

万古霉素分别联合四种中药对肠球菌作用的实验研究

陈开森 黎进 林时荣 杨福明

(南昌大学第一附属医院 江西南昌 330006)

摘要:目的:探讨黄连、金银花、鱼腥草和大青叶单独或分别联合万古霉素体外抗肠球菌作用。方法:体外稀释法。结果:黄连、金银花、鱼腥草和大青叶具有一定的抗菌能力,但表现不一样,其中黄连能力最强,大青叶最弱;联合万古霉素后,黄连、金银花和鱼腥草表现为相加作用,大青叶则表现为无关作用。结论:临床可考虑黄连、金银花、鱼腥草联合万古霉素对肠球菌的作用。

关键词:肠球菌;万古霉素;黄连;金银花;鱼腥草;大青叶

中图分类号:R 285.5

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2011.02.064

肠球菌为临床常见感染的细菌,我院 2008 年的耐药监测中,肠球菌感染率达到 7%左右^[1],为医院感染常见病原菌。由于肠球菌细胞壁厚,部分抗生素通透性差,故常表现为多重耐药性,在治疗和感染控制中具有一定的难度。目前,美国医院分离的耐万古霉素的肠球菌(VRE)达到 20%以上,国内部分地区 VRE 已达到了 10%^[2],如何在其它有效抗生素充分替代前,发挥万古霉素的抗菌作用,延长其在临床上的使用期限将是一个重大的现实课题。中药在我国使用历史较长,是我国人民健康保健的重要依托,在治疗病原体感染方面具有作用时限长、剂量大、副作用小及作用靶位多、细菌不易产生耐药等特点,不适合急性感染及严重感染。西药则具有作用时限短、剂量小、副作用大及作用靶位单一、细菌易产生耐药等特点。如何发挥中西药各自在抗感染方面的优势,将是未来医药发展的方向之一。我们使用低剂量万古霉素分别联合黄连、金银花、鱼腥草和大青叶的提取液进行肠球菌体外抗菌作用实验研究。现报道如下:

1 方法

1.1 中药提取液的制备 从药店购买黄连、金银花、鱼腥草和大青叶,56℃干烤 1 h,准确称取各种药 40 g,加 500 mL 蒸馏水中浸泡 1 h,文火加热煮沸 1 h,将水溶液倒出,剩余药材加蒸馏水用文火加热煮沸 1 h,两次水溶液混合后滤纸过滤,然后倒入有刻度的烧瓶中,文火加热使总液体容积为 200 mL,故各中药浓度为 200 g/L,100℃消毒 30 min,冷却后放 -20℃冰箱备用。

1.2 万古霉素悬液的制备 称取万古霉素粉剂(进口药品注册号 H20050375)0.1 g,净化操作台上紫外灯消毒 30 min,加 10 mL 无菌双蒸馏水,使浓度为 10 mg/mL,即原液。

1.3 HLAR 筛选平板的制备 称取一定量的 MH 琼脂到 2 个烧瓶中,加入 400 mL 蒸馏水,摇匀后 121.3℃消毒 15 min。溶解琼脂,分别称取庆大霉素、链霉素(进口药品注册号 H20061943 和

H20063671)0.2 g 和 0.8 g,净化操作台上紫外灯下照射消毒 30 min,琼脂温度为 60℃左右时将庆大霉素和链霉素分别加到 2 个烧瓶中,使其浓度分别为庆大霉素 0.5 g/L 和链霉素 2 g/L,配制的平板厚度为 4 mm。

1.4 细菌菌株的鉴定 常规条件下待培养的细菌接种到血平板上,培养 16~18 h,挑取单个可疑菌落到肉汤内,洗涤成单个菌落,然后接种到血平板上再培养 16~18 h,按照 VITEK-II 全自动细菌分析鉴定仪的要求进行操作,24 h 后鉴定为粪肠球菌、屎肠球菌,鉴定阳性率为 99%。

1.5 HLAR(耐高水平氨基糖苷类肠球菌)菌株的筛选 挑取粪肠球菌和屎肠球菌到无菌生理盐水中,制备菌悬液为 0.5 麦氏单位,相当于 $1\sim 1.5\times 10^8$ CFU/mL。用无菌滴头吸取 10 μL 的菌悬液分别点种于加有庆大霉素和链霉素的琼脂表面(点种间中心距离大于 24 mm,距离边缘大于 15 mm),35℃普通气体条件下培养 24 h,但链霉素筛选平板如果 24 h 为敏感则再孵育 24 h。如果平板上出现 1 个以上的菌落生长,则判断为耐药。如果同时庆大霉素和链霉素筛选为耐药则该菌株为 HLAR 菌株。质控菌株为 ATCC29219 和 ATCC51299(实验室自留),前者表现为全部敏感,后者表现为全部耐药。

1.6 非 HLAR 粪肠球菌及屎肠球菌和 HLAR 型球菌的万古霉素 MIC 的测定 试管肉汤稀释法,采用原液配制不同浓度的万古霉素溶液,使成倍比关系,浓度依次为 32、16、8、4、2、1、0.5 和 0 mg/L。配制浓度为 0.5 麦氏单位的待测菌,并稀释 1 000 倍,使成 $1\sim 1.5\times 10^5$ CFU/mL。加入待测菌悬液和万古霉素溶液各 1 mL,则万古霉素浓度分别为 16、8、4、2、1、0.5、0.25 和 0 mg/L,菌悬液浓度约为 5×10^4 CFU/mL。

1.7 中药最低抑菌浓度(MIC)测定 采用肉汤连续稀释法,所有操作在常温下进行^[3]。取无菌小试管 48 支,分 4 组每组 12 支,每支试管分别加入无菌营养肉汤 1.0 mL,每组第 1 管分别加入含量为 200 g/L

的黄连、金银花、鱼腥草和大青叶溶液各 1.0mL 混匀。然后取 1.0 mL 加入第 2 管,依次加至第 10 管,第 10 管取出 1.0 mL 弃去,使得各管含黄连、金银花、鱼腥草和大青叶溶液浓度以倍数递减,第 10 管浓度为 0.2 g/L。各组的第 11 管不加药液,第 12 管加入 1.0 mL 中药原液。第 1~11 管每管内加入试验浓度菌悬液 0.1 mL,混匀,第 12 管不加菌悬液。第 1~10 管为试验组,第 11 管为阳性对照,第 12 管为无菌阴性对照。将所有接种管置 35 °C 培养箱中培养 18~24 h,观察结果。

1.8 中药联合万古霉素 MIC 值的测定 根据肠球菌对万古霉素的 MIC 值(参照试验 1.6),将 1 个 MIC 值的万古霉素加入试管中,体积为 1.0 mL,加入浓度为 1×10^6 CFU/mL 的溶液 0.1 mL,同时每管中分别加入中药黄连、金银花、鱼腥草和大青叶溶液 1.0 mL(参照试验 1.7),观察万古霉素与中药联合抗菌效果。通过稀释后每管中万古霉素的浓度为 1/2 MIC,中药黄连浓度为 0.4、0.2、0.1、0.05 g/L;金银花浓度为 1.6、0.8、0.4、0.2 g/L;鱼腥草浓度为 12.5、6.3、3.2、1.6 g/L;大青叶浓度为 50、25、12.5、6.3 g/L。

1.9 结果判断 将反应后的各支试管 2 000 γ /min 离心 5 min,倒取上清液,用接种环挑取底层沉淀物接种到普通哥伦比亚琼脂药敏平板上,35 °C 培养 18~24 h,以无菌生长的试管内药物稀释度的浓度为最低抑菌浓度。同时要求阳性对照管细菌生长正常,阴性对照管无菌生长。每种菌共选择 10 株,每株菌对应每个中药试验都重复 3 次。

2 结果

2.1 万古霉素抗菌效果 非 HLAR 粪肠球菌的 MIC 值分别为 0.5、0.5、1、1、1、2、2、4、4、8 mg/L;非 HLAR 屎肠球菌的 MIC 值分别为 0.5、1、1、2、2、4、4、4、4、8 mg/L;HLAR 的 MIC 值分别为 0.5、0.5、1、1、1、2、2、4、4、8 mg/L。

2.2 中药抗菌效果

2.2.1 黄连抗菌情况 非 HLAR 粪肠球菌的 MIC 值分别为 0.2、0.1、0.2、0.4、0.2、0.2、0.2、0.2、0.4、0.2 g/L;非 HLAR 屎肠球菌的 MIC 值分别为 0.4、0.1、0.2、0.1、0.2、0.2、0.4、0.1、0.4 g/L;HLAR 的 MIC 值分别为 0.2、0.1、0.1、0.2、0.1、0.4、0.2、0.2、0.4、0.2 g/L;平均值为 0.2 g/L。

2.2.2 金银花抗菌情况 非 HLAR 粪肠球菌的 MIC 值分别为 0.4、0.8、0.4、1.6、0.8、0.8、0.4、0.8、0.8、0.4 g/L;非 HLAR 屎肠球菌的 MIC 值分别为 0.8、1.6、0.4、0.8、0.8、0.4、0.8、0.8、0.8、1.6 g/L;HLAR

的 MIC 值分别为 0.4、0.8、1.6、0.8、0.4、0.4、0.8、0.8、0.8、1.6 g/L;平均值为 0.8 g/L。

2.2.3 鱼腥草抗菌情况 非 HLAR 粪肠球菌的 MIC 值分别为 6.3、12.5、3.2、12.5、0.8、6.3、6.3、12.5、6.3、1.6 g/L,平均值为 6.3 g/L;非 HLAR 屎肠球菌的 MIC 值分别为 3.2、6.3、3.2、1.6、12.5、0.8、1.6、0.8、1.6、0.8 g/L,平均为 3.2 g/L;HLAR 的 MIC 值分别为 6.3、6.3、3.2、3.2、1.6、3.2、3.2、6.3、1.6、1.6 g/L,平均为 3.2 g/L。

2.2.4 大青叶抗菌情况 非 HLAR 粪肠球菌的 MIC 值分别为 12.5、12.5、25、6.3、6.3、12.5、25、12.5、12.5、25 g/L,平均为 12.5 g/L;非 HLAR 屎肠球菌的 MIC 值分别为 50、50、12.5、12.5、6.3、50、50、25、25、50 g/L,平均为 25 g/L;HLAR 的 MIC 值分别为 50、12.5、25、25、12.5、25、50、12.5、12.5、50 g/L,平均为 25 g/L。

2.3 黄连、金银花、鱼腥草和大青叶分别联合 1/2 MIC 万古霉素的抗菌情况

2.3.1 黄连联合万古霉素抗菌情况 非 HLAR 粪肠球菌的 MIC 值分别为 0.1、0.05、0.1、0.2、0.1、0.05、0.1、0.05、0.1、0.1 g/L;非 HLAR 屎肠球菌的 MIC 值分别为 0.1、0.05、0.1、0.05、0.1、0.2、0.1、0.2、0.05、0.1 g/L;HLAR 的 MIC 值分别为 0.1、0.05、0.05、0.1、0.05、0.2、0.1、0.05、0.1、0.2 g/L。

2.3.2 金银花联合万古霉素抗菌情况 非 HLAR 粪肠球菌的 MIC 值分别为 0.2、0.4、0.2、0.8、0.8、0.4、0.2、0.2、0.4、0.2 g/L;非 HLAR 屎肠球菌的 MIC 值分别为 0.4、0.8、0.4、0.4、0.2、0.4、0.4、0.4、0.2、0.4 g/L;HLAR 的 MIC 值分别为 0.2、0.2、0.4、0.8、0.4、0.2、0.4、0.8、0.8、0.8 g/L。

2.3.3 鱼腥草联合万古霉素抗菌情况 非 HLAR 粪肠球菌的 MIC 值分别为 3.2、6.3、1.6、6.3、0.8、3.2、3.2、3.2、1.6、0.8 g/L;非 HLAR 屎肠球菌的 MIC 值分别为 1.6、3.2、3.2、0.8、6.3、0.4、0.8、0.4、0.8、0.4 g/L;HLAR 的 MIC 值分别为 3.2、3.2、1.6、1.6、0.8、3.2、1.6、3.2、1.6、0.4 g/L。

2.3.4 大青叶联合万古霉素抗菌情况 非 HLAR 粪肠球菌的 MIC 值分别为 6.3、12.5、25、3.2、6.3、12.5、12.5、12.5、12.5、25 g/L;非 HLAR 屎肠球菌的 MIC 值分别为 25、50、6.3、12.5、3.2、25、50、12.5、25、25 g/L;HLAR 的 MIC 值分别为 50、12.5、12.5、12.5、6.3、12.5、25、6.3、12.5、25 g/L。

2.4 中药联合万古霉素分级抑菌浓度(FIC)指数 $FIC \text{ 指数} = \text{万古霉素联合中药 MIC 值} / \text{万古霉素单独 MIC 值} + \text{中药联合万古霉素 MIC 值} / \text{中药单独}$

MIC 值。黄连和万古霉素的 FIC 为 0.92, 金银花和万古霉素的 FIC 0.94, 鱼腥草和万古霉素的 FIC 为 0.98, 均表现为相加作用; 大青叶和万古霉素的 FIC 为 1.21, 表现为无关作用。

3 讨论

肠球菌通常存在于人类和动物的肠道, 属于正常菌群。西药对该类菌的治疗和控制中通常采用联合方法, 其中之一就是万古霉素联合氨基糖苷类药物。如果细菌产生能使氨基糖苷类药物 AAC(6')-APH(2'') 部位钝化的酶, 则对庆大霉素产生高水平耐药, 同时几乎对所有的氨基糖苷类药物(除开链霉素)耐药, 如果出现核糖体突变或产生了链霉素腺苷酰基转移酶, 则对链霉素也表现为耐药, 如果同时对庆大霉素和链霉素高水平耐药, 则该菌株为 HLAR。我们采用非基因检测方法中的肉汤稀释法检测该菌株是否为 HLAR, 通过试验发现所选择的 30 株肠球菌对万古霉素的 MIC 值 ≤ 8 mg/L, 且四种中药对菌株的抗性表现为与万古霉素无相关性, 表明中药作用的靶位与万古霉素作用靶位不同或无相关性。

从黄连、金银花、鱼腥草和大青叶单独体外抗菌作用的研究发现, 这些常见的中药具有不同的抗菌能力, 其中黄连具有良好的作用效果, 与杨焯建等^[4]报道相似。黄连为毛茛科植物黄连的干燥根茎, 具有分布广泛、来源丰富等特点, 其主要成分为黄连素, 具有广泛的抗菌功能^[5], 黄连中的黄芩苷等成

(上接第 83 页) 染腹腔, 不会发生化学性腹膜炎、发热等并发症。可见阴式卵巢成熟畸胎瘤剥除术既具有腹腔镜微创的优点, 又避免了畸胎瘤内容物对腹腔的污染。

3.3 最大限度地保护卵巢功能是手术的重点 卵巢是女性的性腺器官, 在性激素代谢和内分泌中起着重要的作用, 是女性生命中极其重要的器官。腹腔镜下电凝止血对卵巢功能的影响一直是研究的重点, 张军等^[9]认为卵巢囊肿剥除术中电凝止血与缝合止血相比卵巢功能下降更明显。经阴道畸胎瘤剥除术完整剥除囊肿壁后, 在直视下沿卵巢纵轴用可吸收线缝合卵巢, 术中无电凝止血对卵巢的热损伤, 并尽可能多地保留正常卵巢组织, 最大限度地保护了卵巢功能。

总之, 利用女性的自然通道行卵巢畸胎瘤剥除术, 是一种理想、可行的术式。该手术在硬脊膜外阻滞下即可进行, 而且手术器械简单, 在基层医院也

分也具有抗菌活性^[6], 如何深入研究这些成分的抗菌活性及作用靶位将具有重要现实意义。另外, 金银花的抗菌活性与产地具有一定的关系, 苟占平^[7]等使用川产金银花作为抗菌药物, 发现部分川产金银花对金黄色葡萄球菌具有高效抗菌活性, 对肺炎链球菌、志贺菌、沙门菌和大肠杆菌也具有一定的作用。但有试验研究发现金银花对白色念珠菌没有抗菌活性^[8]。本试验发现鱼腥草对肠球菌也具有低度抗菌能力, 但具体抗菌成分不清, 大青叶抗菌活性较差。中药联合万古霉素的抗菌实验显示, 黄连、金银花、鱼腥草联合万古霉素 FIC 分别为 0.92、0.94、0.98, 均表现为相加作用, 大青叶联合万古霉素 FIC 为 1.21, 表现为无关作用。所以, 临床可考虑黄连、金银花、鱼腥草联合万古霉素对肠球菌的作用。

参考文献

- [1] 陈开森, 廖晚珍, 彭卫华, 等. 昌大一附院 2008 年细菌耐药监测[J]. 实验与检验医学, 2009, 9(5): 481-484
- [2] 杨青, 俞云松, 倪语星, 等. 2007 年中国 CHINET 肠球菌属耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(3): 175-179
- [3] 周邦清. 常用中药的抗菌作用及其测定方法[M]. 重庆: 科技文献出版社, 1987. 289
- [4] 杨焯建, 柳益群, 张颈丰, 等. 黄连和五倍子对耐万古霉素肠球菌的体外抗菌活性[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(5): 819-820
- [5] 杨青, 林青. 黄连素临床运用研究[J]. 医学综述, 2008, 14(2): 297-299
- [6] 文敏, 李雪, 付守廷. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 沈阳医科大学学报, 2008, 25(2): 146-162
- [7] 苟占平, 万德光. 川产习用金银花的抑菌作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 724-725
- [8] 张美玲, 魏莲花, 田涵, 等. 甘肃黄芩、黄参、金银花体外抗(杀)白色念珠菌试验研究[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(2): 70-71

(收稿日期: 2010-04-20)

可施行。手术路径简单, 在直视下近距离操作, 避免了腹腔镜下远距离操作的不便, 又不需人工气腹, 没有 CO₂ 气体的影响, 在盆底操作无需拨开肠管及大网膜即可暴露肿瘤, 对腹腔脏器无干扰。术中肿瘤不易破裂, 即使破裂其内容物自阴道流出, 避免了囊肿内容物对腹腔的污染。患者可以在短期内恢复饮食及活动, 损伤小, 恢复快, 且腹壁无切口、无疤痕, 符合美学及微创原则, 值得各级医院推广应用。

参考文献

- [1] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 1 934
- [2] 徐坚. 腹腔镜下双进路推凝侧剥法卵巢良性肿瘤剥除术[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2001, 17(8): 443
- [3] 刘靖, 刘义, 冯思伟. 经阴道与经腹腔镜行良性卵巢囊肿剥除术的对比分析[J]. 中国医学文摘·计划生育妇产科学, 2008, 27(3): 170-172
- [4] 姜晶, 王强庆, 杨淑玉, 等. 腹腔镜手术治疗卵巢良性囊肿(附 76 例报告)[J]. 腹腔镜外科杂志, 2004, 9(1): 17
- [5] 张军, 周应芳, 李斌, 等. 腹腔镜下卵巢子宫内异位囊肿剥除术不同止血方法对卵巢储备功能的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2009, 44(8): 583-587

(收稿日期: 2010-12-16)