

· 中药抗菌抗病毒研究 ·

扶正透邪方体外干预多重耐药铜绿假单胞菌研究

孔令博 刘清泉 吴璐 高洁 彭爱东

【摘要】 目的 探讨扶正透邪方提取物及其组分和含药血清对多重耐药铜绿假单胞菌的体外抑制作用。方法 运用二倍稀释法检测扶正透邪方提取物、提取物纯化组分(粗多糖、精多糖、皂苷、酚酸+香豆素、黄酮+蒽醌)及给予大鼠 1/2 等效剂量、等效剂量、2 倍等效剂量、8 倍等效剂量提取物灌胃后所得含药血清的体外抑菌情况。结果 扶正透邪方提取物、提取物纯化组分中的皂苷具有较好的体外杀菌作用,其余组分在此次实验所用浓度下没有抑菌作用;给予大鼠 2 倍等效剂量和 8 倍等效剂量扶正透邪方提取物灌胃后所得的含药血清具有较好的体外抑菌作用。结论 扶正透邪方提取物及其部分组分和含药血清具有体外抑菌作用,并能影响多重耐药铜绿假单胞菌的耐药性,为其干预多重耐药铜绿假单胞菌的进一步研究提供了实验依据。

【关键词】 扶正透邪方; 含药血清; 多重耐药铜绿假单胞菌; 体外抑菌

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.02.001

Study on the bacteriostasis of multidrug resistant pseudomonas aeruginosa by Fuzhen Touxie Decoction in vitro KONG Ling-bo, LIU Qing-quan, WU Jun, et al. Emergency Department, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: LIU Qing-quan, E-mail: liuqingquan_2003@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the bacteriostasis of multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa by Fuzheng Touxie Decoction, Component and Decoction-containing serum in vitro. **Methods** The antibacterial situation in vitro of Fuzheng Touxie Decoction, Component and different concentration of Decoction-containing serum by double dilution. **Results** Fuzheng Touxie Decoction, saponins component and high concentration of Decoction-containing serum had significant effect of bacteriostasis on PA, others had no effect of bacteriostasis and cooperation with antibiotics on multidrug resistant PA, there had obvious differences among them. **Conclusions** The bacteriostasis of Fuzheng Touxie Decoction, Component and Decoction-containing serum and the effect on reducing content of antibiotics MIC and MBC had provided experiment evidences on the further research.

【Key words】 Fuzheng Touxie Decoction; Fuzheng Touxie Decoction-containing serum; Multidrug resistant pseudomonas aeruginosa; Bacteriostasis in vitro

“超级细菌”的出现,再次引发全球对耐药菌的恐慌,敲响了抗菌素时代的警钟。现代药理学研究

表明中药抑菌成分较多,可作用于细菌的不同部位和繁殖的不同阶段,并对细菌的多个代谢环节发挥作用,故不易产生耐药性^[1]。近年来的研究证实中医药在细菌耐药方面极具良好的应用前景,但也存在一些问题,如选择的中药大多以清热解毒类为主,缺乏对中药不同组分药效和机制的研究等^[2]。有鉴于此,本研究以扶正透邪方(黄芪、当归、金银花、青蒿、虎杖)为对象,对全方提取物及其各组分和含药血清进行体外抑菌实验,具体如下。

基金项目:国家“十一五”科技重大专项(2009ZX09103-415)

作者单位:100700 北京中医药大学东直门医院急诊科(孔令博、刘清泉、高洁);北京中医药大学中医药防治病毒性疾病教育部重点实验室(吴璐);北京信息职业技术学院(彭爱东)

作者简介:孔令博(1984-),在站博士后,从事中西医结合治疗危重病研究。E-mail:klb_1984@163.com

通讯作者:刘清泉(1965-),主任医师,硕士生导师,从事中西医结合治疗危重病研究。E-mail:liuqingquan_2003@yahoo.com.cn

文献标引格式:

孔令博,刘清泉,吴璐,等.扶正透邪方体外干预多重耐药铜绿假单胞菌研究[J].环球中医药,2012,5(2):81-84.

1 材料与方法

1.1 药物

扶正透邪方提取物(2.0 g/ml)、提取物纯化组分(粗多糖、精多糖、皂苷、酚酸+香豆素、黄酮+蒽醌),由北京中医药大学中药学院中药研究室提供。(pH 试纸检测各组分的 pH 值)

1.2 动物

SD 大鼠 30 只,雌雄各半,清洁级,体重 200 ~ 220 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号 SCXK-(军)2007-004。正常光照条件下,食、水可自由摄取,室温控制在 18 ~ 22℃。

1.3 菌株

多重耐药铜绿假单胞菌临床分离株 1643 号,由首都医科大学附属北京朝阳医院细菌室提供。

1.4 试剂与设备

M-H 肉汤培养基,一次性无菌 24 孔板,加样器,立式自动电热压力蒸汽灭菌器 (ATELL AMA440N),恒温培养箱 (SAMYO SIM-F124),低温高速离心机 (Kendro Labofuge 400R),微量天平 (METTLER AE100),一次性针式滤器 (PALL Corporation 0.2 μm Supor)。

1.5 扶正透邪方提取物和各纯化组分抑菌试验

在 24 孔板中加入 M-H 肉汤培养基 1 ml,第一个孔再分别加入扶正透邪方提取物和经滤器过滤的各组分 1 ml,采用二倍稀释法将各孔依次对倍稀释,最终每个反应体系均为 1 ml,再将含液体培养基的菌液(5×10⁷ CFU/ml)取 10 μl 加入各孔中,37℃,孵育 18 ~ 24 小时。观察各组浑浊情况,记录最小抑菌浓度(MIC 值)。

1.6 用通法^[3]制备含药血清

将 SD 大鼠随机分为空白组、扶正透邪方提取物 1/2 等效剂量组、等效剂量组、2 倍等效剂量组、8 倍等效剂量组(人体按 70 kg 算,则 200 g 大鼠的等效剂量为人的 0.018 倍,并根据等效剂量将扶正透邪方提取物分别稀释至所需要的浓度),每组 6 只,雌雄各半,空白组予蒸馏水灌胃,每日两次,每次 4 ml,其余各组分别予相应浓度的扶正透邪方提取物灌胃,每日两次,每次 4 ml,共 5 天,末次给药后 1 小时,将各组大鼠予 10% 水合氯醛溶液,按 0.4 ml/100 g,腹腔注射麻醉后,腹主动脉采血,4℃ 离心,2 500 转/分,20 分钟,无菌分离血清,将各组 6 只大鼠血清混合后,56 ~ 60℃ 水浴 30 分钟,进行

灭活。

1.7 含药血清抑菌试验

在 24 孔板中分别依次加入 0.8、0.4、0.3、0.2、0.1 ml 的空白血清、1/2 等效剂量含药血清、等效剂量含药血清、2 倍等效剂量含药血清和 8 倍等效剂量含药血清,然后用 M-H 肉汤培养基将各孔补至 1 ml,再将含液体培养基的菌液(5×10⁷ CFU/ml)取 10 μl 加入各孔中,37℃,孵育 18 ~ 24 小时。观察各组浑浊情况。

1.8 菌种鉴定及药物敏感试验

分别将各组菌株转种至含有 M-H 琼脂培养基的培养皿上,37℃,孵育 18 ~ 24 小时。进行菌种鉴定并做药物敏感试验,由东直门医院细菌室进行。

2 结果

2.1 扶正透邪方提取物和各纯化组分抑菌试验结果

扶正透邪方提取物、皂苷具有较好的体外杀菌作用;粗多糖、精多糖、酚酸+香豆素、黄酮+蒽醌均无明显的体外抑菌作用。见表 1。

表 1 扶正透邪方提取物及各纯化组分对多重耐药铜绿假单胞菌的 MIC 值

药物	提取物	粗多糖	精多糖	皂苷	酚酸+香豆素	黄酮+蒽醌
MIC 值 (g/ml)	0.55	-	-	0.067	-	-

注:“-”表示无抑菌作用。

2.2 含药血清抑菌效果

给予大鼠 2 倍和 8 倍等效剂量扶正透邪方提取物灌胃后采血分离的含药血清在血清含量占反应体系 80% 和 40% 时具有较好的体外抑菌作用,而给予大鼠 1/2 等效剂量和等效剂量扶正透邪方提取物灌胃后采血分离的含药血清在实验所选各含量下均无明显的体外抑菌作用。见表 2。

表 2 不同浓度含药血清对多重耐药铜绿假单胞菌的抑菌作用

血清种类	血清含量				
	80%	40%	30%	20%	10%
空白血清	+++	+++	++++	++++	++++
1/2 等效剂量含药血清	++	+++	++++	++++	++++
等效剂量含药血清	++	+++	++++	++++	++++
2 倍等效剂量含药血清	-	-	++++	++++	++++
8 倍等效剂量含药血清	-	-	+++	++++	++++

注:“+”为浑浊、有菌落生长,程度依次增加,阳性对照为“+++”;“-”为澄清、无菌落生长。

2.3 转种后菌种鉴定与药物敏感试验结果

经东直门医院细菌室菌种鉴定, 各组均为铜绿假单胞菌; 药敏结果显示, 扶正透邪方提取物、皂苷和含药血清菌液转种后的铜绿假单胞菌对头孢哌酮舒巴坦钠耐药性为中介, MIC 值为 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 对其他抗生素耐药。粗多糖、精多糖、酚酸+香豆素、黄酮+蒽醌和空白血清菌液转种后的铜绿假单胞菌与实验菌株的药敏结果一致, 对抗生素的敏感性未发生变化。

3 讨论

众所周知, 抗菌素对病原微生物具有强大的杀灭和抑制作用, 但它同时也是细菌耐药性日益增强的罪魁祸首。新型抗菌素的研发总是滞后于耐药菌的增加, 也同样存在诱导出新的耐药菌株的可能。因此, 针对日益严重的多重耐药铜绿假单胞菌感染和多重耐药性产生的复杂机制, 目前现代医学尚缺乏有效的应对措施。

近年来的一些研究进一步表明中医药在耐药菌感染方面存在着巨大的潜力, 如杨钧等^[4]研究发现具有清热解毒通腑泄热功效的中药复方清热颗粒剂能通过降低血浆内毒素水平的作用, 控制和调节某些炎性介质的产生, 增强感染动物的非特异性免疫功能, 从而提高机体自身清除内毒素能力与直接拮抗内毒素毒力的能力, 全面调动机体的抗感染能力。肖洋等^[5]研究结果表明五倍子提取液对铜绿假单胞菌 R 质粒具有较好的消除作用。杨秀捷等^[6]认为耐药铜绿假单胞菌感染者的中医证候以虚实夹杂证及实证为主 (共占 97.26%), 而其中虚实夹杂证以气虚痰阻证、阴虚热郁证为主, 实证以痰热郁阻证、痰瘀互阻证为主。王禹等^[7]研究发现耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 经五倍子、绿茶、防风、丹皮、黄芩、浙贝母含药血清处理后能够恢复对耐酶 β -内酰胺类抗生素的敏感性。结合目前有关耐药菌的中医基础和临床研究, 本课题组认为耐药菌感染属于院内感染, 主要易感人群为免疫功能低下者如老年人、新生儿、使用免疫抑制剂患者等, 这一群体中医体质辨为“正虚”“阴阳失衡”“气血不足”等, 并且临床上细菌出现变异、耐药主要是通过抗菌素的筛选, 在适宜的条件下大量繁殖而发病。这与中医伏邪致病正虚邪伏、伺机而作、待时而发的特点十分相似。因此, 本实验中的扶正透邪方针对正虚邪伏这一耐药菌感染的中医病机,

以扶正透邪为组方原则, 在清热透邪的基础上重视益气养血。本实验运用“通法”^[3]制备含药血清, 通过灭活消除血清中补体等的影响因素。经 pH 试纸检测各组分 pH 值除外物理杀菌、抑菌作用。结果表明扶正透邪方提取物、皂苷具有较好的体外杀菌作用; 给予大鼠 2 倍等效剂量和 8 倍等效剂量扶正透邪方提取物灌胃后采血分离的含药血清具有较好的体外抑菌作用, 为其治疗多重耐药菌感染提供实验依据。提取物的其余组分没有明显的体外抑菌作用证实并不是扶正透邪方提取的各个组分都有抑菌作用, 但其余组分是否能够在体内发挥其整体调节作用以及是否可以提高方中具有抑菌作用组分的含量以达到更好的抑菌效果值得进一步研究。1/2 等效剂量和等效剂量扶正透邪方提取物灌胃后得到的含药血清无体外抑菌作用表明中药也需要达到一定剂量才能发挥疗效, 但并非给药剂量越大含药血清的抑菌作用越好。

值得注意的是, 药敏结果显示扶正透邪方提取物组、皂苷组分和含药血清组转种后的铜绿假单胞菌对头孢哌酮舒巴坦钠耐药性为由耐药转为中介, MIC 值为 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 与王禹等研究结果相似, 提示扶正透邪方提取物、皂苷组分和含药血清可能能够逆转耐药菌的耐药性, 使其对原本耐药的抗菌素重新恢复敏感, 从而解决细菌耐药这一棘手难题, 但扶正透邪方、方中的皂苷组分和含药血清究竟通过何种机制逆转细菌耐药尚不明确, 根据本实验的结果, 仅对头孢哌酮舒巴坦钠的耐药性有改变, 考虑干预纯化酶的可能性较大, 但不除外皂苷组分和含药血清可能对耐药菌的耐药性存在多途径、多环节、多靶点的干预作用, 可以进一步深入研究。同时, 体外抑菌实验只是在一定程度上提示了药物具有抑菌作用, 关键是体内实验进一步研究扶正透邪方的药效和作用机制, 为临床应用提供更可靠的依据。

总之, 中医药能够在整体观念、辨证施治的思维方法指导下, 以扶正祛邪、调和阴阳为大法, 处方用药或祛邪、或扶正、或扶正祛邪、或攻补兼施, 不仅辨病辨证, 更辨患病的人, 不仅强调对抗病原菌, 更注重保护机体脏器组织, 从而达到“阴平阳秘”、“人菌并治”, 为阻止多重耐药菌感染的传播流行、降低其发病率和病死率提供新的手段和措施, 值得进一步挖掘。

参 考 文 献

[1] 刘莎, 符州. 黄芪的免疫调节作用及临床应用[J]. 国际中医中

- 药杂志,2006,28(4):203.
- [2] 蒋培余. 中药抑制剂逆转细菌耐药性的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(10):53-55.
- [3] 王洪武,倪青,林兰. 中药含药血清的研究进展及其在中医学中的应用[J]. 北京中医药,2008,27(9):698-699.
- [4] 杨钧,张淑文,阴赫宏,等. 中药复方清热颗粒剂抗急性耐药菌感染的药效作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(10):61.
- [5] 肖洋,黄红兰,华芳. 五倍子对铜绿假单胞菌 R 质粒消除作用的研究[J]. 微生物学杂志,2003,23(2):55-56.
- [6] 杨秀捷,张晨,齐文升,等. 重症监护病房铜绿假单胞菌耐药性分析及其中医证候特点[J]. 中华中医药杂志,2007,22(11):808-811.
- [7] 王禹,于清宏,吴齐雁,等. 中药含药血清对 MRSA β -内酰胺类抗生素耐药性的逆转作用[J]. 医学信息,2011,24(7):3519-3520.
- (收稿日期:2011-11-21)
(本文编辑:刘群)

岗梅根水提物在小鼠体内抗 H9N2 亚型禽流感病毒实验研究

李耿 汪天呈 姚海燕 陈建新 吴依娜 林吉 赖小平

【摘要】 目的 观察岗梅根水提物对滴鼻感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠的保护作用。方法 以磷酸奥司他韦为阳性药,通过 H9N2 亚型禽流感病毒滴鼻感染小鼠,分别建立小鼠病毒性肺炎动物模型和病毒感染致小鼠死亡的动物模型,观察小鼠肺部病变和死亡情况,以肺指数及小鼠死亡率作为观测指标,评价岗梅根水提物对感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠的保护效果。结果 岗梅根水提物中、低剂量组可显著降低禽流感病毒感染小鼠的肺指数($P<0.01$);降低禽流感病毒感染小鼠死亡率,延长其存活时间($P<0.01$)。结论 岗梅根水提物对滴鼻感染 H9N2 亚型禽流感病毒小鼠具有良好的保护作用。

【关键词】 岗梅根水提物; 小鼠; H9N2 亚型禽流感病毒; 体内; 肺指数; 死亡保护率
【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.02.002

Experimental study of anti-influenza virus H9N2 effects of the water extract of *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* in vivo LI Geng, WANG Tian-cheng, YAO Hai-yan, et al. Herbal Medicine Research College in Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China
Corresponding author: LAI Xiao-ping, E-mail: lxp88@gzhtcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the inhibitory effects of the water extract of *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* on aiv influenza virus H9N2 in vivo. **Methods** The model mice were infected by nasal dripping of H9N2 subtype avian influenza virus. Oseltamivir was selected as the positive control. The inhibitory effects of *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* on influenza viral pneumonia were observed. The lung index and mortality rate were selected as indicators of protective effect. **Results** Compared with the viral control group, low-dose and middle-dose water extract of *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* can obviously ease lung inflammation of mice infected by aiv influenza virus H9N2, reduce the lung index, decrease the mortality rate of the mice infected by H9N2 subtype avian influenza virus, and extend the survival time. **Conclusion** *Radix et Caulis Ilicis Asprellae* has strong inhibitory effects on aiv influenza virus H9N2.

【Key words】 The water extract of *Radix et Caulis Ilicis Asprellae*; Mice; H9N2 subtype avian influenza virus; In vivo; Lung index; Death-protection rate

基金项目:国家自然科学基金(U0732004)

作者单位:510405 广州中医药大学中药学院

作者简介:李耿(1983-),博士,讲师。研究方向:教学及抗病毒研究。E-mail:lg@gzhtcm.edu.cn

通讯作者:赖小平(1960-),研究员,博士生导师。研究方向:中药新药研究与开发。E-mail:lxp88@gzhtcm.edu.cn

文献标引格式:

孔令博,刘清泉,吴珺,等. 扶正透邪方体外干预多重耐药铜绿假单胞菌研究[J]. 环球中医药,2012,5(2):81-84.