

仙鹤草收敛止血功能及体外抑菌实验

徐 威, 王耀斌, 周彦宇, 赵李剑, 刘 斌, 童春义*

湖南大学生物学院 植物功能基因组学与发育调控湖南省重点实验室, 长沙 410082

摘要: 为了研究仙鹤草的收敛止血功效和抑菌作用, 本实验通过构建大鼠皮肤损伤模型、烫伤模型, 在探讨添加溶菌酶对仙鹤草新鲜和冻干粉末对两种大鼠模型的收敛止血功效和保存时间影响基础上, 进一步考察仙鹤草对表皮葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞杆菌的抑菌效果。实验发现: 新鲜仙鹤草粉末对大鼠伤口愈合效果明显强于冻干粉末, 略逊于云南白药; 粉末中添加溶菌酶对大鼠伤口愈合效果没有明显影响, 但可显著延长鲜草存放时间; 表皮葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞杆菌对仙鹤草提取物敏感程度依次降低。结果表明: 仙鹤草收敛止血的有效活性主要存在于鲜叶中; 其提取物可以抑制常见致病菌的生长; 溶菌酶可延长仙鹤草的储存时间。

关键词: 仙鹤草; 损伤模型; 收敛止血; 细菌; 抑菌作用

中图分类号: R961.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.7.006

Styptic Effect *in vivo* and Antibacterial Activity *in vitro* of *Agrimonia pilosa* Ledeb.

XU Wei, WANG Yao-bin, ZHOU Yan-yu, ZHAO Li-jian, LIU Bin, TONG Chun-yi*

Hunan Province Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Developmental Regulation, School of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China

Abstract: In this study, the hemostasis convergence effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb (including: fresh leaves and dried leaves powder containing lysozyme) on the healing of damage model and burn model rat was studied. The function of sterilization of *A. pilosa* extract on 3 common pathogenic bacteria including *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was investigated. The results showed that the wound healing effect of the fresh *A. pilosa* was higher than that of dried powder, but slightly lower than that of Yunnan Baiyao powder. The addition of lysozyme did not affect the healing ability of dried powder to rat wound but significantly prolonged its storage time. From these results, it was concluded that both fresh and dried powder can improve hemostasis convergence, while the fresh powder was better than the dried one. Antibacterial experiment showed that the crude extract of *A. pilosa* can strongly inhibit the growth of *S. epidermidis* and *E. coli*, but not for *P. aeruginosa*. These results demonstrated that active gradient, which existed in the fresh leaves of *A. pilosa*, showed the anti-bacterial ability. The addition of lysozyme can prolong the storage time of *A. pilosa* powder.

Key words: *Agrimonia pilosa*; damage model; hemostasis convergence; antimicrobial effect

仙鹤草为蔷薇科龙牙草属植物龙牙草 (*Agrimonia pilosa* Ledeb.) 的植物全草。我国大部分地区以及韩国、日本、伊朗等亚洲部分国家均有分布。仙鹤草性平, 味苦涩, 归心、肝经, 具有收敛止血、截疟、止痢、解毒的功效, 临床上用于各种出血症, 如咯血、吐血、崩漏下血、血痢, 疟疾、脱力劳伤、痈肿疮毒^[1]。在药理学方面, 仙鹤草被报道具有抗肿瘤^[2,3]、抗病毒^[4]、抗氧化^[5]、抑菌^[6]以及抗高血糖^[7]等活性。仙鹤草资源极其丰富且为多年生草本植物, 因此具

有充足的原料来源并且可实现资源的可持续利用。但实际应用发现, 仙鹤草鲜草和干草抗菌止血功能相差极大, 从而阻碍了仙鹤草的资源开发和利用。为此本文探讨了溶菌酶处理和温度等保存条件下对仙鹤草收敛止血功效的影响, 以获得较好的仙鹤草保存方案, 为进一步开发利用仙鹤草提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

SD 雄性大鼠 (230 ~ 280 g) 由湖南省斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证号: SCXK(湘)2009-

0004;仙鹤草鲜草由湖南省长沙市宁乡县种植户提供;溶菌酶(购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);创可贴和云南白药(云南白药集团股份有限公司);生理盐水和医用胶带;麻醉剂(戊巴比妥钠)(购于上海桥星贸易有限公司)。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)3种菌种由湖南大学生物学院微生物实验室提供。试剂:营养琼脂购自上海前尘生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

主要仪器包括研钵(北京鼎国生物技术公司)、真空干燥机(型号 Free Zone,美国)、手术剪、液氮、低温冰箱(海尔集团有限公司)、电热恒温培养箱、超净工作台、电子天平、高压蒸汽灭菌锅、摇床和微波炉等。

2 实验方法

2.1 仙鹤草的研磨与保存

基地采摘新鲜仙鹤草后冷冻贮存,到实验室后,立即称取30 g仙鹤草放在研钵内,加入少量液氮以增加研钵内鲜叶的脆性和降低研磨过程产生的热量,有利于保护仙鹤草的有效成分。将叶子充分磨碎以后转移到50 mL离心管内,在真空冷冻干燥机上进行处理,最后将分装好的粉末加入不同量的溶菌酶置于常温和低温条件下保存。

2.2 仙鹤草浸出液的制备

取自制的仙鹤草30 g粉末按常规加水浸泡3 h,文火水煎2次,每次各1 h,滤出煎液,合并2次滤液,离心,过滤,最后将药液用文火浓缩至1 g/mL,调节pH至7.4,高压灭菌20 min,4℃冰箱密封储存^[8]。

2.3 仙鹤草粉末保存条件设置

将仙鹤草粉末按照粉末新鲜程度(鲜草干草)、是否添加溶菌酶和保存温度(22、4、-20℃和-80℃)三个因素每15 g一组分成16小组分别保存,以仙鹤草外观颜色(绿色变为灰色)维持时间判断保存时间。

2.4 大鼠实验处理

机械损伤模型建立方法:实验前先在实验室喂养大鼠一周,实验进行时,将大鼠从笼中取出,然后按40 mg/kg的剂量给其3%注射戊巴比妥钠溶液,经过大约5 min后大鼠被麻醉,以75%酒精在大鼠背部净毛,用剃须刀把脊柱两侧需要做手术的毛剃

干净,然后用手术剪在背部脊柱两侧各剪开一个直径约1.5 cm的圆孔。

烫伤模型建立方法^[9]:同上方法麻醉大鼠,用剃毛机将大鼠背部剃去一个直径1.5 cm的圆形部位,酒精消毒后用灼热的黄铜棒将大鼠背部烫伤面积为直径1.5 cm的伤口。

大鼠实验处理方案设置空白对照组、若干处理组和标准药物组,每组大鼠6只,每只大鼠体重在230 g左右。空白对照组为自然愈合组,药物处理组为将仙鹤草粉末覆盖整个伤口(约1.5 g),标准药物组为将云南白药粉末或烫伤膏覆盖整个伤口(约1.5 g)。

2.5 抑菌实验

琼脂培养基制备^[10]:蛋白胨10 g、牛肉膏3 g、琼脂粉15~20 g、氯化钠5 g、蒸馏水1000 mL,调pH值7.0~7.2。用小烧杯快速称取的蛋白胨、牛肉膏和氯化钠用热水溶解后倒入大烧杯中加热,补足水至1000 mL。加入琼脂粉使其溶化,烧瓶分装,121℃高压灭菌20 min后备用。

细菌悬液制备^[11]:取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌新鲜培养物少许接种至营养肉汤和LB培养基中,37℃摇菌5~6 h,相当于 $5 \times 10^{7.8}$ 集落形成数(CFU)/mL的含菌量,1:10稀释,在无菌操作台上将表皮葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌分别涂布接种于平皿培养基上,并且每种细菌接种3个培养基A、B、C。然后将灭菌的牛津杯(内径6 mm、外径8 mm、高10 mm的圆形小管)放置在培养基上,轻轻加压,每个培养基中放3个牛津杯。用仙鹤草浸出液作为实验组,以生理盐水作为对照组。分别向各小管中滴加一定浓度的药液,勿使其外溢。置37℃培养8~18 h,观察结果。

2.6 统计学分析

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析,实验结果均以Mean ± SD表示,组间差异性检验采用单因素方差分析。

3 结果与分析

3.1 溶菌酶和温度对仙鹤草的保存影响

将仙鹤草放在不同条件观察保存时间,以材料颜色变化与否作为保存效果的判断依据。结果如表1所示。由表可知,温度对仙鹤草储存起着关键性的决定作用,低温下能够长时间保持仙鹤草的新鲜,-80℃下保存时间是常温下保存的3~6倍,-20℃下亦有2

~3 倍的提高。而溶菌酶也有助于仙鹤草的保存,特别 对于干草有显著的延长保存时间的效果。

表 1 温度和溶菌酶对仙鹤草的储存时间影响

Table 1 Effects of temperature and lysozyme on the storage time of *A. pilosa*

组别 Groups	储存时间 Storage time(d)			
	22 °C	4 °C	-20 °C	-80 °C
新鲜仙鹤草粉末(未加酶) Fresh herb(lysozyme free)	10	15	30	60
新鲜仙鹤草粉末(加酶) Fresh herb(lysozyme-added)	20	30	57	80
冻干仙鹤草粉末(未加酶) Dry herb(lysozyme free)	15	40	60	60
冻干干仙鹤草粉末(加酶) Dry herb(lysozyme-added)	50	100	140	180

3.2 仙鹤草对皮外伤口的收敛止血作用

通过分析仙鹤草粉末对机械损伤、烫伤大鼠外皮和对对照组的伤口愈合效果,结果如表 2 所示。新鲜仙鹤草粉末(加 0.05% 的溶菌酶)和新鲜仙鹤草粉末(未加溶菌酶)对伤口的愈合时间均为 10 d 左右,涂抹云南白药的大鼠愈合时间为 5 d 左右。干仙鹤草粉末(加 0.05% 溶菌酶)和干仙鹤草粉末(未加酶)处理的伤口愈合时间为 13 d 左右,原因是干

粉末更易脱落造成愈合时间较长。由实验数据可知,仙鹤草的收敛止血作用非常有效,鲜草粉末对伤口愈合效果明显强于干草粉末,但是略逊于云南白药和烧伤膏。效果较商品化云南白药和烧伤膏差可能是因为白药和烧伤膏为药物浓缩物,有效成分浓度较高,而本实验所用粉末为未处理物,浓度较低,这也为进一步研究仙鹤草商品化及中成药化提供方向。

表 2 仙鹤草药物对伤口的收敛止血作用

Table 2 Convergence and hemostatic effects of *A. pilosa* on wounds

组别 Group	伤口直径 Diameter of the wound(cm)	数量 Number	愈合时间 Healing time(d)
空白组 Control	1.5	6	18 ± 1.8
新鲜仙鹤草粉末(加酶) Fresh herb(lysozyme-added)	1.5	6	10 ± 2 **
新鲜仙鹤草粉末(未加酶) Fresh herb(lysozyme free)	1.5	6	10 ± 2 **
干仙鹤草粉末(加酶) Dry herb(lysozyme-added)	1.5	6	13 ± 1.5 **
干仙鹤草粉末(未加酶) Dry herb(lysozyme free)	1.5	6	13 ± 1 **
云南白药 Yunnan Baiyao plaster	1.5	6	5 ± 1 ***
烧伤膏 Burn cream	1.5	6	6 ± 1.5 ***

注:*** $P < 0.005$, 差异极显著; ** $P < 0.01$, 差异显著。

Note: Data were mean ± standard deviation (SD) values for groups of six animals each. Values were statistically significant, ** $P < 0.01$ compared with control at the corresponding time; *** $P < 0.005$ compared with *A. pilosa* powder-treated group at the corresponding time.

3.3 溶菌酶对大鼠伤口愈合作用的影响

进一步研究了溶菌酶浓度对仙鹤草促进大鼠伤口愈合效果,从表 3 可以看出,当单独使用溶菌酶溶液擦拭伤口时,伤口的愈合速度较为缓慢,几乎与大鼠自然愈合相当。当用于仙鹤草粉末混合溶菌酶敷在伤口处时,大鼠伤口愈合明显加快。说明促进大鼠伤口愈合效果主要是仙鹤草的作用,而溶菌酶仅起到了杀菌消毒的作用。

3.4 仙鹤草浸出液对细菌的抑制作用

促进伤口愈合的同时,防止伤口受细菌感染也是非常重要的药物特性,为此,本文初步探究了仙鹤草抗菌效果。如表 4 可知,仙鹤草浸出液对表皮葡

萄球菌和大肠杆菌均有较好的抑菌效果,其中表皮葡萄球菌的抑菌圈达 30 mm 以上,大肠杆菌抑菌圈直径在 19 mm 左右,而对铜绿假单胞菌的抑菌效果不是很明显,抑菌圈直径为 9.2 mm,低于 10 mm,这与文献报道^[12]相符。

依据美国临床和实验室标准协会(CLSI)标准,抑菌圈大于 20 mm 为极敏,15 ~ 20 mm 为高敏,10 ~ 14 mm 为中敏,10 mm 以下为低敏,0 为不敏。由此可判断,仙鹤草对三种菌均有一定的抑制效果,但对表皮葡萄球菌极敏,对大肠杆菌为高敏,而对铜绿假单胞菌低敏。

表 3 加入溶菌酶分析结果
Table 3 Analysis results of adding lysozyme

组别 Group	伤口直径 Diameter of the wound (cm)	数量 Number	愈合时间 Healing time (d)
冻干仙鹤草粉末(加 0.1% 酶) Dry drug(0.1% lysozyme)	1.5	6	13 ± 1 **
冻干仙鹤草粉末(加 0.3% 酶) Dry drug(0.3% lysozyme)	1.5	6	13 ± 1 **
冻干仙鹤草粉末(加 0.5% 酶) Dry drug(0.5% lysozyme)	1.5	6	13 ± 1 **
0.1% 溶菌酶溶液 0.1% Lysozyme solution	1.5	6	18 ± 2
0.3% 溶菌酶溶液 0.3% Lysozyme solution	1.5	6	18 ± 2
0.5% 溶菌酶溶液 0.5% lysozyme solution	1.5	6	18 ± 2
冻干仙鹤草粉末(不加酶) Dry drug(lysozyme free)	1.5	6	13 ± 1 **
空白组 Control	1.5	6	18 ± 1.8

注: ** $P < 0.01$, 差异显著。

Note: Data were mean ± standard deviation (SD) values for groups of six animals each. Values were statistically significant, ** $P < 0.01$ compared with control at the corresponding time.

表 4 仙鹤草浸出液对不同细菌的抑菌圈直径
Table 4 Antibacterial circle diameter of *A. pilosa* against different bacterials

组别 Group	菌种 Bacterial strain	抑菌直径 Inhibitory zone diameter (mm)	敏感性 Sensibility
1	表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	30.4	极敏 Extremely sensitive
2	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	19.7	高敏 Highly sensitive
3	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.2	低敏 Slightly sensitive

4 讨论与结论

仙鹤草是一种很有价值的中草药, 适合运用到皮外伤口的愈合以及呼吸道炎症^[13]等常见症状。大鼠机械损伤和烧伤实验都证明了仙鹤草具有显著愈合伤口的效果, 同时抑菌试验也证明仙鹤草能够通过抑制部分有害细菌的生长防止伤口受细菌感染, 从而保证了伤口愈合。

本实验还发现新鲜的仙鹤草粉末具有皮外伤口愈合功能, 其功效远远大于干仙鹤草, 这可能是其中的有效物质是以水结合物的方式起作用。而通过低温保存和添加溶菌酶之后, 其存储时间可以实现显著提高, 说明低温和溶菌酶都有缓解仙鹤草有效成分流失, 这可能与低温和溶菌酶条件下具有一定保水抑菌作用有关, 具体的作用机制还有待进一步的探究。

参考文献

1 Wu XD (武晓丹), Jin ZX (金哲雄). Progress of research on *Agrimonia pilosa* Ledeb. . *Proceedings of The First National Chinese Medicine Commodity Academic Conference* (第一届全国中药商品学术大会论文集), 2008: 297-304.

2 Koshiura R, Miyamoto K, Ikeya Y, et al. Antitumor activity of methanol extract from roots of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Jpn J Pharmacol*, 1985, 38: 9-16.

3 Miyamoto K, Kishi N, Koshiura R. Antitumor effect of agrimoniin, a tannin of *Agrimonia pilosa* Ledeb., on transplantable rodent tumors. *Jpn J Pharmacol*, 1987, 43: 187-195.

4 Shin WJ, Lee KH, Park MH, et al. Broad-spectrum antiviral effect of *Agrimonia pilosa* extract on influenza viruses. *Microbiol Immunol*, 2010, 54: 11-19.

5 Zhu LC (祝连彩), Wang BC (王伯初), Tan J (谭君), et al. 仙鹤草醇提物及其不同极性部位的抗氧化活性研究. *J Chin Med Mater* (中药材), 2009, 32: 1272-1275.

6 Yamaki M, Kashihara M, Ishiguro K, et al. Antimicrobial principles of Xian he cao (*Agrimonia pilosa*). *Planta Med*, 1989, 55: 169-170.

7 Jung CH, Zhou S, Ding GX, et al. Antihyperglycemic activity of herb extracts on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70: 2556-2559.

8 Wu SX (邬苏晓), Xiao ZZ (肖正中), Li SY (李淑仪). Bacteriostatic test *in vitro* on water extracts of 20 Chinese herbs. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2008, 36: 8104-8105.