

· 实验研究 ·

苦参异戊烯基黄酮与甘草黄酮联用体外抑菌活性评价及抗小鼠乳腺炎作用研究

曹雅琦^{1,2}, 魏丹丹², 张森², 曾飞², 郭盛², 郭建明², 段金康^{1,2}

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 南京中医药大学中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 探讨苦参异戊烯基黄酮与甘草黄酮以及两者联用的体内、体外抗菌活性, 为苦参和甘草的资源价值发现及其综合开发利用提供科学依据。方法 制备获得苦参异戊烯基黄酮部位(KSHT)及甘草黄酮部位(GCHT), 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对所制备的组分进行定性分析。采用金黄色葡萄球菌生长、细菌生物被膜生成及细菌色素生成等指标来评价 2 种黄酮部位单用及联合用药的体外抑菌活性; 进一步采用金黄色葡萄球菌致小鼠乳腺炎模型进行体内抗菌活性评价。结果 从 KSHT 中鉴定出 20 个黄酮类成分, 其中 18 个为异戊烯基取代黄酮类化合物。从 GCHT 中共鉴定出 22 个黄酮类化合物, 均为黄酮及二氢黄酮类化合物。KSHT 对金黄色葡萄球菌生长抑制作用、生物被膜形成和色素生成的抑制效果均优于 GCHT, 且二者联用优于各自单用, 表现出协同抗菌作用。体内抗菌实验结果显示, 二者高、低剂量单用及联用对小鼠乳腺炎各项指标均有一定改善作用, 二者联用对乳腺炎小鼠脏器指数、组织载菌量的改善作用优于单用组, 且 KSHT 优于 GCHT; 但 GCHT 对模型组小鼠乳腺组织病理学改善作用及对炎症因子 IL-1 β 、IL-2、TNF- α 的降低作用均优于 KSHT, 且与联用组相当。结论 苦参异戊烯基黄酮与甘草黄酮联用抗金黄色葡萄球菌作用优于单用, 在畜牧养殖业中乳腺炎的防治中具有一定的应用前景。为苦参和甘草的资源价值发现及其综合开发利用提供科学依据, 同时为制备防治奶牛乳腺炎及金黄色葡萄球菌感染的日化用品、中成药和中兽药提供参考, 并为畜牧养殖业替代抗生素研究提供支撑。

关键词:苦参; 甘草; 异戊烯基黄酮; 金黄色葡萄球菌; 抑菌; 乳腺炎

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2020)03-0331-08

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0331

引文格式:曹雅琦, 魏丹丹, 张森, 等. 苦参异戊烯基黄酮与甘草黄酮联用体外抑菌活性评价及抗小鼠乳腺炎作用研究[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(3): 331-338.

Bacteriostasis of Prenylated Flavonoids from *Sophora Flavescens* and Flavonoids from *Glycyrrhiza Uralensis* Alone and Their Combination on *Staphylococcus Aureus* and Experimental Mastitis

CAO Ya-qi^{1,2}, WEI Dan-dan², ZHANG Sen², ZENG Fei², GUO Sheng², GUO Jian-ming², DUAN Jin-ao^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang, 212013, China; 2. National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, State Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the antibacterial activity of prenylated flavonoids from *Sophora flavescens* and licorice flavonoids and their combination *in vitro* and *in vivo*, so as to provide scientific basis for the resource value discovery and comprehensive development of *Sophora flavescens* Ait. and *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **METHODS** The UPLC-Q-TOF-MS technology was applied to qualitatively analyze the prepared prenylated flavonoids from *Sophora flavescens* Ait. (KSHT) and licorice flavonoids (GCHT). The *in vitro* antibacterial activity was evaluated by investigating the effect of a single use and com-

收稿日期: 2020-02-29

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81603273); 宁夏重点研发计划(2017BY079); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-21)

第一作者: 曹雅琦, 女, 硕士研究生, E-mail: celsbl@126.com

通信作者: 魏丹丹, 女, 助理研究员, 主要从事中药资源化学与资源循环利用研究, E-mail: dandan19860502@163.com;

段金康, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源化学与资源循环利用研究, E-mail: dja@njucm.edu.cn

combined use of KSHT and GCHT on inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* and the generation of biofilm and flavin. The *in vivo* antibacterial activity was evaluated by building a mouse mastitis model induced by *Staphylococcus aureus*. **RESULTS** A total of 20 and 22 flavonoids were identified from KSHT and GCHT, respectively. KSHT outperformed GCHT in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* and the generation of biofilm and flavin. Moreover, the combined use of KSHT and GCHT had better inhibitory effect than their independent use, suggesting that they have synergistic antibacterial action. Whether they were independently or jointly used in high or low doses, all the indexes of mastitis in mice were improved. Compared with the independent use of KSHT and GCHT, the combined use can better improve the viscera index and fungal burden of tissue in mice with mastitis. Regarding the improvement of indexes, KSHT was better than GCHT. In terms of the effect on improving the histopathology of mammary gland and reducing IL-1 β , IL-2 and TNF- α in model group, GCHT was better than KSHT, but equivalent to the combination group. **CONCLUSION** The results of *in vitro* and *in vivo* tests indicated that the combined use of KSHT and GCHT has the best effect in resisting *Staphylococcus aureus*. It is expected that they can be jointly used in the prevention and treatment of mastitis in animal husbandry.

KEYWORDS: *Sophora flavescens* Ait.; *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; prenylated flavonoids; *Staphylococcus aureus*; bacteriostasis; mastitis

苦参为豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根,具有驱虫、消炎、利尿、止泻等多种生物活性^[1]。从苦参中分离出的异戊烯基黄酮类化合物对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和枯草杆菌等革兰阳性菌有显著的抗菌作用^[2-3]。甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根和根茎,含有丰富的黄酮类成分。目前,国内外对甘草黄酮的研究集中在抑菌、免疫、抗肿瘤和抗氧化活性等方面^[4-5]。苦参和甘草均为常用中药,二者配伍使用始见于苦参甘草汤,出自《备急千金要方》卷十五,主治疳痢不止。

金黄色葡萄球菌是一种常见的人畜共患病原菌,是引起奶牛乳腺炎的主要病原菌之一^[6],其在奶牛乳腺炎中的检出率为 17.43%~52.80%^[7],给国内外养殖业造成了巨大的经济损失。而近年来由于抗生素的滥用,导致金黄色葡萄球菌耐药性逐渐增强,出现了多种耐药菌株,因此,养殖业迫切需要探索新的抗菌策略来控制耐药菌株的感染。中药具有多组分、多靶点和多作用的特点,在长期临床应用中尚未发现明显的耐药性,从中草药中寻找新型抗菌药物已成为解决细菌耐药性的有效途径^[8]。

本研究对苦参异戊烯基黄酮类化合物及甘草黄酮类化合物进行了体内、体外抗菌活性评价,为苦参和甘草的资源价值发现及其综合开发利用提供科学依据,同时为防治奶牛乳腺炎及其他金黄色葡萄球菌感染的日化用品、中成药和中兽药的研发提供参考,并为畜牧养殖业替代抗生素研究提供支撑。

1 材料

1.1 实验菌株

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923),由上海医药工业研究院馈赠。

1.2 实验药材

苦参药材来自内蒙古地区所生产苦参饮片,购自 2018 年 7 月,经南京中医药大学段金廛教授鉴定为豆科槐属植物苦参 *S. flavescens* 的干燥根,标本现存于江苏省中药资源产业化过程协同创新中心,标本号为 SF20180722;甘草药材来源于江阴天江药业,购自 2017 年 10 月,经南京中医药大学段金廛教授鉴定为豆科甘草属植物甘草 *G. uralensis* 的干燥根及根茎,标本现存于江苏省中药资源产业化过程协同创新中心,标本号为 GU20171023。

1.3 实验试剂

LB 培养基(LB)、水解酪蛋白培养基(MH)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)购自上海源叶生物科技有限公司;甲醇(色谱纯)、甲酸(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、无水乙醇(分析纯)、结晶紫(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司;乙酸乙酯(分析纯)购自南京晚晴有限公司;AB-8 大孔吸附树脂购自索莱宝有限公司;摇瓶、平皿、康宁全白酶标 96 孔微孔板购自上海化科实验器材有限公司;超纯水由 Millipore 超纯水系统提供。

小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-2(IL-2)、白介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫试剂盒购自南京金益柏生物科技有限公司;苏木素-伊红染液试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;注射用青霉素钠购自江苏省人民医院;兽用青霉素购自久鹏制药有限公司。

1.4 实验动物

BALB/C 孕鼠,雌性,SPF 级,购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场,动物生产许可证号:SCXK(苏)2017-0001;屏障饲养环境系统,温度 20~25℃,相对湿度 40%~70%,换气次数 10~20 次/h,每日 12 h/12 h 交替照明;实验期间每日消毒地面、台面和墙面,消毒剂为新洁而灭、来苏尔、乙醇交替使用。

1.5 仪器

DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海昕仪仪器仪表有限公司),TDL-80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),FW80 型高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),超净工作台,恒温生化培养箱,Quitix125D 电子天平(德国赛多利斯公司),IS-RDV1 型恒温振荡器(美国精骐公司),KH-500 型超声波清洗器,旋转蒸发仪(瑞士布奇公司)。Waters ACQUITY UPLC 系统(美国 Waters 公司),Waters 2998 型 PDA 检测器(美国 Waters 公司),Waters Q-TOF Premier 飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司),MassLynx 4.1 质谱工作站软件(美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 苦参异戊烯基黄酮、甘草黄酮的制备

干燥苦参药材,粉碎,6 倍量乙酸乙酯渗漉提取 4 次,减压浓缩回收溶剂后,经 AB-8 大孔树脂柱层析,弃去 10%乙醇部位,收集 80%乙醇洗脱馏分,浓缩并冷冻干燥,得苦参异戊烯基黄酮富集部位(KSHT)。干燥甘草药材,粉碎,10 倍量 70%的乙醇加热回流提取 3 次,乙酸乙酯萃取后萃取物经 AB-8 大孔树脂柱层析,收集 60%醇洗脱馏分,浓缩并冷冻干燥,得甘草黄酮富集部位(GCHT)。黄酮含量测定参照文献^[9],以芦丁为对照品,加入 5%亚硝酸钠溶液,于 500 nm 处测定吸光度,KSHT 黄酮含量为 50.12%,GCHT 的含量为 41.13%。

2.2 KSHT 及 GCHT 定性分析

采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对苦参异戊烯基黄酮及甘草黄酮进行定性分析。其中超高效液相色谱部分采用 Waters Acquity 系统(Waters, Prague, Czech Republic),Waters Acquity UPLC 色谱柱(BEH C₁₈ 100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),柱温为 35℃,以 A(0.1%甲酸-水)和 B(乙腈)为流动相进行梯度洗脱:0~1 min,5%~30% B;1~5 min,30%~50% B;5~14 min,50%~70% B;14~20 min,70%~100% B;流速为 0.4 mL/min,进样

量为 5 μL。Q-TOF-MS 离子源采用电喷雾 ESI,阴离子模式,扫描时间为 1 s,质量范围为 m/z 100~1 000,毛细管电压:2.0 kV,离子源温度:120℃,去溶剂化温度:350℃,流速:600 L/h,锥孔气流速:50 L/h。

2.3 KSHT 及 GCHT 对金黄色葡萄球菌的抑制作用

2.3.1 KSHT 及 GCHT 对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度(MIC)值测定 参考文献^[10]测定供试液对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度。活化菌株,取 A_{600 nm} 值为 1 的菌液用麦氏比浊管稀释至 0.5 麦氏比浊度,继续稀释 1 000 倍得到试验用菌液(约为 1.5×10^6 U/mL),备用。96 孔板 4 倍稀释法配置苦参异戊烯基黄酮及甘草黄酮不同浓度梯度溶液。以注射用青霉素钠为阳性药物对照,96 孔板 10 倍稀释法配置阳性药不同浓度梯度溶液。苦参异戊烯基黄酮及甘草黄酮的最终浓度梯度为 0.39~100 μg/mL,青霉素钠最终浓度梯度为 1×10^{-3} ~10 μg/mL。菌液加药后 37℃下培养 16 h,用酶标仪于 600 nm 处检测各孔 A(吸光度)值,试验重复 3 次,每次平行 3 个复孔,取平均值,计算相应浓度下的抑菌率,以肉眼观测不到菌落生长的浓度为各组相应 MIC 值。

2.3.2 KSHT 及 GCHT 抑制金黄色葡萄球菌生物被膜及黄素 IC₅₀ 值测定 按 2.3.1 项下浓度梯度配置各供试液及菌液,于 96 孔板中 37℃下培养各加药后菌液及空白菌液 36 h,使其被膜生长充分,之后弃去培养基,PBS 溶液洗涤,甲醇固定,用 0.5%结晶紫染色,加入双蒸水洗涤晾干,加入 33%冰醋酸于 37℃培养箱中溶解后于 570 nm 处测定 A 值,计算 KSHT 及 GCHT 对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制率及半数抑制浓度 IC₅₀ 值^[11]。

按 1:1 000 比例吸取对数生长期的金黄色葡萄球菌菌液于 TSB 培养基中,于 96 孔板中 37℃下培养各加药后菌液及空白菌液 16 h;之后将菌液于 12 000 r/min 下离心后弃去上清液,PBS 溶液清洗沉淀,离心后弃去上清,重复 3 次,加入甲醇溶液于 55℃下水浴加热 3 min,之后于 12 000 r/min 下离心 10 min,吸取上清液于 96 孔板中,于 465 nm 处测定 A 值,计算 KSHT 及 GCHT 对金黄色葡萄球菌黄素生成的抑制率及半数抑制浓度 IC₅₀ 值^[12]。

2.4 KSHT 与 GCHT 联用抑制金黄色葡萄球菌活性评价

采用微量棋盘稀释法^[13],于 96 孔微孔板测定 KSHT 与 GCHT 以 2×MIC~1/16×MIC 的质量浓度联合应用对金黄色葡萄球菌的抑菌效果,计算分级抑菌浓度(FIC)指数。同时,测定各孔 600 nm 处的吸光度 A 值:A 值大于 0.1 的标记为绿色,即有菌生长;A 值小于 0.1 的标记为红色,即无菌生长。

FIC 指数=MIC(KSHT 联合)/MIC(KSHT 单用)+MIC(GCHT 联合)/MIC(GCHT 单用),式中 MIC(KSHT 单用)和 MIC(GCHT 单用)分别为 KSHT 和 GCHT 单用时的各自的浓度, MIC(KSHT 联合)和 MIC(GCHT 联合)为两药联用时各自的浓度。若 FIC 指数≤0.5,两药具协同作用;0.5<FIC 指数≤1,相加作用;1<FIC 指数≤2,无关作用;FIC 指数>2,拮抗作用。

2.5 KSHT 及 GCHT 体内抗小鼠乳腺炎活性评价

BALB/c 孕鼠 72 只,适应饲养 1 周,待其分娩后 6~8 d,随机分为 9 组,每组 8 只:空白对照组,模型组,阳性药组(兽用青霉素),KSHT 高、低剂量组,GCHT 高、低剂量组,KSHT-GCHT 1:1 联用高、低剂量组,依据药典要求甘草及苦参给药量,换算至小鼠,高剂量给药组灌胃剂量为 100 mg/kg,低剂量给药组灌胃剂量为 50 mg/kg;模型组及空白组灌胃相同体积的 1%吐温-80 的生理盐水。小鼠自由饮水,模型组及各给药组于第 5 对乳房处注射生理盐水稀释的浓度为 2.0×10⁴ U/mL 的金黄色葡萄球菌,每侧 50 μL;空白组于相同位置注射相同体积的生理盐水。造模成功后连续给药 7 d,各给药组用 1%吐温-80 的生理盐水溶解,末次给药后脱颈处

死小鼠,快速剪开腹部皮肤,观察乳腺组织的病理变化。

2.5.1 乳腺脏器指数及组织病理学评价 称取各组小鼠乳腺组织质量,计算其脏器指数。取第 5 对乳腺组织一侧置于 4%多聚甲醛溶液固定,HE 染色,并进行乳腺组织病理学评价。

2.5.2 乳腺组织载菌量及炎症因子测定 另一侧乳腺组织称质量后按每 1 g 质量加入 1 mL 无菌生理盐水,冰上研磨为匀浆。各组匀浆液稀释至合理的倍数,取 100 μL 稀释液涂布平板,置于 37℃培养箱中培养 16~18 h,选择菌落数为 30~300 的平板进行计数,并换算各小鼠乳腺组织单位质量的载菌量。剩余乳腺组织匀浆液以 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,按照试剂盒说明书,测定各炎症因子水平。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示;对每组数据进行正态和方差齐性的检验:数据呈正态分布且方差齐时,选用单因素方差分析的方法,组间两两比较选用检验法进行统计分析,方差不齐时采用 *Dunnett's* 检验;数据不呈正态分布时,采用非参数检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 KSHT 及 GCHT 定性分析

根据 UPLC-QTOF/MS 质谱信息,参考文献报道^[14-24],从 KSHT 中共鉴定 20 个黄酮类成分,其中 18 个为异戊烯基取代黄酮类化合物。从 GCHT 中共鉴定出 22 个黄酮类化合物,均为黄酮及二氢黄酮类化合物,结果见表 1~2。

表 1 苦参异戊烯基黄酮化合物归属

序号	保留时间/min	Mass[M-H] ⁻	碎片峰	化合物名称
1	2.288	563.140 6	249.091 3	5,4'-二羟基-异黄酮-7-O-β-D-木糖-(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖苷
2	5.032	283.061 2	249.019 3	biochanin A
3	5.265	385.129 2	205.087 0;249.113 2	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-8-异戊烯基-7,2',4'-三羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇
4	7.144	353.139 5	249.113 2;271.061 2	isoxanthohumol
5	7.926	441.191 9	353.103 1;385.129 3	Kushenol Q
6	8.454	453.191 9	149.024 4;275.165 3	Kushenol N
7	9.361	437.197 0	191.035 0;161.024 4;275.165 3	kurarinone
8	9.594	439.176 2	287.128 9;261.149 6;193.014 2	kushenol X
9	10.312	467.207 5	437.197 0;379.118 7;325.071 8;205.050 6	neokurarinol

10	11.643	437.160 6	381.098 0;313.035 4;285.045 0	kushenol C
(续表)				
序号	保留时间/min	Mass[M-H] ⁻	碎片峰	化合物名称
11	11.983	451.212 6	249.113 2	kushenol D
12	12.425	423.181 3	261.149 6;193.050 6;137.133 6;161.024 4	sophoraflavanone G
13	13.565	439.176 2	261.076 8;177.019 3	kushenol L
14	15.594	421.165 7	287.128 9;261.149 6	8-lavandulyl kaempferol
15	15.932	437.197 0	313.180 9;301.071 8;189.019 3;165.040 1	kuraridin
16	16.628	423.181 3	379.151 1;285.113 2	Norkurarinone
17	17.284	437.197	409.202 0;325.071 8;285.149 6;261.149 6	Leachianone A
18	17.579	507.238 8	323.201 7;317.066 7;275.092 5;137.133 6	kushenol M
19	17.985	407.186 4	379.191 5;161.024 4	kushenol A
20	18.36	491.243 9	275.128 9;161.024 4	kushenol B

表 2 甘草黄酮化合物归属

序号	保留时间/min	Mass[M-H] ⁻	碎片峰	化合物
1	2.349	417.117 3	255.069 0	甘草苷
2	3.219	549.162 1	549.165 0	甘草素-4'-芹糖苷
3	3.468	417.117 6	255.064 7	异甘草苷
4	3.658	475.312 4	417.117 3;255.064 5	7-甲氧基甘草苷
5	6.262	255.062 3	119.047 9;135.007 6	甘草素
6	6.549	267.065 1	159.042 8	考迈斯托醇
7	7.587	367.116 8	309.037 0;297.039 4;201.017 4	甘草宁 B
8	8.527	353.138 5	283.063 5;116.935 8	甘草宁 I
9	9.237	367.118 6	351.088 0	甘草宁 N
10	9.892	353.101 6	353.120 8	甘草黄酮醇
11	10.544	353.101 1	353.104 8;339.121 8	异甘草黄酮醇
12	11.351	365.102 2	365.104 8	甘草醇
13	11.982	337.107 8	337.106 8;335.089 8;116.926 0	Licoagroaurone
14	13.693	351.085 9	337.106 8	甘草宁 G
15	14.837	335.087 3	305.045 2;291.068 8	5-甲氧基光甘草酮
16	15.517	391.190 4	369.133 0;365.147 8	kanzonol C
17	16.064	369.169 3	369.171 7;295.198 6	乌拉尔醇
18	16.608	423.216 2	391.188 5;233.115 7	Licoricidin
19	17.414	423.214 4	325.179 9;183.011 0	kanzonol H 及其异构体
20	17.779	421.198 7	389.172 8;339.195 4	kanzonol J 及其异构体
21	18.443	437.236 7	271.086 1;203.104 7	Licoriisoflavan A
22	18.578	419.148 5	339.229 8	甘草宁 H

3.2 KSHT 及 GCHT 对金黄色葡萄球菌 MIC 值的影响

分别为 25 μg/mL 与 100 μg/mL;通过比较 MIC 值及不同剂量下两者抑菌率发现,苦参异戊烯基黄酮的体外抑菌活性优于甘草黄酮,结果见表 3。

表 3 苦参异戊烯基黄酮及甘草黄酮体外抑菌活性

样品	抑制率/%					MIC/(μg·mL ⁻¹)
	100 μg/mL	25 μg/mL	6.25 μg/mL	1.56 μg/mL	0.39 μg/mL	
KSHT	91.41±10.23	89.45±3.42	61.55±1.32	28±12.13	17.78±0.23	25
GCHT	96.41±3.24	60.51±4.71	53.47±2.16	39.12±3.13	11.23±2.14	100
青霉素	93.39±8.21 ^a	94.23±2.19 ^b	62.42±2.19 ^c	30.38±10.21 ^d	24.81±0.13 ^e	1

注:青霉素剂量 a=10 μg/mL,b=1 μg/mL,c=0.1 μg/mL,d=0.01 μg/mL,e=0.001 μg/mL。

3.3 KSHT 与 GCHT 联用对 FIC 指数的影响

苦参异戊烯基黄酮(KSHT)与甘草黄酮(GCHT)联用时,对金黄色葡萄球菌的抑制活性见图 1。由结果可知,当二者浓度均为各自 MIC 值的 1/4 时,两药联合使用表现出显著的抑菌作用。二者联用的 FIC 指数见表 4,由此可知:二者以各自 MIC 浓度的 1/4 联用时,对金黄色葡萄球菌生长具有协同抑制作用;二者以各自 MIC 浓度以上进行联用时,对金黄色葡萄球菌生长具有相加作用。

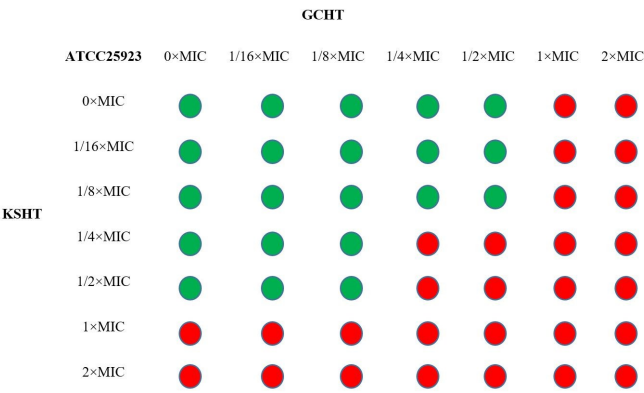


表 4 苦参异戊烯基黄酮与甘草黄酮联合抑菌作用

组别	联用/(μg·mL ⁻¹)		FIC 指数	作用效果
	KSHT	GCHT		
1/4×MIC KSHT-1/4×MIC GCHT	6.25	25	0.50	协同
1/4×MIC KSHT-1/2×MIC GCHT	6.25	50	0.75	相加
1/2×MIC KSHT-1/2×MIC GCHT	12.5	50	1.00	相加
1/2×MIC KSHT-1/4×MIC GCHT	12.5	25	0.75	相加
1×MIC KSHT	25.0	0	—	—
1×MIC GCHT	0	100	—	—

表 5 苦参异戊烯基黄酮及甘草黄酮抑制金黄色葡萄球菌生物被膜生成活性

样品	抑制率/%					IC ₅₀
	100 μg/mL	25 μg/mL	6.25 μg/mL	1.56 μg/mL	0.39 μg/mL	
KSHT	89.35±6.21	88.34±4.17	80.64±3.56	74.13±2.34	45.18±2.1	1.25±0.09
GCHT	93.21±3.17	76.15±9.34	60.31±7.85	45.64±4.87	20.19±6.86	2.84±0.13
KSHT-GCHT	98.37±6.98	96.71±10.21	89.11±6.34	65.54±7.35	17.19±2.18	1.14±0.09
青霉素	95.78±3.21 ^a	90.93±3.26 ^b	85.32±2.17 ^c	75.93±1.98 ^d	34.70±3.28 ^e	1.67×10 ⁻³ ±6.5×10 ⁻⁵

注:青霉素剂量 a=10 μg/mL,b=1 μg/mL,c=0.1 μg/mL,d=0.01 μg/mL,e=0.001 μg/mL。

表 6 苦参异戊烯基黄酮及甘草黄酮抑制金黄色葡萄球菌黄素生成活性

样品	抑制率/%					IC ₅₀
	100 μg/mL	25 μg/mL	6.25 μg/mL	1.56 μg/mL	0.39 μg/mL	
KSHT	87.56±4.79	59.47±9.16	41.25±7.54	26.66±5.21	12.78±1.31	7.22±0.42
GCHT	91.45±2.89	87.96±3.28	44.13±8.91	31.26±4.73	15.31±1.47	20.35±2.36
KSHT-GCHT	98.36±1.86	52.15±2.65	42.13±9.87	26.71±3.76	17.24±5.34	6.41±1.13
青霉素	100.03±2.32 ^a	99.99±1.32 ^b	47.32±2.16 ^c	40.67±3.14 ^d	20.54±1.21 ^e	1.29×10 ⁻¹ ±1.3×10 ⁻³

注:青霉素剂量 a=10 μg/mL,b=1 μg/mL,c=0.1 μg/mL,d=0.01 μg/mL,e=0.001 μg/mL。

图 1 苦参异戊烯基黄酮及甘草黄酮的抑菌作用

3.4 KSHT 及 GCHT 对金黄色葡萄球菌生物被膜及色素生成抑制作用

KSHT 及 GCHT 在体外均有显著的抑制金黄色葡萄球菌生物被膜生成的活性,KSHT 对金黄色葡萄球菌的生物被膜 IC₅₀ 值为 1.25 μg/mL,GCHT 对金黄色葡萄球菌的生物被膜 IC₅₀ 值为 2.84 μg/mL,两者 1:1 联用时,对金黄色葡萄球菌的生物被膜的 IC₅₀ 值为 1.14 μg/mL,KSHT 对生物被膜抑制作用优于 GCHT,两者 1:1 联用时,抑制被膜生长作用优于单用,结果见表 5。

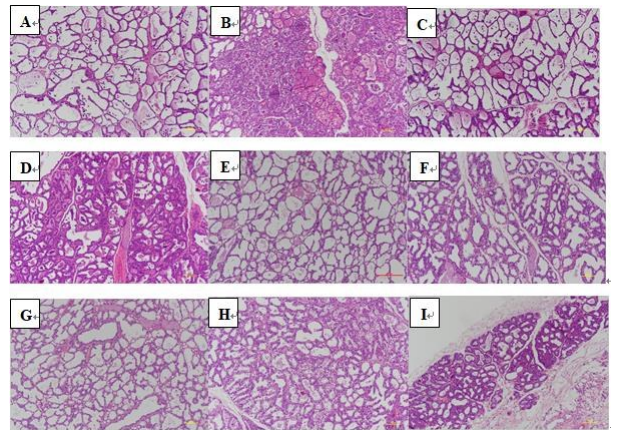
KSHT 与 GCHT 在体外均有显著的抑制金黄色葡萄球菌色素生成的作用,KSHT 对金黄色葡萄球菌色素的 IC₅₀ 值为 7.22 μg/mL,GCHT 对金黄色葡萄球菌的色素 IC₅₀ 值为 20.35 μg/mL,两者 1:1 联用时,对金黄色葡萄球菌的色素的 IC₅₀ 值为 6.41 μg/mL,结果表明,KSHT 效果优于 GCHT,两药 1:1 联用时,其抑制色素生成活性优于单用,结果见表 6。

3.5 苦参异戊烯基黄酮及甘草黄酮抗小鼠乳腺炎的作用

3.5.1 组织病理学观察 组织病理学观察表明:空白对照组小鼠乳腺组织无异常病理变化,间质无明显炎症浸润(图 2A);模型组小鼠乳腺腺泡病变明显,腺泡明显增生,腺泡腔内可见大量炎性细胞碎片,炎症细胞类型多样,以嗜中性粒细胞为主(图 2B)。相比模型组,各给药组均有不同程度的改善,两药联用效果优于各自单用:KSHT 高剂量组乳腺腺泡上皮细胞轻微剥脱,无显著炎性细胞浸润(图 2C);KSHT 低剂量组乳腺腺泡上皮细胞轻微剥脱,间质中度炎性细胞浸润,以嗜中性粒细胞为主(图 2D)。GCHT 高剂量组乳腺组织无异常病理变化,乳腺腺泡上皮细胞轻微剥脱(图 2E);GCHT 低剂量组乳腺间质轻微炎性细胞浸润,以嗜中性粒细胞为主(图 2F)。KSHT-GCHT(1:1)联用高剂量组仅见乳腺腺泡上皮细胞轻微剥脱,无显著炎性细胞浸润(图 2G);KSHT-GCHT(1:1)联用低剂量组乳腺腺泡上皮细胞轻微剥脱,间质轻微炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主(图 2H)。阳性药组乳腺组织仅有间质轻度炎症细胞浸润(图 2I)。

3.5.2 乳腺组织脏器指数、载菌量及炎症因子含量的测定 脏器指数结果显示:相比空白组,模型组小鼠乳腺指数显著增加,可能与炎症所致的红肿热痛相关;与模型组相比,阳性药组、GCHT 高剂量组、KSHT 高剂量组以及 KSHT 与 GCHT1:1 联用组小鼠乳腺指数显著下降,提示各治疗组均可不同程度改善乳腺炎小鼠乳腺的红肿热痛,其中 KSHT 与 GCHT1:1 联用组优于两者单用。各组乳腺组织载菌量结果显示:与空白组相比,模型组小鼠乳腺载菌量显著增加;与模型组相比,各给药组小鼠乳腺载菌量均下降。其中,GCHT 组效果优于 KSHT 组,

KSHT 与 GCHT 联用组效果最优,优于两者单用(表 7)。炎症因子测定结果显示:金黄色葡萄球菌造模后,模型组小鼠乳腺组织 IL-1 β 、IL-2 和 TNF- α 含量均显著上升,IL-1 β 与 TNF- α 的含量增加尤其显著。二者单用时,甘草黄酮 GCHT 各剂量组对 IL-1 β 、IL-2 和 TNF- α 的降低作用均优于同剂量下的苦参异戊烯基黄酮组 KSHT,与相同剂量的二者联用组抗炎效果相当或略有优势。对于 IL-2 的调控,KSHT 组单用时与模型组相比未有显著差异,与 GCHT 联用后对 IL-2 有显著下调作用,且效果优于 GCHT 单用。对于 TNF- α 的调控作用,KSHT 与 GCHT1:1 联用组的下调作用要优于 KSHT 单用组,KSHT 与 GCHT1:1 联用组对各炎症因子的下调作用均优于 KSHT 单用,略优于 GCHT 单用(表 7)。



A. 空白对照组;B. 模型组;C. KSHT 高剂量组;D. KSHT 低剂量组;E. GCHT 高剂量组;F. GCHT 低剂量组;G. KSHT-GCHT(1:1)高剂量组;H. KSHT-GCHT(1:1)低剂量组;I. 阳性药组

图2 苦参异戊烯基黄酮及甘草黄酮对小鼠乳腺炎模型乳腺病理损伤的影响($\times 100$)

表7 乳腺炎小鼠乳腺脏器指数、载菌量及组织炎性指标($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	乳腺脏器指数	载菌量/ ($\times 10^4$ U $\cdot$ g $^{-1}$)	IL-1 β / (ng $\cdot$ mL $^{-1}$)	IL-2/ (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	TNF- α / (ng $\cdot$ mL $^{-1}$)
空白对照组	0.23 $\pm$ 0.02	4 $\pm$ 2	91.27 $\pm$ 13.78	1 458.70 $\pm$ 256.07	286.94 $\pm$ 51.74
模型组	0.33 $\pm$ 0.04 ^{##}	290 $\pm$ 23 ^{##}	109.45 $\pm$ 6.5 ^{##}	1 683.88 $\pm$ 257.48 [#]	352.72 $\pm$ 44.73 ^{##}
GCHT 高剂量组	0.29 $\pm$ 0.05 ^{**}	83 $\pm$ 18 ^{**}	85.86 $\pm$ 4.24 ^{**}	1 426.69 $\pm$ 110.75 [*]	281.72 $\pm$ 22.49 ^{**}
GCHT 低剂量组	0.34 $\pm$ 0.02	210 $\pm$ 12 [*]	81.94 $\pm$ 5.51 ^{**}	1 362.36 $\pm$ 236.48 ^{**}	270.02 $\pm$ 47.64 ^{**}
KSHT 高剂量组	0.24 $\pm$ 0.01 ^{**}	75 $\pm$ 13 ^{**}	97.20 $\pm$ 11.94 ^{**}	1 502.36 $\pm$ 191.34	299.57 $\pm$ 36.69 [*]
KSHT 低剂量组	0.30 $\pm$ 0.03	118 $\pm$ 11 [*]	91.215 $\pm$ 12.06 [*]	1 560.28 $\pm$ 195.85	335.2 $\pm$ 32.14
KSHT-GCHT 高剂量组	0.26 $\pm$ 0.02 ^{**}	70 $\pm$ 18 ^{**}	89.69 $\pm$ 15.35 ^{**}	1 407.48 $\pm$ 159.16 [*]	277.51 $\pm$ 32.23 ^{**}
KSHT-GCHT 低剂量组	0.30 $\pm$ 0.02 [*]	105 $\pm$ 21 [*]	87.66 $\pm$ 7.84 ^{**}	1 444.78 $\pm$ 188.22 [*]	280.46 $\pm$ 43.76 ^{**}
阳性药	0.14 $\pm$ 0.02 ^{**}	70 $\pm$ 17 ^{**}	97.93 $\pm$ 10.28 [*]	1 642.30 $\pm$ 306.56	330.62 $\pm$ 2.49 [*]

4 讨论

我国是养殖业大国,饲料中添加抗生素的兴起使动物养殖业的发展进入一个新的阶段,但抗生素过量、超量使用的情况严重制约我国养殖业的绿色

可持续发展^[25]。抗生素滥用,导致细菌耐药性逐渐增强,如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的出现,严重威胁人、畜安全。根据我国农业部《兽药管理条例》《饲料和饲料添加剂管理条例》有关规定,自 2020 年 1 月 1 日起,已发布停止生产、进口、经营、使用部分药物饲料添加剂,主要包括土霉素预混剂、土霉素钙预混剂、亚甲基水杨酸杆菌肽预混剂、那西肽预混剂、杆菌肽锌预混剂、恩拉霉素预混剂、喹烯酮预混剂、黄霉素预混剂、黄霉素预混剂(发酵)、维吉尼亚霉素预混剂等 10 种添加剂。绿色环保的无抗养殖新体系将逐渐成为养殖业的主流趋势,因此,研究出无耐药性的饲用添加剂成为新时代养殖行业的重中之重^[26]。文献报道^[27],苦参异戊烯基黄酮对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和枯草杆菌等革兰阳性菌有显著的抗菌作用;甘草黄酮具有抗氧化、抗菌、抑制炎症反应、降血脂、抗肿瘤等作用,能够有效地预防和改善细菌感染、溃疡等多种疾病^[28]。因此,从中药及天然药物中寻找新型替代抗生素类饲料添加剂成分是行业共识和必由之路;同时,同为豆科根茎类药用植物,苦参和甘草主要分布于我国生态环境较为脆弱的西北地区,长期的挖根取药势必进一步加剧当地的生态恶化,因此对其进行资源综合利用,实现资源的吃干榨尽符合绿色、可持续发展战略。

本研究对苦参异戊烯基黄酮类化合物及甘草黄酮类化合物以及两者联用进行了体内、体外抗菌活性评价,为苦参和甘草的资源价值发现及其综合开发利用提供科学依据,同时为防治奶牛乳腺炎及其他金黄色葡萄球菌感染的日化用品、中成药和中兽药的研发提供参考,并为畜牧养殖业替代抗生素研究提供支撑。

参考文献:

- [1] DING PL, HOU AJ, CHEN DF. Three new isoprenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(3): 237-243.
- [2] SUN MY, CAO HY, SUN L, et al. Antitumor activities of Kushen; Literature review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 373219.
- [3] 房康, 陈辰, 高荣凯, 等. 苦参总黄酮超声提取工艺及抑菌研究 [J]. *山东中医杂志*, 2016, 35(11): 989-991.
- [4] 张福欣, 宋佳烜, 刘晓东, 等. 甘草黄酮抗氧化及免疫活性 [J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(6): 1180-1183.
- [5] FUKAI T, MARUMO A, KAITOU K, et al. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Fitoterapia*, 2002, 73(6): 536-539.
- [6] SEARS PM, MCCARTHY KK. Management and treatment of staphylococcal mastitis [J]. *Vet Clin North Am Food Anim*

- Pract*, 2003, 19(1): 171-185, vii.
- [7] 樊利军, 张梦泽, 韦艺媛, 等. 奶牛金黄色葡萄球菌乳腺炎小鼠模型的建立 [J]. *实验动物科学*, 2011, 28(6): 1-6.
- [8] 程成, 张薇, 朱波, 等. 中药抗常见耐药菌的作用及其机制研究进展 [J]. *南京中医药大学学报*, 2019, 35(2): 229-233.
- [9] 陈依春, 李捷, 姚欢, 等. 紫外分光光度法测定市售檀香中总黄酮含量 [J]. *中国民族民间医药*, 2020, 29(1): 52-54.
- [10] SADER HS, FLAMM RK, JONES RN. Antimicrobial activity of daptomycin tested against Gram-positive pathogens collected in Europe, Latin America, and selected countries in the Asia-Pacific Region (2011) [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 75(4): 417-422.
- [11] 谢强, 林玉桓, 苗淑萍, 等. 香芹酚对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞膜的影响 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(23): 54-58, 62.
- [12] 李略. 柠檬酸循环调节金黄色葡萄球菌金黄色素的产生 [D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [13] ORHAN G, BAYRAM A, ZER Y, et al. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1): 140-143.
- [14] WENG ZB, ZENG F, ZHU ZH, et al. Comparative analysis of sixteen flavonoids from different parts of *Sophora flavescens* Ait. by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2018, 156: 214-220.
- [15] ZHANG L, XU L, XIAO SS, et al. Characterization of flavonoids in the extract of *Sophora flavescens* Ait. by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector and electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(5): 1019-1028.
- [16] KUROYANAGI M, ARAKAWA T, HIRAYAMA Y, et al. Antibacterial and antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(12): 1595-1599.
- [17] MA XC, XIN XL, ZHANG BJ, et al. Structural determination of flavonoids from *Sophora flavescens* [J]. *Magn Reson Chem*, 2008, 46(9): 903-906.
- [18] MA XC, XIN XL, LIU KX, et al. Simultaneous determination of nine major flavonoids in *Sophora flavescens* by RP-LC [J]. *Chromatographia*, 2008, 68: 471-474.
- [19] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. *中草药*, 2016, 47(12): 2061-2068.
- [20] 马海娟, 高简, 张亚丽, 等. 基于 HPLC-MSⁿ 的甘草成分快速鉴定及质谱裂解途径研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(3): 1120-1123.
- [21] 赵鹏宇, 焦利卫, 张志明, 等. UPLC-QTOF-MS 研究不同国家甘草黄酮成分差异 [J]. *中国食品添加剂*, 2017(3): 111-116.
- [22] 段天璇, 马长华, 王文全, 等. HPLC-MS 法鉴定甘草的指纹图谱 [J]. *中国药师*, 2009, 12(4): 414-417.
- [23] 张鲁, 康雪芳, 李红丽, 等. 甘草地上部分黄酮类成分 HPLC-MS 分析 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(5): 48-51.
- [24] LE MARECHAL C, THIERY R, VAUTOR E, et al. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products: a review [J]. *Dairy Sci Technol*, 2011, 91(3): 247-282.
- [25] 许英民. 抗生素替代物的种类及其在养禽上应用 [J]. *养禽与禽病防治*, 2016(3): 9-11.
- [26] 丁丽军, 袁华根. 益生菌的作用及安全性研究进展 [J]. *兽医导刊*, 2018(2): 252.
- [27] 何常明. 苦参和山豆根黄酮类成分及其生物活性的比较研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [28] TSUKIYAMA R, KATSURA H, TOKURIKI N, et al. Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(5): 1226-1230.

(编辑:董宇)