

中药对细菌抑菌作用的体外实验方法学研究

陶庆春

作者单位:100029 北京市,北京中医药大学第三附属医院检验科

当今社会科技飞速发展,医疗手段和药物层出不穷。自青霉素发明以来感染性疾病得到了较好的控制,但是如今抗生素的不规范使用,致使多重耐药细菌出现。虽然抗生素在不断地更新换代,但还是不能完全控制由耐药性细菌所致的疾病。再者新一代抗生素价格昂贵,增加了患者的经济负担。中药在控制耐药性细菌感染方面具有其独特的优势,中药价格较低,毒副作用小,且很少有耐药现象出现。

中药对细菌抑菌作用的体外实验方法有很多,现将几种主要方法列举如下。

1 中药煎剂直接体外抑菌法

这种方法应用最普遍,用此方法进行研究的药物也最多,主要有:中型滇丁香浸膏、竹板、黄连、黄芩、连翘、射干、防风、黄柏、败酱草、鱼腥草、大黄、千里光、诃子、丹皮、白芍、九节茶、夏枯草、厚朴、大青叶、蒲公英、金银花、连翘、地丁、瓜蒌、龙胆草、蚤休、栀子、板蓝根、知母、秦艽、四季青、马齿苋、生晒参、生葱、蒜、白薇、紫草、山豆根、苦参、芙蓉叶等。

直接体外抑菌法研究过的耐药性细菌(主要来源于临床)有:肺炎链球菌,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、凝固酶阴性葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌等。

1.1 稀释法

1.1.1 肉汤稀释法

1.1.1.1 常量稀释法 取无菌管 12 支,每管加入水解酪蛋白肉汤 2 ml。在第 1 管中加入药物 2 ml 混匀,连续倍比稀释至第 11 管,并从第 11 管中吸取 2 ml 弃去,第 12 管为不含药物的生长对照。在每管内加入制备好的接种物各 100 μ l,使得每管最终菌液浓度为 5×10^5 CFU/mL,注意稀释菌液于 15 min 内完成。当生长对照管生长状况良好,同时确定接种物未被污染后,肉眼观察药物最低浓度无细菌生长者,即为受试菌的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)^[1]。若需要测定最小杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC)则把无菌生长的试管中吸取 0.1 ml 加到冷却至 50 $^{\circ}$ C 的 MH 琼脂混合倾注平板,将前述稀释的原接种液倒在平板上,培养 48-72 h 后计数菌落,即可得到抗菌药物的 MBC。

李建志等^[2]采用常量稀释法研究 7 种中草药对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)、肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌等 13 种菌株的抑菌作用,结果表明 7 种中药对各菌株生长均有不同程度的抑制作用。

1.1.1.2 微量稀释法 方法同常量稀释法,先将药物作稀释,再配制 0.5 麦氏浓度菌液,用蒸馏水或生理盐水稀释菌液,使得最终菌液浓度为 5×10^7 CFU/mL,每孔含 0.1 ml。35 $^{\circ}$ C 培养 18 h 后借助比浊计判别是否有细菌生长。若需要测定 MBC,方法同常量稀释法。

尹洪萍等^[3]将 10 种中药药液用 Luria-Bertani (LB) 液体培养基做对倍连续稀释成系列浓度,用微量加样器依次在微孔板各孔内加入稀释药液和菌液各 80 μ l,设不加药对照。震荡混匀,置于 5%~8% CO₂ 孵箱,35 $^{\circ}$ C 培养 18 h 后,借助比浊计判别是否有细菌生长。分别从每孔取两接种环接种在 MH 琼脂平板,依前法再次孵育 18 h 后观察是否有细菌生长,记录各中药的 MIC,并计算 MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 的药物浓度,从而观察各种中药对耐药性肺炎链球菌的抑菌作用。彭青等^[4]用微量稀释法研究 6 种中药单体对 MRSA 的抗菌作用。结果表明 6 种中药单体对 MRSA 有不同程度的抑制作用,其中大黄酸抑菌作用最强。

1.1.2 琼脂稀释法 琼脂稀释法是将药物混匀于琼脂培养基中,配制含不同浓度的药物平板,使用多点接种器接种细菌,经孵育后观察细菌生长情况,以抑制细菌生长的琼脂平板所含药物浓度测得 MIC。

药液稀释: 排列无菌试管 10 支,于 2-10 支管中加无菌蒸馏水 10 ml,取中药提取物 20 ml,于第 1 管中加入 10 ml,第 2 管中加入 10 ml。于第 2 管混合后取出 10 ml,加入第 3 管,再混合后取 10 ml 加入第 4 管,如此连续稀释至第 9 管取出 10 ml 弃掉,第 10 管的无菌蒸馏水作对照。

含药平板制备: 将已溶化的无菌 MH 琼脂 900 ml,分装于 10 瓶,每瓶 90 ml,将第 1 管中 10 ml 药物倒入含 90 ml 培养基的瓶中,混匀后倾注平板。第 2 管及以后的平板制备同第 1 管,凝固后备用,整个制备过程均为无菌操作。经过称重、计算出每组每 ml 培养基中提取物的干重量。

中药抑菌试验:将 0.5 麦氏浓度菌液稀释 10 倍,用多点接种仪分别取菌液点种于含不同药物浓度的琼脂平板上,于 35℃ 培养 18-24 h,观察 MIC,并统计出 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 的药物浓度和累积抑菌百分率^[9]。

田健等^[6]用琼脂稀释法研究黄柏等几种中草药对葡萄球菌的体外抗菌作用,研究表明黄柏等几种中药对 SA 和表皮葡萄球菌均有很好的抑菌作用,而且黄柏、地榆、紫草 3 种药物以一定比例混合后同样具有很好的抑菌效果。李仲兴等^[7]同样用此方法研究连翘对 SA 及表皮葡萄球菌的体外抗菌活性,发现有较好的体外抗菌效果。

连续稀释法测出的抗菌效力比扩散法强,原因可能是与中药成分在琼脂中的渗透性较好有关。琼脂扩散法的优点是可以在同一个平板上同时做多个菌株的 MIC 测定,结果可靠,易发现污染菌。缺点是费时费力,中药浓度不好控制。对革兰阴性菌而言,微量肉汤稀释法测得的 MIC 与常量肉汤稀释法测得的结果相同或低一个稀释度(1 孔或 2 倍)。但这两种方法易受培养基成分和 PH 值、接种菌浓度、孵育时间和温度、终点判读的误差等影响。

1.2 改良稀释法 由于中草药为天然药物,相对于抗生素来说用量大,药性弱,而且自身有浓度和色度,这就使稀释法在结果观察上需要观察浓度及管底或孔底的细菌沉积,需要借助其他手段进行终点判读。

赵晓丹等^[8]研究借助比色法来测定抑菌活性,即除了实验组外,另取一稀释系列,不接种任何细菌作为空白对照。将培养后的培养物与空白对照用分光光度计进行比色,以相同浓度下两者浊度完全相同为准,即培养基中完全没有细菌生长的最低浓度为 MIC。

1.3 扩散法

1.3.1 挖孔法 实验用细菌在 LB 液体培养基中培养 18 h,取少量菌液经稀释后取 0.1 ml 涂布于普通琼脂培养基上,待琼脂表面稍干后用打孔器挖出直径约 6 mm 的孔,两孔间距约 20 mm,然后将 0.05 ml 中药提取物加于琼脂孔内,并在相邻孔内加入一定量用于检测药物敏感性的抗生素(浓度及用量参照药敏试验方法),培养 18 h 后观察。中药孔及抗生素孔周围细菌生长,但两孔间出现细菌不生长的区域,视为抑制剂有效;两孔周围及孔间细菌均匀生长成片状,视为中药提取物对细菌耐药性无抑制作用^[9]。

李洪涛等^[10]曾用琼脂平板打孔法研究 16 种中西药及复方制剂对奶牛子宫内膜炎主要致病菌的体外抑菌作用,结果发现黄连、黄芩、大黄的抑菌效果较好,一组中西药复方抑菌效果明显。

1.3.2 药敏纸片法 中药纸片的制备方法为取优质滤纸若干张,用打孔器制备纸片,高压灭菌后,取上述纸片放入无菌玻璃平皿内,每片加中药 30 ul,置 37℃ 温箱内温干备用。用

已温干的中药纸片代替抗生素纸片,其他操作按 K-B 法^[11]进行,即用无菌棉拭子蘸取 0.5 麦氏浓度菌液,在管内壁将多余的菌液旋转挤去后,在琼脂表面均匀涂抹接种 3 次,每次旋转平板 60°,最后沿平板内缘涂抹一周。将平板在室温下干燥 3-5 min,用纸片分配器或无菌镊子将含药纸片紧贴于琼脂表面,各纸片中心相距 > 24 mm,纸片距平板内缘 > 15 mm,置 35℃ 温箱孵育 16-18 h 后读取结果。

钱红等^[12]采用 K-B 法进行中药方剂 Bingdeling 联合青霉素以及内酰胺类抗生素(阿莫西林)、氨基糖苷类抗生素(庆大霉素)、大环内酯类抗生素(罗红霉素)等抗菌药体外对 SA 的药敏试验。结果表明,体外 Bingdeling 联合青霉素、阿莫西林、庆大霉素、罗红霉素应用,对 SA 有协同增强抗菌作用。

1.3.3 杯碟法 又称小杯法或平皿法,由牛津大学 Abraham 首创。小杯内的药物在接种有细菌的平皿培养基中扩散,使杯子周围产生抑制细菌生长的抑菌圈,其大小与药物作用大小成正比。内径 90 mm 的平板,注入高压灭菌后水浴平衡至 50℃ 的水解酪蛋白琼脂 20 ml 作为底层并使其凝固,另取适量培养基,加入适量的菌悬液混匀,每平皿 5 ml 作为均层。注供试菌的双层琼脂平板上,按间隔一致的距离置小钢管即牛津小杯,定量加入药液。

张钟允等^[13]用此方法研究中药安福雷组方颗粒剂对奶牛乳房炎主要致病菌的体外抑菌作用,其中 SA 和表皮葡萄球菌对安福雷颗粒剂极敏,停乳链球菌对其高敏,大肠杆菌对其中敏,结果表明安福雷组方颗粒剂对奶牛乳房炎有较好的体外抑菌效果。

以上 3 种扩散方法中,K-B 法所得抑菌圈较规则,易测量,但纸片的质量、含量和保存方式等对结果都有影响。杯碟法要求操作精准,若有滑动则所得抑菌圈不规则。打孔法则弥补了杯碟法的缺点。

1.4 菌落计数法 将不同浓度的药物与菌液混合作用一定时间后,与生长对照分别均匀倒在 MH 培养基上,35℃ 培养 24 h,观察细菌生长状况,分别计数菌落数,按下列公式计算抑菌率:抑菌率(%)=(对照皿菌落数-实验皿菌落数)/对照皿菌落数×100%^[14]。也可以通过菌落计数和测定吸光度值,做出吸光度-菌数标准曲线。以样品液测得吸光度值(A)查找对应的菌数,通过添加中药和不加中药的菌液浓度变化可以得到该样品液体的抑菌效果,抑菌率表示如下:抑菌率(%)=(对照菌浓度-含药菌浓度)/对照菌浓度×100%^[15]。

钱红等^[12]用菌落形成计数方法,观察 Bingdeling 对临床常见 4 种细菌:SA、大肠埃希菌、沙门菌、铜绿假单胞菌的体外抑菌作用,结果发现中药方剂 Bingdeling 体外对 SA 的生长具有非常明显的抑制作用。

2 含药血清体外抑菌法

含药血清制备为实验动物 Wistar 大鼠,中药灌胃 3 d,末

次给药后 1 h, 颈动脉无菌手法采血, 离心并将分离的含药血清混合, 56 °C, 30 min 灭活, -60 °C 保存备用。同上法以 0.9% NaCl 注射液, 双黄连口服液灌胃, 制备阴性对照和阳性对照血清。采用 MH 肉汤培养基对含药血清进行梯度稀释。

菌液制备: 将受试菌接种于血琼脂平皿, 37 °C, 孵育 18-24 h, 次日, 取菌苔适量于 MH 肉汤中, 37 °C, 6-8 h 孵育后, 以适量生理盐水调整菌液浓度至 1×10^8 CFU/mL ~ 2×10^8 CFU/mL (0.5 麦氏单位) 备用。

体外抑菌试验: 将受试菌以生理盐水调整菌液浓度至 10^7 CFU/mL, 取 50 μ l 加入含药血清 1 ml 中, 使试验体系中细菌终浓度为 5×10^5 CFU/mL, 37 °C, 孵育 18-24 h, 观察出现澄清试管 (即受试菌未生长, 含药血清有抑菌作用) 为 MIC^[6]。

3 噻唑蓝 (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MIT) 比色法

MIT 比色法原理: 四甲基偶氮唑盐分子结构中的四氮唑环可在活细胞线粒体的琥珀酸脱氢酶的催化下断裂, 形成难溶解的蓝紫色结晶物甲瓩, 沉积于细胞内或细胞周围, 在一定细胞浓度范围内, 其生长量与活细胞数量及细胞活性状态呈正比关系。用异丙醇或二甲亚砜等有机溶剂溶解甲瓩, 该溶液在 570 nm^[7] 波长下的 A 可直接反映活细胞数量。抑菌率 = $(1 - \text{测定孔 A} / \text{阳性对照孔 A}) \times 100\%$, 以开始出现微浑的孔 (即阳性对照孔被抑制达 80% 以上的孔) 的药物质量浓度作为 MIC。使用时需要建立待测菌种的直接数据与菌体浓度之间的标准曲线或回归关系。使用的关键在于待测菌液的浓度必须调试到合适的范围。不同的细菌其脱氢酶活性不同, 实验条件如温度、反应时间、MIT 浓度等也不同。另外 MIT 极易被氧化, 易受实验条件中混入的各种氧化剂的干扰。

4 营养物质消耗法

细菌的生长繁殖需要营养, 可以通过营养物质的消耗来测定细菌的生长状况。例如细菌被抗菌药物抑制时, 摄取营养 (如葡萄糖) 的能力下降, 培养基中剩余葡萄糖浓度高的原理制备测试组和对照组, 对照组细菌生长摄取葡萄糖多, 培养基中剩余的葡萄糖则少。通过比较各药物浓度组葡萄糖的量, 求得 MIC 值。可以用葡萄糖氧化酶法准确测定葡萄糖消耗量^[8,9], 或者用 3,5-二硝基水杨酸比色法定量剩余葡萄糖, 该法具有较高的准确性和重复性。

另外也可以通过培养基中蛋白质的消耗, 测定其量的变化来判断细菌的生长状况。可以采用凯氏定氮法测定蛋白质的量, 可满足快速试验的要求, 但操作较繁琐。也可采用考马斯亮蓝 G250 染色法^[20]。

体外试验为新药的开发研究提供了有价值的信息, 具有简便、快速、经济、重复性好的特点。但由于中药的特性使得中药的体外试验尚不规范, 传统的中药抑菌试验存在很多问题, 今后我们应该在量化、标准化方面多下功夫。此外, 中药的成分复杂, 在体内的作用机理也相对复杂, 因此, 在研究中

药的抑菌机制方面还有待于进一步的探索。只有加强对药物的药代动力学及作用机制上的研究, 才能全面的阐述中药的抑菌作用。

5 参考文献

- 白雪, 林展, 李药兰, 等. 水杨梅和水团花提取物体外抑菌活性的实验研究. 中草药, 2008, 39: 1532-1535.
- 李建志, 杨丽珍, 刘文丽, 等. 7 种中草药抗菌作用实验研究. 黑龙江医药, 2010, 23: 107-108.
- 尹洪萍, 袁红, 华春珍, 等. 10 种中药对耐药性肺炎链球菌的抑制作用. 医药导报, 2003, 22: 483-484.
- 彭青, 侯冰, 华德兴, 等. 6 种中药单体对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌作用. 中国热带医学, 2010, 10: 665-666.
- 宋振民, 梁水广, 赵秀杰. 穿心莲提取物对凝固酶阴性葡萄球菌的体外抗菌活性研究. 药物评价, 2006, 8: 62-65.
- 田健, 晁青, 黄柏, 等. 几种中草药对葡萄球菌的体外作用. 中国现代药物应用, 2008, 2: 21-23.
- 李仲兴, 王秀华, 赵建宏, 等. 连翘对金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌的体外抗菌活性研究. 天津中医药, 2007, 24: 328-330.
- 赵晓丹, 傅达奇, 陈计雷, 等. 醋蒜提取物抑菌作用研究. 中国调味品, 2004, 10: 13-19.
- 雷连成, 韩文瑜, 乔红伟. 大肠杆菌耐药性中药抑制剂的初步研究. 吉林农业大学学报, 2003, 25: 429-433.
- 李洪涛, 王晓兰, 孙延明. 16 种中西药及复方制剂对奶牛子宫内膜炎主要致病菌的体外抑菌试验. 兽医技术, 2008, 228: 62-64.
- CLSI. Introduction to Tables 1 and 2 for Use With M02-A10 (Disk Diffusion) and M07-A8 (MIC Testing). Approved Standard, 2010, 20.
- 钱红, 肖农, 秦志峰, 等. 中药 Bingdelling 体外对临床常见 4 种细菌的抑菌作用. 第二军医大学学报, 2010, 31: 212-214.
- 张钟允, 廖兴广, 张秀丽, 等. 安福雷颗粒剂对奶牛乳房炎主要致病菌的体外抑菌试验. 中医学报, 2010, 25: 471-472.
- 帕提古丽·马合木提, 阻丽皮亚·玉努斯. 西伯利亚花椒枝条提取物抑菌作用的测定. 食品科学, 2006, 17: 185-187.
- Malkoskim K. A novel antibacterial milk. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 8: 2309-2315.
- 周立勤, 陈林娜, 李波, 等. 中药制剂对多重耐药细菌的体外抑菌试验. 微循环学杂志, 2005, 15: 87-88.
- Gabrielson J, Hart M, Jarelov A, et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. J Microbiol Methods, 2002, 50: 63-73.
- Riesselman MH, Hazen KC, Ulter JE. Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay. J Clin Microbiol, 2000, 38: 333-340.
- Li RK, Elie CM, Clayton GE, et al. Comparison of a new colorimetric

assay with the NCCLS broth microdilution method (M27-A) for anti-fungal drug MIC determination. J Clin Microbiol, 2000, 38: 2334 - 2338.

20 蒋立科, 杨婉身, 主编. 现代生物化学实验技术. 中国农业出版社, 2003.

(收稿日期: 2011-01-28)

(本文编辑: 杨军)



2011 全国医院科室创新管理与和谐医护患关系构建培训班

为贯彻落实卫生部关于在全国医疗卫生系统开展“三好一满意”活动, 推动医院在改革发展中坚持“以病人为中心”, 加强医院科室科学化管理, 促进和谐医护患关系建设, 培养医疗卫生行业职业化管理队伍, 同时交流各地的先进经验, 中国医院协会评价评估部与海南省医院协会经研究决定于 2011 年 05 月 27 号在海南省海口市举办“全国医院科室创新管理与和谐医护患关系构建培训班”。现将有关事宜通知如下。

1 会议内容

医院中层执行力培养; 科室创新管理与学科建设; 临床科研与医学创新; 护士长管理艺术, 护患交流与沟通; 科室绩效管理; 护理风险防范等。

2 会议时间及地点

报到时间: 2011 年 05 月 27 日(会务组安排机场接送)

会议日期: 2011 年 05 月 28 日-06 月 02 日

会议地点: 海口汇银大酒店(海口市琼山区中山南路 2-6 号, 四星, 总机: 0898-36666688)

3 拟邀请下列知名专家进行专题讲学

王吉善(教授): 中国医院协会副秘书长, 评价评估部主任, 中国医院协会医疗质量管理委员会副主任;

刘振华(教授): 中国医院协会医疗质量管理专业委员会副主任委员, 著名医疗风险防范研究专家;

刘庭芳(教授): 中国医院协会常务理事, 清华大学医药卫生研究中心主任, 2010 年度全国医院管理突出贡献奖获得者;

张振伟(教授): 中国医院协会评价评估部副主任;

王诚丽(教授): 湖南郴州市人民医院副院长, 绩效管理直接操盘手;

马晓华(教授): 深圳市人民医院护理部主任。

4 参加人员

各医院分管领导, 科室主任, 特别是护理部、妇产科、检验科、财务科、影像科等相关人员。

5 会议论文

有论文者带论文参加会议, 欢迎有学术和实践指导价值的论文。

6 会议费用及支付方式

会务费: 1980 元/人(注: 含会议注册费、培训费、资料费、专家报告费及考察调研费等), 报到时交纳, 费用回各单位报销。

会议期间食宿由会务组统一安排, 标准: 220 元/人/天。

诚挚邀请各医疗同仁参加, 海南国际旅游岛欢迎您的到来, 离岛免税政策将为您带来更多的惊喜!

7 组织及报名事项

主办单位: 中国医院协会评价与评估部

承办单位: 海南省医院协会

协办会务: 海口欧亚达会展服务有限公司

8 报名方式

传真: 0898-68587690

联系人: 杨老师

E-mail: ouyadahuizhan@163.com

电话: 0898-68587692, 0898-68587691

短信: 杨老师 13976689808, 18976081101

中国医院协会评价与评估部
海南省医院协会