

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.05.0554

122 味维吾尔药体外抗真菌作用

吴晶¹, 王亮¹, 潘兰², 贾晓光^{2*}, 阎澜¹, 姜远英^{1*}

1. 第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433

2. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 乌鲁木齐 830002

[摘要] **目的** 测定 122 味维吾尔药的体外抗真菌活性, 以期找到活性较好的抗真菌药物。 **方法** 用 75% 乙醇超声提取维吾尔药; 美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 推荐的 M38-A2 和 M27-A3 微量液基稀释法进行抗深部真菌活性筛选; 棋盘微量液基法考察维吾尔药与氟康唑协同抗耐药白假丝酵母菌的作用; 磷钼钨酸-干酪素法测定鞣质含量, 并比较不同溶剂提取部位抑菌活性与鞣质含量的关系。 **结果和结论** 在 122 味维吾尔药活性测定中, 在 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 测定浓度下, 对新生隐球菌有抑制作用的有黄河子皮 (*Terminalia chebula* Retz.)、毛诃子 (*Terminalia bellerica* Roxb.) 等 21 味, 对白假丝酵母菌有抑制作用的有黄河子皮、毛诃子等 15 味, 对烟曲霉仅姜黄 (*Curcuma longa* L.) 有效。姜黄抗菌谱最广, 且对深部真菌及浅部真菌均有较好的抑制作用。9 味维吾尔药与氟康唑合用对耐药白假丝酵母菌有较好协同抗真菌作用; 黄河子皮、毛诃子、岩白菜 (*Bergenia purpurascens* Engl.)、阿拉伯胶树汁 (*Acacia senegal* Willd.)、鞣树果 (*Rhus coriaria* L.) 这 5 味活性较好药材的抗真菌活性部位集中在乙酸乙酯部位, 且不同溶剂提取部位的最低抑菌浓度与鞣质含量呈正相关。

[关键词] 抗真菌活性; 维吾尔药; 白假丝酵母菌; 筛选; 药物协同作用

[中图分类号] R 291.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)05-0554-09

Antifungal activity of 122 kinds of Uighur medicines *in vitro*

WU Jing¹, WANG Liang¹, PAN Lan², JIA Xiao-guang^{2*}, YAN Lan¹, JIANG Yuan-ying^{1*}

1. New Drug Research Center, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine and Ethnodrug, Urumqi 830002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

[Abstract] **Objective** To identify the Uighur medicine with good antifungal activity via determining the *in vitro* antifungal activities of 122 kinds of Uighur medicines. **Methods** The 75% ethanol extracts of 122 kinds of Uighur medicines were prepared by ultrasonic extraction, and anti-deep fungal medicines were screened according to the M38-A2 and M27-A3 broth microdilution method approved by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). The broth microdilution checkerboard method was used to determine the synergistic effect of Uighur medicine and fluconazole against drug-resistant *Candida albicans*. Tannin content was determined by phosphomolybdotungstic acid-casein method, and the relationship between antifungal activity of different extractions and contents of tannin was studied. **Results and conclusion** At a determination concentration of 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 21 kinds of Uighur medicines such as *Terminalia chebula* Retz. and *Terminalia bellerica* Roxb. had inhibitory effect on *Cryptococcus neoformans*, 15 kinds of Uighur medicines such as *Terminalia chebula* Retz. and *Terminalia bellerica* Roxb. had inhibitory effect on *Candida albicans*, and *Curcuma longa* L. had inhibitory effect on *Aspergillus fumigatus*. *Curcuma longa* L. had the widest antifungal spectrum and showed good inhibitory effect on deep and superficial fungus. Nine kinds of Uighur medicines showed synergistic effects with fluconazole against *Candida albicans*. Antifungal activity parts of *Terminalia chebula* Retz., *Terminalia bellerica* Roxb., *Bergenia purpurascens* Engl., *Acacia senegal* Willd and *Rhus coriaria* L. were concentrated in ethyl acetate, and the minimum inhibitory concentration of different solvent extraction was directly proportional to the content of tannin.

[收稿日期] 2016-11-24 **[接受日期]** 2017-02-24

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470158), 国家药品(维药)标准提高项目(290). Supported by National Natural Science Foundation of China (81470158) and National Drug (Victoria Drug) Standard Improvement Project (290).

[作者简介] 吴晶, 硕士生. E-mail: wjinghb69@163.com

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 0991-2633141, E-mail: xgjia@vip.sina.com; Tel: 021-81871357, E-mail: 13761571578@163.com

[Key words] antifungal activity; Uighur medicine; *Candida albicans*; screening; drug synergism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(5): 554-562]

近年来,由于广谱抗生素、免疫抑制剂、糖皮质激素等药物在临床上的广泛应用,深部真菌感染的发病率和病死率大幅增加^[1-3],其中白假丝酵母菌(*Candida albicans*, CA)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*, AF)和新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*, CN)为最常见的深部感染真菌。除现有抗真菌药物种类较少、抗真菌作用不强、抗真菌谱较窄、不良反应较大外,随着氮唑类药物在临床上的长期应用,真菌耐药现象也日趋严重(部分真菌如克柔念珠菌、AF等先天耐药;CA的继发性耐药,以及真菌在体内形成生物被膜、转变成菌丝后的高度耐药),抗真菌新药的研发迫在眉睫。从天然药物中发现抗真菌新药及协同现有药物抗耐药真菌的药物是目前抗真菌新药研发的重要策略之一^[4-5]。维吾尔民族药(以下简称维药)是新疆少数民族千百年来来的医药学的创造,是中药的重要组成部分,新疆独特的地理位置和气候条件孕育了它的独特性,但对其研究相对薄弱,缺乏系统的现代化研究^[6]。马志桥等^[7]通过对新疆维药成药的专利申请与研究进行文献调研及系统性分析,发现其治疗领域主要集中在皮肤病、风湿病等病种,且多数是较为原始的复方研究,单组分单成分研究较少。因此我们参考《中华本草》(第三十三卷-维吾尔药卷)^[8],选择临床应用悠久、疗效确切、基源清楚,具有维吾尔民族特色的122味药材^[9-10],采用统一筛选标准进行抗深部真菌作用的活性测定,并进一步探索其抗菌谱及与氟康唑(*fluconazole*, FLC)的协同作用,并初步确定其活性部位,为临床用药和民族药开发提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂与仪器 122味维药材(详见附表1)均由新疆中药民族药研究所提供,并经该研究所贾晓光教授鉴定,凭证标本(201510A1~A122)保存在第二军医大学药学院新药研究中心;FLC注射

液(2 mg/mL,批号 A447404)购自美国 Pfizer 公司,伏立康唑(*voriconazole*, VCZ)及酮康唑(*ketconazole*, KCZ)均购自美国 Sigma 公司。没食子酸(CAS:149-91-7, PS08121401)购于成都普思生物科技股份有限公司,磷钼钨酸试液购于厦门海标科技有限公司,其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

DL-1000B型智能超声波清洗器(上海之信仪器有限公司),SW-CT-IF型单人双面超净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司),XW-80A型漩涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司),隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),MJX型智能霉菌培养箱(宁波江南仪器厂),Multiskan MK3型酶标仪(芬兰 Labsystems 公司),TECAN Infinite M200型多功能酶标仪(瑞士)。

RPMI 1640 培养液:RPMI 1640(美国 Gibco 公司)10 g、NaHCO₃ 2.0 g、吗啡啉丙磺酸(*morpholinepropanesulfonic acid*, MOPS;美国 Sigma 公司)34.5 g,加三蒸水 900 mL 溶解,以 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0(25 °C),三蒸水定容至 1 000 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,4 °C 保存。

YEPD 培养液:酵母浸膏 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g,加三蒸水 900 mL 溶解,加入 2 mg/mL 氯霉素水溶液 50 mL,三蒸水定容至 1 000 mL,高压灭菌(121 °C, 15 min),4 °C 保存。

沙堡葡萄糖琼脂培养基:蛋白胨 10 g、葡萄糖 40 g、琼脂 18 g,定容至 1 000 mL,高压灭菌(121 °C, 15 min),4 °C 保存。

CA 国际标准菌株 SC5314、Y0109 由美国华盛顿乔治敦大学 William A. Fonzi 教授惠赠;CN32609、AF7544、CA102、CA103、近平滑假丝酵母菌(*Candida parapsilosis*, CP) ATCC22019、光滑假丝酵母菌(*Candida glabrata*, CG) 537、石膏样小孢子菌(*Microsporum gypseum*, MG)、红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*, TR)由第二军医大学长海

医院真菌室提供。所有菌株均经形态学和分子鉴定。

1.2 药材的提取 药材粉碎,过 20 目筛,取 10 g 药粉于 5 倍量的 75% 乙醇中浸泡,30 °C 充分振摇 24 h,超声提取 60 min,离心取上清液,得终浓度为 200 mg 生药/mL 的提取液,置于 -20 °C 冰箱备用。

1.3 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)测定

1.3.1 阳性对照药配制 VCZ 和 KCZ 用二甲亚砜(DMSO)溶解,配制成 6.4 mg/mL 药物母液,置于 -20 °C 冰箱备用。

1.3.2 菌悬液配制 酵母菌于 35 °C SDA 固体培养基划线孵育 24~48 h,挑取单菌落接种至 YEPD 培养液,于 30 °C、200 r/min 振荡培养 16 h,使菌株处于生长对数期;丝状菌(AF、MG 和 TR)于 35 °C 马铃薯葡萄糖琼脂培养基孵育 7 d,经 4 层无菌纱布过滤,以保证菌株活力;以血细胞计数板计数,用 RPMI 1640 培养液调整酵母菌液浓度为 $(0.5 \sim 2.5) \times 10^3$ CFU/mL、丝状菌孢子浓度为 $(0.5 \sim 2.5) \times 10^4$ CFU/mL,用于药敏实验铺板。

1.3.3 体外抑菌活性测定 参照 2008 年和 2009 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的 M38-A2 和 M27-A3 微量液基稀释法^[11-12]:取无菌 96 孔板,于每排 1 号孔加 100 μ L RPMI 1640 培养液作空白对照,12 号孔只加 100 μ L 菌悬液作生长对照;2 号孔分别加菌液 198 μ L 和药液 2 μ L,3~11 号孔各加菌悬液 100 μ L,从 2~11 号孔依次倍比稀释,使各孔的最终维药提取物浓度分别为 2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91 μ g/mL;阳性对照药 FLC、VCZ 和 KCZ 的终浓度分别为 16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.13、0.063 和 0.031 μ g/mL,各孔中乙醇或 DMSO 的含量均低于 1%。药敏板于 35 °C 恒温培养箱中培养,假丝酵母菌和 AF 孵育 48 h、CN 孵育 72 h,用酶标分析仪于 630 nm 处测各孔光密度(D)值,并辅以目测。每次配制药敏板的同时均制备一质控菌药敏板。

1.3.4 MIC 值结果判定 与生长对照孔(D 值控制在 0.2 左右)比较,以 D 值下降 90% 以上的最低

浓度孔为 MIC 值(即真菌生长被抑制 90% 时的药物浓度)。维药提取物大多颜色较深,部分 D 值偏高,同时辅以目测,以肉眼观察无菌生长的最低浓度为 MIC,若 D 值偏高,以目测为准。实验过程严格对照,设有质控菌株(CP ATCC22019)及质控化合物(FLC、VCZ、KCZ),其 MIC 参考值如下:FLC 0.5~4.0 μ g/mL;VCZ 0.016~0.12 μ g/mL;KCZ 为 0.03~0.25 μ g/mL。每次实验时质控菌 MIC 值介于 CLSI M38-A2 和 M27-A3 公布的标准范围内,且对照菌株生长良好,方认为实验操作准确可靠,结果可接受。实验均在不同时间段重复 3 次,3 次结果不超过一个浓度差则可用,且以较高浓度作为 MIC 值。

1.4 联合 FLC 对抗耐药 CA103 的作用 采用棋盘式微量液基稀释法^[12-14]:合用的 2 种药物于 96 孔板上以二维棋盘的纵(A~D)、横(2~11)两个方向分别进行 2 倍的倍比稀释,使得 FLC 的终浓度为 1、0.5、0.25 和 0.13 μ g/mL,维药提取物合用的终浓度为 1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91 和 1.95 μ g/mL。实验所用试剂、药物单用、实验操作步骤同上述 1.3 项。联合用药结果判定:部分抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)是评价联合用药的两药相互作用方式的主要参数,FICI 计算方法:将 2 种药物联合抑菌时的 MIC 值与单用时 MIC 值的比值相加。本实验选用目前国际公认的标准评价联合用药效果:FICI \leq 0.5,协同作用,且 FICI 指数越小,协同作用越强;0.5<FICI \leq 1,相加作用;1<FICI \leq 4,无关作用;FICI>4,拮抗作用。

1.5 各部位鞣质含量测定及抗真菌活性测定

1.5.1 对照品溶液制备 精密称取没食子酸对照品 0.050 8 g,置 100 mL 棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,精密量取 5 mL,置 50 mL 棕色量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得含没食子酸 0.05 mg/mL 的对照品溶液。

1.5.2 供试品溶液制备 选取抗 CA MIC 值<250 μ g/mL 的黄河子皮、毛诃子、鞣树果、阿拉伯胶树汁、岩白菜 5 味药材粉末各 20 g,用 10 倍体积的

70%丙酮浸泡4 h,超声提取30 min,共提取4次,3 000×g室温离心10 min,合并4次提取液,减压回流干燥至恒质量,为粗总鞣质部位;将药渣用75%乙醇按照丙酮提取法再次提取,减压回流干燥至恒质量,我们认为非鞣质部位;将粗总鞣质部位与2倍体积的水混悬,依次用等体积的乙醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,然后分别回收溶剂得到乙醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位及水部位。使用乙醚是除去极性较小的杂质,而乙酸乙酯部位和正丁醇部位是较纯的鞣质部位。取各部位,精密称定,置250 mL棕色量瓶中,加水150 mL,放置过夜,超声处理10 min,冷却,加水稀释至刻度,摇匀,静置,过滤取续滤液20 mL,置100 mL棕色量瓶,用水稀释至刻度,摇匀。

1.5.3 标准曲线绘制 精密量取对照品溶液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置25 mL棕色量瓶中,各加入磷钼钨酸试液1 mL,再分别加水11.5、11、10、9、8、7 mL,用29%碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,避光30 min,在760 nm的波长处测定D值。以D值为纵坐标y、浓度为横坐标x绘制标准曲线。线性方程 $y = 0.0365x + 0.0428$,相关系数 $R^2 = 0.9996$,在1.0~10.0 μg/mL范围内线性关系良好。

1.5.4 鞣质含量测定 总酚:精密量取供试品溶液2 mL,置25 mL棕色量瓶中,按照1.5.3项下的方法,自“加入磷钼钨酸试液1 mL”起,加水10 mL,依法测定D值,根据标准曲线计算供试品溶液中没食子酸的量(mg)。

不被吸附的多酚:取供试品溶液25 mL,加至已盛有干酪素0.6 g的100 mL具塞锥形瓶中,密塞,置30℃水浴中保温1 h,时时振摇,取出,放冷,摇匀,滤过。弃去初滤液,精密量取续滤液2 mL,置25 mL棕色量瓶中,按照1.5.3项下的方法,自“加入磷钼钨酸试液1 mL”起,加水10 mL,依法测定D值,根据标准曲线计算供试品溶液中没食子酸的量(mg)。同时进行干酪素吸附空白试验,计算扣除空白值。

按下式计算鞣质的含量:鞣质含量=总酚量-不被吸附的多酚量。3次测定结果取平均值。

1.5.5 体外抑菌活性测定 精密称取乙醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位及粗总鞣质部位,

用30%乙醇溶解制成6.4 mg/mL溶液进行活性测定。药物测试浓度范围0.25~128 μg/mL。测定方法与1.3项相同。

2 结果

2.1 122味维药醇提物体外抗深部真菌活性筛选 本实验药物浓度范围为3.91~2 000 μg/mL(生药量),将MIC值>2 000 μg/mL视为无效。经测定,对CN有效的维药有21味,对CA有效的有15味,仅姜黄对AF有效。小檗果实、黑种草子、芸香子、相思子、阿纳其根、芹菜籽这6味药仅对CN有抑制作用,MIC值分别为62.5、250、250、500、500、500 μg/mL。

2.2 考察对CA SC5314有抑制作用的15味维药的抗菌谱 结果表明,大多数维药对耐药CA、CN、CP等都有较好的抑制作用,其中姜黄抗菌谱最广,能抑制所有测试菌株。对CA SC5314抑制效果较好的有黄河子皮、毛诃子、鞣树果、阿拉伯胶树汁、岩白菜5味药材,其MIC值均≤62.5 μg/mL;黄河子皮、毛诃子、阿拉伯胶树汁、鞣树果、儿茶、石榴花、余甘子、阿里红、紫檀香9味药材对TR和MG均有抑制作用,且MIC值≤250 μg/mL。详见表1。

2.3 维药协同FLC抗临床耐药CA103活性测定结果 对CA SC5314有抑制作用的15味药材中,除骆驼蓬子、马蔺子、阿里红无协同作用,紫檀香、司卡摩尼亚脂、姜黄表现为相加作用外,黄河子皮、毛诃子、鞣树果、岩白菜、罗望子、石榴花、阿拉伯胶树汁、余甘子、儿茶9味维药与FLC合用对临床耐药菌CA103表现出较强抑菌活性,能使FLC对耐药CA的MIC值(>1 024 μg/mL)平均降低64倍以上;阿拉伯胶树汁单用对耐药CA103无效,但与FLC合用后MIC值下降,协同作用最为显著,FICI值低至0.01。详见表2。

2.4 5味抗真菌维药的活性部位初探 黄河子皮、毛诃子、岩白菜、阿拉伯胶树汁、鞣树果各部位抗CA SC5314的MIC值和鞣质含量测定结果见表3。结果表明,抗真菌活性较强的部位鞣质含量相对较高,而鞣质含量较低的部位则不具有抗真菌活性,如黄河子皮的乙酸乙酯部位和正丁醇部位的鞣质含量分别为68.76%和36.07%,相对应的MIC值为2 μg/mL和4 μg/mL;水部位不含鞣质,其MIC值>128 μg/mL。

表 1 15 味维药醇提取物对 10 种常见致病真菌的抗真菌作用(MIC)

Tab 1 *In vitro* antifungal effects (MIC) of 15 kinds of Uighur medicines against 10 common pathogenic fungi

Drug	CA				CP	CG	CN	AF	TR	MG
	Y0109	SC5314	103	102	ATCC22019	537	32609	7544		
Voriconazole	0.063	0.063	64	64	0.016	0.016	0.031	0.25	0.016	0.25
Ketoconazole	0.063	0.13	>1 024	>1 024	0.13	0.016	0.13	4	0.25	1
Fluconazole	0.25	0.5	>1 024	>1 024	1	0.5	2	>1 024	2	2
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	15.63	31.25	31.25	31.25	31.25	>2 000	3.91	>2 000	125	250
<i>Terminalia bellerica</i> Roxb.	31.25	31.25	31.25	31.25	62.5	>2 000	7.81	>2 000	250	250
<i>Acacia senegal</i> Willd	31.25	62.5	>2 000	>2 000	>2 000	>2 000	7.81	>2 000	250	250
<i>Bergenia purpurascens</i> Engl.	31.25	62.5	62.5	31.25	125	7.81	7.81	>2 000	1 000	500
<i>Rhus coriaria</i> L.	31.25	62.5	62.5	62.5	125	3.91	31.25	>2 000	125	250
<i>Punica granatum</i> L.	125	250	250	250	250	15.63	7.81	>2 000	250	250
<i>Acacia catechu</i> (L.) Willd	125	250	1 000	1 000	250	15.63	31.25	>2 000	125	125
<i>Tamarindus indica</i> L.	125	250	250	250	250	31.25	31.25	>2 000	1 000	1 000
<i>Phyllanthus emblica</i> L.	250	500	500	500	125	1 000	31.25	>2 000	125	125
<i>Fomes officinalis</i> Ames	500	500	>2 000	>2 000	>2 000	>2 000	125	>2 000	250	250
<i>Pterocarpus indicus</i> Willd.	500	1 000	500	500	500	250	125	>2 000	125	250
<i>Convolvulus scammonia</i> L.	500	1 000	>2 000	>2 000	1 000	250	125	>2 000	1 000	500
<i>Peganum harmala</i> L.	1 000	1 000	>2 000	>2 000	1 000	250	125	>2 000	1 000	500
<i>Curcuma longa</i> L.	1 000	1 000	1 000	1 000	2 000	500	250	2 000	1 000	1 000
<i>Iris lactea</i> Pall. var. <i>chinensis</i> Koidz	2 000	2 000	>2 000	>2 000	1 000	125	500	>2 000	1 000	1 000

MIC: Minimum inhibitory concentration; CA: *Candida albicans*; CP: *Candida parapsilosis*; CG: *Candida glabrata*; CN: *Cryptococcus neoformans*; AF: *Aspergillus fumigatus*; TR: *Trichophyton rubrum*; MG: *Microsporium gypseum*

表 2 15 味维药醇提取物单用及联合 FLC 对 CA103 的作用(MIC)

Tab 2 Effect (MIC) of 15 Uighur medicines single and combined with FLC against CA103

Drug	Concentration of FLC $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$					FICI	Interaction
	0	0.13	0.25	0.5	1		
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	31.25	1.95	1.95	1.95	1.95	0.07	Synergy
<i>Terminalia bellerica</i> Roxb.	31.25	1.95	1.95	1.95	1.95	0.07	Synergy
<i>Rhus coriaria</i> L.	62.5	31.25	15.63	15.63	15.63	0.32	Synergy
<i>Bergenia purpurascens</i> Engl.	62.5	7.81	7.81	7.81	7.81	0.13	Synergy
<i>Tamarindus indica</i> L.	250	62.5	31.25	31.25	31.25	0.16	Synergy
<i>Punica granatum</i> L.	250	7.81	7.81	7.81	1.95	0.03	Synergy
<i>Pterocarpus indicus</i> Willd.	500	500	500	500	250	0.88	Add
<i>Phyllanthus emblica</i> L.	500	7.81	7.81	7.81	1.95	0.02	Synergy
<i>Acacia catechu</i> (L.) Willd	1 000	31.25	15.63	15.63	7.81	0.02	Synergy
<i>Curcuma longa</i> L.	1 000	1 000	500	500	250	0.57	Add
<i>Peganum harmala</i> L.	>2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	1.01	Indifferent
<i>Convolvulus scammonia</i> L.	>2 000	2 000	2 000	15.63	7.81	0.51	Add
<i>Acacia senegal</i> Willd	>2 000	7.81	7.81	7.81	7.81	0.01	Synergy
<i>Fomes officinalis</i> Ames	>2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	1.01	Indifferent
<i>Iris lactea</i> Pall. var. <i>chinensis</i> Koidz	>2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	1.01	Indifferent

FLC: Fluconazole; CA: *Candida albicans*; MIC: Minimum inhibitory concentration; FICI: Fractional inhibitory concentration index

表 3 5 味维药各部位抗 CA SC5314 的 MIC 值和鞣质含量测定

Tab 3 MIC values and contents of tannin of different parts of 5 kinds of Uygur medicines against CA SC5314

Drug	MIC against CA SC5314 $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$					
	Crude tannins	Non-tannin	Ethyl ether site	Ethyl acetate site	Butanol site	Water site
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	8	>128	16	2	4	>128
<i>Terminalia bellerica</i> Roxb.	16	>128	16	2	8	>128
<i>Bergenia purpurascens</i> Engl.	16	>128	64	4	8	>128
<i>Acacia senegal</i> Willd	>128	>128	32	8	8	>128
<i>Rhus coriaria</i> L.	64	>128	16	2	16	>128

Drug	Content of tannin in extracts (%)					
	Crude tannins	Non-tannin	Ethyl ether site	Ethyl acetate site	Butanol site	Water site
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	12.53	0.75	8.12	68.76	36.07	0
<i>Terminalia bellerica</i> Roxb.	9.49	0.12	6.23	50.72	28.68	0
<i>Bergenia purpurascens</i> Engl.	8.75	0.34	2.57	49.13	27.12	0
<i>Acacia senegal</i> Willd	17.7	0.24	4.12	41.95	26.63	0
<i>Rhus coriaria</i> L.	3.07	0.33	8.33	56.05	12.33	0

MIC: Minimum inhibitory concentration; CA: *Candida albicans*

3 讨论

维吾尔医药是中国传统民族医学的重要组成部分,是集中医、波斯医学、阿拉伯医学和古希腊医学之长形成的医药学理论和临床实践基础^[15]。新疆地处亚欧大陆中心,其特殊的地理位置和环境孕育了维药的独特性,目前维药材的治疗领域主要集中在皮肤病、风湿病等少数几个病种,其中又以皮肤病居首,例如新疆知名治疗皮肤病的良药地锦草、雅丽蔓、驱虫斑鸠菊、阿纳齐根,以及组方类药百癣夏塔热胶囊、复方卡力孜然酊等^[7,16-18],体现了维药在真菌病治疗领域有独特优势。

本研究首次用统一筛选标准对 122 味维药进行了系统性体外抗深部真菌活性研究,发现其中 15 味维药抗真菌作用较强,大多能协同 FLC 抗耐药 CA,且初步断定其主要活性成分是鞣质。因初筛进行的是大规模药物活性测定,我们无法保证同一提取方法对所有药物的提取均能达到最大效率,故仅根据提取溶剂极性大小对乙醇提取浓度进行了摸索,将文献报道较好的中药(五倍子、月季花、黄连、苦参等 12 味中药)进行了水提取物(0%)、75%醇提取物、99%醇提取物的抗 CA 活性测定,发现 75%乙醇提取物的抗真菌效果相对较好,且相比水提液相对澄清、不易沉淀。故我们选取 75%乙醇作为中药提取

浓度。

分析 122 味维药体外抗真菌活性结果,我们发现维药对 CN 抑制作用明显,但对 AF 有效的极少,且对 CN 有效的维药大多数对 CA 也有很好的抑制作用。进一步扩大抗菌谱发现,除阿拉伯胶树汁、阿里红、司卡摩尼亚脂、骆驼蓬子和马蔺子 5 味药物对 CA 耐药菌不敏感,其余 10 味药材对 CA 标准菌和耐药菌均有较好的抑制作用,提示我们这 10 味维药对 CA 基本无耐药性或耐药性小。同一味维药虽对不同菌株的抗菌活性不同,但对酵母菌属和丝状菌属表现出很好的一致性(对假丝酵母菌效果较好的药物对 TR 和 MG 也有较好活性),如鞣树果、岩白菜、儿茶、石榴花、罗望子、余甘子等。协同抗耐药 CA 结果发现,黄河子皮、毛诃子、鞣树果、岩白菜、罗望子、石榴花、阿拉伯胶树汁、余甘子、儿茶这 9 味维药与 FLC 合同也有较好的增效作用。

对 CA MIC 值 < 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 5 味维药进行文献调研,发现它们主要成分中均含较多鞣质,故提取鞣质部位及非鞣质部位进行抗真菌活性测定,发现非鞣质部位基本无抗真菌活性,鞣质部位活性较好。为了考察鞣质含量与其抗真菌活性是否相关,我们参照 2015 年版《中华人民共和国药典》(四部)通则^[19]部分,采用磷钼钨酸-干酪素法测定鞣质含量,发现鞣质含量高的部位抗真菌活性高,不含鞣质的

水部位基本无抗真菌活性。如黄河子皮、毛诃子、鞣树果的乙酸乙酯部位和正丁醇部位鞣质含量较高,相应的抗真菌活性较强;而水部位基本不含鞣质,相应的不具有抗真菌活性,因而认定鞣质为上述药材的主要抗真菌活性成分。抗真菌领域物质基础研究大多集中在生物碱、黄酮、挥发油类,对极性大部位鞣质关注较少,值得我们深入研究。

维药在抗真菌领域的研究尚不多,对维药的抗真菌活性进行系统性研究,深入挖掘维药材的抗菌谱及协同抗真菌作用,将为探索寻找高效、低毒的抗真菌药物开辟途径,更为少数民族临床用药提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] ANTINORI S, MILAZZO L, SOLLIMA S, GALLI M, CORBELLINO M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: a narrative review[J]. Eur J Intern Med, 2016, 34: 21-28.
- [2] McCARTY T P, PAPPAS P G. Invasive candidiasis[J]. Infect Dis Clin N Am, 2016, 30: 103-124.
- [3] PU S, NIU S, ZHANG C, XU X, QIN M, HUANG S, et al. Epidemiology, antifungal susceptibilities, and risk factors for invasive candidiasis from 2011 to 2013 in a teaching hospital in southwest China [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2017, 50: 97-103.
- [4] MARTIN K W, ERNST E. Herbal medicines for treatment of fungal infections: a systematic review of controlled clinical trials[J]. Mycoses, 2004, 47: 87-92.
- [5] DENNING D W, BROMLEY M J. How to bolster the antifungal pipeline[J]. Science, 2015, 347: 1414-1416.
- [6] 刘永刚,木艾塔尔·努尔麦麦提,阿曼古丽,赵娜,木叶赛尔·吐尔逊,杨小林. 维药开发中存在的问题及建议[J]. 中国现代中药, 2014, 16: 87-89.
- [7] 马志桥,章懋好,胡豪,王一涛. 新疆维吾尔药成药研究进展——基于专利申请与学术文献分析[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22: 4-7.
- [8] 国家中医药管理局,《中华本草》编委会. 中华本草: 维吾尔药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [9] GRAZIOSE R, LILA M A, RASKIN I. Merging traditional Chinese medicine with modern drug discovery technologies to find novel drugs and functional foods[J]. Curr Drug Discov Technol, 2010, 7: 2-12.
- [10] LIU Q, LUYTEN W, PELLENS K, WANG Y, WANG W, THEVISSSEN K, et al. Antifungal activity in plants from Chinese traditional and folk medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143: 772-778.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard, edn 3; Document M38-A2[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard, edn 3; Document M27-A3[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009.
- [13] HUANG S, CAO Y Y, DAI B D, SUN X R, ZHU Z Y, CAO Y B, et al. *In vitro* synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 31: 2234-2236.
- [14] YANG F, DING S, LIU W, LIU J, ZHANG W, ZHAO Q, et al. Antifungal activity of 40 TCMs used individually and in combination for treatment of superficial fungal infections [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 163: 88-93.
- [15] 颜承云,谷继伟,宗希明,佟德成. 我国民族药资源概述[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26: 46-47.
- [16] 古力娜·达吾提,尤丽吐孜,艾则孜·亚森,努尔买买提. 维药地锦草软膏的体外抗真菌及其对豚鼠皮肤真菌感染的治疗作用研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23: 178-180.
- [17] 尤力都孜·买买提,努尔买买提·艾买提,艾则孜·亚森,古力娜·达吾提. 维药雅丽蔓制剂体外抗真菌作用研究[J]. 中国民族医药杂志, 2006, 12: 50-51.
- [18] 李鸿飞,孙宇,卿德刚,倪慧,贾晓光,张娟. 进口维药白花丹与国产白花丹的比较[J]. 新疆中医药, 2014, 32: 68-70.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 2202.

附表1 122种维吾尔药名及拉丁名

序号	汉语药名	拉丁学名	拉丁名	维吾尔族语药名
1	相思子	<i>Abrus precatorius</i> L.	Abrus Fructus	且西密 胡如斯
2	阿拉伯胶树汁	<i>Acacia senegal</i> Willd	Acacia senegal Folium	阿卡克亚
3	阿纳其根	<i>Anacyclus pyrethrum</i> (L.) DC.	Anacyclus Radix	阿克尔 开尔哈
4	芹菜	<i>Apium graveolens</i> L.	Apium Herba	开热非谢
5	芹菜子	<i>Apium grauens</i> L. var. dulcedc.	Apium grauens	青菜 欧如合
6	小檗实	<i>Berberis heteropoda</i> Schrenk	Berberis Fructus	孜日克
7	岩白菜	<i>Bergenia purpurascens</i> (Hook. f. et Thoms.) Engl.	Bergenia crassifolia Herba	
8	儿茶	<i>Acacia catechu</i> (L.) Willd	Catechu	卡提印地
9	菊苣子	<i>Cichorium intybus</i> L.	Cichorium Semen	卡森 欧如合
10	司卡摩尼亚脂	<i>Convolvulus scammonia</i> L.	Convolvulus	赛克木尼亚
11	孜然	<i>Cuminum cyminum</i> L.	Cuminum Semen	孜热
12	姜黄	<i>Curcuma longa</i> L.	Curcuma Radix	则其外
13	菟丝子	<i>Cuscuta chinensis</i> Lam	Cuscuta Herba	色日克 月改 欧如合
14	多榔菊	<i>Doronicum hookarii</i> L.	Doronicum altaicum Pall Rhizoma	代如乃吉
15	小豆蔻	<i>Elettaria cardamomum</i> Maton	Elettaria Maton Semen	拉亲达乃
16	小茴香根皮	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Foeniculum Cortex	巴地洋 依力提孜 破斯提
17	阿里红	<i>Fomes officinalis</i> (Vill. ex Fr.) Ames	Fomes officinalis Calvatia	哈日混
18	马蔺子	<i>Iris lactea</i> Pall. var. chinensis Koidz	Iris lactea Fructus	切合日提马克 欧如台
19	丁香罗勒	<i>Ocimum gratissimum</i> L. var. suave (Willd.) Hook. f	Ocimum Fructus	排然吉木西克
20	骆驼蓬子	<i>Peganum harmala</i> L.	Peganum Fructus	阿德热斯曼 欧如合
21	紫苏子	<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britt. var. arguta (Benth) Hand. Mazz	Perilla frutescens Fructus	巴兰古 欧如合
22	余甘子	<i>Phyllanthus emblica</i> L.	Phyllanthus Radix	阿米勒 破斯提
23	荜茇	<i>Piper longum</i> L.	Piperis longi Fructus	皮里皮力
24	紫檀香	<i>Pterocarpus indicus</i> Willd.	Pterocarpus Lignum	克孜力 散代力
25	石榴花	<i>Punica granatum</i> L.	Punica Flos	阿那尔 古丽
26	鞣树果	<i>Rhus coriaria</i> L.	Rhus coriaria Fructus	苏马克
27	芸香子	<i>Ruta graveolens</i> L.	Ruta Semen	索杂比 欧如合
28	罗望子	<i>Tamarindus indica</i> L.	Tamarindus Fructus	台米日 印地
29	毛诃子	<i>Terminalia bellerica</i> Roxb.	Terminalia bellerica Fructus	白力勒
30	黄诃子皮	<i>Terminalia chebula</i> Retz.	Terminalia chebula Cortex	色日克 艾里勒 破斯提
31	葫芦子	<i>Lagenaria siceraria</i> (Molina) Standl.	Lagenaria Semen	哈帕克 欧如合
32	铁线蕨	<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	Adiantum Herba	皮尔斯药山
33	欧龙芽草	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	Agrimonia pilosa Herba	哈排斯
34	刺糖	<i>Alhagi pseudoalhagi</i> Desv.	Alhagi Semen	洋塔克 西克日
35	蜀葵花	<i>Althaea rosea</i> (L.) Cavan.	Althaea Flos	阿克 来里 古丽
36	蜀葵	<i>Althaea rosea</i> (L.) Cavan.	Althaea Fructus	阿克来里
37	牛舌草花	<i>Anchusa italica</i> Rete.	Anchusa Flos	高孜班 古丽
38	牛舌草	<i>Anchusa italica</i> Rete.	Anchusa Herba	高孜万
39	茴萝	<i>Anethum graveolens</i> L.	Anethum Fructus	色日克 其且克
40	芹菜根皮	<i>Apium graveolens</i> L.	Apium Radix	开热非谢 依力提孜 破斯提
41	圆根马兜铃	<i>Aristolochia rotunga</i> L.	Aristolochia Radix	孜热万
42	艾蒿	<i>Artemisia argyi</i> Lévl. et Vant	Artemisia Herba	艾满
43	一枝蒿	<i>Artemisia rupestris</i> L.	Artemisia Herba	一孜秋 艾密尼
44	天竺黄	<i>Bambusa textilis</i> McClure	Bambusa	塔巴西尔
45	小檗浸膏	<i>Berberis heteropoda</i> Schrenk	Berberis Rhizoma	如苏提
46	芜菁子	<i>Brassica rapa</i> L.	Brassica rapa	查木古尔 欧如合
47	金盏花	<i>Calendula officinalis</i> L.	Calendula Semen	艾密射 巴哈尔
48	刺山柑根皮	<i>Capparis spinosa</i> L.	Capparis Radix	比合 开白尔 破斯提
49	红花子	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	Carthamus Fructus	扎让杂 欧合如
50	阿勃勒	<i>Cassia fistula</i> L.	Cassia Fructus	黑亚尔 先拜尔
51	欧矢车菊	<i>Centaurea behen</i> L.	Centaurea Flos	阿克 拜赫曼
52	洋甘菊	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Chamomilia Flos	巴不乃
53	洋甘菊根	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Chamomilia Radix	巴不乃 依力提孜
54	鹰嘴豆	<i>Cicer arietinum</i> L.	Cicer Fructus	努呼提
55	菊苣	<i>Cichorium intybus</i> L.	Cichorium Folium	卡斯尼
56	菊苣根	<i>Cichorium intybus</i> L.	Cichorium Radix	卡森 依力提孜
57	肉桂子	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl	Cinnamomi Cortex	达尔亲 古丽
58	西瓜子	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. et Nakai	Citrullus Semen	塔吾孜 欧日格
59	秋水仙	<i>Colchicum autumnale</i> L.	Colchicum Flos	苏仁江
60	破布木果	<i>Cordia dicholoma</i> Forst. f.	Cordia Fructus	赛尔皮斯堂
61	芫荽	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Coriandrum Herba	优米哈克 苏提

(续表)

序号	汉语药名	拉丁学名	拉丁名	维吾尔族语药名
62	欧榛	<i>Corylus avellane</i> L.	Corylus Semen	分都克
63	甜瓜子	<i>Cucumis melo</i> L.	Cucumis melo Semen	扩混 欧如合
64	黄瓜子	<i>Cucumis sativus</i> L.	Cucumis Semen	台尔海买克 欧如合
65	青香茅	<i>Cymbopogon caesius</i> (Nees) Stapf	Cymbopogon Herba	依孜合尔
66	榅桲子	<i>Cyonia obonga</i> Mill.	Cyonia Semen	比也 欧如合
67	胡萝卜子	<i>Daucus carota</i> L. var. sativa DC	Daucus Semen	赛维孜 欧如合
68	奇诺	<i>Dracaena cochinchinensis</i> (Lour.) S. C. Chen	Dracaena Agar	混斯药山
69	白蜡树子	<i>Fraxinus szaboana</i> Lingelsh.	Fraxinus Fructus	艾日米盾 欧如谷
70	欧烟堇	<i>Fumaria officinalis</i> L.	Fumaria Herba	夏塔热 印地
71	欧龙胆	<i>Gentiana lutea</i> L.	Gentiana lutea Rhizoma	金提亚那
72	甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	Glycyrrhiza uralensis Radix	曲曲克布亚
73	西黄芪胶	<i>Astragalus gummi fer</i> Labill	Gummi Astragalus	开提拉
74	阿拉伯胶	<i>Acacia senegal</i> Willd	Gummi Arabicum	艾热比 依力蜜
75	铁筷子	<i>Helleborus thibetanus</i> Franch.	Helleborus Radix	卡拉 海拜克
76	大麦	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Hordeum Semen	阿日帕
77	神香草	<i>Hyssopus cuspidatus</i> Boriss	Hyssopus Herba	祖发
78	新疆圆柏实	<i>Sabina vulgaris</i> Antoine	Juniperus Rhizoma	阿日查 梅维斯
79	莴苣子	<i>Lactuca sativa</i> L.	Lactuca Semen	欧松 欧如合
80	薰衣草	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill	Lavandula Flos	乌斯土胡都斯
81	家独行菜子	<i>Lepidium sativum</i> L.	Lepidium Semen	艾比 日沙德
82	补血草	<i>Limonium gmelinii</i> (Willd.) O. Kuntze	Limonium Herba	克孜力 拜赫曼
83	亚麻子	<i>Linum usitatissimum</i> L.	Linum Semen	孜合尔 欧日合
84	欧蜜蜂花	<i>Melissa officinalis</i> L.	Melissa Flos	巴得然吉布亚 印地
85	铁力木花	<i>Mesua ferrea</i> L.	Mesua Flos	那尔米西克
86	肉豆蔻衣	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	Myristica Fructus	白斯巴色
87	没药	<i>Commiphora myrrha</i> Engl.	Myrrha	木尔买克
88	香桃木实	<i>Myrtus communis</i> L.	Myrtus Flos	艾布里 阿斯
89	黑种草子	<i>Nigella glandulifera</i> Freyn et Sint.	Nigella Fructus	斯亚旦
90	睡莲花	<i>Nymphaea candida</i> Presl	Nymphaea Flos	尼鲁法尔
91	罗勒	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Ocimum Folium	热依汗
92	罗勒子	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Ocimum Semen	热依汗 欧如合
93	盒果藤根皮	<i>Operculina turpethum</i> L.	Operculina Cortex	托尔布德
94	欧白及	<i>Orchis chusua</i> D. Don	Orchis Radix Rhizoma	苏来甫
95	猫儿草	<i>Origanum majorana</i> L.	Origanum Herba	买尔赞朱西
96	酸浆	<i>Physali alkekengi</i> L.	Physali Fructus	卡克乃吉
97	洋茴香	<i>Pimpinella anisum</i> L.	Pimpinella Flos	如米别地洋
98	阿月浑子	<i>Pistacia vera</i> L.	Pistacia Cortex	皮斯台
99	腺毛车前子	<i>Plantago psyllium</i> L.	Plantago Semen	衣斯皮胡力
100	白花丹	<i>Plumbago zeylanica</i> L.	Plumbago Radix	谢提然吉
101	欧玉竹	<i>Polygonatum officinale</i> All	Polygonatum Rhizoma	沙卡库力
102	马齿苋子	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Portulaca Semen	色米孜 欧提 欧如合
103	洋李	<i>Prunus domestica</i> L.	Prunus Fructus	卡拉 欧如克
104	石榴子	<i>Punica granatum</i> L.	Punica Semen	阿那尔 欧如合
105	橡子	<i>Quercus robur</i> L.	Quercus Fructus	白鲁提
106	芸香	<i>Ruta graveolens</i> L.	Ruta graveolens Herba	索奈比
107	黄花柳	<i>Salix caprea</i> L.	Salix Folium	比地 米西克
108	檀香	<i>Santalum album</i> L.	Santalum Lignum	阿克 散代力
109	芝麻	<i>Sesamum indicum</i> L.	Sesamum Semen	困居提
110	菝葜	<i>Smilax china</i> L.	Smilax Herba	确比其尼
111	龙葵果	<i>Solanum nigrum</i> L.	Solanum Fructus	依提 欧祖蜜
112	马钱子	<i>Strychnos nux-vomica</i> L.	Strychnos Semen	库其拉
113	香科科	<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	Teucrium Herba	卡麻孜尔由斯
114	阿育魏实	<i>Trachyspermum ammi</i> (L.) Sprague	Trachyspermum Fructus	居维那
115	刺蒺藜	<i>Tribulus terrestris</i> L.	Tribuli Fructus	欧胡日 提坎
116	荨麻	<i>Urtica cannabina</i> L.	Urtica Semen	查卡克 欧提
117	松萝	<i>Usnea longissima</i> Ach	Usne	乌西乃
118	驱虫斑鸠菊	<i>Vernohia anthelmintica</i> Willd	Vernohia Flos	卡拉 孜热
119	天山堇菜	<i>Viola tianshanica</i> Maxim	Viola Herba	比乃非谢吉
120	无核葡萄	<i>Vitis vini fera</i> L.	Vitis Fructus	欧如合斯孜 欧祖密
121	冰糖	<i>Saccharum sinense</i> Roxb.		那瓦提
122	淀粉	<i>Triticum aestivum</i> L.		尼夏斯台