

# 蒺藜 TTS-12 对须癣毛癣菌的体内外抗菌活性研究

陈彦洁<sup>1,2,3</sup>, 柳传毅<sup>2,3</sup>, 吕满霞<sup>1,2</sup>, 方琼彤<sup>2,3</sup>, 吴新荣<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>华南理工大学食品科学与工程学院, 广州 510641; <sup>2</sup> 中国人民解放军南部战区总医院药学部;

<sup>3</sup>广州市老年慢病患者合理用药重点实验室, 广州 510010

**摘要:**为考察天然产物蒺藜 TTS-12 对须癣毛癣菌的体外和体内抗菌活性,本研究采用 CLSI 的 M38-A2 方案对须癣毛癣菌进行最小抑菌和杀菌浓度的检测,选取多重指标考察 TTS-12 对须癣毛癣菌的抑菌作用;建立豚鼠感染须癣毛癣菌豚鼠体癣模型,分组给药观察低、中、高剂量蒺藜 TTS-12 凝胶剂对豚鼠体癣模型在背部病变程度评分,病灶皮肤真菌培养阴性率,病灶皮肤病理变化的影响。结果发现, TTS-12 对须癣毛癣菌的标株菌株的 MIC 值为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MFC 为 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,其还能够显著抑制须癣毛癣菌的菌丝生长,浓度为 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 TTS-12 作用 15 天时,菌丝生长抑制率已经高于 60%,且对须癣毛癣菌的孢子萌发抑制作用呈时间和浓度依赖性。动物实验中,低、中、高剂量蒺藜 TTS-12 凝胶剂均能显著降低背部病变程度评分 ( $P < 0.01$ ),中、高剂量能增高病灶皮肤真菌培养阴性率 ( $P < 0.05$ ),病灶皮肤 HE 染色切片表明高剂量组棘层肥厚降低,背部炎症减弱,使角质层恢复正常。以上结果表明蒺藜 TTS-12 在体外抗须癣毛癣菌和豚鼠体癣模型中均有较好的活性。

**关键词:**蒺藜 TTS-12; 须癣毛癣菌; 抗菌活性; 豚鼠; 体癣模型

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)4-0704-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.4.023

## Antibacterial activity of TTS-12 against *T. mentagrophytes* in vitro and in vivo

CHEN Yan-jie<sup>1,2,3</sup>, LIU Chuan-yi<sup>2,3</sup>, LYU Man-xia<sup>1,2</sup>, FANG Qiong-tong<sup>2,3</sup>, WU Xin-rong<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;

<sup>2</sup> Department of Pharmacy, General Hospital of Southern Theater Command, PLA;

<sup>3</sup> Guangzhou Key Laboratory of Rational Drug Use for the Elderly with C-hronic Disease, Guangzhou 510010, China

**Abstract:** In the study, we evaluated the antibacterial activity of TTS-12 against *T. mentagrophytes* in vitro and in vivo. The M38-A2 method of CLSI was used to detect the minimum inhibitory and fungicide concentration. When guinea pigs were affected, their skin culturing and pathologic changes in local lesions of guinea pig model before and after treatment were record. The effects of low dose, medium dose and high dose of TTS-12 gels on symptom scores were observed. In the treatment period, all treatment group showed a more significant lesion score decrease ( $P < 0.01$ ), high dose and medium-dose group increased negative rate on fungal reculture ( $P < 0.05$ ), TTS-12 showed high antibacterial activities against *T. mentagrophytes* and also had a certain therapeutically effect on guinea pig that infected with *Trichophyton mentagrophytes*.

**Key words:** TTS-12; *T. mentagrophytes*; antibacterial activity; guinea pig; tinea corporis model

体癣是最为常见的皮肤浅部真菌病,是除了头部、手部、脚部和甲部外,发生在身体皮肤上的皮肤真菌感染。目前,约有 40 个不同种类的的皮肤癣菌,而根据其消化角质能力的不同分为三大属:毛癣菌属 (*Trichophyton*)、小孢子菌属 (*Microsporum*) 和表

皮菌属 (*Epidermophyton*)<sup>[1,2]</sup>。随着广谱抗生素的长期使用,真菌耐药菌株的出现,开发天然无副作用的抗菌药物有着重要的意义。蒺藜为蒺藜科蒺藜属植物蒺藜 (*Tribulu stermtris* L.) 的干燥成熟果<sup>[3]</sup>。甾体皂苷 (*Steroidal saponins*) 为蒺藜的主要成分之一,现代研究表明,蒺藜皂苷类具有抗衰老、抗菌、抗癌等作用<sup>[4]</sup>。甾体皂苷通常都为很好的抗菌物质<sup>[5]</sup>,甾体皂苷 TTS-12 是从蒺藜全草中分离纯化得到的单体产物,属于螺甾烷醇型甾体皂苷,其化学名为替告

收稿日期: 2018-07-24 接受日期: 2018-12-18

基金项目: 2014 年度全军后勤科研计划 (CGZ14C003)

\* 通信作者 Tel: 86-20-88653476; E-mail: 13902300518@139.com

皂苷元 3-O-β-D-吡喃木糖(1→2)-[β-D-吡喃木糖(1→3)]-β-D-吡喃葡萄糖(1→4)-[α-L-吡喃鼠李糖(1→2)]-β-D-吡喃半乳糖苷<sup>[6]</sup>,其结构如图 1 所示。前期研究表明,甾体皂苷 TTS-12 对常见的四种皮肤癣菌,红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)、须癣毛癣菌(*T. mentagrophytes*)、石膏样小孢子菌(*Microsporum gypseum*)和犬小孢子菌(*Microsporum canis*)均有较强的抗菌活性<sup>[7]</sup>。体外抗皮肤癣菌的效果决定了 TTS-12 是否具有成药的潜质,除了用 CLSI 的 M38-A2 方案对皮肤癣菌进行最小抑菌浓度和最小杀菌浓度的检测外<sup>[8]</sup>,本实验还选了多种指标考察 TTS-12 对皮肤癣菌的抑菌作用,以此来充分证明 TTS-12 的抗皮肤癣菌效果。随后采用自制的蒺藜 TTS-12 凝胶剂观察其对感染须癣毛癣菌的豚鼠体癣治疗效果,进一步研究在动物水平上,蒺藜 TTS-12 的抗菌效果,为蒺藜 TTS-12 开发成新的抗真菌药物提供科学理论依据。

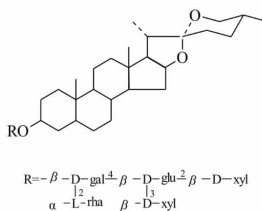


图 1 蒺藜 TTS-12 化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds TTS-12

## 1 实验仪器与材料

### 1.1 仪器

LRH-70 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、BHC-IIB2 生物安全柜(广州苏净医疗设备有限公司)、YXQ-LS-18SI 压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司)、OLYMPUS 生物显微镜(奥林巴斯有限公司)、BP210S 型电子天平(德国赛多利斯)、LRH-70 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);SW-CJ-IF 净化工作台(上海博讯实业有限公司);移液枪(美国 Thermo 公司)。

### 1.2 材料

TTS-12 对照品(纯度:99.6%)由第二军医大学药学院天然药化教研室提供、酮康唑(纯度 > 98.0%, MACKLIN);氟康唑(纯度 > 98.0%, aladdin);酵母粉(OXOID, 批号:1338303-02)、YEAST EXTRACT(OXOID);马铃薯葡萄糖琼脂粉(广东环凯微生物科技有限公司,批号:3104890)、RPMI-1640 Medium(SIGMA 公司);二甲基亚砜分析

纯(天津大茂化学试剂厂);3799-96 孔板(COST-AR);自制 0.5%、0.8%、1% 蒺藜 TTS-12 凝胶;盐酸特比萘芬乳膏(中美天津史克制药有限公司,批号:L07060A);脱毛膏(薇婷,批号:20150321)。

### 1.3 菌株和动物

须癣毛癣菌[*Trichophyton mentagrophyton*, CM-CC(F)T5e]、近平滑菌念珠菌(*Candida parapsilosis*, ATCC22019)购于中国医学科学院皮肤病研究所,21 株须癣毛癣菌临床分离菌株由广州军区广州总医院医院检验科惠赠;普通级豚鼠,每只体重约 200 ~ 250 g,雌雄各半,共 56 只。试验动物许可证号:SCXK(粤)2016-0002, NO. 44007200002096。于广州军区广州总医院动物中心普通环境饲养。

## 2 实验方法

### 2.1 真菌的培养及菌液的配置

须癣毛癣菌的标准菌株接种在 PDA 培养基上,于 28 °C 的培养箱中活化 7 ~ 14 天。选取生长状态良好,无污染的菌落作为受试菌株,于菌落上滴加适量 0.85% 无菌生理盐水,用无菌棉棒轻轻反复刮擦菌落表面,使孢子充分与生理盐水充分混合。用两层纱布过滤菌悬液至离心管中,再放置于涡旋振荡器震荡 15 s 左右。用血细胞计数板进行计数,用无菌生理盐水调整菌液浓度至 2 ~ 6 × 10<sup>5</sup> CFU,最后用不含氮源 RPMI-1640 培养基稀释 10 倍,备用。

### 2.2 TTS-12 对皮肤癣菌标准菌株及临床菌株最小抑菌浓度(MIC)

采用 CLSI M38-2 方案对 MIC, MIC 的测定方法如下:将适量 TTS-12 溶于 DMSO 中,使浓度为 6.4 mg/mL,吹打均匀后用 RPMI-1640 液体培养基稀释 100 倍。取 96 孔板,1 ~ 10 孔加入 100 μL RPMI-1640 培养基,将 100 μL 药液培养基加至第 10 孔中,用移液枪吹打均匀后转移 10 μL 至第 9 孔,以此类推直至第 1 孔,舍弃最后 100 μL。TTS-12 的浓度范围在 0.062 5 ~ 32 μg/mL。1 ~ 10 孔加入 100 μL 菌液。第 11 孔加入 200 μL 无菌培养基作为空白对照,第 12 个孔加入 100 μL 无菌培养基和 100 μL 菌液作为阴性对照。每组平行 3 次,置于 28 °C 恒温培养箱中培养,4 天后判读结果,无菌生长孔所对应的最低药物浓度为 MIC。

### 2.3 TTS-12 对皮肤癣菌标株及临床菌株的最小杀菌浓度(MFC)

从以上的药敏板中转移完全抑制真菌生长的携药培养基至 PDA 平板培养基中,28 °C 培养 5 天,肉

眼观察有无真菌生长,无真菌生长菌液所对应的的最小浓度为 MFC。质控实验在与上述实验平行操作的条件下进行,近平滑念珠菌(ATCC 22019)作为质控菌株,酮康唑作为质控药,按照以上的步骤步骤对质控菌株进行 MIC 测定,当 MIC 落在 0.062 5 ~ 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时数据可信有效。

## 2.4 TTS-12 对菌丝生长的抑制作用

配制 TTS-12 浓度为 2、4、6、8、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PDA 平板培养基。用 0.7 cm 打孔器取生长良好的菌块作为菌饼,接种于载药培养基上,于 28  $^{\circ}\text{C}$  的环境中培养 15 天,每 24 h 观察一次,平行 5 次。

菌落直径(cm) = 测量菌落直径 - 0.7

菌丝生长抑制率 = [(对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / 对照组菌落直径]  $\times$  100%

## 2.5 TTS-12 对孢子萌发动力学的影响

TTS-12 用 DMSO 溶解后,再用 100 倍生理盐水溶解,使终浓度为 1、2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。接种 10  $\mu\text{L}$   $1 \sim 4 \times 10^8$  spores/mL 菌液,斡旋震荡后,分别置于室温处理 30、60、90、120、150、180 min,10 000 rpm 离心 5 min,用无菌生理盐水冲洗孢子,重悬于 100  $\mu\text{L}$  无菌水中,取 10  $\mu\text{L}$  置于含 PDA 的凹玻片中,置于湿盒中于 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱培养 24 h,显微镜观察孢子萌发情况,平行 5 次。

孢子萌发率 = (发芽孢子数 / 孢子总数)  $\times$  100%

## 2.6 豚鼠体癣模型制备

取豚鼠 56 只,每只豚鼠后背部用剃毛刀剃毛(2.5 cm  $\times$  2.5 cm),然后轻涂适量脱毛膏,5 min 后用灭菌水清理干净背部的毛并擦干,用手术刀刮伤皮肤至有针状血出现为止,随机取 8 只(雌雄各半)作为空白组,其余 48 只豚鼠用制备好的菌悬液(浓度调节为  $1 \times 10^7$  CFU/mL)涂抹于创面上 0.4 mL/d,空白组用无菌生理盐水涂抹于创面上 0.4 mL/d,每天观察并且重复染菌至第 5 天,取背部接种处皮屑用 10% 氢氧化钾进行镜检,以镜检阳性为造模成功。

## 2.7 分组给药及评价方法

成功造模后,将豚鼠随机分为模型组、阴性对照组、阳性对照组及低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 10 只。空白组、模型组给予无菌生理盐水,阴性对照组给予空白凝胶基质、阳性对照组给予盐酸特比萘芬乳膏、低中高剂量组组分别给予 0.5%、

0.8%、1% 的蒺藜 TTS-12 凝胶。48 小时内开始给药,每只豚鼠背部给予 0.4 mL/天,每天一次,连续给药 7 天。开始给药后每天观察并对背部病变程度进行评分<sup>[9]</sup>,具体评分见表 1。

表 1 豚鼠背部病变程度评分标准

Table 1 Lesion score standard of Guinea pig

评分标准 Scoring Standards	评分 Scoring
无病变 No lesions	0
出现少数红斑、丘疹或病灶开始痊愈,有新体毛长出 A few erythema appeared or papules began to heal, new body hair grew	1
红斑数量变多或散在背部其四周发红 The number of erythema increased	2
红斑全面扩大,有大量鳞屑及厚皮 The erythema enlarged, with plenty of scale and thick skin	3
伴有出血的极期病变 Hemorrhagic disease	4

给药 7 天后,第 8 天将豚鼠处死,用无菌生理盐水清洗背部皮肤,取病灶部位皮肤,每只豚鼠病灶皮肤处取 5 块 5  $\times$  5 mm 组织,2 块皮肤放置于 10% 甲醛溶液中,做 HE 染色切片,用显微镜观察病灶皮肤炎性发生情况。剩余 3 块放入 70% 乙醇中浸泡 2 ~ 3 min,杀灭杂菌,经无菌生理盐水清洗后接种到含青霉素和放线菌酮的 PDA 培养基中,培养在 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中,7 天后观察须癣毛癣菌生长情况,计算病灶皮肤真菌培养的阴性率。

## 2.8 统计方法及数据处理

数据使用软件 SPSS20.0 进行统计学分析,各组豚鼠背部病变程度评分比较采用单因素方差分析,各组病灶皮肤真菌培养阴性率比较采用  $\chi^2$  检验,设  $P < 0.05$  为有统计学意义, $P < 0.01$  为有显著统计学差异。

## 3 结果

### 3.1 最小抑菌浓度(MIC)的测定

用肉眼观察,与生长对照组孔相比,约抑制 80% 真菌生长的孔所对应的最低浓度为最小抑菌浓度。TTS-12 对须癣毛癣菌及其临床菌株均有较好的抑菌活性,对须癣毛癣菌的 MIC 值为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,对两者种的临床菌株 MIC 范围为 1 ~ 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.5 ~ 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其抑菌活性高于抗真菌常用药物氟康唑,与酮康唑相似。实验中质控菌株的 MIC 落在有效范围内,实验可信有效(表 2,3)。

表 2 TTS-12 及 3 种药物对 21 株须癣毛癣菌临床菌株的 MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )Table 2 MIC of TTS-12 and common antifungal drugs against 21 clinically isolated strains of *T. mentagrophytes* ( $\mu\text{g/mL}$ )

药物 Drugs	最小抑菌浓度平均值 MIC geomean	最小抑菌浓度范围 MIC range	半数抑菌浓度 MIC <sub>50</sub>	90% 最小抑菌浓度 MIC <sub>90</sub>
TTS-12	1.907	0.5 ~ 8	1	4
氟康唑 Fluconazole	8.571	4 ~ 16	8	16
酮康唑 Ketoconazole	3.381	1 ~ 8	4	4
盐酸特比萘芬 Terbinafine hydrochloride	0.118	0.0156 ~ 0.25	0.0625	0.250

表 3 TTS-12 及 3 种药物对 21 株须癣毛癣菌临床菌株的 MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )Table 3 MIC of TTS-12 and common antifungal drugs against 21 clinically isolated strains of *T. mentagrophytes* ( $\mu\text{g/mL}$ )

药物 Drugs	最小抑菌浓度平均值 MIC geomean	最小抑菌浓度范围 MIC range	半数抑菌浓度 MIC <sub>50</sub>	90% 最小抑菌浓度 MIC <sub>90</sub>
TTS-12	1.907	0.5 ~ 8	1	4
氟康唑 Fluconazole	8.571	4 ~ 16	8	16
酮康唑 Ketoconazole	3.381	1 ~ 8	4	4
盐酸特比萘芬 Terbinafine hydrochloride	0.118	0.0156 ~ 0.25	0.0625	0.250

### 3.2 最小杀菌浓度 (MFC) 的测定

TTS-12 对须癣毛癣菌的 MFC 为  $8 \mu\text{g/mL}$ , 对临床菌株的 MFC 在  $4 \sim 32 \mu\text{g/mL}$ 。结果表明, TTS-12 对须癣毛癣菌标准菌株和临床菌株均有较好的杀菌作用(表 4, 5)。

### 3.3 TTS-12 对菌丝生长的抑制作用

TTS-12 对皮肤癣菌的菌丝抑制程度随浓度递增, 如图 2 所示, 在第 15 天时, 浓度  $4 \mu\text{g/mL}$  的 TTS-12 对须癣毛癣菌的菌丝生长抑制率已经高于 60%, 蒺藜 TTS-12 对须癣毛癣菌菌丝生长有良好的抑制效果。

表 5 TTS-12 及 3 种药物对 21 株须癣毛癣菌临床菌株的 MFC ( $\mu\text{g/mL}$ )Table 5 MFC of TTS-12 and common antifungal drugs against 21 clinically isolated strains of *T. mentagrophytes* ( $\mu\text{g/mL}$ )

药物 Drugs	最小杀菌浓度平均值 MFC geomean	最小杀菌浓度范围 MFC range	半数杀菌浓度 MFC <sub>50</sub>	90% 最小杀菌浓度 MFC <sub>90</sub>
TTS-12	14.476	4 ~ 32	8	32
氟康唑 Fluconazole	88.381	32 ~ 256	64	128
酮康唑 Ketoconazole	6.476	4 ~ 16	8	8
盐酸特比萘芬 Terbinafine hydrochloride	0.798	0.25 ~ 2	0.5	2

### 3.4 TTS-12 对孢子萌发动力学的影响

TTS-12 对须癣毛癣菌的孢子萌发动力学如图 3 所示, 用不同浓度的 TTS-12 ( $1 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ ) 处理须癣毛癣菌, 其可以抑制皮肤癣菌的孢子萌发, 其抑制孢

表 4 蒺藜 TTS-12 及常用药物对须癣毛癣菌标准菌株的 MFC 值 ( $\mu\text{g/mL}$ )Table 4 MFC of TTS-12 and common antifungal drug against two standard strains of *T. mentagrophytes* ( $\mu\text{g/mL}$ )

药物 Drugs	须癣毛癣菌 <i>T. mentagrophytes</i>
TTS-12	8
氟康唑 Fluconazole	64
酮康唑 Ketoconazole	8
盐酸特比萘芬 Terbinafine hydrochloride	0.25

子萌发的效果与 TTS-12 的浓度和时间呈正相关。

### 3.5 豚鼠背部病变程度评分

体内实验中, 在接种菌液的第 5 天后, 各组均出现有红斑及白色或淡黄色的鳞屑, 并伴有出血的病

变情况,在给药期间,除了模型组和阴性对照组外,其余各组均显著降低豚鼠背部病变程度评分,对背部体癣症状有一定的改善,红斑减少,厚皮脱落皮肤变光滑,各组一般背部病变情况可见图 4。给药第 1 天,和空白对照组比较,模型组及各给药组豚鼠背部病变程度评分显著增加且皮屑镜检为阳性,表

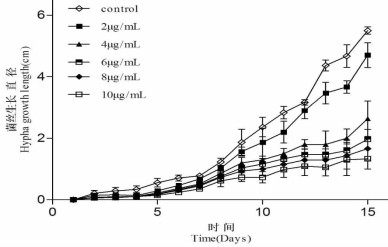


图 2 不同浓度的 TTS-12 分别对须癣毛癣菌丝生长的影响 ( $n=5, x \pm s$ )

Fig. 2 Effect of different concentrations of TTS-12 for *T. mentagrophytes* ( $n=5, x \pm s$ )

明造模成功并且各给药组评分无差异说明各组豚鼠分配均匀;和模型组相比,给药的第 1、4、8 天,阴性对照组豚鼠背部病变程度评分差异无统计学意义,说明阴性对照组的空白凝胶剂基质对体癣模型背部病变情况没有明显改善。给药第 4 天,和模型组相比,低剂量组能降低豚鼠背部病变程度评分并具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ),中剂量组、高剂量组能显著降低豚鼠背部病变程度评分 ( $P < 0.01$ ),阳性对照组未见显著降低豚鼠背部病变程度评分,在给药第 8 天中剂量组、高剂量组与阳性对照组相比效果相当,没有统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。

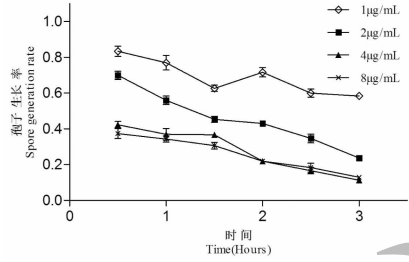


图 3 TTS-12 对须癣毛癣菌的孢子萌发动力学影响 ( $n=5, x \pm s$ )

Fig. 3 Effect of kinetics of *T. mentagrophytes* spores by TTS-12 ( $n=5, x \pm s$ )

### 3.6 豚鼠病灶皮肤病理变化

病灶皮肤 HE 染色切片结果表明,模型组和阴性对照组病灶真皮层中可以见到有大量的中性粒细胞浸润,棘层肥厚,有明显的炎性,角质层可见有菌丝,低中高剂量组有一定程度的棘层肥厚,但厚度小于模型组,炎性细胞浸润较模型组轻,但比阳性对照组严重,其中高剂量组的角质层正常,炎症情况比较轻。各组 HE 染色病理结果见图 6。

### 3.7 豚鼠病灶皮肤真菌培养阴性率

造模成功后,病灶背部皮肤皮屑镜检下可以观察到有大量的菌丝,给药处理后取病灶皮肤进行真菌培养,其阴性率能一定程度反映药物的杀菌效果。病灶皮肤真菌培养结果显示各组真菌培养阴性率分别为:空白组 100%、模型组 20.83%、阴性对照组 25%、阳性对照组 75%、低剂量组 41.67%、中剂量组 54.17%、高剂量组 66.67%,其中空白组背部皮肤的真菌培养未见有须癣毛癣菌的生长,模型组大

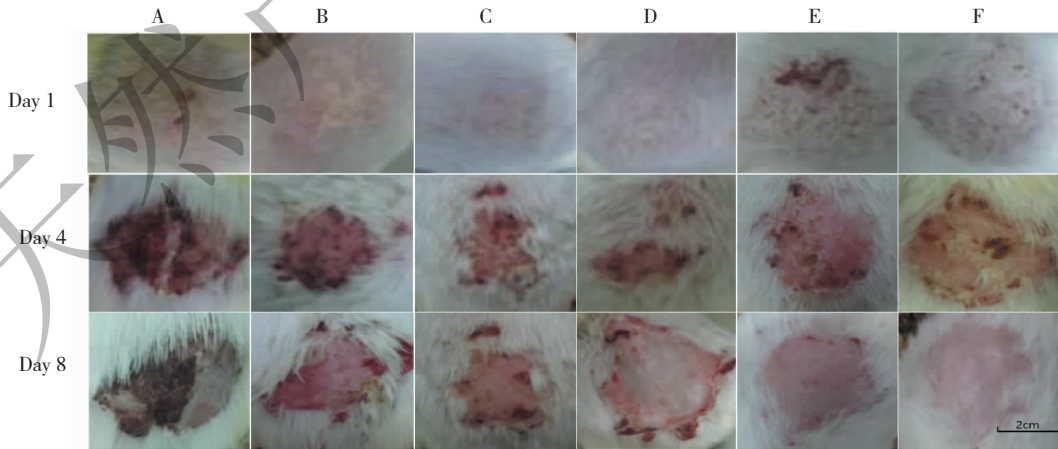


图 4 各组豚鼠背部病变情况 ( $n=10$ )

Fig. 4 Groups of guinea pig lesions ( $n=10$ )

注:A 模型组,B 阴性对照组,C 低剂量组,D 中剂量组,E 高剂量组,F 阳性对照组。

Note: A: Model group, B: Negative group, C: Low-dose group, D: Middle-dose group, E: High-dose group, F: Positive group.

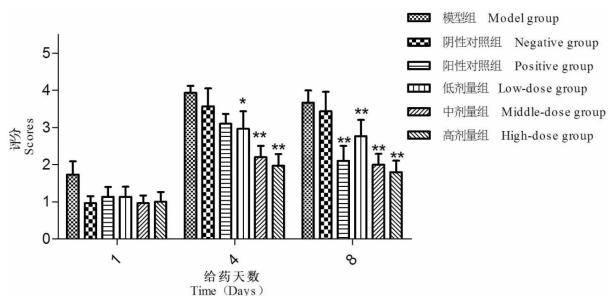


图5 给药后各组豚鼠背部症状评分图 (n = 10, x ± s)

Fig. 5 Lesion score of guinea pig after treatment (n = 10, x ± s)

注:与模型组相比,\*表示 P < 0.05,\*\* P < 0.01。

Note: Compare with control,\* P < 0.05; \*\* P < 0.01.

多数病灶皮肤的真菌培养可见有须癣毛癣菌的生长。结果表明,与模型组相比,中剂量组皮肤真菌培养阴性率有统计学差异(P < 0.05),阳性对照组、高

剂量组皮肤真菌培养阴性率有明显的差异(P < 0.01),且两者皮肤真菌培养阴性率相当,说明高剂量组表现出一个比较好的杀菌作用,具体结果见表6。

#### 4 讨论

蒺藜被分离鉴定出含有载体皂苷、黄酮、糖苷、植物甾醇、单宁酸等化合物。皂苷和黄酮作为蒺藜中的主要代谢产物,因其具有多种生物活性,成为蒺藜研究的主要对象。学者发现其甾体皂苷种类丰富,多达108种<sup>[10]</sup>,蒺藜TTS作为一种螺甾烷醇型甾体皂苷具有良好的抗菌活性。

随着越来越多的研究从中药或植物中寻找有效抗真菌成分,这些新型抗真菌成分药效的评价和检测方法也随之发展和系统化。对活性成分进行体外抗真菌和毒性评价是筛选的第一步,随后进行体内动物模型试验来进一步验证。

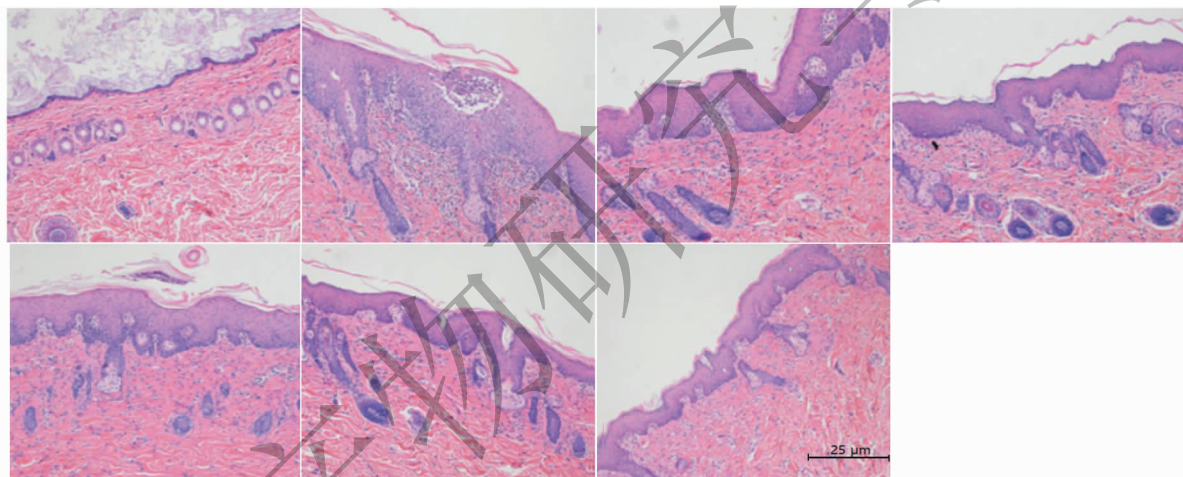


图6 各组 HE 染色病理切片 (×400)

Fig. 6 HE pathological section (×400)

注:A空白组,B模型组,C阴性对照组,D阳性对照组,E低剂量组,F中剂量组,G高剂量组。

Note: A: Blank group, B: Model group, C: Negative group, D: Positive group, E: Low-dose group, F: Middle-dose group, G: High-dose group.

表6 病灶皮肤真菌培养阴性率

Table 6 Negative rate of lesions skin fungal culture

组别 Groups	阴性 Negative	阳性 Positive	总数 Amount	阴性率% Negative rate
空白组 Blank group	24	0	24	100
模型组 Model group	5	19	24	20.83
阴性对照组 Negative control	6	18	24	25.00
阳性对照组 Positive control	18	6	24	75.00**
低剂量组 L-dose group	10	14	24	41.67#
中剂量组 M-dose group	13	11	24	54.17*
高剂量组 H-dose group	16	8	24	66.67**

注:与模型组相比,\*表示 P < 0.05; \*\* P < 0.01;与阳性对照组相比,#表示 P < 0.05。

Note: Compare with control,\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; Compare with positive,#P < 0.05.

在标准化的体外抗菌药敏实验方案中,美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Standards Institute, CLSI)制定的 M27-A3、M38-A2 就为我们提供了一个快速、简单、可靠的测量方法,方案提出后众多学者都采取此方法进行抗菌药物筛选<sup>[11]</sup>。体外实验中测得 TTS-12 对须癣毛癣菌的标株菌株的 MIC  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ , MFC  $\leq 32 \mu\text{g/mL}$ ,且 TTS-12 能够显著抑制须癣毛癣菌的菌丝生长,孢子萌发,说明蒺藜 TTS-12 有较强的体外抗菌活性。本次实验中同时选取了标准菌株和临床分离菌株测定其抗菌作用,使数据具有一定的代表性和可信服性。

而对于动物感染体癣模型的研究从很早就已见报道,最早可见 1908 年 Bloch 建立体癣动物模型<sup>[12]</sup>的报道,随后越来越多的学者对动物体癣模型进行探讨,包括对动物的选择,感染菌株的选择,预处理和处理方法的比较及接种范围等<sup>[12]</sup>。动物体癣模型的造模在感染菌株的选取上,可选用红色毛癣菌、须癣毛癣菌或犬小孢子菌,但由于犬小孢子菌产孢较少,菌悬液浓度达不到高浓度,红色毛癣菌为亲人性菌株,它在自然环境下极少感染动物,因此需要使用免疫抑制剂干预才能造模成功,须癣毛癣菌同时具有亲人和亲动物的特点,使其成为造模更理想的选择。

此外,豚鼠感染皮肤癣菌病理进程也是可预测的:豚鼠在接种菌株之后的 4 到 6 天会有短暂的红斑或丘疹出现,并在 7 到 8 天之间反应达到高峰期,随后红斑或丘疹就会逐渐增加并融合在一起。在接种的 4 周内,这些病变情况逐渐发生后,大多数豚鼠会自愈,所以试验中建议在豚鼠感染后 3 ~ 5 天给药,观察时间控制在 2 周内<sup>[13]</sup>。

本试验从豚鼠背部病变程度评分、病灶皮肤真菌培养阴性率及病灶皮肤病理变化来综合评价低中高剂量的蒺藜 TTS-12 凝胶对豚鼠感染须癣毛癣菌体癣模型的作用,从试验结果来看,相对于模型组,低中高剂量的蒺藜 TTS-12 凝胶对于病灶皮肤出现的红斑、出血、瘙痒有一定程度的缓解作用,能不同程度地杀灭侵袭皮肤的须癣毛癣菌,并呈一定的量效关系,其中高剂量组的治疗效果最佳,与阳性对照组相当,以上研究为蒺藜 TTS-12 凝胶以后临床应用提供试验依据。

## 参考文献

- 1 Aly R. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections [J]. J Am Acad Dermatol, 1994, 31: 21.
- 2 White TC, Oliver BG, Graser Y, et al. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes [J]. Eukaryotic Cell, 2008, 7: 1238-1245.
- 3 Qi JH. Recent researches on the pharmacologic functions of gross saponin in *Tribulus Terrestris. L* [J]. J Xi'an Univ Art&Sci; Nat Sci Ed (西安文理学院学报: 自科版), 2013, 16(3): 26-29.
- 4 Chhatre S, Nesari T, Somani G, et al. Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris* [J]. Pharmacogn Rev, 2014, 8(15): 45-51.
- 5 Sun Q, Ju Y, Zhao Y. Steroid saponins with biological activities [J]. Chni Tradit Herb Drugs (中草药), 2002, 33: 276-280.
- 6 Liu J, Chen HS, Xu YX, et al. Studies on chemical constituents of *Trbulus terrestris* [J]. Acad J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2003, 24: 221-222.
- 7 Tan CW, Wu BJ, Sun JW, et al. The improvement of CLSIM38 A2 determine the sensitivity of tinea to steroid saponin [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2017, 39: 828-830.
- 8 Siopi M, Pournaras S, Meletiadis J. Comparative evaluation of sensititre yeast one and CLSI M38-A2 reference method for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* spp. against echinocandins [J]. J Clin Microbiol, 2017, 55: 1714-1719.
- 9 Miao MS, Cui TS, Tian S, et al. Effects of kuijieling on balance of peripheral blood treg/th17 in experimental ulcerative colitis rats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2015, 26: 735-738.
- 10 Zhu WY, Meng H. A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Tribulus terrestris* [J]. Chem Cen Jour (化学核心杂志), 2017, 11(1): 60.
- 11 Ana AI, Melhem MSC, Bonfietti LX, et al. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology [J]. Rev Ins Med Trop Sao Paulo, 2015, 57(S19): 57-64.
- 12 Bloch B. Zur Lehre von den Dermatomykosen [J]. Arch Dermatol Res, 1908, 93: 157-220.
- 13 Shimamura T, Kubota N, Shibuya K. Animal model of dermatophytosis [J]. J Biotechnol Biotechno, 2012, 1: 125384.