

· 论著 ·

大蒜素对空肠弯曲杆菌抑菌作用的研究

潘洪涛¹, 杨宗兴¹, 赵文萃¹, 王艳萍¹, 宋海艳^{1,2}, 张琦¹ (1. 解放军208医院, 吉林长春130062; 2. 延边大学药学院, 吉林延吉133000)

[摘要] 目的 研究大蒜素对空肠弯曲杆菌的抑菌作用和强度。方法 采用纸片扩散法(K-B法)测定抑菌圈直径; 采用肉汤稀释法分别测定大蒜素、环丙沙星、红霉素对空肠弯曲杆菌的最低抑菌浓度(MIC), 比较大蒜素、环丙沙星、红霉素的最低抑菌浓度及抑菌率。结果 大蒜素(MIC为12.80 μg/ml, 抑菌率90.40%)对空肠弯曲杆菌的抑菌作用较环丙沙星(MIC为20.48 μg/ml, 抑菌率90.21%)和红霉素(MIC为35.84 μg/ml, 抑菌率90.33%)更强。结论 大蒜素对空肠弯曲杆菌具有抑菌作用。

[关键词] 大蒜素; 环丙沙星; 红霉素; 最低抑菌浓度; 抑菌率

[中图分类号] R96 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)02-0147-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.02.014

Study on anti-microbial activity of allicin on *Campylobacter jejuni*

PAN Hongtao¹, YANG Zongxing¹, ZHAO Wencui¹, WANG Yanping¹, SONG Haiyan^{1,2}, ZHANG Qi¹ (1. Department of Pharmacy, No. 208 Hospital of PLA, Changchun 130062, China; 2. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China)

[Abstract] **Objective** To study the anti-microbial activity and strength of allicin on *Campylobacter jejuni*. **Methods** Disc diffusion method (K-B) was used to determine the diameter of the bacteriostatic ring. The minimal inhibitory concentration (MIC) of allicin, ciprofloxacin and erythromycin were detected by constant broth dilution method, respectively. The minimal inhibitory concentrations and bacteriostatic rate of allicin, ciprofloxacin and erythromycin were compared. **Results** The anti-microbial activity on *Campylobacter jejuni* of allicin (MIC 12.8 μg/ml, bacteriostatic rate 90.40%) was better than that of ciprofloxacin (MIC 20.48 μg/ml, bacteriostatic rate 90.21%) and erythromycin (MIC 35.84 μg/ml, bacteriostatic rate 90.33%). **Conclusion** Allicin has anti-microbial activity on *Campylobacter jejuni* *in vitro*.

[Key words] allicin; ciprofloxacin; erythromycin; MIC; bacteriostatic rate

大蒜素是由大蒜的鳞茎中提取的一种有机硫化物,为大蒜的主要生物活性成分,化学名为二烯丙基三硫化物(diallyl trisulfide, DATS)。大蒜素具有降血压、降血脂、抗心律失常、抑菌等多种药理作用,因其具有很强的抗菌作用,也被称为天然广谱抗生素^[1]。2012年国外报道,大蒜素对引起人类腹痛、腹泻和发热的弯曲杆菌有抑制作用。美国每年有240万人发生腹痛、腹泻和发热等病。大蒜素能够破坏空肠弯曲杆菌生物膜和减少细胞内三磷酸腺苷的数量,抑制细胞代谢,进而杀灭弯曲杆菌^[3]。本实验采用自行提取的大蒜素,研究其对空肠弯曲杆菌

的抑菌作用,通过比较大蒜素、环丙沙星、红霉素对空肠弯曲杆菌的抑菌效用,探讨大蒜素的抑菌作用及强度。

1 材料

1.1 仪器 CP225D 微量电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);UV-3200S 紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);LC-10ATVP 高效液相色谱仪(日本岛津公司);TDL-5B 离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司);TN-100C(II)托盘扭力天平(上海良平仪器仪表有限公司);RE-52 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SH2-D(III)循环水式真空泵(巩义布予华仪器有限公司);BC-J80S 二氧化碳培养箱(上海博讯实业公司);XFS-280CB 手提式压力灭菌器(浙江新丰医疗器械有限公司);HR40-IIA₂ 生物安全柜(青岛海尔特种电器公司);

[作者简介] 潘洪涛,副主任技师。Tel:15304451257;E-mail:pta208@163.com

[通讯作者] 赵文萃,副主任药师。研究方向:药剂学。Tel:(0431)86988148;E-mail:zhaowencui208@126.com

CN0025A CampyGen 微需氧产气袋(OXOID, 英国);厌氧罐(日本三菱瓦斯化学株式会社);Trans-ferpette 微量移液器(德国)。

1.2 试剂 大蒜素对照品(含量为 88.4%, 中国食品药品检定研究院, 批号: 100384-201102);大蒜素粗提取液(解放军 208 医院药剂科实验室自制, 浓度为 14.62mg/ml);盐酸环丙沙星(含量为 99.30%, 武汉胜天宇生物科技有限公司, 批号: 130601);红霉素(含量为 92.50%, 武汉胜天宇生物科技有限公司, 批号: 201304006);环丙沙星药敏纸片(OXOID, 英国);红霉素药敏纸片(OXOID, 英国);马尿酸钠(北京路桥技术有限责任公司, 批号: 130105);茚三酮(北京陆桥技术有限责任公司, 批号: 130104);甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

1.3 菌株和培养基 MH 药敏培养皿(批号: 131031), 哥伦比亚血琼脂平皿(批号: 131106), 脑心浸液琼脂(批号: 130125), 布氏肉汤(批号: 130312)均购自北京路桥技术有限责任公司。空肠弯曲杆菌(ATCC33291, 上海信然实业有限公司)。

2 方法

2.1 菌株处理

2.1.1 菌株的复苏 按菌株复苏说明精密吸取菌株复溶培养基 1ml 于冻干菌株内, 轻轻振荡, 使冻干菌体溶解呈悬浮状, 用接种环挑取菌液直接划线于哥伦比亚血琼脂平皿, 于 42 °C 微需氧(5% 氧气、10% 二氧化碳和 85% 氮气)^[2] 条件下培养 48 h, 得到复苏的菌种^[3]。

2.1.2 菌株的培养 用接种环挑取复苏得到的单个菌落直接划线于哥伦比亚血琼脂平皿, 于 42 °C 微需氧条件下 48 h 传代一次。

2.1.3 菌株的保存^[3,4] 用接种环刮取哥伦比亚血琼脂平皿表面的单个菌落, 溶于含 30% 甘油的脑心浸液肉汤中, 将菌浓度调到 6 个麦氏浓度, 将制好的脑心浸液甘油菌悬液分装于无菌离心管中, -70 °C 冷冻保存。

2.2 菌株的鉴定^[4] 根据空肠弯曲杆菌菌落的生长特征、革兰染色特征、过氧化氢酶实验、氧化酶实验、动力实验、马尿酸水解实验、尿素酶实验、25 °C 生长实验和 42 °C 生长实验的结果, 进行判定。

2.3 药敏实验

2.3.1 K-B 法 大蒜素药敏纸片的制备: 用打孔器将滤纸制成 6 mm 的圆片, 高压灭菌后于无菌操作下, 将滤纸片放入洁净平皿内, 每 4 层滤纸片滴加浓度分别为 1 000、2 000 和 3 000 μg/ml 的大蒜素药液

20 μl, 分别得到每片含大蒜素 5、10 和 15 μg 的药敏纸片。阴性对照纸片滴加 20 μl 生理盐水, 将上述药敏纸片于无菌安全柜中晾干, 备用。

实验菌的接种与药敏纸片的贴放: 用接种环挑取形态相似的单个菌落于灭菌生理盐水中, 校正浓度至 0.5 麦氏比浊标准的菌悬液(约含空肠弯曲杆菌 1×10^8 CFU/ml)。用无菌棉拭子蘸取菌悬液, 涂布于 MH 药敏培养皿表面, 每个平皿贴放 6 片药敏纸片, 分别为: 环丙沙星(每片含环丙沙星 5 μg)、红霉素(每片含红霉素 15 μg)、大蒜素(每片分别含大蒜素 5、10、15 μg)、生理盐水为空白对照, 其中空白对照贴于平皿中心。于 42 °C 微需氧环境下培养 18~24 h, 观察结果。用游标卡尺测量抑菌环的直径, 记录结果, 实验重复 3 次。判定标准: 按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准^[5]。

2.3.2 肉汤稀释法 试剂储备液的制备: 分别精密称取环丙沙星 51.56mg、红霉素 55.35 mg 于 10ml 容量瓶中, 加无菌注射用水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 均制备成浓度为 5 120 μg/ml 的药物储备液。精密量取大蒜素粗提取液 3.50 ml (约相当于大蒜素 51.20 mg) 于 10 ml 容量瓶中, 加 1% 吐温-80 溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 5 120 μg/ml 的大蒜素储备液, -20 °C 保存备用。

菌悬液的制备^[6]: 按“2.3.1”项下实验菌液制备浓度为 0.5 麦氏比浊标准的菌悬液(约含空肠弯曲杆菌 1×10^8 CFU/ml), 使用时用布氏肉汤将上述菌悬液进行 1:1 000 稀释后备用(约含空肠弯曲杆菌 1×10^5 CFU/ml)。

最低抑菌浓度(MIC)的测定: ①测定方法的选择: 采用分光光度法, 分别取空白布氏肉汤及空肠弯曲杆菌样品于 200~800 nm 波长范围内进行扫描, 结果空肠弯曲杆菌样品在(600±1) nm 波长处有最大吸收, 空白布氏肉汤无干扰, 故选择 600 nm 为检测波长。②单药 MIC 的测定: 取无菌试管 39 支, 随机分成 3 组, 即环丙沙星组、红霉素组、大蒜素组, 每组 13 支, 将每组试管标记为 1~13 号。每组 1 号试管中分别精密加入布氏肉汤 5.23、5.33、5.76 ml, 每组 2~13 号试管分别精密加入布氏肉汤 3 ml, 环丙沙星组 1 号试管中加入环丙沙星储备液 0.77 ml、红霉素组 1 号试管中精密加入红霉素储备液 0.67 ml, 大蒜素组 1 号试管中精密加入大蒜素储备液 0.24 ml。将每组 1 号试管中药物与布氏肉汤混匀, 然后分别从每组 1 号试管中精密吸取 3 ml 至每组 2 号试管, 混匀后从每组 2 号试管中再精密吸取 3 ml 至每组 3 号试管, 如此连续倍比稀释至每组 11

号试管,并从11号试管中精密吸取3 ml弃去,每组12号试管(3 ml 布氏肉汤+3 ml 菌液)作为空白生长对照,13号试管以灭菌布氏肉汤作为对照。然后每组1~12号试管中加入上述制备好的菌悬液3 ml,摇匀。环丙沙星组1~11号试管中环丙沙星药物浓度见表3;红霉素组1~11号试管中红霉素药物浓度见表4;大蒜素组1~11号试管中大蒜素药物浓度见表2。从每组1~12号试管中精密吸取3 ml,于600 nm 波长处测定吸光度。剩余液体再于42℃微需氧条件下培养24 h,肉眼观察细菌生长情况并测定吸光度,每组实验重复3次。

MIC的判断^[6]:实验结果显示,空白对照管中有细菌生长(肉汤浑浊),灭菌布氏肉汤管中无细菌生长(透明),实验组以肉眼观察试管中无菌生长及吸光度测定结果确定MIC。选择抑菌率 $\geq 90\%$ 抑制空肠弯曲杆菌生长的最小药物浓度为MIC。抑菌率计算公式: $\text{抑菌率}\% = (1 - \frac{A_2 - A_1}{A_2' - A_1'}) \times 100\%$

A_1 :实验组培养前的吸光度; A_2 :实验组培养24 h后的吸光度; A_1' :空白对照组培养前的吸光度; A_2' :空白对照组培养24 h后的吸光度。

3 结果与分析

3.1 菌株的鉴定^[4] 肉眼观察哥伦比亚血琼脂平皿长出的菌落形态为不溶血,扁平,湿润,有光泽,水滴样,半透明。革兰染色镜检为G⁻菌,形态大小为 $[(0.3 \sim 0.4 \mu\text{m}) \times (1.5 \sim 3 \mu\text{m})]$,呈S形、螺旋状。氧化酶实验结果:空肠弯曲杆菌与试剂接触10 s内呈深紫色。过氧化氢酶实验结果:空肠弯曲杆菌与试剂接触后0.5 min内产生气泡。马尿酸水解实验结果:呈紫色。42℃生长实验结果:空肠弯曲杆菌生长。动力实验结果:穿刺线模糊,侧光可观察穿刺线周围有生长痕迹;均为阳性。尿素酶实验结果:试剂不变色。25℃生长实验结果:空肠弯曲杆菌不生长;均为阴性。结果鉴定符合空肠弯曲杆菌性质。

3.2 K-B法 K-B法是以抑菌圈的直径表示抑菌作用的大小。结果显示,3种药物对空肠弯曲杆菌均有抑菌作用,其中大蒜素(含量1、2、3)与环丙沙星和红霉素相比,均具有更为明显的抑菌作用($P < 0.05$),结果见表1。

3.3 肉汤稀释法 大蒜素、环丙沙星、红霉素对空肠弯曲杆菌的MIC实验及抑菌率,结果见表2。

本实验以抑菌率 $\geq 90\%$ 的最小药物浓度为MIC,结果显示,大蒜素、环丙沙星、红霉素的MIC分别为12.80、20.48和35.84 $\mu\text{g}/\text{ml}$,其对应抑菌

表1 3种药物K-B法抑菌实验结果比较

药物种类	每片药敏纸含量 (m/ μg)	抑菌圈直径平均值 (mm)
红霉素	15	10.04
环丙沙星	5	10.24
大蒜素(含量1)	5	11.22*
大蒜素(含量2)	10	14.07*
大蒜素(含量3)	15	25.13*

* $P < 0.05$,与红霉素、环丙沙星比较

表2 3种药物的MIC及抑菌率

序号	红霉素		环丙沙星		大蒜素	
	浓度 ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	抑菌率 (%)	浓度 ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	抑菌率 (%)	浓度 ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	抑菌率 (%)
1	0.28	0	0.32	0	0.10	0
2	0.56	0	0.64	0	0.20	0
3	1.12	0	1.28	0	0.40	0
4	2.24	17.88	2.56	14.74	0.80	6.70
5	4.48	24.61	5.12	45.89	1.60	20.42
6	8.96	60.65	10.24	84.54	3.20	63.73
7	17.92	84.62	20.48	90.25	6.40	87.12
8	35.84	90.33	40.96	95.21	12.80	90.40
9	71.68	95.12	81.92	99.14	25.60	92.84
10	143.36	98.15	163.84	99.57	51.20	95.57
11	286.72	98.43	327.68	99.89	102.40	99.71

率分别为90.40%、90.21%和90.33%。

4 讨论

大蒜素具有多种药理作用,现国内外已多有报道。近年来国外已有大蒜素对空肠弯曲杆菌抑菌作用的研究。截至笔者投稿,国内尚未见文献报道大蒜素对空肠弯曲杆菌的抑菌作用。本实验通过将大蒜素粗提取物与环丙沙星、红霉素对空肠弯曲杆菌的抑菌作用进行比较,从而研究大蒜素的抑菌作用。

本实验采用哥伦比亚血琼脂平皿为固体培养基培养空肠弯曲杆菌,菌株生长情况良好。以布氏肉汤为液体培养基进行肉汤稀释法实验,本法简单易行,可为微生物实验室研究提供基础。

采用K-B法和肉汤稀释法比较大蒜素、环丙沙星、红霉素对空肠弯曲杆菌的抑菌作用。上述两种方法结果均显示大蒜素抑菌作用强于环丙沙星和红霉素。大蒜素的抗菌活性主要在于其能够与含有巯基的酶相互作用,不可逆地抑制巯基蛋白酶的活性^[7]。根据大蒜素的抗菌活性实验结果表明,将大蒜素制成剂型,用于治疗空肠弯曲杆菌的感染,可为临床提供一种新的抗菌药物。

2007, 61(4):653-662.

- [14] Meltzer HY, Bobo WV, Nuamah IF, *et al.* Efficacy and tolerability of oral paliperidone extended-release tablets in the treatment of acute schizophrenia: pooled data from three 6-week, placebo-controlled studies[J]. *J Clin Psychiatr*, 2008, 69(5): 817-829.
- [15] Einarson TR, Hemels ME, Nuamah I, *et al.* An analysis of potentially prolactin-related adverse events and abnormal prolactin values in randomized clinical trials with paliperidone palmitate[J]. *Ann Pharmacother*, 2012, 46(10):1322-1330.
- [16] Molitch ME. Drugs and prolactin[J]. *Pituitary*, 2008, 11(2): 209-218.
- [17] Bankowski BJ, Zacur HA. Dopamine agonist therapy for hyperprolactinemia[J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2003, 46(2):

349-362.

- [18] 郭金宏,曹长安. 溴隐亭治疗抗精神病药物致高泌乳素血症的临床研究[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2003, 3(3): 244.
- [19] Lee MS, Song HC, An H, *et al.* Effect of bromocriptine on antipsychotic drug-induced hyperprolactinemia: eight-week randomized, single-blind, placebo-controlled, multicenter study[J]. *Psychiatr Clin Neurosci*, 2010, 64(1):19-27.
- [20] Rocha FL, Hara C, Ramos MG. Using aripiprazole to attenuate paliperidone-induced hyperprolactinemia[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr*, 2010, 34(6):1153-1154.
- [21] 魏桂林,徐小薇,李大魁. 药物与高催乳素血症[J]. *药物不良反应杂志*, 2000, 2(2):73-75.

[收稿日期] 2014-02-17 [修回日期] 2014-09-22

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 109 页)

- [16] Ishida T, Ichihara M, Wang X, *et al.* Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes[J]. *J Control Release*, 2006, 115(3): 243-250.
- [17] Lu W, Wan J, She Z, *et al.* Brain delivery property and accelerated blood clearance of cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle[J]. *J Control Release*, 2007, 118(1):38-53.
- [18] Park K. To PEGylate or not to PEGylate, that is not the question[J]. *J Control Release*, 2010, 142(2): 147-148.
- [19] Cukierman E, Khan DR. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(5): 762-770.
- [20] Grantab R, Sivanathan S, Tannock IF. The penetration of anticancer drugs through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 1033-1039.
- [21] Netti PA, Berk DA, Swartz M A, *et al.* Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors [J].

Cancer Res, 2000, 60(9): 2497-2503.

- [22] Brown E, Mckee TD, Tomaso ED, *et al.* Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 796-800.
- [23] Ramanujan S, Pluen A, Mckee TD, *et al.* Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium[J]. *Biophys J*, 2002, 83(3): 1650-1660.
- [24] Alexandrakis G, Brown E, Tong RT, *et al.* Two-photon fluorescence correlation microscopy reveals the two-phase nature of transport in tumors[J]. *Nat Med*, 2004, 10(2): 203-207.
- [25] Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, *et al.* Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles[J]. *J Control Release*, 2013, 172(3): 782-794.
- [26] Damia G, D'Incalci M. Contemporary pre-clinical development of anticancer agents-what are the optimal preclinical models[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(16): 2768-2781.

[收稿日期] 2014-01-14 [修回日期] 2014-09-23

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 149 页)

本实验结论大蒜素抑菌效果优于红霉素和环丙沙星,与国外报道有差异^[2]。大蒜素粗提取物的含量测定参照《中华人民共和国药典(一部)》2010年版^[8],含二烯丙基三硫化物不含二烯丙基一硫和二硫化物,而国外资料没有明确提出其成分,所用菌株是否存在差异。另外,我国自古以来常以大蒜作为调料和食品(如甜蒜),能否产生细菌抗药性,值得进一步研究。

【参考文献】

- [1] Cavallito CJ, Bailey JH. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. isolation, physical properties, and antibacterial action[J]. *Am Chem Soc*, 1944, 66(11):1950.
- [2] Lu X, Samuelson DR, Rasco BA, *et al.* Antimicrobial effect of diallyl sulphide on *Campylobacter jejuni* biofilms[J]. *J*

Antimicrob Chemother, 2012, 67(8):1915-1926.

- [3] 骆海明,陈倩. 弯曲菌菌种冷冻保存及复苏方法研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2007, 19(6):518.
- [4] 韩新锋,刘书亮,张晓利,等. 鸡肉空肠弯曲杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(1):31.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved standard M07-A8 methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically [S]. 8th ed. Villanova, PA:NCCLS, 2009, 29(2).
- [6] 孙长贵,曾向铭,杨燕. 肉汤稀释法酵母菌药物敏感性试验及质量控制介绍[J]. *江西医学检验*, 2007, 25(1):57.
- [7] 陈振华,刘文恩. 碳青霉烯酶研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(6):848.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:23.

[收稿日期] 2014-03-03 [修回日期] 2014-09-24

[本文编辑] 李睿旻