

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00212

• 短篇论著 •

中药方剂 *Bingdeling* 体外对临床常见 4 种细菌的抑菌作用

Inhibitory effects of Chinese herbal formula *Bingdeling* on four common bacteria *in vitro*

钱红^{1△}, 肖农^{2△}, 秦志峰³, 刘彦军⁴, 沈毅君⁴, 王一⁵, 许青^{1*}

1. 同济大学附属上海市第十人民医院肿瘤科, 上海 200072

2. 上海市闸北区药品与食品检验所, 上海 200435

3. 第二军医大学长征医院中医科, 上海 200003

4. 上海复旦张江生物医药股份有限公司, 上海 201210

5. 同济大学附属上海市第十人民医院病理科, 上海 200072

[摘要] **目的** 研究中药方剂 *Bingdeling* 体外对金黄色葡萄球菌等细菌的抑制作用。**方法** 采用菌落形成计数方法, 观察 *Bingdeling* 对临床常见 4 种细菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门菌、铜绿假单胞菌)体外抑菌作用; 采用液体培养基连续稀释法测定 *Bingdeling* 体外对金黄色葡萄球菌生长的最小抑菌浓度(MIC); 采用纸片扩散法进行中药方剂 *Bingdeling* 联合青霉素以及 β-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)等抗菌药体外对金黄色葡萄球菌的药敏试验。**结果** 体外抑菌实验结果表明, 中药方剂 *Bingdeling* 体外对金黄色葡萄球菌的生长具有非常明显的抑制作用; *Bingdeling* 体外对金黄色葡萄球菌生长的 MIC 是原液的 0.016 倍; 体外 *Bingdeling* 联合青霉素、阿莫西林、庆大霉素、罗红霉素应用, 对金黄色葡萄球菌有协同增强抗菌作用。**结论** *Bingdeling* 体外对金黄色葡萄球菌有明显的抑菌作用, 且与阿莫西林等抗菌药有协同抑菌作用, 具有潜在的临床应用价值。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 最小抑菌浓度; 中药方剂

[中图分类号] R286.8

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)02-0212-03

各类细菌感染是目前影响人类身体健康的主要问题之一, 寻求有效低毒的抗菌制剂成为目前抗菌药物的研究重点。中药方剂 *Bingdeling* 是我们的自主知识产权配方, 主要由黄芪、大黄、白术、板蓝根、黄芩、山茱萸、防风等组成。我们的前期工作^[1-2]表明, *Bingdeling* 可提高小鼠的免疫力, 且可提高荷瘤化疗小鼠的化疗效果及生存时间。

我们在原有的工作基础上, 对 *Bingdeling* 在体外对 4 种主要致病菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门菌、铜绿假单胞菌), 进行了抑菌以及对抗菌药增敏作用的研究; 采用液体培养基连续稀释法测定了其对外金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度; 以及联合抗菌药体外对金黄色葡萄球菌的药敏试验, 旨在为临床应用 *Bingdeling* 预防并联合治疗细菌感染性疾病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003、大肠杆菌 CMCC(B)44102、沙门菌 CMCC(B)50094、铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104 均购自中国生物制品鉴定所标准菌株。中药 *Bingdeling* 方剂按文献^[1-2]配制, 主要成分为: 黄

芪、大黄、白术、板蓝根、黄芩、山茱萸、防风等。庆大霉素(大同市云岗制药有限公司, 批号: 060701)、阿莫西林(上海海虹实业集团巢湖中振药业有限公司, 批号: 060818)、罗红霉素(丽珠集团丽珠制药厂, 批号: 060302)。培养基: 蛋白胨水缓冲液、营养肉汤培养基、营养琼脂培养基, 均购自中国科学院上海昆虫研究科技开发公司康乐培养基有限公司。抗菌药物纸片: 庆大霉素(批号: 070411), 阿莫西林(批号: 070330), 罗红霉素(批号: 070319), 青霉素 G(批号: 070403), 均购自杭州天和微生物试剂有限公司。生化培养箱(上海虹浦仪器厂), SW-CJ-IB 标准净化工作台(苏州净化设备厂), Olympus 数码相机。

1.2 药品对 4 种致病菌的抑制作用 将 4 种菌株分别接种于营养肉汤培养基 16~24 h 后, 用蛋白缓冲液倍比稀释并计数, 使各菌液的终浓度为 150 cfu/ml, 0.2 ml/每孔, 加入 6 孔板。以蛋白胨水缓冲液将中药 *Bingdeling* 方剂原液按 1:1、1:2、1:3、1:4 的比例稀释后加入 6 孔板, 1 ml/孔, 每个稀释浓度各 3 孔。同时做阳性对照, 培养 48 h 观察结果并对形成的菌落计数。

1.3 第 1 天、第 5 天 *Bingdeling* 及各抗菌药物 MIC 比较

[收稿日期] 2009-04-06 **[接受日期]** 2009-12-07

[基金项目] 国家自然科学基金(30872591)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30872591)。

[作者简介] 钱红, 主治医师。E-mail: shqhong9@yahoo.com.cn

△共同第一作者(Co-first authors)。

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-66313384, E-mail: xuqingmd@yahoo.com.cn

相同条件下比较 *Bingdeling* 药品与 β -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)对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)。*Bingdeling* 实验药物组:取药物原液加入含肉汤培养基的试管,倍比稀释分别为原液的 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256、1/512、1/1 024、1/2 048、1/4 096、1/8 192、1/16 384、1/32 768、1/65 536、1/131 072、1/262 144、1/524 288 共 20 个浓度组;抗菌药药物组:另将阿莫西林、庆大霉素、罗红霉素自浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时倍比稀释,分别为 5.00、2.50、1.25、0.63、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.002 5、0.001 25、0.000 625、0.000 312 5、0.000 156 25、0.000 078 125、0.000 039 062 5、0.000 019 531 25、0.000 009 765 625 各 20 个浓度组。同时设肉汤阳性(肉汤+细菌)对照组、空白对照(肉汤);调整菌液浓度至 0.5 麦氏标准浊度,取终浓度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 的金黄色葡萄球菌液 0.1 ml 接种至各稀释液管。35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育至 24 h 观察结果,结果判定:当空白对照管生长菌液变为浑浊,而加入药物管澄清(完全抑制金黄色葡萄球菌生长)时,这个最高稀释倍数管的药物浓度为该药品对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)。

1.4 联合药物敏感试验和杀菌试验 自培养基中挑取金黄色葡萄球菌,接种于营养肉汤,35~37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h,备用。取直径约 90 mm、高 16~17 mm 的平底双碟,分别注入加热融化的培养基 20 ml,使碟底内均匀摊布,放置水平台上使其凝固,作为底层。另取培养基适量加热融化后,放冷至 48~50 $^{\circ}\text{C}$,加入 1% 金黄色葡萄球菌悬液,摇匀,在每 1 双碟中分别加入 5 ml,使其在原有底层上均匀摊布,作为细菌层。放置冷却后,在每 1 双碟中以等距离均匀安置牛津杯 1 个并在杯中滴加 *Bingdeling* 药品原液,同时加入阿莫西林 10 $\mu\text{g}/\text{片}$ 、庆大霉素 10 $\mu\text{g}/\text{片}$ 、罗红霉素 15 $\mu\text{g}/\text{片}$ 、青霉素 G 10 u/片药敏试纸 1 片。观察菌落大小,并评价抑菌效果。

2 结果

2.1 药品对 4 种致病菌的抑制作用 菌落计数结果(表 1)表明,在 4 种细菌菌株中,*Bingdeling* 对金黄色葡萄球菌的

菌落形成抑制作用最明显。

表 1 不同比例下药品对 4 种致病菌的培养结果

($n=6$,菌落数/孔)

菌种	药物原液稀释浓度				阳性对照
	1:1	1:2	1:3	1:4	
金黄色葡萄球菌	0	0	0	0	28.0
大肠杆菌	6.7	8.3	17	19.6	28.8
铜绿假单胞菌	14	19.6	29.3	29.6	29.9
沙门菌	24	25	27	28	30

2.2 最低抑菌浓度比较 1~5 d 内、相同条件下比较 *Bingdeling* 与 4 种抗生素对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)。结果显示第 1 天,0.016 倍原液的 *Bingdeling* 与 0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的阿莫西林、0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的庆大霉素、0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的罗红霉素作用相当。而在培养的第 5 天:0.032 倍原液的 *Bingdeling* 与 0.390 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的阿莫西林、1.250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的庆大霉素、0.312 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的罗红霉素作用相当。与第 1 天相比,第 5 天的最低抑菌浓度 *Bingdeling* 增加到 2 倍,而阿莫西林、庆大霉素、罗红霉素的浓度分别增加到 12.2 倍、10.0 倍和 312.0 倍。

表 2 第 1 天和第 5 天药物及各抗菌药对金黄色葡萄球菌的 MIC

药物种类	MIC		
	第 1 天	第 5 天	第 5 天/第 1 天 药物浓度比值
<i>Bingdeling</i>	0.016 倍原液	0.032 倍原液	2.0
阿莫西林	0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.390 $\mu\text{g}/\text{ml}$	12.2
庆大霉素	0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.250 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10.0
罗红霉素	0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.312 $\mu\text{g}/\text{ml}$	312.0

2.3 联合药物敏感试验和杀菌试验结果 结果显示中药方剂 *Bingdeling* 与抗生素的抑菌圈相互交连,且交连处产生钝角(图 1)。这表明采用纸片扩散法进行中药方剂 *Bingdeling* 联合 4 种抗菌药体外对金黄色葡萄球菌可产生累加作用。

图1 联合药物敏感试验和杀菌试验结果

A:庆大霉素;B:罗红霉素;C:青霉素;D:阿莫西林

3 讨论

金黄色葡萄球菌主要定植在人的鼻前庭、会阴部、新生儿脐带残端,偶尔定植在皮肤、阴道、肠道和咽部,能引起肺、骨、心脏和血源的各种感染^[3],医院感染中金黄色葡萄球菌在革兰阳性菌中居第1位^[4]。且随着抗生素的广泛应用,细菌的抗药性已成为临床上棘手的问题。中药是我国医药的一个重要组成部分,毒副作用小,应用前景广阔。研究表明中药因抑菌作用不同于抗生素,不易产生耐药性^[5]。当抗生素对细菌产生耐药时,传统中药仍可具有一定的作用优势,且在预防感染方面具有较大潜力。

本实验所用中药方剂 *Bingdeling* 为本单位自主知识产权产品。据文献^[6-8]报道大黄、白术、板蓝根、黄芩等单药均有抗菌及提高机体免疫功能的作用,尤其是对金黄色葡萄球菌有效。此外,我们的前期研究表明中药方剂 *Bingdeling* 尚可提高小鼠的免疫力,且可提高荷瘤化疗小鼠的化疗效果及生存时间^[1-2]。本研究拟证实 *Bingdeling* 在控制细菌感染方面的作用与价值。

实验菌落计数结果显示,中药方剂 *Bingdeling* 按原液稀释 1:1、1:2、1:3、1:4 的 4 种浓度,对 4 种细菌菌株(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门菌、铜绿假单胞菌)均具有一定的抑制作用,其中对金黄色葡萄球菌的菌落形成抑制作用最为明显。结果提示 *Bingdeling* 在抑制金黄色葡萄球菌方面的潜在药物价值。

与第 1 天相比,第 5 天的最低抑菌浓度 *Bingdeling* 仅增加了 2 倍,而阿莫西林、庆大霉素、罗红霉素的浓度增加值分别为 12.2 倍、10.0 倍、312.0 倍。结果表明 *Bingdeling* 抑制金黄色葡萄球菌效果肯定且稳定,具有一定的持续性。而联合抗菌药的实验结果显示,*Bingdeling* 方剂与阿莫西林、庆大霉、罗红霉素、青霉素 G 的抑菌圈相互交连,且交连处产生钝角,尤其与阿莫西林合用抑菌效果更为明显,说明 *Bingdeling* 分别联合 4 种抗菌药体外对金黄色葡萄球菌可产生累加以及增强作用,这对未来 *Bingdeling* 联合此类抗菌临床应用提供了有力的证据。

需要说明的是,本实验应用的是标准金黄色葡萄球菌株,对其他类型的金黄色葡萄球菌的抑菌作用有待进一步研

究探讨。此外,资料显示中药方剂 *Bingdeling* 各个单药组分均具有一定的抗炎和提高机体免疫功能的作用^[6-8],这也为今后证实 *Bingdeling* 组方在体对相关疾病的抑菌作用提供了有利的依据,亦有待于今后动物及临床实验中进一步研究明确。

本研究证实:中药 *Bingdeling* 方剂体外对金黄色葡萄球菌有明显的抑菌作用,且与阿莫西林等抗菌药具有协同杀菌作用。这为探讨中成药在替代或合并抗生素治疗与预防临床细菌感染性疾病方面提供了有力的实验依据。

[参考文献]

- [1] Xu Q, Brabham J G, Zhang S M, Munster P, Fields K, Zhao R J, et al. Chinese herbal formula, *Bingdeling*, enhances antitumor effects and ameliorates weight loss induced by 5-fluorouracil in the mouse CT26 tumor model[J]. *DNA Cell Biol*, 2005, 24: 470-474.
- [2] Niu G L, Tan J, Turner J G, Brabham J G, Burdelya L G, Crucian B E, et al. *Bingdeling*, a Chinese herbal formula, stimulates multifaceted immunologic responses in mice[J]. *DNA Cell Biol*, 2000, 19: 515-520.
- [3] 徐秀华. 临床医院感染学[M]. 2版. 长沙:湖南科技出版社, 2005:20.
- [4] 文细毛,任南,徐秀华,黄勋. 全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2002, 12: 241-244.
- [5] 胡晓贞,颜麒麟. 青英颗粒解热抗菌作用的实验研究[J]. *同济大学学报:医学版*, 2007, 28: 38-45.
- [6] 王育红,李凤学,张志清,李仲兴,王秀华. 24种中药水煎剂与免煎颗粒剂对临床菌株的体外抑菌作用[J]. *江苏中医药*, 2006, 27: 52-54.
- [7] 杨明炜,陆付耳,徐丽君,刘艳娟,陈茹. 20种清热解毒中药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌抗药性的影响[J]. *中草药*, 2004, 35: 799-800.
- [8] 杨海燕,张传美,吴金凤. 七种中药对金黄色葡萄球菌的体外抑制试验[J]. *动物医学进展*, 2007, 28: 48-51.

[本文编辑] 尹茶