

香叶醇、 β -香茅醇和丁香酚抗念珠菌活性的体外研究*

李晓晴¹, 惠海英¹, 骆志成²

(1. 陕西省人民医院皮肤科, 西安 710068; 2. 兰州大学第二医院皮肤科, 兰州 730030)

摘要:目的 探讨香叶醇、 β -香茅醇和丁香酚3种中药单体体外抗念珠菌活性。方法 先采用纸片法药敏试验对3种中药单体抗念珠菌活性进行初筛实验,再参照CLSI-M27-A方案中的微量稀释法检测3种中药单体对61株临床分离致病念珠菌的最小抑菌浓度(MIC)。结果 3种中药单体对61株临床分离念珠菌均具有较强的抑菌活性,对念珠菌属的平均MIC分别为:香叶醇 $424.70 \pm 387.33 \mu\text{g/ml}$, β -香茅醇 $411.70 \pm 419.05 \mu\text{g/ml}$ 和丁香酚 $579.15 \pm 468.81 \mu\text{g/ml}$ 。结论 香叶醇、 β -香茅醇和丁香酚3种中药单体对临床常见条件致病性念珠菌均具有不同程度的抑制作用;CLSI M27-A方案中的酵母菌微量稀释法适合于抗真菌中药的筛选。

关键词: 中药单体;念珠菌;微生物敏感性试验

中图分类号:R379.4;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)02-087-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.02.026

Study on Anticandidal Activities of Geraniol, β -Citronellol and Eugenol in Vitro

LI Xiao-qing¹, HUI Hai-ying¹, LUO Zhi-cheng²

(1. Department of Dermatology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China;

2. Department of Dermatology, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

Abstract: **Objective** To determine the anticandidal activities of three Chinese herbal monomers (Geraniol, β -Citronellol and Eugenol) in vitro. **Methods** The anticandidal activities of the three compounds were examined by disc diffusion method, then the minimum inhibitory concentration (MIC) was tested in 61 clinically isolated *Candida* strains by CLSI-M27-A microdilution method. **Results** All of tested *Candida* strains were susceptible to Geraniol, β -Citronellol and Eugenol, and their MICs were $424.70 \pm 387.33 \mu\text{g/ml}$, $411.70 \pm 419.05 \mu\text{g/ml}$ and $579.15 \pm 468.81 \mu\text{g/ml}$, respectively. **Conclusion** Geraniol, β -Citronellol and Eugenol were of anticandidal activities in vitro. Microdilution method from M27-A is available for the susceptibility-testing of *Candida* to Chinese herbs in vitro.

Keywords: Chinese herbal monomers; *candida*; microbial sensitivity tests

近年来受诸多因素的影响,条件致病性真菌如念珠菌致深部真菌感染的发生率逐年升高^[1],有报道白念珠菌感染已成为引起医院交叉感染的第四大因素^[2]。而目前临床用之有效且安全的抗真菌药物却十分有限,因此迫切需要研制开发高效低毒的新型药物。此前本文研究人员已通过体外药敏试验证实玫瑰挥发油具有抗念珠菌活性^[3],为进一步研究其抗菌有效成分,本研究采用药敏试验中的纸片扩散法和美国临床实验室标准协会(CLSI)推荐M27-A方案中的微量液基稀释法对玫瑰挥发油含有的主要中药单体香叶醇、 β -香茅醇和丁香酚^[4]的体外抗念珠菌活性分别进行定性和定量实验,现将结果汇报如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床菌株:均来自门诊念珠菌致病患者,共61株,分离纯化后经芽管实验、厚壁孢子实验及

API 20C AUX 酵母菌鉴定系统进行鉴定。其中白念珠菌42株,近平滑念珠菌8株,光滑念珠菌5株,克柔念珠菌2株,热带念珠菌3株,季也蒙念珠菌1株。实验前各菌均转种纯化。

1.1.2 质控和参考菌株:由北京大学真菌和真菌病中心提供,分别为近平滑念珠菌 ATCC22019 和克柔念珠菌 ATCC6258。

1.1.3 中药单体:香叶醇由昆山市千灯百花香料厂提供,含量 $\geq 98\%$; β -香茅醇由Fluka公司提供,含量 $\geq 95\%$;丁香酚由上海飞强化工厂提供,含量 $\geq 98.5\%$;氟康唑(FCZ)由上海三维制药公司提供,两性霉素B(AmB)由上海生工公司提供。

1.1.4 培养基:改良沙氏固体培养基(SDA);RP-MI1640 液体培养基,按 CLSI 方案配制;改良Shadomy 琼脂购自广州市乐通泰生物科技有限公司。

1.2 方法

* 作者简介:李晓晴(1980-),女,硕士研究生,主治医师,研究方向:医学真菌病,E-mail:medlixq@126.com。

1.2.1 中药单体制备:应用比重瓶测得三种中药单体相对密度分别为香叶醇 0.889 4,β-香茅醇 0.859 0,丁香酚 1.066 4。将香叶醇、β-香茅醇和丁香酚用二甲基亚砜(DMSO)溶解,分别配制成浓度为 444 700,429 500,533 200 μg/ml 的储存液。FCZ 用无菌蒸馏水制成浓度为 1 280 μg/ml 的储存液;AmB 用 DMSO 制成 1 600 μg/ml 储存液。均置-20℃冰箱备用。

1.2.2 纸片扩散法:将改良 Shadomy 琼脂水浴加热倒入平皿,置 35℃干燥 20~25 min,均匀涂布(采用 K-B 法)ATCC22019 菌液(5×10^5 cfu/ml),平皿静置 10 min;将直径 0.8 cm 的灭菌空白滤纸圆片(杭州富阳特种纸厂)浸泡于含有 15 g/dl 的 3 种中药单体、1 ml/dl DMSO 及 0.2 g/dl 氟康唑液体中,取出后分别紧贴于含菌琼脂表面,置 35℃温箱培养 18~24 h 后测量结果。

1.2.3 液基稀释法:参照 CLSI M27-A 方案,应用微量液基稀释法测定 3 种中药单体的最小抑菌浓度(MIC)。各药液储存浓度应高于最高稀释度 10 倍以上,同时 DMSO 的终浓度<1%。香叶醇、β-香茅醇、丁香酚浓度范围分别为 21.72~11 117.5, 20.97~10 737.5,26.04~13 330 μg/ml;FCZ 及 AmB 浓度范围为 0.25~128,0.062 5~32 μg/ml。

1.2.4 结果判定:MIC 采用视觉法判断终点。药敏板经 35℃培养 48 h 后观察:与生长对照比较,生长完全抑制,空白对照清亮所对应的最低药物浓度为中药单体和 AmB 的 MIC;与生长对照比较≥80%生长抑制所对应的最低药物浓度为 FCZ 的 MIC。

1.3 统计学分析 应用 SPSS19.0 统计软件进行统计学处理,实验结果以几何均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

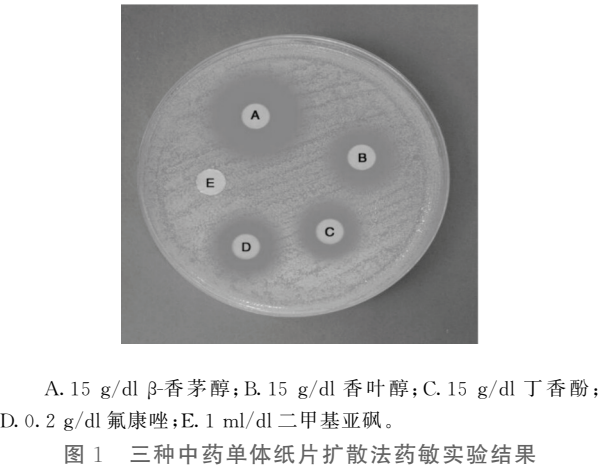
2 结果

2.1 纸片扩散法结果 15 g/dl 的香叶醇、15 g/dl β-香茅醇和 15 g/dl 丁香酚抑菌圈直径分别为 22, 27 和 18 mm;空白对照 1 ml/dl DMSO 抑菌圈直径为 0;阳性对照 0.2 g/dl FCZ 抑菌圈直径为 20 mm。

2.2 三种中药单体对实验念珠菌的 MIC 见表 1。香叶醇、β-香茅醇、丁香酚对临床分离 61 株念珠菌的 MIC 范围分别为 173.71~1 389.69,83.89~1 342.19,208.28~1 666.25 μg/ml。对念珠菌属的平均 MIC 分别为:香叶醇 424.70±387.33 μg/ml,β-香茅醇 411.70±419.05 μg/ml,丁香酚 579.15±468.81 μg/ml。

2.3 统计分析结果 应用 Wilcoxon 秩和检验对

表 1		三种中药单体对 6 种念珠菌的 MIC ($\bar{x}\pm s$,μg/ml)		
菌种	株数	MIC(μg/ml)		
		香叶醇	β-香茅醇	丁香酚
白念珠菌	42	377.3±327.05	376.64±367.32	569.98±492.50
近平滑念珠菌	8	568.08±546.46	671.09±528.65	454.26±313.66
光滑念珠菌	5	347.42±263.44	292.11±205.50	833.13±456.32
热带念珠菌	3	694.84±530.70	266.32±290.59	524.84±360.76
克柔念珠菌	2	982.66±491.33	949.07±474.54	1 178.22±589.10
季也蒙念珠菌	1	694.84±0.00	1 342.19±0.00	416.56±0.00
ATCC22019	1	434.99±209.22	564.32±332.54	454.26±220.92
ATCC6258	1	1 071.60±319.25	949.07±711.81	1 284.86±431.18



3 种中药单体的 MIC 进行两两比较,除 β-香茅醇与丁香酚差异有统计学意义外($Z=-1.99$, $P=0.046$),其余两对香叶醇与丁香酚、香叶醇与 β-香茅醇差异无统计学意义(P 值均>0.05)。

3 讨论 中药作为抗真菌药物的研究有着悠久的历史,至今已发现 300 余种中草药具有抗真菌活性^[5]。如王文花等^[6]采用水提醇沉法对黄连、黄芩、黄柏、知母、甘草 5 味中药的提取液进行体外抗白念珠菌的实验显示均对白念珠菌有较强的抑菌效果;张国哲等^[7]通过对 132 味中药的水煎剂抑制真菌活性筛选后发现五倍子、大青叶、蒲公英、乌梅、大黄等 13 种中药有较强的抑菌活性。以上中

药研究多数是用其水煎剂或粗提物进行实验,其成份与药理作用复杂,并受多种因素影响,而其活性单体成分抗真菌作用的报道却少见。

本实验先采用纸片扩散法直观测定三种中药单体具有抗念珠菌活性,进一步参照 CLSI-M27-A 方案,对它们抗念珠菌活性分别进行定量检测,结果表明香叶醇、 β -香茅醇、丁香酚在体外均能有效抑制多种念珠菌的生长,且对克柔念珠菌、光滑念珠菌及对氟康唑耐药的白念珠菌也有较好的抗菌作用。且这三种中药单体的 MIC 几何均值均小于玫瑰挥发油本身,由此可认为这些中药单体可能为玫瑰挥发油抗念珠菌的有效成分,为临床筛选药用植物挥发油抗真菌新药及其有效成分的研究提供依据。

曾有学者报道香叶醇和香茅醇对黄曲霉、杂色曲霉等霉菌有较强的抑制作用,香叶醇对须发癣菌和奥杜安小孢子菌的 MIC 为 0.39 mg/ml^[8,9]; Pinto 等^[10]研究发现丁香酚不仅对皮肤癣菌属和曲霉菌属具有抗菌活性,而且对氟康唑有天然耐药的克柔念珠菌和易诱导耐药的光滑念珠菌均表现出较高的抑制活性。上世纪 90 年代由宋军等人采用固体琼脂法测定丁香酚对白念珠菌的 MIC 为 200 mg/L,并在透射电镜下观察其作用于真菌后的超微结构改变推测丁香酚可能作用于真菌的细胞膜,引起损伤、破坏和通透性的改变,药物进入细胞内使线粒体受到损伤,引起细胞能量代谢障碍等而导致菌细胞死亡。其他两种中药单体(香叶醇和香茅醇)抗菌原理尚未见报告。因此,三种中药单体的具体抗菌机制还需进行更深入研究,诸如采用电镜、免疫组化等多种方法从细胞、分子水平对其抗菌机制进行探讨,以及开展动物模型进行体内抗菌实验等。

目前,对于中草药抗真菌体外药敏试验还没有标准化方案。本实验将 CLSI-M27-A 运用到中草药抗念珠菌实验中,同样具有方便、可重复性好、结果易分析等优点。除玫瑰挥发油外,许多其他药用植物提取物中也含有以上三种中药单体,如花椒、香茅草、丁香等。应用药用植物中的单体成分进行抗真菌药物研究,具有广阔前景。

参考文献:

- [1] Guo F, Yang Y, Kang Y, et al. Invasive candidiasis in intensive care units in China: a multicentre prospective observational study[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(7): 1660-1668.
- [2] Gafter-Gvili A, Vidal L, Goldberg E, et al. Treatment of invasive candidal infections: systematic review and meta-analysis[J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(9): 1011-1021.
- [3] 李晓晴, 骆志成, 李文竹. 玫瑰挥发油抗念珠菌活性的体外研究及两种药敏实验方法的比较[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2006, 20(6): 321-323.
Li XQ, Luo ZC, Li WZ. Study on anti-candidal activity of the essential oil from rosa rugosa in vitro and the difference between macro and micro dilution methods [J]. Chin J Derm Venereo, 2006, 20(6): 321-323.
- [4] 陈红艳, 廖蓉苏, 杨今朝, 等. 玫瑰花挥发性化学成分的分析研究[J]. 食品科技, 2011, 36(11): 186-190, 196.
Chen HY, Liao RS, Yang JC, et al. Analysis of volatile chemical compounds from the flower of rosa rugosa[J]. Food Science and Technology, 2011, 36(11): 186-190, 196.
- [5] Liu X, Han Y, Peng K, et al. Effect of traditional Chinese medicinal herbs on *Candida spp.* from patients with HIV/AIDS[J]. Adv Dent Res, 2011, 23(1): 56-60.
- [6] 王文花, 李劲松, 肖晴晴, 等. 5 种中药体外抗白色念珠菌的实验研究[J]. 广西中医学院学报, 2010, 13(3): 54-55.
Wang WH, Li JS, Xiao QQ, et al. Study on anti *candidal albicans* activities of five Chinese Herbal Monomers in vitro[J]. Journal of Guangxi Traditional Chinese Medical University, 2010, 13(3): 54-55.
- [7] 张国哲, 苏 昕. 132 味中药水提物对 8 种致病真菌抑菌活性的筛选[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(9): 1834-1837.
Zhang GZ, Su X. Selection of bacteriostasis effects of water extracts from 132 Chinese drugs on eight fungi [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 39(9): 1834-1837.
- [8] 余伯良, 罗惠波, 周 健, 等. 山苍子油抗霉菌及抑制黄曲霉产毒的有效成分研究[J]. 四川轻化工学院学报(自然版), 2002, 15(1): 32-36.
Yu BL, Luo HB, Zhou J, et al. Study on the active ingredient of antibiotic activities of Litsea Cubeba oil on moulds and the effect on aflatoxin production [J]. Journal of Sichuan Institute of Light Industry and Chemical Technology, 2002, 15(1): 32-36.
- [9] 张 继, 白贞芳, 杨永利, 等. 甘肃省花椒属药用植物资源[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(4): 255-257.
Zhang J, Bai ZF, Yang YL, et al. Resources of the zan-thoxylum medicinal plant in Gansu province[J]. Chin Pharm J, 2002, 37(4): 255-257.
- [10] Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and *Dermatophyte* species[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(pt11): 1454-1462.

收稿日期: 2015-10-20

修回日期: 2015-12-23