

黄芩素体外抑菌与体内抗炎作用研究

付 璟*,石继和[#](铜仁市人民医院药剂科,贵州 铜仁 554300)

中图分类号 R285;Q946.91 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)23-2136-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.23.09

摘要 目的:研究黄芩素体外抑菌与体内抗炎作用。方法:采用滤纸片研究黄芩素(10 mg/ml)对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉的抑制作用;采用试管二倍稀释法测定黄芩素对上述5种菌株的最低抑菌浓度(MIC)。二甲苯诱发小鼠急性炎症,测定小鼠耳廓肿胀度与小鼠血清肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1含量。结果:10 mg/ml黄芩素对5种菌株具有一定的抑制作用。5种菌株MIC分别为0.312 5、0.312 5、0.625 0、0.312 5、0.625 0 mg/ml。0.20、0.10 mg/kg黄芩素可明显抑制模型小鼠耳廓肿胀,0.20、0.10 mg/kg黄芩素可明显降低模型小鼠血清TNF- α 含量,0.20 mg/kg黄芩素可明显降低模型小鼠血清IL-1含量。结论:黄芩素具有一定的体外抗菌与体内抗炎作用。

关键词 黄芩素;大肠埃希菌;金黄色葡萄球菌;铜绿假单胞菌;白色念珠菌;黑曲霉;耳肿胀;肿瘤坏死因子 α ;白细胞介素1

Antibacterial Activity *in vitro* and Anti-inflammatory Effects *in vivo* of Baicalein

FU Jing, SHI Ji-he(Dept. of Pharmacy, Tongren Municipal People's Hospital, Guizhou Tongren 554300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the antibacterial activity *in vitro* and anti-inflammatory effects *in vivo* of baicalein. METHODS: Filter paper was used to study inhibitory effects of baicalein (10 mg/ml) on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. MIC of baicalein to 5 strains was determined by tube double dilution method. Xylene induced mice acute inflammation, and mice ear swelling, swelling inhibition rate and serum contents of TNF- α and IL-1 were all determined. RESULTS: 10 mg/ml Baicalein had inhibitory effects on 5 strains. MIC of baicalein to the 5 Strains were 0.312 5, 0.312 5, 0.625 0, 0.312 5 and 0.625 0 mg/ml. 0.2, 0.1 mg/kg baicalein inhibited xylene induced mice ear swelling significantly, and 0.2, 0.1 mg/kg baicalein can significantly reduce the serum content of TNF- α in xylene induced mice; 0.2 mg/kg baicalein can significantly decrease the serum content of IL-1 in xylene induced mice. CONCLUSIONS: Baicalein has antibacterial activity *in vitro* and anti-inflammatory effects *in vivo*.

KEYWORDS Baicalein; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albicans*; *Aspergillus niger*; Ear swelling; TNF- α ; IL-1

黄芩是传统常用中药,为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎之功效^[1]。黄芩素是其主要有效成分之一,具有多种药理作用。研究表明,黄芩素在体外可抑制流感甲型病毒细胞病变^[2];体内可延长流感病毒感染小鼠的存活时间^[3],抑制 H₂O₂ 诱导的 RAV264.7 细胞凋亡、亚二倍体形成 DNA 断裂、金属蛋白酶(Caspase)-3 的活化^[4];通过降低大鼠体内细胞因子的含量而发

挥解热作用^[5];能明显抑制大鼠膀胱癌 MBT-2 细胞增殖,并诱导其凋亡^[6];对心肌细胞缺血再灌注损伤具有保护作用^[7]。本研究拟通过5种菌株及动物模型阐明黄芩素的体外抑菌及体内抗炎作用,为黄芩素的进一步研究提供一定理论依据。

1 材料

1.1 仪器

GHP-9050 型隔水式培养箱(金坛华特实验仪器有限公司)

- 理与临床,2007,23(6):51.
- [10] 刘亚欧,白筱璐,余悦,等.柴黄制剂的解热抗炎作用研究[J].中药药理与临床,2008,24(2):22
- [11] 迟莉,李茹柳,徐颂芬,等.白术黄芩新方镇痛抗炎和对胃肠道运动影响的研究[J].中药药理与临床,2007,23(2):8.

- [12] 阳柳平.研究白术的化学成分及药理作用概况[J].中国医药指南,2012,10(21):607.
- [13] 王婷婷,文今福,金松南.地锦草的化学成分及药理作用研究进展[J].泰山医学院学报,2012,33(8):629.
- [14] 姚松学,李春华,蔡高玉,等.地锦草的药理作用研究[J].亚太传统医学,2010,6(9):144.

(收稿日期:2014-02-24 修回日期:2014-04-10)

* 主管药师。研究方向:中药药理学。E-mail: 13595618350 @ 163.com

通信作者:主管药师。研究方向:医院药学。电话:0856-5282012。

司);RE-52A型旋转蒸发器(上海亚嘉鹏科技有限公司);LDZX-50KBS型高压灭菌器(济南华舜仪器有限公司);SHB-3型循环水真空泵(郑州合众仪器有限公司);DT100型电子分析天平(北京光学仪器厂);UV-2800AH型分光光度计(郑州南北仪器设备有限公司);Model 550型酶联分析仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

黄芩素(上海基免实业有限公司,批号:110305-1,质量分数:98%);醋酸泼尼松片(辰欣药业股份有限公司,批号:20130705);牛肉膏、蛋白胨、琼脂培养基(青岛海博生物技术有限公司);NaOH、NaCl、乙醇、乙酸乙酯、石油醚、正丁醇、二甲基亚砷(DMSO,均为分析纯,北京威特化工有限公司提供);肿瘤坏死因子(TNF)- α ;白细胞介素(IL)-1测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 菌种

大肠埃希菌[*Escherichia coli*, CMCC(B)44102]、金黄色葡萄球菌[*Staphylococcus aureus*, CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[*Pseudomonas aeruginosa*, CMCC(B)10104]、白色念珠菌[*Candida albicans*, CMCC(F)98001]、黑曲霉[*Aspergillus niger*, CMCC(F)98003]由国家医学微生物菌种保藏管理中心提供。

1.4 动物

SPF级KM小鼠,♀♂兼用,体质量20~22g,购自重庆医科大学实验动物中心[实验动物使用许可证号:SCXK(渝)2012-0006]。

2 方法

2.1 黄芩素溶液的制备

准确称取黄芩素1.0g,置100ml容量瓶中,用40%乙醇溶液溶解并定容至刻度,得10mg/ml黄芩素溶液。

2.2 菌种的活化及菌悬液的制备

2.2.1 细菌的活化及菌悬液的制备 参考文献^[8]加以改进,将细菌(即大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌)接种于肉汤琼脂培养基斜面,37℃下培养24h,将活化的细菌传种于肉汤培养基,37℃下培养16~18h;再传种于新鲜肉汤培养基,增殖培养2~6h,用肉汤培养基稀释,得细菌悬液($1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/ml),备用。

2.2.2 白色念珠菌的活化及菌悬液的制备 参考文献^[8]方法加以改进,将白色念珠菌接种于沙氏培养基斜面,30℃下培养24~48h,将活化的白色念珠菌传种于沙氏液体培养基,30℃培养16~18h;再传种于沙氏液体培养基,增殖培养2~6h,用沙氏液体培养基校正,得白色念珠菌悬液($1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/ml),备用。

2.2.3 黑曲霉的活化及菌悬液的制备 参考文献^[8]方法加以改进,将黑曲霉通过平板划线法接种在沙氏固体培养基平板上,28℃下培养5~7d。加0.05%吐温80溶液洗脱孢子,充分震荡,血球计数板计数,得黑曲霉悬液($1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/ml),备用。

2.3 黄芩素对体外菌种的抑制作用

参考文献^[9-10]方法,将滤纸片(直径:6mm)分别在黄芩素原液(10mg/ml)及空白对照溶液(40%乙醇)中浸渍后取出。取0.1ml菌液,均匀涂布于整块MH琼脂培养基(1000ml蒸馏水,牛肉膏3.0g,蛋白胨10.0g,NaCl5.0g,琼脂15g,加热溶解后调pH为7.2~7.4,煮沸10min,滤过,高温高压灭菌20min制得)表面,室温放置3~5min后,贴加含药纸片,37℃下培养15~16h,测定其纸片周围抑菌圈直径的大小,每个样品重复测定3次。

2.4 最低抑菌浓度(MIC)的测定

取10只无菌的试管,标记1~10,1号试管为空白对照(40%乙醇),第10号试管为不含药物的生长对照(含40%乙醇和菌种)。2~8号试管按二倍稀释法(1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128)逐级稀释黄芩素溶液,得质量分数分别为10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125mg/ml的黄芩素溶液。分别取菌液100 μ l,加入2~10号试管中,使每管最终菌液浓度约为 5×10^5 CFU/ml^[11],平行实验做2次。定量取上述培养液,采用平板涂布法在适宜的固体培养基上涂板,倒置培养,其中细菌用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,37℃下培养24h;白色念珠菌采用沙氏琼脂培养基,28℃下培养24~48h;黑曲霉采用沙氏琼脂培养基,28℃下培养5~7d进行平板计数,以平板上菌落数小于生长对照为该药液对该菌种的MIC。

2.5 黄芩素对模型小鼠耳廓肿胀与炎性细胞因子的影响

2.5.1 模型的复制与分组、给药 60只KM小鼠均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、醋酸泼尼松(60mg/kg)组与黄芩素高、中、低剂量(0.20、0.10、0.05mg/kg)组。ig给药,每天1次,连续7d。末次给药30min后将20 μ l二甲苯涂抹在小鼠右耳廓正反两面使其致炎,左耳不涂为空白对照。

2.5.2 指标的测定 复制模型20min后,小鼠眼眶取血,常规离心后得血清,TNF- α 、IL-1含量测定按说明书方法进行。用打孔器分别在两耳处同一部位取下圆耳片(直径8mm),分别称定质量,计算小鼠耳廓肿胀度与耳廓肿胀抑制率。

2.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩素对体外菌种的抑制作用

空白对照滤纸片直径为6mm,10mg/ml黄芩素溶液分别与大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉作用后,滤纸片直径分别为(27.2 \pm 0.3)、(26.8 \pm 0.3)、(18.5 \pm 0.3)、(22.6 \pm 0.3)、(10.7 \pm 0.3)mm。表明黄芩素对体外菌种有一定抑制作用,其中对大肠埃希菌抑制作用最强,对黑曲霉抑制作用最弱。

3.2 MIC的测定

黄芩素对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉的MIC分别为0.312 5、0.312 5、0.625、0.312 5、0.625 mg/ml。MIC测定结果详见表1。

表1 MIC测定结果

Tab 1 Determination of MIC

菌种	黄芩素质量分数比例						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
大肠埃希菌	-	-	-	-	-	+	+
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	+	+
铜绿假单胞菌	-	-	-	-	+	+	+
白色念珠菌	-	-	-	-	-	+	+
黑曲霉	-	-	-	-	+	+	+

注：“-”为阴性反应；“+”为阳性反应

note：“-”means negative；“+”means positive

3.3 黄芩素对模型小鼠耳廓肿胀与炎性细胞因子的影响

3.3.1 黄芩素对模型小鼠耳廓肿胀的影响 与模型组比较，黄芩素高、中剂量组小鼠耳廓肿胀度降低，差异有统计学意义($P < 0.05$)，抑制率分别为29.87%、18.83%。黄芩素对模型小鼠耳廓肿胀的影响见表2(正常对照组无反应，不列入表中)。

表2 黄芩素对模型小鼠耳廓肿胀的影响

Tab 2 Effect of baicalein on ear swelling in model mice

组别	剂量,mg/kg	n	肿胀度,mg	抑制率,%
模型组		10	15.40±3.70	
黄芩素高剂量组	0.20	10	10.80±2.44*	29.87
黄芩素中剂量组	0.10	10	12.50±2.76*	18.83
黄芩素低剂量组	0.05	10	14.90±3.47	3.25
醋酸泼尼松组	60.00	10	6.40±3.18**	58.44

与模型组比较：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

vs model group：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

3.3.2 黄芩素对模型小鼠炎性细胞因子的影响 与模型组比较，黄芩素高、中剂量组小鼠血清TNF- α 含量降低，黄芩素高剂量组小鼠血清IL-1含量降低，差异有统计学意义($P < 0.05$)。黄芩素对模型小鼠炎性细胞因子的影响见表3。

表3 黄芩素对模型小鼠炎性细胞因子的影响

Tab 3 Effect of baicalein on inflammatory cytokines in model mice

组别	剂量,mg/kg	n	TNF- α ,ng/L	IL-1,ng/L
正常对照组		10	68.35±3.17	41.23±3.04
模型组		10	104.27±2.54*	78.63±3.42*
黄芩素高剂量组	0.20	10	82.62±2.93*	63.48±3.31*
黄芩素中剂量组	0.10	10	91.66±3.06*	72.94±3.05
黄芩素低剂量组	0.05	10	102.41±3.27	76.23±2.98
醋酸泼尼松组	60.00	10	66.41±2.75**	40.36±2.83**

与正常对照组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较： $^{\#}P < 0.05$ ， $^{\#\#}P < 0.01$

vs normal control group：* $P < 0.05$ ；vs model group： $^{\#}P < 0.05$ ， $^{\#\#}P < 0.01$

0.01

4 讨论

本研究所选用的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉5种供试菌，涉及格兰阴性菌、葡球

菌、芽孢杆、真菌，具有一定代表性。研究表明，黄芩素对多种细菌均有一定抑制作用。

小鼠耳廓肿胀法可间接反映药物是否具有抗变质性炎症的作用^[2]。研究结果表明，黄芩素可抑制二甲苯所致小鼠耳廓肿胀度。IL-1和TNF- α 是介导急性期炎症反应的重要细胞因子。研究表明，黄芩素能抑制二甲苯诱导的IL-1和TNF- α 的释放，降低其含量。

综上，黄芩素对多种细菌及真菌具有较强的抑制作用，对二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀与IL-1、TNF- α 含量增加具有明显抑制作用。本结论可为进一步研究黄芩素的抗菌抗炎作用提供一定理论依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:282.
- [2] Chen L, Dou J, Su Z, *et al.* synergistic activity of baicalein with ribavirin against influenza A (H1NA) virus infections in cell culture and in mice[J]. *Antiviral Res*, 2011, 91(3):314.
- [3] 吴修华,刘妮,杨丽,等.黄芩素体内抗甲型流感病毒作用的研究[J].广州中医药大学学报,2009,26(2):157.
- [4] Lin H, Shen S, Lin C, *et al.* Baicalein inhibition of hydrogen peroxide-induced apoptosis via ROS-dependent heme oxygenase gene expression[J]. *Biochem Biophys Acta*, 2007, 1773(7):1073.
- [5] 李倩楠,葛晓群.黄芩苷的解热作用及对细胞因子的影响[J].中国中药杂志,2010,35(8):1068.
- [6] Ikemoto S, Sugimura K, Kuratukuri K, *et al.* Antitumor effects of lipoxigenase inhibitors on murine bladder cancer cell line (MBT-2)[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(2B):733.
- [7] Woo AY, Cheng CH, Waye MM. Baicalein protects rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation damage via a prooxidant mechanism[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(1):244.
- [8] 李建志,刘旭红,杨丽珍,等.11种中草药抗菌作用实验研究[J].中医药信息,2009,26(3):82.
- [9] 范秀容.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1989:2661.
- [10] 李浩华,章卫民,高晓霞,等.白木香果皮提取物的抗菌活性[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):100.
- [11] 马建凤,刘华钢,朱丹.中药体外抑菌研究的方法学进展[J].药物评价研究,2010,33(1):42.
- [12] 范文昌,梅全喜,欧秀华,等.12种广东地产清热解毒药材的抗炎作用研究[J].中国药业,2011,20(8):28.

(收稿日期:2014-02-27 修回日期:2014-04-06)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅