

# 8种中药单体抗球形马拉色菌的体外药敏实验

黄欣<sup>1</sup> 沈亮亮<sup>1</sup> 徐红<sup>2</sup> 温海<sup>2</sup>

(1. 同济大学附属同济医院皮肤科, 上海 200065; 2. 第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003)

**【摘要】** 目的 观察 8 种中药单体对球形马拉色菌的体外抑菌效果。方法 参照美国临床和实验室标准化研究所 (CLSI) 制订的 M 27-A 方案中酵母菌微量稀释法, 测定各中药单体体外抗球形马拉色菌的敏感性。结果 8 种中药单体中, 苦参碱、氧化苦参碱、麝香草酚、丁香酚有较强的抗马拉色菌作用 (MIC < 0.98~1.96 μg/mL)。结论 苦参碱、氧化苦参碱、麝香草酚、丁香酚有较强的抗马拉色菌作用, CLSIM 27A 方案可用于抗马拉色菌敏感性测定。

**【关键词】** 中药单体; 马拉色菌; 最小抑菌浓度

**【中图分类号】** R 379.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2011)02-0098-03

## Inhibition of eight Chinese herbal components on *M. globosa* *in vitro*

HUANG Xin<sup>1</sup>, SHEN Liang-liang<sup>1</sup>, XU Hong<sup>2</sup>, WEN Hai<sup>2</sup>

(1. Department of Dermatology, Tongji Hospital Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065; 2. Department of Dermatology, Changzheng Hospital Second Military Medical University, Shanghai 200003)

**【Abstract】 Objective** To observe the *in vitro* inhibitive effect of eight kind of Chinese herbal components on ATCC standard strains of *M. globosa*. **Methods** The sensitivities of Chinese herbal components to *M. globosa* were determined on the basis of Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A microdilution method. **Results** The MICs of Matrine, Oxymatrine, thymol and Eugenol were less than 0.98 to 1.96 μg/mL. **Conclusions** Matrine, Oxymatrine, thymol and Eugenol have inhibitive effects on *M. globosa* *in vitro* and the susceptibilities could be determined by CLSIM 27-A scheme.

**【Key words】** Chinese herbal components; *M. globosa*; Minimum inhibitive sensitivity

[Chin J Mycol 2011, 6(2): 98-100]

马拉色菌是人体和其他温血动物皮肤表面的条件致病性真菌, 与该菌有关的疾病较多包括花斑糠疹、马拉色菌毛囊炎、脂溢性皮炎、特应性皮炎等, 因涉及病种较多, 对其治疗也越来越受到重视。目前针对马拉色菌多为纯西药治疗, 药物种类有限, 且易反复, 因此开发安全有效的纯中药制剂成为治疗方面的一个研究热点。本研究参照美国临床和实验室标准化研究所 CLSI 制订的 M 27-A 方案中酵母菌微量稀释法<sup>[1]</sup>, 检测了 8 种中药单体对球形马拉色菌的体外药敏试验, 旨在初步筛选出对球形马拉色菌有抑制作用的中药单体。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

抗真菌药: 酮康唑粉 (西安杨森制药有限公司, 含量 99.9%) 特比萘芬粉 (山东齐鲁制药厂, 含量 99.9%)。8 种中药单体 (氧化苦参碱、麝香草酚、肉桂酸、丹皮酚、丁香酚、盐酸小檗碱、苦参碱、黄芩苷) 均购自中国药品生物制品检定所, 均为化学对照品。实验菌株: 球形马拉色菌标准株 (CBS7966), 由中国科学院皮肤病研究所惠赠。Leeming 和 Nottman 培养基<sup>[2]</sup>: 1% 蛋白胨, 0.5% 葡萄糖, 0.1% 酵母浸膏, 0.4% 牛胆盐, 0.1% 甘油, 0.05% 单硬脂酸甘油酯, 0.05% 吐温 60, 1% 全脂牛奶, 2% 橄榄油, 1.2% 琼脂, 0.5% 放线菌酮, 0.05% 氯霉素。马拉色菌液体培养基<sup>[3]</sup>: 麦芽浸膏

基金项目: 上海市卫生局青年科研基金 (2006Y53)。

作者简介: 黄欣, 女 (汉族), 博士, 副主任医师。E-mail: alida\_huang@yahoo.com.cn

通讯作者: 温海, E-mail: wenhai98@sohu.com

20 g/L、酵母浸膏 2 g/L、葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、玉米油 20 g/L, 加蒸馏水溶解后高压灭菌。

## 1.2 马拉色菌的体外药敏试验 (参照 CLSI 制定的 M27-A 方案中酵母菌微量稀释法)

药液加样 酮康唑粉、特比萘芬粉先以二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 再用马拉色菌液体培养基稀释至 2 倍实验浓度, 即酮康唑、特比萘芬的终质量浓度为 0.03~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。丁香酚终质量浓度为 0.245~125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 其余 7 种中药单体为 0.98~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将稀释的药物按浓度由高到低依次加入微量药敏板 96 孔酶标板 1~10 列中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 第 11、12 列分别加入 100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$  马拉色菌液体培养基 (药物用 DMSO 稀释者含同浓度的 DMSO), 分别作为生长对照和空白对照, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

菌液制备及接种 将受试菌连续传代培养 2 次, 第 2 次 32 $^{\circ}\text{C}$  传代培养 5 d 用无菌生理盐水洗脱纯化的菌落, 制成菌悬液, 并调整其至麦氏 6 号比浊管浓度, 经血细胞计数板计数其菌含量为  $(1\sim 5)\times 10^7$  CFU/mL, 用培养基稀释菌悬液  $10^3$ , 其菌含量为  $(1\sim 5)\times 10^4$  CFU/mL, 在 96 孔板中 1~11 列每孔加入菌液 100  $\mu\text{L}$ , 使其最终菌浓度为  $(0.5\sim 2.5)\times 10^4$  CFU/mL。

培养及结果判定 将接种后的药敏培养板置 32 $^{\circ}\text{C}$  湿盒孵育, 培养 24 h 后观察结果, 取真菌完全受抑制 (无生长) 的最低药物浓度的试验孔, 即为该药的最小抑菌浓度 (MIC)。每种药同时做 3 排, 结果取 3 个数的平均值。整个药敏过程重复 2 次, 结果显示其 MIC 范围在 1~2 个药物浓度梯度之间。

## 2 结果

2.1 酮康唑、特比萘芬对球形马拉色菌标准株 (CBS7966) 的 MIC 值均为 0.0625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 8 种中药单体对球形马拉色菌标准株 (CBS7966) 的 MIC 值 (见表 1)

由表 1 可知 8 种中药单体中苦参碱、氧化苦参碱、麝香草酚、丁香酚对球形马拉色菌标准株 (CBS7966) 较敏感。

## 3 讨论

马拉色菌是人体和其他温血动物皮肤表面的正常菌群, 与花斑糠疹、毛囊炎、脂溢性皮炎、特应

表 1 8 种中药单体对球形马拉色菌标准株 (CBS7966) 的 MIC 值 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Tab 1 MICs of *M. globosa* (CBS7966) to eight chinese herbal components

中药单体	MIC 值
苦参碱	0.98
氧化苦参碱	< 0.98
麝香草酚	1.96
肉桂酸	31.25
丹皮酚	31.25
丁香酚	1.96
盐酸小檗碱	62.5
黄芩苷	125

性皮炎等疾病有关。因其涉及病种较多, 而相关的抗真菌药物种类有限, 因此寻找安全性好, 抗菌谱广、疗效高而且价格低的抗真菌药物仍是一项艰巨的任务。从中药中提取筛选抗真菌活性成分, 进而开发利用是一个重要的研究方向, 具有广阔的前景。

国内外关于中药抗马拉色菌的相关报道较少, 国内朱敏等报道了 23 种中药及 14 种单体抗马拉色菌的体外药物敏感研究<sup>[3]</sup>。国外 Hammer<sup>[4]</sup> 和 Weseler<sup>[5]</sup> 等报道了茶树油抗马拉色菌的实验研究。本实验选用与马拉色菌相关皮肤病中较常见的球形马拉色菌做为实验菌株对 8 种中药单体进行了初筛试验, 研究结果表明氧化苦参碱、苦参碱、麝香草酚、丁香酚对球形马拉色菌较敏感 (MIC < 0.98~1.96  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。麝香草酚 (Thymol), 来源于唇形科植物麝香草, 其分子式为  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ , 对皮肤癣菌具有杀菌作用<sup>[6-7]</sup>。Fontenelle 等<sup>[8]</sup> 报道含有麝香草酚的 *L. siloides* 精油具有抗马拉色菌的作用。丁香酚 (Eugenol), 来源于桃金娘科植物丁香挥发油, 其分子式为  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$ , 丁香酚在 1: 8000~1: 16000 浓度时, 对致病性真菌有抑制作用<sup>[6-7]</sup>。宋军等<sup>[9]</sup> 报道表明丁香酚对石膏样毛癣菌、粉小孢子菌、羊毛状小孢子菌、红色毛癣菌、黄癣菌、絮状表皮癣菌等常见致病真菌均有较强的作用。杨雪云等<sup>[10]</sup> 报道苦参碱和氧化苦参碱对几种林木病原真菌孢子萌发均有抑制作用。汪长中等报道<sup>[11]</sup> 苦参碱对体外白念珠菌生物膜抑制作用。而关于氧化苦参碱、苦参碱、丁香酚抗马拉色菌的研究报道较少 (经检索 PubMed 数据库和万

方数据库)。国内、外为数不多的马拉色菌体外药敏实验报道<sup>[12-13]</sup>表明,酮康唑、特比萘芬对马拉色菌均较敏感,与本实验的体外药敏实验结果一致,酮康唑、特比萘芬的MIC值均为0.0625 μg/mL。唑类药物的药敏试验多数有拖尾现象,在较宽的质量浓度范围内产生部分抑菌。本实验摸索实验条件时分别于培养的24 h、48 h两个时间点观察药敏实验结果,发现24 h判读时,结果清晰,未见拖尾现象。这与朱敏<sup>[3]</sup>等报道的抗马拉色菌体外药敏实验结果判读时间一致。

氧化苦参碱、苦参碱、麝香草酚、丁香酚这4种中药单体在体外药敏实验中对马拉色菌具有较好的抑菌效果。酮康唑、特比萘芬的MIC值均为0.0625 μg/mL。氧化苦参碱、苦参碱与这2种西药的MIC值是较接近的,这提示我们这4种中药单体在抗马拉色菌方面是有一定开发前景的。对于马拉色菌体外药敏实验尚无统一的标准化实验方案。本实验参考CLSIM 27-A方案,将其用于中药单体抗马拉色菌的体外药敏实验中,同样具有实验结果易分析、方便、可重复性等优点。

#### 参考文献

- [1] National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts[S]. Approved standard M27-A. 1997.
- [2] Van Belkum A, Boekhout T, Bosboom R. Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing[J]. *J Clin Microbiol* 1994; 32(10): 2528-2532.
- [3] 朱敏,章强强,王侠生,等. 23种中草药及14种单体抗马拉色菌体外药敏试验[J]. *临床皮肤科杂志*, 2003, 32(4): 193-195.
- [4] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *In vitro* activities of ketoconazole, econazole, miconazole, and Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against *Malassezia* species[J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(2): 467-469.
- [5] Weseler A, Geiss HK, Saller R, et al. Antifungal effect of Australian tea tree oil on *Malassezia* pachydermatis isolated from canines suffering from cutaneous skin disease[J]. *Schweiz Arch Tierheilkoh* 2002; 144(5): 215-221.
- [6] 季宇彬. 中药有效成分药理与应用[M]. 第1版. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995.
- [7] 蔡永敏,任玉让,王黎,等. 最新中药药理与临床应用[M]. 第1版. 北京: 华夏出版社, 1999.
- [8] Fontenelle ROS, Moraes SM, Brito LHS, et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham[J]. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 934-940.
- [9] 宋军,李鹤玉,赵小秋,等. 丁香酚抗真菌作用的实验研究[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 1996, 10(4): 203-204.
- [10] 杨雪云,赵博光,巨云为. 苦参碱和氧化苦参碱的抑菌活性及增效作用[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2008, 32(2): 79-82.
- [11] 汪长中,程惠娟,官妍,等. 苦参碱对体外白念珠菌生物膜抑制作用[J]. *中国公共卫生*, 2008, 24(12): 1491-1492.
- [12] R Filip, R Davicina, C Anesini. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguayensis* against *Malassezia furfur*[J]. *Phytother Res* 2010; 24(5): 715-719.
- [13] de Wit K, Paulussen C, Matheussen A, et al. *In vitro* profiling of pramiconazole and *in vivo* evaluation in *Microsporum canis* dermatitis and *Candida albicans* vaginitis laboratory models[J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(11): 4927-4929.

[收稿日期] 2011-02-10

[本文编辑] 施慧

## 欢迎订阅《中国真菌学杂志》

《中国真菌学杂志》是由国家新闻出版总署批准出版发行的高级医学学术期刊,由上海长征医院主办,现已被“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”收录。

本刊主要报道我国真菌学特别是医学真菌学的最新研究进展,内容涉及基础医学及临床医学中的大部分专业,以从事皮肤、感染、血液、呼吸、器官移植、肿瘤、急救、创伤、检验等与真菌感染专业有关的中高级医务人员、研究人员及从事微生物学、分子生物学及药理学等基础研究的研究人员为主要读者群,是真菌学工作者之间交流的窗口和平台。辟有:专家论坛、论著、论著摘要、技术和方法、学术讲座、继续医学教育、综述、真菌病治疗和疑难病例分析等栏目。

本刊为双月刊,大16K,铜版纸彩色印刷,每期定价9.8元,全年共58.8元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-799),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。地址:上海市凤阳路415号《中国真菌学杂志》编辑部 邮编:200003 联系人:王飞 电话:021-81885496 传真:021-81885497 电子信箱:zgzyx@126.com 网址:www.cjnycolgy.com