEHPL on the strains of clinically isolated Gram-positive and Non-fermentive bacteria

菌种名称 Strain names	菌株号 Strain No.	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zones (mm)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	菌种名称 Strain names	菌株号 Strain No.	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zones (mm)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
表皮葡萄球菌	1642403	11	0.100	0.75	金黄色葡萄球菌	38857401	12	0.100	0.70
<i>Staphylococcus</i>	1658276	17	0.050	0.35	<i>S. aureus</i>	1656227	13	0.100	0.65
<i>epidermidis</i>	1467321	16	0.050	0.40		091	14	0.050	0.45
	1630982	12	0.100	0.65		1678644	24	0.025	0.25
	393964	9	0.200	0.85		262	15	0.050	0.50
	394784	22	0.025	0.30		1658739	17	0.050	0.45
	3044401	15	0.050	0.45	木糖葡萄球菌	995	16	0.050	0.45
类白喉杆菌	400146	11	0.100	0.70	<i>S. xylosus</i>				
<i>Corynebacterium</i>	391406	10	0.100	0.80	非发酵菌 Non-fermentive bacteria	1647523	11	0.100	12.80 时也存活
<i>diphtheroides</i>						1703934	8	0.200	12.80 时也存活

菌存活, 说明其对这两株菌没有杀菌作用。

## 3 讨论

由于笔者已证明 TEHPL 抗菌不需光照, 所以所有检测均未光照处理。实验中所有供试细菌菌株全部为医院直接从患者身上分离的致病菌菌株, TEHPL 对其中革兰氏阳性菌菌株均有较强抑菌和杀菌作用, 只是对不同菌株(包括同种菌的不同菌株), 其 MIC 和 MBC 不同; TEHPL 只对其中的非发酵菌菌株有抑菌作用, 对其余革兰氏阴性菌菌株无抗菌作用。这些结果提示 TEHPL 可主要用于抗临床革兰氏阳性致病菌菌株所致感染。

因为所有供试菌株均进行过临床抗生素药敏检测, 以选择敏感抗生素用于对患者的治疗, 所以供试菌株均有相应的临床常用抗生素耐药性检测记载(表 1)。例如表皮葡萄球菌菌株 1658276 对 OX、E 有耐药性, 金黄色葡萄球菌菌株 262 对 OX、VA、AZM、P、SXT、DA 有耐药性, 类白喉杆菌菌株 400146 对 KZ、CFP、CAZ、CXM、CTX 有耐药性, 而 TEHPL 对这些菌株均有抑菌和杀菌作用, 这表明

TEHPL 可用于控制临床上对多种抗生素有耐药性的革兰氏阳性致病菌菌株引起的感染。

革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的主要区别在于其细胞壁的组成和结构不同, 因此结果提示 TEHPL 抗菌机制有可能与细菌细胞壁的结构和组成有关。

### 参考文献:

- 祖若夫, 胡宝龙, 周德庆. 1993. 微生物学实验教程[M]. 上海: 复旦大学出版社: 192-193
- Ebermann R, Alth G, Kreitner M, et al. 1996. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells[J]. *J Photochem Photobiol B*, 36(2): 95-97
- Gulick RM, McAuliffe V, Holden-Wiltse J, et al. 1999. Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's Wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults. AIDS Clinical trials group protocols 150 and 258 [J]. *Ann Intern Med*, 130(6): 510-514
- Hippius H. 1998. St John's Wort (*Hypericum perforatum*)-a herbal antidepressant[J]. *Curr Med Res Opin*, 14(3): 171-184
- Hubner WD, Lande S, Podzuweit H. 1994. *Hypericum* treatment of mild depressions with somatic symptoms[J]. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 7(Suppl 1): 12-14
- Jacobson JM, Feinman L, Liebes L, et al. 2001. Pharmacokinetics, safety, and antiviral effects of hypericin, a derivative of St. John's
- (下转第 465 页 Continue on page 465)

要高,因此从生产成本与生产效率综合考虑,选择 2 水平则更适宜于工业化生产;B 因素对脱色率、总甙收得率影响都不大,适于微滤过滤液固形物含量前后不一致的连续生产工艺流程,验证了生产可连续性;C 因素中对脱色率影响较少,随着洗水量的增加总甙收得率越高,初步浓缩时采用高效膜技术,对生产成本影响很少,因此可选择 3 水平。因此综合考虑各方面因素,确定最优脱色工艺为: A<sub>2</sub>BC<sub>3</sub>, 树脂重量 3 倍的鲜罗汉果果汁、果汁固形物含量为工艺流程中的任意含量、洗水量为脱色材料的 4 倍重量。

### 3.3 工艺验证试验

为考察上述优选所得鲜罗汉果果汁脱色工艺的稳定性,按该工艺条件进行 3 次中试试验(每次投鲜罗汉果 60 kg),分别检测罗汉果果汁脱色脱率、总甙收得率,结果见表 4。

中试试验结果表明,按优化工艺条件脱色,各项指标均达到或超过正交试验表中的较高值,RSD 值仅为 1.5%与 1.1%,因此可以认为优化是成功的,得到的工艺稳定可行,适宜于工业化生产。

## 4 讨论

通过正交试验对罗汉果果汁脱色工艺条件进行了优化,并按最佳工艺进行了验证性中试试验,结果证明该工艺用于罗汉果果汁脱色处理时工艺简单(易操作、易控制)、稳定性好、脱色效果好、总甙收得率高、适合于工业化生产。

本试验首次采用 D900 型树脂对鲜罗汉果果汁进行脱色处理,较好地去掉了易褐变物质与色素,经脱色处理后的果汁在后序加工中,不会因受热及长

表 4 工艺验证试验结果 (n=3)  
Table 4 Result of technology certification test

编号 No.	脱色率 Rate of decolorization (%)	总甙收 得率 (%) Rate of total mogroside	平均脱色率、总甙 收得率 (%) Average of decolorization and total mogroside	RSD (%)
1	97.1	97.2		
2	95.8	98.2	96.5(97.7)	1.5(1.1)
3	96.7	97.6		

时间存放发生褐变而产生颜色变化,极大地改善了鲜罗汉果果汁品质,增加了产品的附加值。通过本实验的成功试验,该技术工艺可广泛应用于类似的果汁脱色生产中,具有较大的应用价值。

### 参考文献:

- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社:147-148
- 李锋,李典鹏,蒋水元,等. 2003. 罗汉果栽培与开发利用[M]. 北京:中国林业出版社:123-128
- 苏瑞君,王晓岩,王秋芝. 1997. 罗汉果咽喉片治疗慢性咽喉的临床研究[J]. 吉林中医药,17(6):38-39
- 陈馥馨. 1996. 新编中成药手册[M]. 北京:中国医药科技出版社:326
- Jin CH(金春花),Jiang XL(姜秀莲),Ke MZ(柯美珍),et al. 1997. Pharmacological studies of Luohanguo Yanhou tablet (罗汉果咽喉片的药理研究)[J]. Chin Trad Med(中药材),20(11):574-577
- Li DP(李典鹏),Zhang HR(张厚瑞). 2000. Studies and uses of Chinese medicine Luohanguo—a special local product of Guangxi(广西特产植物罗汉果的研究与应用)[J]. Guihaia(广西植物),20(3):270-276
- Wang M(王密),Song ZJ(宋志军),Ke MZ(柯美珍),et al. 1994. Effects of different doses of *Momordica grosvenori* Swingle on the immune function of rats(不同剂量的罗汉果对大鼠免疫功能的影响)[J]. Acta Acad Med Guangxi(广西医科大学学报),11(4):428-430,163-167

(上接第 468 页 Continue from page 468)

- wort plant, in patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. Antimicrob Agents Chemother,45(2):517-524
- Li H(李宏),Jiang HC(姜怀春). 2005. Antibacterial effect of the total extract of *Hypericum perforatum* L. on *Brevibacterium flavum*(贯叶连翘总提取物对黄色短杆菌的抗菌作用)[J]. Guihaia(广西植物),25(4):362-365
- Li H(李宏),Zou GL(邹国林). 2002. Antibacterial effect of the total extract of *Hypericum perforatum* L. on *Bacillus subtilis*(贯叶连翘总提取物对枯草杆菌的抗菌作用)[J]. J Southwest China Normal Univ(西南师范大学学报),27(3):404-407
- Liu J(刘健),Chen Y(陈扬),Hou F(侯芳),et al. 2000. Comparative *in vitro* activity of Cefitibuten(头孢布烯体外抗菌作

- 用)[J]. Chin J Clin Pharm(中国临床药理学杂志),16(4):243-250
- Miccoli L,Beurdeley-Thomas A,De Pinieux G,et al. 1998. Light-induced photoactivation of hypericin affects the energy metabolism of human glioma cells by inhibiting hexokinase bound to mitochondria[J]. Cancer Res,58(24):5777-5786
- Prince AM,Pascual D,Meruelo D,et al. 2000. Strategies for evaluation of enveloped virus inactivation in red cell concentrates using Hypericin[J]. Photochem Photobiol,71(2):188-195
- Weller M,Trepel M,Grimmel C,et al. 1997. Hypericin-induced apoptosis of human malignant glioma cell is light-dependent, independent of bcl-2 expression, and does not require wild-type p53[J]. Neurol Res,19(5):459-470