

In Vitro Evaluation of the Potential Anti Mycobacterium Tuberculosis Activity of 29 Chinese Traditional Medicinal Plants

Lifen Han, Shanmin Song, Wei Deng, Menglan Gan, Renfeng Wang, Zaichang Yang*

School of Pharmaceutical, Guizhou University, Guiyang Guizhou
Email: *1183813006@qq.com

Received: Jul. 11th, 2017; accepted: Jul. 29th, 2017; published: Aug. 1st, 2017

Abstract

Tuberculosis is one of common infectious diseases that has been difficult to control so far and has been on the rise in recent years. Chinese herbal medicine is an important natural resource for the discovery of new drug, and China has a wealth of natural medicine resources. In this experiment, 29 traditional Chinese medicines were selected for the screening of anti-M tuberculosis H37Rv and BCG respectively. The results indicated that 14 kinds of herbs showed powerful activity against Mycobacterium tuberculosis H37Rv and BCG. Among them, 9 kinds of Chinese herbal medicine exhibited synergistic antibacterial effect combined with isoniazid and rifampicin respectively. In addition, it was first discovered that the Sanjiaotiao (Chinese name) had anti-Myco bacterium tuberculosis activity. The study laid the foundation for the discovery of the new skeleton of anti-Mycobacterium tuberculosis drug.

Keywords

Mycobacterium Tuberculosis, Traditional Chinese Medicine, Bioassay Screening

体外评价29种中药的抗结核分枝杆菌活性

韩立芬, 宋善敏, 邓伟, 甘梦兰, 王仁凤, 杨再昌*

贵州大学药学院, 贵州 贵阳
Email: *1183813006@qq.com

收稿日期: 2017年7月11日; 录用日期: 2017年7月29日; 发布日期: 2017年8月1日

*通讯作者。

文章引用: 韩立芬, 宋善敏, 邓伟, 甘梦兰, 王仁凤, 杨再昌. 体外评价 29 种中药的抗结核分枝杆菌活性[J]. 药物化学, 2017, 5(3): 39-44. DOI: 10.12677/hjmce.2017.53006

摘要

结核病是迄今为止最难控制的传染病之一，且近年来呈上升趋势。中药是新药发现的重要来源之一，且在我国储存量大。本试验选取29种中草药，分别对结核分枝杆菌H37Rv和牛分枝杆菌BCG菌株进行活性筛选，发现14种中草药具有抗结核杆菌作用，其中9种中草药与异烟肼和利福平存在协同抗菌作用，首次发现三角条具有抗结核杆菌活性。研究结果为发现新型抗结核杆菌分子骨架奠定了基础。

关键词

结核杆菌，中草药，活性筛选

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

结核是一种由结核分枝杆菌引起的仅次于艾滋病的世界第二大致命传染病。主要通过空气经呼吸道传播，以肺结核为主，但结核杆菌几乎可以在身体任何部位引起疾病，被称为白色瘟疫。肺结核病人的主要症状包括咳嗽、发烧、盗汗和体重减轻等，感染者如果抵抗力下降或出现耐药时，可导致病情恶化，呼吸极为困难，最终死于肺咯血。根据 WHO 的统计分析，全世界约 1/3 的人口感染了结核分枝杆菌，成为全球性的公共卫生问题。中国是全球 22 个结核病高负担国家，具有高患病率、高耐药率、高感染率、低递减率、青壮年结核病患病和死亡比例高、农村疫情高于城市等流行特点[1]。

一线抗结核药物主要有异烟肼、利福平、乙胺丁醇、吡嗪酰胺，在药物的选择压力下，结核杆菌出现耐药菌株，中国有四分之一的活动型结核病人对异烟肼和利福平耐药，而耐药结核(MDR-TB)和广泛耐药结核(XDR-TB)的出现给结核病的防控和治疗带来严峻挑战[2]。

相比其它药物，抗结核杆菌药物的研发严重滞后，近 40 年来只有一个全新结构的抗结核药物(贝达喹啉)上市[3]。因此，寻找新的药物作用靶点、发现新型抗结核杆菌分子刻不容缓。在药物发展史中，很多药物分子来自植物，比如青蒿素、奎宁、吗啡、紫杉醇等均分离自植物，我国中草药资源丰富，通过筛选，可能发现一些具有抗结核杆菌的品种，是发现新型抗结核杆菌药物的重要资源[4]。本论文报道了 29 种中草药体外抗结核杆菌的筛选结果。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌株来源

结核分枝杆菌 H37Rv、牛结核分枝杆菌 BCG 菌株(购自 ATCC)。

2.1.2. 药品与试剂

甲醇、80%的乙醇、石油醚、乙酸乙酯、二甲基亚枫、利福平、异烟肼、甘油、改良罗氏培养基基础。

2.1.3. 植物提取物的制备

所有中草药购自贵阳市和平药房。中草药名称、传统药效、药用部位和提取物的制备方法见表 1。

2.2. 中草药抗 H37Rv、BCG 体外试验

采用药基法进行。改良罗氏培养基 40.84 g, 加入 12 ml 的甘油, 加蒸馏水 600 ml 煮沸 5~10 分钟, 115℃ 20 分钟灭菌, 待冷至 55℃ 左右时以无菌操作加入 1000 ml 无菌搅匀的全蛋液, 混匀, 分装在 15 mm × 150 mm 的试管, 每管 5 ml。中草药提取物样本用 DMSO 配成母液, 加入到试管中, 每个样本配 4 个浓度, 分别为 10、5、2.5、1.25 mg/ml, 异烟肼为阳性对照(0.5、1、2 μg/ml), 阴性对照为含 5% DMSO 的无药培养基, 放置成斜面, 用 85℃ 流动蒸汽加热 50 分钟后冷却待用, 分别接种 H37Rv、BCG 菌悬液 (10^8 CFU/ml) 20 μl 后, 置于 36.5℃ 的恒温培养箱中培养 20 天。每个浓度做 3 管, 平行做 2 次。培养结束后, 试管斜面菌落数小于 5 个(含 5 个)视为有效, 此时的样本浓度即为该样本抗结核杆菌的 MIC 值。MIC 值大于 10 mg/ml 的样本视为无抗结核杆菌活性[5]。

2.3. 与异烟肼、利福平的联合抗 BCG 试验

为探索有抗结核杆菌活性的中草药样本是否与异烟肼、利福平存在协同作用, 进行了联合抗菌试验。本试验经测试得知, 利福平、异烟肼抗 BCG 的 MIC 值分别为 3.2 μg/ml 和 1.0 μg/ml。含药培养基的制备方法同上, 分组如下, 联合抗菌组: 异烟肼(1/2 MIC) + 中草药样本(1/2 MIC)、利福平(1/2 MIC) + 中草药样本(1/2 MIC); 阳性药对照组: 异烟肼(MIC)利福平(MIC); 阳性药亚抑菌浓度组: 异烟肼(1/2 MIC)、利福平(1/2 MIC); 中草药亚抑菌浓度组: 中草药样本(1/2 MIC)。按上述方法, 培养结束后, 试管斜面菌落数小于 5 个(含 5 个)视为有联合作用, 标记为“+”, 6 个菌落以上视为无联合作用, 标记为“-”。

3. 结果

3.1. 中草药抗 H37Rv、BCG 体外试验

29 种中草药提取物, 有 14 种表现出抗结核杆菌活性(表 1)。其中千里光、大蓟、三角条、山茱萸、杜仲、秦皮、苦参、玉竹、远志、白术、半夏的 MIC 值为 2.5 mg/ml, 夏枯草、金银花、蒲公英的 MIC 值为 2.5 mg/ml。大蓟抗结核杆菌 H37Rv 的 MIC 值为 2.5 mg/ml, 但是牛结核杆菌 BCG 对大蓟更为敏感, MIC 值为 1.25 mg/ml。除大蓟外其余 13 种中草药抗 H37Rv 和 BCG 的 MIC 值没有差异。

3.2. 与异烟肼、利福平的联合抗 BCG 试验

具有抗牛结核杆菌 BCG 活性的 14 种中草药提取物, 在亚抑菌浓度(1/2 MIC)下没有抗菌活性, 阳性药异烟肼和利福平在亚抑菌浓度(1/2 MIC)下同样未能抑制 BCG 菌株的生长。在培养基中加入亚抑菌浓度的中草药提取物和亚抑菌浓度的阳性药, 结果显示(表 2), 大蓟、远志、千里光、三角条、杜仲、秦皮、半夏、苦参、蒲公英与异烟肼和利福平都存在协同抗菌作用, 山茱萸、玉竹、白术仅与异烟肼存在协同抗菌作用, 金银花、夏枯草与异烟肼和利福平都不存在协同抗菌作用。

4. 讨论

从上世纪 50 年代开始, 我国医药工作者对抗结核中草药进行过大量研究, 其中郭钧等对 266 种单味中草药进行了抗结核杆菌试验[6], 主要以中草药水煎液加入培养基的方式进行筛选, 其中有 18 味中草药使用酒精浸剂。我们对 29 种中草药进行试验, 14 种显示有抗菌作用, 其中大蓟、苦参、夏枯草、山茱萸、金银花 5 种中草药与郭钧的结果相符, 蒲公英、远志、玉竹、半夏具有抗结核杆菌活性, 但在郭钧的报道中是无效的, 另外 5 种有抗结核杆菌活性的中草药(千里光、三角条、杜仲、秦皮、白术)未出现在

Table 1. Name, traditional functions, medicinal parts, extracting methods and MIC value of 29 traditional Chinese medicines**表 1.** 29 种中草药名称、传统药效、药用部位、提取方法和抗结核杆菌最小抑菌浓度

名称	科	传统功效	药用部位	提取方法	MIC (mg/ml)	
					H37Rv	BCG
千里光	菊科	清热解毒、明目、止痒	全草	80%的乙醇热回流(80℃)提取两次, 滤液回收乙醇蒸干。	2.5	2.5
鸡屎藤	茜草科	利湿祛风, 止血止痛	根	同上	> 10	> 10
牛膝菊	菊科	抗炎止血	全草	同上	> 10	> 10
葛根	豆科	用于表证发热、项背强痛、麻疹不透	根	同上	> 10	> 10
夏枯草	唇形科	清肺热	全草	同上	5	5
大蓟	菊科	凉血止血、散瘀消肿	全草	同上	2.5	1.25
黄芪	蝶形花科	补气、阴虚盗汗	根	同上	> 10	> 10
蒲公英	菊科	清热解毒、利尿散结	全草	同上	5	5
金银花	忍冬科	清热解毒	花	同上	5	5
三角条	天南星科	除湿健脾、化痰祛瘀	根	同上	2.5	2.5
山茱萸	山茱萸科	滋阴补肾	果实	甲醇浸泡 7 天, 滤液回收甲醇蒸干。	2.5	2.5
杜仲	杜仲科	补肾强筋	皮	同上	2.5	2.5
地骨皮	茄科	滋阴补肾	根皮	同上	> 10	> 10
川芎	伞形科	活血化瘀	根	同上	> 10	> 10
枇杷叶	蔷薇科	止咳化痰	叶	同上	> 10	> 10
秦皮	木犀科	清热燥湿	树皮	同上	2.5	2.5
地丁	堇菜科	清热解毒	全草	同上	> 10	> 10
车前草	车前科	利尿通淋	全草	同上	> 10	> 10
牛蒡子	菊科	消肿解毒	果实	同上	> 10	> 10
辛夷	木兰科	祛风寒	花	同上	> 10	> 10
虎杖	蓼科	利尿除湿、清热解毒	根	同上	> 10	> 10
苦参	豆科	清热燥湿	根	同上	2.5	2.5
防风	伞形科	祛风寒	根	同上	> 10	> 10
玉竹	百合科	滋阴	根	同上	2.5	2.5
白芷	伞形科	清热解毒	根	同上	> 10	> 10
远志	远志科	祛痰、安神	根	同上	2.5	2.5
白术	菊科	燥湿健脾	根	同上	2.5	2.5
半夏	天南星科	燥湿祛痰	根	同上	2.5	2.5
当归	伞形科	活血化瘀	根	同上	> 10	> 10
异烟肼	-	-	-	-	1 µg/ml	1 µg/ml

Table 2. Combined anti-bcg trial of 14 Chinese herbal medicines with isoniazid and rifampicin
表 2. 14 种中草药与异烟肼、利福平的联合抗 BCG 试验

中草药提取物	浓度 (mg/mL)	提取物	
		+INH (0.5 µg/ml)	+RIF (1.6 µg/ml)
大蓟	0.6	+	+
远志	1.25	+	+
千里光	1.25	+	+
三角条	1.25	+	+
山茱萸	1.25	+	-
金银花	2.5	-	-
杜仲	1.25	+	+
秦皮	1.25	+	+
夏枯草	2.5	-	-
玉竹	1.25	+	-
白术	1.25	+	-
半夏	1.25	+	+
苦参	1.25	+	+
蒲公英	2.5	+	+

郭钧的样本库中。中草药主要通过小分子化合物产生药效，一些小分子因极性小，水煎难以溶出活性分子或溶出有限，我们主要采用乙醇热回流或甲醇浸泡提取，我们推测，造成结果有差异应与提取方法不同有关。

结核分枝杆菌不发酵糖类，与牛分枝杆菌的区别在于结核分枝杆菌可合成烟酸和还原硝酸盐，而牛分枝杆菌不能。牛分枝杆菌 BCG 菌株对人没有致病性，本试验揭示 H37Rv 和 BCG 菌株对中草药的敏感性十分接近，这一点与郭钧的报道相符。因此，对中草药进行抗结核杆菌筛选，可先用 BCG 菌株初筛，然后再采用 H37Rv 菌株和野生结核杆菌菌株进行验证。

从中草药中发现与现有抗痨药物不同的分子骨架是研发新型抗结核药物的基础。我们的研究结果表明，三角条具有抗结核杆菌活性，应值得重视。三角条的学名为瑶山南星，是侗族民间医生用于治疗结核的单味秘方，目前未见研究报道。我们拟对三角条进行活性跟踪，相关工作正在进行中。

基金项目

国家自然科学基金(81460531)，贵州省社会发展科技攻关项目(SY 字[2013]3058 号)。

参考文献 (References)

- [1] The World Health Organization (2016) Global TB Report. The World Health Organization, Geneva.
- [2] Eric, L.N., Melvin, K.S. and Wing, W.Y. (2010) Current Development and Future Prospects in Chemotherapy of Tuberculosis. *Respirology*, **15**, 764-778.
- [3] Adhvaryu, M. and Vakharia, B. (2011) Drug-Resistant Tuberculosis: Emerging Treatment Options. *Current Clinical Pharmacology*, **3**, 51-67.
- [4] Gutierrez-Lugo, M.T. and Bewley, C.A. (2008) Natural Products, Small Molecules and Genetics in Tuberculosis Drug Development. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **51**, 2606-2612.
- [5] Patricia, T.K. and George, P. (1985) Public Health Mycobacteriology, a Guide for the Level 3 Laboratory. U .S. De-

partment of Health and Human Service Public Health Service Centers of Disease Control, Atlanta, 162-182.

- [6] 郭钧, 单菊生, 阎邦首. 中药对结核杆菌抗菌作用的研究(1)试管内 291 种中药对结核菌抑菌作用研究[J]. 中国防痨杂志, 1964, 5(3): 481-487.

Hans 汉斯

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjmce@hanspub.org