

凤仙花对于治疗灰指甲的药效研究

但大莉 钟李婷 刘娜 谭雯丽 乔靖宇

陕西服装工程学院, 陕西西咸新区, 712046;

摘要: 目的:探讨凤仙花醇提取物对灰指甲主要致病菌红色毛癣菌和白念珠菌的体外抑制作用及机制。方法:采用微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度和最低杀菌浓度, 绘制生长曲线, 检测碱性磷酸酶泄漏评价细胞壁通透性。结果:提取物对红色毛癣菌和白念珠菌的 MIC 分别为 31.25、62.5 mg/mL, MFC 分别为 62.5、125 mg/mL; 生长曲线呈浓度依赖性抑制; 药物使胞外碱性磷酸酶活性显著升高。结论:认为凤仙花提取物体外对灰指甲致病菌有显著抑制作用, 机制与破坏细胞壁完整性、增加通透性有关, 为其传统应用提供现代药理学依据。

关键词: 凤仙花; 治疗; 灰指甲; MIC 测定

DOI: 10.69979/3029-2808.26.03.014

引言

灰指甲(甲癣)作为皮肤科临床常见的真菌感染性疾病, 其致病菌主要为红色毛癣菌和白念珠菌等, 具有病程迁延、难以根治且易复发的临床特点^[1]。目前, 临床治疗主要采用口服或外用抗真菌药物, 但口服药物存在肝功能损伤等潜在风险, 而外用制剂因药物难以穿透坚硬甲板抵达病灶, 常导致疗程漫长且疗效欠佳, 因此, 开发高效低毒、渗透性良好的抗真菌新药成为该领域的研究热点。本研究拟通过体外抑菌实验, 系统考察凤仙花提取物对灰指甲主要致病菌的抑制作用, 探讨其可能的抗菌机制, 为凤仙花的临床合理应用提供科学依据。

1 灰指甲的临床现状与治疗困境

1.1 灰指甲的临床现状



图1 灰指甲症状

灰指甲, 医学上称为甲癣或甲真菌病, 是指由皮肤

癣菌、酵母菌和非皮肤癣菌性霉菌等致病真菌侵犯甲板或甲下组织所引起的一种常见感染性皮肤病, 具体症状见图1。据流行病学调查, 该病在人群中的发病率较高, 约占所有甲部疾病的50%, 且发病率随年龄增长呈上升趋势, 尤其在老年人群、糖尿病患者以及免疫功能低下者中更为普遍。从临床表现来看, 患者病甲常呈现浑浊、增厚、变色、翘起、表面凹凸不平等特征^[2-3], 严重者可导致甲板与甲床分离, 甚至全甲损毁, 可传染至身体其他部位或密切接触者。

1.2 灰指甲的治疗困境

目前, 灰指甲的临床治疗主要依赖药物治疗, 包括口服抗真菌药和外用抗真菌制剂两大类, 然而这两类疗法均存在明显的局限性, 使得临床治疗面临诸多困境。其中, 口服抗真菌药物如特比萘芬、伊曲康唑等, 虽然具有疗效确切、作用范围广的优点, 但其作用机制需经血液循环到达甲母质和甲床, 方可进入甲板发挥作用, 因此疗程通常较长, 一般需持续数周至数月, 此类药物需经肝脏代谢, 可能引起肝酶升高、肝损伤等不良反应, 甚至存在诱发药物性肝炎的风险。外用抗真菌药物虽然避免了口服药的全身性毒副作用, 但面临更为严峻的挑战: 甲板质地坚硬致密, 由多层角蛋白构成^[4], 具有天然的药物屏障功能, 常规的外用药液或膏剂难以有效穿透甲板到达甲下病灶区域, 导致生物利用度极低, 疗效不尽如人意。

2 传统中药凤仙花的药用价值

2.1 凤仙花



图2 凤仙花

凤仙花(*Impatiens balsamina* L.)俗称指甲花(图2),在我国各地广泛栽培,其花、茎、种子均可入药^[5]。古籍中早有凤仙花捣敷外用的记载,现代研究表明,凤仙花富含黄酮类、萘醌类等活性成分,其中指甲花醌及其甲醚被证实具有较强的抗菌活性。近年来,随着中药现代化研究的深入,凤仙花的药用价值重新受到关注,已有专利将凤仙花提取液与其他中药组方制成凝胶剂用于灰指甲的治疗,显示出良好的应用前景。

3 材料与方法

3.1 仪器与试剂

3.1.1 药物制备

研究所用凤仙花药材于2025年11月采集自陕西省咸阳市礼泉县某村,经本团队鉴定为凤仙花科植物凤仙花的干燥全草。将采集的凤仙花全草去除杂质,用蒸馏水快速冲洗干净后置于阴凉通风处自然阴干,随后置于60℃恒温干燥箱中烘干至恒重。粉碎后过40目筛。取粗粉100g,加10倍量70%乙醇加热回流提取2次,每次2小时。合并滤液,减压浓缩后干燥,得凤仙花醇提取物干膏。临用前以含10%DMSO的无菌水配制成1g/mL母液,过滤除菌,4℃保存备用,用于后续实验的梯度稀释。

3.1.2 菌株与试剂

研究所用菌株包括红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*,标准菌株编号ATCC 28188)和白念珠菌(*Candida albicans*,标准菌株编号ATCC 10231),均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。菌株接收后,按照说明书要求复苏,并转接至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基上,于28℃恒温培养箱中培养7—14天,待菌落生长良好后置于4℃冰箱保存,每月定期传代以保持菌株活性。实验所用主要试剂具体信息见表1。

表1 试剂信息

试剂/耗材名称	生产厂家	批号/货号
沙氏葡萄糖琼脂培养基	青岛海博生物技术有限公司	HB0253
RPMI 1640 培养基	赛默飞世尔科技公司	31800022
盐酸特比萘芬标准品	中国食品药品检定研究院	100563-202002
碱性磷酸酶测试盒	南京建成生物工程研究所	A059-2
0.22 μm 微孔滤膜	美国密理博公司	SLGP033RB

3.1.3 主要仪器

实验所用主要仪器包括用于无菌操作的SW-CJ-2D型双人单面净化工作台、用于恒温培养的SPX-250B型生化培养箱、用于菌液浓度测定的UV-1800型紫外可见分光光度计、用于液体震荡培养的THZ-98C型恒温振荡器、用于酶标分析的Multiskan FC型酶标仪、用于灭菌的YXQ-LS-50SII型立式压力蒸汽灭菌器,以及用于液体分离的TGL-16M型高速冷冻离心机等^[6]。

3.2 实验方法

3.2.1 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MFC)测定

采用临床实验室标准协会推荐的微量肉汤稀释法测定凤仙花提取物对两种供试菌的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度。实验前,将保存于4℃的红色毛癣菌和白念珠菌分别接种于沙氏葡萄糖琼脂斜面上,于28℃培养

箱中活化培养,红色毛癣菌培养7天,白念珠菌培养48小时。用无菌接种环刮取适量新鲜菌落,置于含无菌生理盐水的试管中,采用血球计数板计数,并用RPMI 1640培养基调整菌悬液浓度至 1×10^4 CFU/mL至 5×10^4 CFU/mL备用。

在无菌96孔板中,采用二倍稀释法将凤仙花提取物母液用RPMI 1640培养基稀释成10个浓度梯度,每孔加入100 μL药液,使药物终浓度范围分别为500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125、3.906、1.953、0.976 mg/mL(以生药量计)。

随后,向各孔加入100 μL配制好的菌悬液,使每孔总体积为200 μL。同时设置阳性对照组,加入等体积终浓度为1 μg/mL的特比萘芬溶液;阴性对照组,加入等体积无菌RPMI 1640培养基,不含药物但含菌液;空白对照组,仅含培养基,不含菌液。将96孔板置于28℃

恒温培养箱中培养,红色毛癣菌培养7天,白念珠菌培养48小时。以肉眼观察,将孔内完全澄清、无肉眼可见真菌生长的最低药物浓度判定为该提取物的最低抑菌浓度。

所有实验重复3次。从MIC测定中所有澄清孔的孔内吸取100 μ L培养液,均匀涂布于不含药物的沙氏葡萄糖琼脂平板上,置于28 $^{\circ}$ C培养箱中继续培养,红色毛癣菌培养7天,白念珠菌培养48小时。观察平板上是否有菌落生长,以无菌落生长的最低药物浓度判定为该提取物的最低杀菌浓度。

3.2.2 生长曲线测定

采用比浊法绘制凤仙花提取物作用下的真菌生长曲线,以动态观察药物对真菌生长的影响。将活化后的红色毛癣菌和白念珠菌分别用沙氏葡萄糖液体培养基制备成浓度为 1×10^5 CFU/mL的菌悬液。取无菌试管,每管加入4.5mL菌悬液。

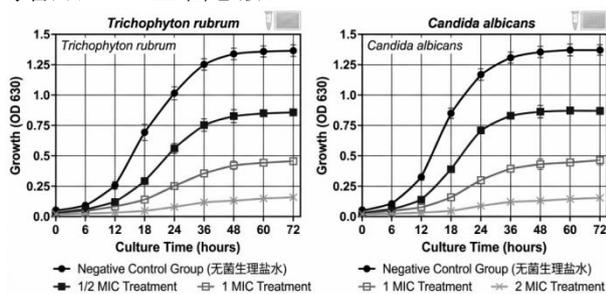


图3 不同药物浓度作用下供试菌的生长曲线数值变化

根据MIC测定结果,在实验组中加入0.5mL不同浓度的凤仙花提取物溶液,使药物终浓度分别设置为1/2 MIC、1 MIC和2 MIC。同时设置阴性对照组,加入0.5 mL无菌生理盐水。每组设3个复管。将所有试管置于28 $^{\circ}$ C恒温振荡培养箱中,以150 r/min的转速振荡培养。分别在培养的第0、6、12、18、24、36、48、60、72小时,从各管中吸取200 μ L菌液,转移至96孔板中,使用酶标仪在630nm波长处测定各孔的光密度值。以培养时间为横坐标,以测得的OD₆₃₀平均值为纵坐标,绘制不同药物浓度作用下供试菌的生长曲线(图3),观察药物对真菌生长周期的影响。

表2 凤仙花提取物对两种供试菌的MIC和MFC测定结果(n=3)

供试菌种	凤仙花提取物 MIC(mg/mL)	凤仙花提取物 MFC (mg/mL)	特比萘芬 MIC(μ g/mL)
红色毛癣菌	31.25	62.5	< 1
白念珠菌	62.5	125	< 1

3.3.2 对真菌生长曲线的影响

通过绘制生长曲线动态观察凤仙花提取物对真菌

3.2.3 细胞壁通透性检测

细胞壁通透性检测是通过测定胞外碱性磷酸酶的活性来评价凤仙花提取物对真菌细胞壁通透性的影响^[7],其原理是碱性磷酸酶存在于细胞壁与细胞膜之间,正常情况下无法透过细胞壁,当细胞壁完整性遭到破坏后,该酶会泄漏到培养液中。

测试中取活化后的红色毛癣菌和白念珠菌,用沙氏葡萄糖液体培养基制备成浓度为 1×10^6 CFU/mL的菌悬液。分别向无菌锥形瓶中加入50mL菌悬液,然后加入不同浓度的凤仙花提取物,使药物终浓度分别为1/2 MIC、1 MIC和2 MIC。同时,设置不加药物的阴性对照组和加入1 μ g/mL特比萘芬的阳性对照组。将锥形瓶置于28 $^{\circ}$ C恒温振荡培养箱中,以120 r/min振荡培养。分别于药物作用后的0、6、12、24小时,各吸取5mL培养液,置于离心管中,以4000 r/min离心10分钟,小心吸取上清液。按照碱性磷酸酶测试盒说明书步骤,在520nm波长处测定各样本上清液的吸光度值,并根据公式计算AKP活性,通过比较各时间点实验组与对照组AKP活性的差异,评价凤仙花提取物对真菌细胞壁的损伤作用。

3.3 结果

3.3.1 凤仙花提取物的MIC与MFC

体外抑菌实验结果显示,凤仙花醇提取物对红色毛癣菌和白念珠菌均表现出不同程度的抑制作用。通过微量肉汤稀释法观察,随着药物浓度的递减,孔内菌体生长逐渐明显。经肉眼判读,凤仙花提取物对红色毛癣菌的最低抑菌浓度为31.25 mg/mL,对白念珠菌的最低抑菌浓度为62.5 mg/mL。凤仙花提取物对红色毛癣菌的最低杀菌浓度为62.5 mg/mL,对白念珠菌的最低杀菌浓度为125 mg/mL。阳性对照药特比萘芬对各菌株的MIC均小于1 μ g/mL,表明本实验系统可靠,具体结果见表2。该结果表明,凤仙花提取物对灰指甲的主要致病菌具有明确的抑制作用,且对红色毛癣菌的抑制效果优于白念珠菌。

生长的影响。结果显示,在阴性对照组中,红色毛癣菌

和白念珠菌均呈现典型的生长趋势，即经过短暂的延滞期后，进入快速生长的对数期，随后进入生长平稳的平台期。与对照组相比，经不同浓度凤仙花提取物处理的菌液，其生长均受到不同程度的抑制。在 1/2 MIC 浓度作用下，两种真菌的生长速度明显减慢；在 1 MIC 浓度作用下，两种真菌的生长几乎被完全抑制，整个培养期间 OD 值无明显升高，曲线呈平坦直线状态。其作用机制可能不仅仅是抑制生长，在高浓度下还具有杀灭效果。

3.3.3 对真菌细胞壁通透性的影响

表 2 凤仙花提取物对红色毛癣菌胞外 AKP 活性的影响 (U/L, $\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	0 小时	6 小时	12 小时	24 小时
阴性对照组	1.23±0.15	1.34±0.21	1.41±0.18	1.52±0.25
1/2 MIC 组	1.20±0.12	2.15±0.32*	3.68±0.45*	5.21±0.61*
1 MIC 组	1.25±0.18	3.42±0.41*	6.13±0.58*	8.95±0.76*
2 MIC 组	1.21±0.14	5.16±0.53*	8.84±0.72*	12.37±1.04*
阳性对照组	1.22±0.11	4.05±0.38*	7.26±0.64*	10.58±0.91*

(注：*表示与同一时间点的阴性对照组比较，P<0.05。)

4 结论与讨论

本研究通过体外抑菌实验，考察了凤仙花醇提物对灰指甲主要致病菌红色毛癣菌和白念珠菌的抑制作用。实验结果表明，凤仙花提取物对两种供试菌均表现出明确的抑菌活性，其对红色毛癣菌的最低抑菌浓度为 31.25 mg/mL，最低杀菌浓度为 62.5 mg/mL；对白念珠菌的最低抑菌浓度为 62.5 mg/mL，最低杀菌浓度为 125 mg/mL。生长曲线测定进一步证实，凤仙花提取物对真菌的抑制作用呈现明显的浓度依赖性，在最低抑菌浓度作用下，真菌生长完全被抑制。值得注意的是，凤仙花对真菌细胞壁的作用机制与临床常用的唑类抗真菌药物存在明显差异。唑类药物主要通过抑制细胞色素 P450 依赖的 14 α -去甲基酶，阻断麦角固醇的生物合成，从而破坏真菌细胞膜的完整性和功能。

本研究结果进一步支持了这些民间疗法的合理性，提示现代制剂研发中可借鉴封包促渗原理，结合脂质体、微乳或透皮肤等新型给药技术，提高凤仙花有效成分的经甲板渗透效率，从而将这一传统中药转化为使用便捷、疗效确切的新型抗真菌外用制剂。

参考文献

[1] 张艳, 李华, 王芳. 凤仙花提取物对灰指甲主要致病

菌的抑制作用[J]. 生物化工, 2023, 9(5): 76-79.

[2] 刘晓明. 凤仙花的化学成分及生物活性研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2016.

[3] 姚越, 郭淑静, 李叶贤, 等. 激光疗法联合外用抗真菌药物治疗甲真菌病应用进展[J]. 中国真菌学杂志, 2024, 19(6): 633-637.

[4] 赵秘密, 黄梦雅, 周汛. 伊曲康唑联合特比萘芬序贯疗法治疗甲真菌病有效性和安全性的 Meta 分析[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(7): 983-986.

[5] 王德明. 治疗灰指甲验方[J]. 江西中医药, 1982, (1): 46.

[6] 杨雪, 王敏. 凤仙花化学成分及药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(5): 320-324.

[7] 李媛, 张强, 刘伟, 等. 透甲递送系统用于甲真菌病治疗的研究[J]. 控释杂志, 2025, 379: 114029.

[8] 陈丽, 王晓红. 凤仙透骨草不同萃取部位体外抗真菌作用研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 456-458.

根据细胞壁通透性检测结果，凤仙花提取物可显著增加真菌胞外碱性磷酸酶的活性^[8]，且呈现时间依赖性和浓度依赖性。以红色毛癣菌为例，在药物作用 6 小时后，1 MIC 和 2 MIC 处理组上清液中的 AKP 活性即开始显著高于阴性对照组 (P<0.05)。随着作用时间延长至 12 小时和 24 小时，各给药组 AKP 活性持续升高，而阴性对照组各时间点的 AKP 活性始终维持在较低水平，具体数据见表 2。

作者简介：但大莉，女，陕西商洛人，大学本科在读，研究方向为制药工程。

基金课题：2025-2026 年度陕西服装工程学院创新训练计划项目“凤仙花对于治疗灰指甲的药效研究”（编号：202504003X）