

苦参碱对合轴马拉色菌麦角固醇生物合成的抑制作用

蔡玲玲 张丰川 李元文 张小静 孙毅坤 李海聪

【摘要】 目的 观察苦参碱对合轴马拉色菌麦角固醇生物合成的影响,探讨苦参碱抑菌机理。**方法** 本研究分为苦参碱组、酮康唑组及空白组,分别通过高效液相色谱法检测 8 天后三组培养基中合轴马拉色菌的麦角固醇含量,最后采用 SPSS 17.0 对数据进行分析处理。**结果** 苦参碱组、酮康唑组与空白组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明两组均有抑制麦角固醇合成的作用,苦参碱组与酮康唑组两者之间差异无统计学意义($P = 0.65 > 0.05$),说明两组抑制麦角固醇合成的作用相当。体外抑菌试验中两组药物对于合轴马拉色菌临床株和标准株的抑制强弱有明显差异($P < 0.05$),两组药物对于标准菌株的抑菌效果均明显强于临床菌株。**结论** 苦参碱可以抑制合轴马拉色菌麦角固醇合成,作用与酮康唑相当,考虑其抑菌机制可能与破坏麦角固醇合成有关。

【关键词】 苦参碱; 合轴马拉色菌; 麦角固醇; 酮康唑; 高效液相色谱法

【中图分类号】 R285 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.03.011

Inhibition of matrine on ergosterol biosynthesis of Malassezia sympodialis CAI Ling-ling, ZHANG Feng-chuan, LI Yuan-wen, et al. Dermatological Department, Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China.

Corresponding author: ZHANG Feng-chuan, E-mail: bjzfc@sina.com

【Abstract】 Objective To test the Malassezia sympodialis ergosterol concentrations by HPLC to discuss mechanism on matrine inhibition of malassezia. **Methods** The ergosterol concentrations of Malassezia sympodialis was checked after matrine or ketoconazole affected by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Results** Two groups can both inhibit ergosterol ($P = 0.65 > 0.05$), and have no significance. Two groups had obvious differences of malassezia inhibitions on clinical strains when compared with standard strains, two treatment groups both had stronger inhibition in standard groups than clinical groups ($P = 0.02 < 0.05$). **Conclusion** Matrine has inhibitions of ergosterol of Malassezia sympodialis as well as ketoconazole. Its inhibition mechanism of Malassezia sympodialis might have relationship of inhibition of ergosterol biosynthesis.

【Key words】 Matrine; Malassezia sympodialis; Ergosterol; Ketoconazole; High performance liquid chromatography (HPLC)

苦参碱是由中草药植物苦参 *Sophora flavescens* Ait

的根、植株、果实或苦豆子 *Sophora alopecuroides* L.、广豆根 *Sophora subprostrata* Chun et T. Chen 提取制成的,是中药苦参、山豆根的主要活性成分。近几年,很多学者都把对苦参碱的相关研究作为自己的研究方向,发现苦参碱具有多种药理作用,如抗肿瘤、抗病原微生物^[1]、抗心律失常、抗炎作用及调节免疫^[2]、抑制增殖、抗过敏、抑制肝纤维化和抑制病毒复制等作用,因此苦参碱的研究受到各方面极大的关注。本文主要研究苦参碱对于合轴马拉色菌麦角固醇合成的影响及探讨苦参碱抑制马拉色真菌

基金项目:北京市教委科研共建项目

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院皮肤科(蔡玲玲、张丰川、李元文);北京中医药大学药学院[孙毅坤、李海聪(硕士研究生)];宁夏医科大学总医院中医科(张小静)

作者简介:蔡玲玲(1982-),女,博士,主治医师。研究方向:皮肤性病学。E-mail: lingling89159166@126.com

通讯作者:张丰川(1968-),博士,主任医师,硕士生导师,中国性学会中医性学专业委员会秘书长。研究方向:真菌感染性皮肤病。E-mail: bjzfc@sina.com

的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

苦参碱粉由湖北午时药业股份有限公司生产(国药准字:H20059335)。酮康唑粉由西安杨森制药有限公司生产,含量 99.9%,溶于 2.5% 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液,控制 DMSO 终浓度低于 1%。橄榄油固体培养基(成分为:橄榄油、土豆、葡萄糖、琼脂、蛋白胨、氯霉素、蒸馏水)、酵母膏葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose, YEPD)(成分为:酵母浸膏、蛋白胨、葡萄糖、氯霉素、蒸馏水)、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、氢氧化钾溶液、Fisher 甲醇溶液、石油醚(沸程 30~60℃)、无水 Na₂SO₄。

1.2 菌种来源

实验菌种:实验用合轴马拉色菌菌株(临床菌株:01780 CBS7222;标准菌株:01899 *Malassezia sympodida*-lis),来自北大医院微生物室真菌实验室培养与鉴定。

1.3 设备

FM 生化培养箱、高压灭菌锅、超净台、超声波细胞粉碎仪(JYD-150,上海芝信);显微镜(OLYMPUS-BX60F5);冷冻离心机(珠海黑马);恒温振荡仪、恒温水浴箱(HH-W420,金坛);旋转蒸发器(上海亚荣);电子天平、培养皿、移液器(Eppendorf);移液器枪头(Axygen);烧杯、烧瓶、量筒、蓝盖试剂瓶(Schott);玻璃棒、药匙、试管、离心管、锥形烧瓶、梨形漏斗、容量瓶、45 mm 滤膜。

1.4 色谱条件

色谱柱:Waters symmetry shield TMRP C18, 4.6 mm×250 mm, 5 μm;流动相:100% 甲醇(Fisher 公司);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:283 nm;进样量 20 μL。Waters 2487 双波长 UV 检测器;Waters 1525 泵;Waters 1500 系列柱温箱;Breeze 色谱数据处理工作站;CINTRA 型紫外分光光度计。

1.5 体外抑菌实验

通过美国国家临床实验室标准化委员会制订的 M27-A 方案中酵母菌微量稀释法,对合轴马拉色菌标准株和临床株进行体外抑菌试验,在同一条件下找到苦参碱、酮康唑 2 组药物的最佳抑菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)和最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。基本步骤:(1)制备菌悬液:将合轴马拉色菌标准菌株

和临床株各 1 株,接种于橄榄油固体培养基上,35℃ 恒温箱培养 2 天;连续传代培养 2 次;用无菌生理盐水洗脱纯化的菌落,制成菌悬液,做好标记。用麦氏管和细胞计数板调整浓度为 1.0×10^7 CFU/mL。(2)药液加样:按照每孔分别含药液 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10% 的比例,将苦参碱、酮康唑贮备液直接用马拉色菌液体培养基各配置 10 个浓度。同时设一组阴性对照:每孔加入马拉色菌液体培养基 200 μL;一组阳性对照:每孔加入制备好的菌液 100 μL 及合轴马拉色菌液体培养基 100 μL。在摇床上将菌液及药液混匀 5 分钟,放入 35℃ 恒温箱孵育。(3)结果判读:48 小时后观察结果,由于马拉色菌为嗜脂性的,菌落浮在液体表面,微黄色,薄薄一层漂浮在透明的液基表面,肉眼观察非常清晰,采用直接法读取数据。结果判断的前提是阳性对照生长良好,阴性对照无菌生长清晰,其他孔随药物浓度梯度升高而菌的生长受到抑制。若存在拖尾现象,则将每孔内生长情况与阳性对照做比较,以生长被抑制 80% 判定为 MIC 值,用麦氏管做参照,根据菌液的清浊程度寻找 MBC。最佳抑菌浓度判定标准:达到一定浓度后,即使再增加药物浓度,细菌抑制程度也不会变化,观察麦氏比浊管对比所得的浊度保持一致。

1.6 检测麦角固醇的高效液相色谱实验

1.6.1 配置含药培养基 根据体外药敏结果选取苦参碱、酮康唑对 2 组马拉色菌的最佳抑菌浓度,于无菌、直径为 60 mm 的平皿内分别加入的苦参碱粉、酮康唑粉,将 40℃ 左右尚未凝固的橄榄油固体培养基 10 mL 迅速倒入上述平皿内,混匀,待其凝固。加入药物的质量=最佳抑菌浓度×10 mL。

1.6.2 制备供试品 将新制备的菌液分别接种在含药和不含药的橄榄油固体培养基上,设不含药的为空白对照组,共 10 个空白组+10 个苦参碱组+10 个酮康唑组,最后将 30 组均置于 35℃ 恒温培养 5 天,刮取平皿上的菌苔,分别接种于 YEPD 液中,用恒温振荡仪在 35℃ 下,振荡培养 3 天,使真菌处于活化状态。然后对于含马拉色菌的培养液抽滤、用蒸馏水洗涤 3 次,将滤下的真菌湿菌的试管中再加入 PBS 液(PH 7.4 的磷酸盐缓冲液)10 mL 混悬。将试管放置在盛有冰盐的烧杯里,放入超声波细胞粉碎仪台上,用超声波细胞粉碎仪内的手型夹固定试管,声波探头放入试管液面下 2 cm 和温度计探头放入冰块中。设置粉碎仪数据如下:70 W 功率,破碎 5 秒,间隔 3 秒,反复 90 次。破碎后的菌液装入离心管内,放入冷冻离心

机 10000 rmp, -4℃, 离心 10 分钟, 取上清液作为酶液。酶液中加入新配置的皂化剂(10% KOH+甲醇溶液)20 mL 混匀, 倒入 50 mL 锥形烧瓶中, 放置在恒温水浴箱中 80℃ 水浴皂化 2 小时。得到的皂化物, 加石油醚(沸程 30 ~ 60℃)30 mL, 用梨形漏斗萃取 3 次, 加饱和的 NaCl 溶液 20 mL 洗涤 2 次。萃取液合并提取液用无水 Na₂SO₄ 干燥脱水, 用旋转蒸发仪在 70℃ 减压浓缩至干, 得到非皂化物(non-saponifiable lipids, NSLs), 加甲醇溶解定容 10 mL 装入 100 mL 容量瓶中, -20℃ 保存。

1.6.3 样品测定 Sigma 公司的麦角固醇标准品母液(CAS 号: 57-87-4)浓度为 10 mg/mL 溶于氯仿, 也同样用甲醇溶解稀释 100 倍, 定容后放置 100 mL 容量瓶中, 浓度为 100 ug/mL, -20℃ 保存。标准品和样品分别进样 20 μL, 每个样品进样 2 次。麦角固醇含量是通过面积归一法计算, 公式: 测得样品的峰面积/标准品的峰面积 = 样品浓度/标准品浓度。因此可以测定样品中的麦角固醇的含量。本实验反复操作 10 次, 8 天为一个实验周期, 本实验时间为 2 个月。每个样品进样 2 次 × 实验 10 次, 每组样品分别测 200 个数据, 最终麦角固醇含量取均值。

1.7 统计学方法

体外抑菌实验采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。四组数据经正态检验, 发现 $P < 0.05$, 不符合正态分布, 因此采用非参数检验的 K 个独立样本 t 检验, 并将四组分别进行两两比较。

检测麦角固醇的高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 实验由统计软件 SPSS 17.0 计算出。药物作用后的三组数据分别经过正态检验, 结果: $P < 0.05$, 不符合正态, 因此采用非参检验中 K 个独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 体外抑菌实验

临床菌株在 MIC、MBC 值上, 无论是苦参碱组还是酮康唑均大于标准菌株, $P = 0.03 < 0.05$, 差异有统计学意义。临床菌株之间两组药物 MIC 和 MBC 差异无统计学意义, $P = 0.47 > 0.05$ 。标准菌株之间两组药物 MIC 和 MBC 差异无统计学意义, $P = 0.68 > 0.05$ 。

2.2 检测麦角固醇的 HPLC 实验

三组数据比较 $P = 0.00 < 0.01$ 差异有显著统计学意义, 苦参碱组与酮康唑比较 $P = 0.54 > 0.05$ 两组差

异无统计学意义, 苦参碱组与酮康唑分别与空白组比较, $P < 0.01$, 有统计学意义。具体结果见表 2。

表 1 药物作用后合轴马拉色菌临床菌株和标准菌株的 MIC 值和 MBC 值 (mg/mL)

组别	MBC	MIC
苦参碱组		
合轴马拉色菌临床菌株	0.71 ± 0.23	0.45 ± 0.06
合轴马拉色菌标准菌株	0.69 ± 0.33	0.32 ± 0.04
酮康唑组		
合轴马拉色菌临床菌株	0.80 ± 0.15	0.41 ± 0.12
合轴马拉色菌标准菌株	0.76 ± 0.25	0.49 ± 0.18

表 2 HPLC 测得 8 天后三组培养基中合轴马拉色菌临床菌株和标准菌株的麦角固醇含量

菌种/分组	苦参碱	酮康唑	空白组
合轴马拉色菌临床菌株	19.33 ± 1.21	20.17 ± 1.18	260.01 ± 10.22
合轴马拉色菌标准菌株	2.03 ± 0.32	3.40 ± 0.28	249.99 ± 21.01

3 讨论与展望

中药单体成分简单、容易配制不同剂型、简便易推广, 随着抗菌药耐药、不良反应多等问题的出现, 中药单体抗真菌的研究越来越多。其中苦参碱抑菌研究较多, 朱敏等^[1]采用连续 7 天涂菌法诱导豚鼠皮肤感染马拉色菌, 筛选出有效的抗马拉色菌的中草药单体苦参碱、柠檬醛、丁香酚等 3 种。杨雪云等^[3]研究发现苦参碱和氧化苦参碱对供试林木病原真菌孢子萌发均有抑制作用, 其中苦参碱对杨褐斑病菌和龙竹材霉变菌抑制作用较强。桂蜀华等^[4]采用培养基药物浓度稀释法测定苦参碱对 13 株皮肤癣菌的最小抑菌浓度 (MIC) 及最小杀菌浓度 (MBC), 发现苦参碱有较强的抗真菌活性, 能抑制和杀灭羊毛状小孢子菌、白色念珠菌等多种真菌, 其中对武汉羊毛状小孢子菌、武汉白色念珠菌 38253 的抑制能力最好。

笔者及科研团队近年一直在研究中药苦参及单体苦参碱对马拉色菌及其感染所致的皮肤病的疗效和机制^[5-8]。本次研究通过麦角固醇测定, 说明苦参碱具有较好的抑制合轴马拉色菌麦角固醇合成的作用, 抑制强度与酮康唑相当。以酮康唑为代表抗真菌药的抑菌机理是通过抑制麦角固醇合成达到破坏真菌细胞膜来抑制真菌繁殖。该实验一定程度上说明苦参碱抑制马拉色菌繁殖的机理可能与影响麦角固醇合成有关。

此外, 通过观察合轴马拉色菌临床菌株和标准

菌株的 MIC 值、MBC 值、麦角固醇含量,发现苦参碱对于标准菌株抑菌效果均强于临床菌株,说明苦参碱抑菌作用强弱和菌种有关。SD 临床上容易反复、难以彻底治愈与临床菌株抑制作用相对欠佳有一定关系。虽然 SD 的发病是多种因素综合作用的结果,目前研究发现 SD 和皮脂分泌、遗传因素、神经因素、激素水平、马拉色真菌感染、免疫缺陷以及 HIV 感染等有相关性。然而马拉色菌局部大量繁殖一定会加重局部皮损的炎症、甚至破坏毛囊,因此将马拉色菌抑制在一定的程度内是治疗必要的手段。苦参碱在体外实验中证明了它对马拉色菌较好的抑菌作用,然而临床使用和推广必须要确保药物使用的安全性,因此今后可以开展相关的研究,如 MIC 值到 MBC 值范围内的小剂量外用研究等。

参 考 文 献

- [1] 朱敏,王侠生,李莉,等. 3 种中草药单体治疗豚鼠皮肤马拉色菌感染的实验研究[J]. 临床皮肤科杂志, 2008, 37(3): 160-162.
- [2] 刘太华,刘德芳,王骏,等. 苦参碱、氧化苦参碱和槐定碱对巨噬细胞 RAW264.7 表达 CD91、CD13 和分泌 TNF- α 的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(4): 399-403.
- [3] 杨雪云,赵博光,巨云为,等. 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.
- [4] 桂蜀华,付涛,梁远园,等. 苦参碱体外抗真菌活性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(4): 382-385.
- [5] 张丰川. 马拉色菌中医药治疗及研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2079-2081.
- [6] 张丰川,蔡玲玲,李元文,等. 苦参不同制剂及成分对合轴马拉色菌标准株体外抑菌实验研究[J]. 环球中医药, 2012, 5(8): 576-581.
- [7] 张丰川. 苦参对合轴马拉色菌的体外抑菌作用及其机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2011.
- [8] 蔡玲玲. 苦参碱对 3 种常见马拉色菌体外抑菌研究及临床疗效观察[D]. 北京:北京中医药大学, 2012.

(收稿日期: 2013-02-15)

(本文编辑: 禹佳)