

溴甲酚紫法测定黄连素的体外抗阴道毛滴虫作用

陈 熙¹⁾, 周本江^{2,3)}

(1) 昆明医科大学病原生物学及免疫学实验室, 云南 昆明 650500; 2) 昆明医科大学病原生物学及免疫学系, 云南 昆明 650500; 3) 昆明医科大学海源学院人体寄生虫学教研室, 云南 昆明 650106)

[摘要] **目的** 溴甲酚紫法体外测试黄连素的抗阴道毛滴虫活性. **方法** 设计实验组、已知疗效对照组和阴性对照组, 溴甲酚紫比色法体外测定药物作用于阴道毛滴虫后不同时间、不同药物浓度的培养基 OD 值, 经线性回归分析, 绘制 IC₅₀ 曲线图, 进行药效学比较分析. **结果** 药物作用早期 (2 h), 黄连素 IC₅₀ 值高于甲硝唑; 4 ~ 6 h 2 种药物的 IC₅₀ 值较接近, 12 h 时, 甲硝唑的 IC₅₀ 值为 11.64 μg/mL, 黄连素的 IC₅₀ 值为 10.58 μg/mL, 24 h, 黄连素、甲硝唑的 IC₅₀ 值继续下降, 在 9.53 ~ 9.61 μg/mL 之间. 48 h, 两药的 IC₅₀ 值在 5.38 ~ 6.03 μg/mL 之间, 黄连素 IC₅₀ 值稍高. **结论** 黄连素体外抗阴道毛滴虫的活性与甲硝唑相当, 作为治疗阴道毛滴虫感染或治疗耐甲硝唑虫株的替代药物, 具有很好的开发利用前景.

[关键词] 阴道毛滴虫; 抗滴虫药物; 体外培养; 黄连素

[中图分类号] R382.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 04 - 0013 - 04

The Anti-trichomonas Activity of Berberine by Applying the Bromocresol Purple Colorimetric Spectroscopic Assay in vitro

CHEN Xi¹⁾, ZHOU Ben-jiang^{2,3)}

(1) Laboratory of Pathogen Biology and Immunology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Dept. of Pathogenic Biology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 3) Dept. of Human Parasitology, Haiyuan College of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650106, China)

[Abstract] **Objective** To test in vitro the anti-trichomonas vaginalis activity of berberine by bromocresol purple assay. **Methods** The Trichomonas vaginalis in experimental group, known-efficacy group and negative group, were tested by applying the bromocresol purple colorimetric spectroscopic assay. Before and after the treatment, the OD values of culture medium were measured at different times to make the linear regression analysis and draw IC₅₀ curves. **Results** Compared at the earlier incubation period (2 h), the IC₅₀ value of berberine was higher than that of metronidazole. During the 4 h and 6 h, the IC₅₀ values of two medicaments were similar. At 12 h, the IC₅₀ value of metronidazole was 11.64 μg/mL and that of berberine was 10.58 μg/mL. At 24 h, the the IC₅₀ values of two medicaments kept decreasing, were between 9.53 and 9.61 μg/mL. At 48 h, the IC₅₀ values of two medicaments were between 5.38 and 6.03 μg/mL while the IC₅₀ value of berberine was higher. **Conclusion** The berberine has similar anti-trichomonas vaginalis activity with metronidazole, and can substitute metronidazole in treating the trichomonas vaginalis infection and the metronidazole-resistant strains infection, so it has good application prospects.

[Key words] Trichomonas vaginalis; Anti-trichomonas drugs; Culture in vitro; Berberine

正常情况下, 健康女性阴道内环境因乳酸杆菌的作用而呈酸性 (pH3.8 ~ 4.4). 阴道毛滴虫感染后, 消耗阴道内的糖原, 妨碍了乳酸杆菌的酵解作用, 导致乳酸浓度降低, 从而破坏了阴道的自净功

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (2010ZC111)

[作者简介] 陈熙 (1981 ~), 女, 云南曲靖市人, 医学硕士, 助理实验师, 主要从事医学寄生虫学实验教学工作.

[通讯作者] 周本江. E-mail: kmbj998@yahoo.com.cn

能, 阴道毛滴虫得以繁殖并导致继发性细菌感染, 造成阴道黏膜发生炎性病变^[1]. 甲硝唑是临床上应用最多的抗阴道毛滴虫药物, 临床实践证明甲硝唑可导致消化、神经、血液、皮肤等组织、系统的不良反应, 存在致死性危险^[2], 有潜在的致癌、致畸、致突变作用^[3]. 此外阴道毛滴虫对甲硝唑的耐药性为 9.6%^[4]. 鉴于上述原因, 甲硝唑的临床应用受到一定限制^[5]. 因此, 需要开发新的抗阴道毛滴虫药物.

黄连素 (Berberine, 又名小檗碱) 是从中药黄檗、黄连、三棵针、唐松草等植物药材中提取的生物碱, 临床上常用的制剂为盐酸小檗碱. 黄连素作为广谱抗菌药在临床上得到了广泛使用, 其疗效确切, 对多种革兰氏阳性、阴性菌以及真菌具有抑制或杀灭作用, 主要用于胃肠道感染. 目前, 黄连素在临床上也被大量用于降血糖, 属于胰岛素增敏剂^[6]. 此外, 临床试验发现黄连素还具有降血脂的作用^[7]. 本研究通过体外试验观察黄连素抗阴道毛滴虫活性, 以期拓展该药的临床应用范围, 发现治疗耐甲硝唑的阴道毛滴虫感染的新方法.

1 材料与方法

1.1 培养基

选用肝浸汤培养基, 调节 pH 值至 5.6, 分装 15 mm × 150 mm 试管, 每管 8 mL, 高压灭菌, 置 4 °C 冰箱保存. 使用前将肝浸汤培养管置于沸水中煮 10 min, 待冷却后加入 2 mL 无菌马血清, 初次接种及第 1、2 次转种时均需每管加入适当浓度的青、链霉素^[8].

1.2 虫株来源与培养

试验虫株取自昆明医科大学第一附属医院妇科门诊阴道毛滴虫镜检阳性患者的阴道分泌物, 接种于肝浸汤培养基, 置 37 °C 培养箱内培养 48 h 后进行第 1 次转种, 之后每 3 d 转种 1 次, 转种 3 代后进行药物试验.

1.3 药物及试剂

黄连素 (批号: 200904019), 由昆明理工大学生命科学与技术学院杨健副教授制备; 甲硝唑注射液 (批号: B090926b3), 购自昆明南疆制药有限公司, 稀释至 40 μg/mL 浓度备用; 溴甲酚紫显色剂: 取溴甲酚紫 0.1 g, 溶于 95% 无水乙醇, 定溶至 100 mL, 常温保存备用.

1.4 药物试验

将黄连素 (实验组), 甲硝唑 (已知疗效对照组) 分别用蒸馏水配制成 20、10、5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 μg/mL 7 个浓度, 另设 1 个药物浓度为 0 的阴性对照组, 共计 15 支培养管, 每管 2 mL, 各接种 1.0 mL 新鲜培养的阴道毛滴虫, 滴虫密度约为 20 000/mL. 于 2 药物组的 14 支培养管中加入相应稀释度的药液 1.0 mL, 阴性对照管加入 1.0 mL 蒸馏水. 全部 15 支培养管加盖密闭, 在 37 °C 培养箱内进行培养, 采用文献^[9]溴甲酚紫法测试黄连素抗阴道毛滴虫活性: 于加药后 2、4、6、12、24 及 48 h, 自各培养管中分别吸取 0.1 mL 混悬液, 以 1 500 r/min (离心半径 4 cm) 离心 5 min, 取 80 μL 上清液于酶标板中, 加入 20 μL 溴甲酚紫显色剂, 用酶标仪测 490 nm 处吸光度 (OD) 值, 按下列公式计算各药物浓度的 OD 值差值:

OD 值差值 = 实验孔 OD 值 - 阴性对照孔 OD 值

1.5 统计学处理

用 Excel 统计作用不同时间各药物浓度孔的 OD 值差值, 并导入 SPSS, 进行统计和线性回归分析, 计算两种药物的相应 IC₅₀ 值.

2 结果

2.1 黄连素、甲硝唑不同浓度, 不同时间抗阴道毛滴虫活性

用溴甲酚紫法检测各孔 OD 值, 计算各药物孔 OD 值差值, 显示 OD 值变化值 (Y) 与黄连素和甲硝唑两种药物的浓度和作用时间 (X) 之间均呈现出良好的线性相关关系 ($P < 0.01$), 重复试验数据基本相同. 根据线性回归方程计算出相对应的 IC₅₀ 值, 结果见表 1 和表 2.

2.2 黄连素与甲硝唑不同时间的 IC₅₀ 比较

根据黄连素、甲硝唑不同时间的抗阴道毛滴虫 IC₅₀ 值 (表 1, 表 2), 绘制曲线图 (图 1). 药物作用 2 h, 黄连素 IC₅₀ 值高于甲硝唑; 4 ~ 6 h 2 种药物的 IC₅₀ 均有下降, 且两药的 IC₅₀ 值较接近, 6 ~ 12 h, 黄连素的 IC₅₀ 值下降较甲硝唑的 IC₅₀ 值下降明显, 12 h 时, 甲硝唑的 IC₅₀ 值为 11.64 μg/mL, 黄连素的 IC₅₀ 值为 10.58 μg/mL, 24 h, 黄连素、甲硝唑的 IC₅₀ 值继续下降, 在 9.53 ~ 9.61 μg/mL 之间. 第 48 h, 两药的 IC₅₀ 值较 24 h 均下降相近的剂量, IC₅₀ 值在 5.38 ~ 6.03 μg/mL 之间, 黄连素 IC₅₀ 值稍高.

表1 黄连素不同浓度,不同时间抗阴道毛滴虫活性

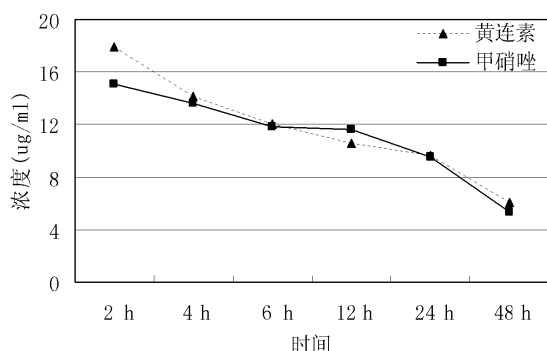
Tab. 1 The anti-trichomonas activity of berberine at different concentration and different times

作用时间 (h)	线性回归方程	r 值	P 值	IC ₅₀ 值 (μg/mL)
2	Y=0.5-0.014X	91.502	≤0.001	17.86
4	Y=0.452-0.016X	7.540	≤0.03	14.13
6	Y=0.458-0.019X	18.801	≤0.007	12.05
12	Y=0.275-0.013X	18.530	≤0.008	10.58
24	Y=0.173-0.009X	8.785	≤0.031	9.61
48	Y=0.217-0.018X	11.13	≤0.021	6.03

表2 甲硝唑不同浓度,不同时间抗阴道毛滴虫活性

Tab. 2 The anti-trichomonas activity of metronidazole at different concentration and different times

作用时间 (h)	线性回归方程	r 值	P 值	IC ₅₀ 值 (μg/mL)
2	Y=0.331-0.011X	19.097	≤0.007	15.05
4	Y=0.49-0.018X	65.561	≤0.001	13.60
6	Y=0.474-0.02X	46.362	≤0.001	11.85
12	Y=0.489-0.021X	24.494	≤0.004	11.64
24	Y=0.324-0.017X	8.304	≤0.035	9.53
48	Y=0.129-0.012X	19.027	≤0.007	5.38

图1 黄连素和甲硝唑不同时间的 IC₅₀ 值Fig. 1 Comparison of the IC₅₀ values of berberine and the metronidazoles at different times

3 讨论

酸碱指示剂溴甲酚紫显色度与酸量成正比。阴道毛滴虫在生长代谢过程中产生乙酸和乳酸,培养基的 pH 值下降。若加入有效该药物,对阴道毛滴虫有抑制或杀灭作用,随着虫数的减少、代谢的减弱,产生的乙酸和乳酸量必然减少, pH 显色就会发生相应的改变,溴甲酚紫法能极大地减少传统的计数法的繁杂工作,定量操作简便,精确度高,重复性好,是进行抗阴道毛滴虫药物筛选的有效方法。

比较观察发现黄连素在药物作用的早期 (2 h),达到 IC₅₀ 值的药量高于甲硝唑,即剂量相同

时,甲硝唑发挥药效作用比黄连素快。而在之后的 4~6 h,2 种药物达到 IC₅₀ 值的药量基本相同,表明此时段内 2 种药物的抗阴道毛滴虫作用相当。12 h 时,甲硝唑的 IC₅₀ 值为 11.64 μg/mL,黄连素的 IC₅₀ 值为 10.58 μg/mL,说明 12 h,相同有效剂量时,黄连素的抗阴道毛滴虫作用略强于甲硝唑,24 h,黄连素、甲硝唑的 IC₅₀ 值继续下降,数值接近,说明两药的抗阴道毛滴虫作用相近。48 h,两药的 IC₅₀ 值较第 24 h 均下降相近的剂量,黄连素 IC₅₀ 值稍高,表明在药物作用的后期,甲硝唑的抗阴道毛滴虫作用较强。

黄连素是一种重要的生物碱,能对抗病原微生物,对多种细菌都有抑制作用,其中对痢疾杆菌作用最强,在临床中一直作为非处方药用于治疗腹泻,它无耐药性和副作用,价格便宜、服用简单、携带方便。近年来,国内也曾有过用中药黄连治疗滴虫性阴道炎的临床报道^[10],以及用不同试验方法开展的黄连素体外杀灭阴道毛滴虫的实验^[11],也证实黄连素具有抗阴道毛滴虫的作用,国外报道该药含有高效抗毛滴虫成分,其中小檗碱的杀虫作用与甲硝唑相当^[12]。这与本研究中,发现的黄连素的 IC₅₀ 值与甲硝唑相近相吻合。

黄连、黄柏、三颗针等植物在我国分布、种植广泛,从中提取的黄连素价格便宜,是常见的中成

(下转第 27 页)