

[7] 张晓云,郭善文,张乐峰. 无偿献血者脂肪性原因调查及对策[J]. 中国实用医药杂志, 2011, 6(3): 273-274.

[8] 季阳,王迅,郑忠伟,等. 重新评估献血者 ALT 检测的意义[J]. 中国输血杂志, 2009, 22(4): 521-522.

[9] 董立杰. 标本脂血对临床生化检测结果的评估及其对策[J]. 实用医技杂志, 2010, 17(4): 344-346.

[10] 石凌波, 史惠群. 利用高速离心法消除脂血对生化测定的干扰[J]. 检验医学, 2008, 23(2): 138-140.

[11] 李璐, 顾光煜. 聚乙二醇及其衍生物在检验医学中的应用[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(6): 469-471.

[12] Veljkovic K, Servedio D, Don-Wauchope AC. Reporting of post-polyethylene glycol prolactin; precipitation by polyethylene glycol 6000 or polyethylene glycol 8000 will change reference intervals for monomeric prolactin[J]. Ann Clin Biochem, 2012, 49(pt4): 402-404.

[13] Heald AH, Blantern E, Anderson SG, et al. Quantitative adjustment for macroprolactin is an integral part of laboratory assessment of hyperprolactinaemia[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2012, 12(2): 376-380.

[14] Bell DA, Hoad K, Leong L, et al. A high pressure liquid chromatography method for separation of prolactin forms[J]. Ann Clin Biochem, 2012, 49(3): 285-288.

[15] Beda-Maluga K, Pisarek H, Komorowski J, et al. The detection of macroprolactin by precipitation and ultrafiltration methods[J]. Endokrynol Pol, 2011, 62(6): 529-536.

[16] Boughen L, Liggat J, Ellis G. Thermal degradation of polyethylene glycol 6000 and its effect on the assay of macroprolactin[J]. Clin

Biochem, 2010, 43(6): 750-753.

[17] 方军, 潘恩云. 高泌乳素血症患者筛查巨泌乳素的临床意义[J]. 检验医学, 2011, 26(5): 686-689.

[18] 丁振若. 现代检验医学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 514-515.

[19] 丁杰锋, 屠凤娟, 赵文, 等. 用聚乙二醇沉淀法筛检巨催乳素血症及临床意义分析[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(4): 284-285.

[20] 林景涛, 翟铤, 代艳杰, 等. 高脂血对血清酶类活性测定影响及处理方法[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(15): 1542-1545.

[21] 吕娟, 陈莉娜, 杨雪飞, 等. 高脂血清对糖化血清蛋白测定的影响及处理方法[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(3): 226-229.

[22] 张妍, 李君, 李津涛. 高脂血清对胰岛素测定的影响及处理方法[J]. 天津医科大学学报, 2008, 14(4): 566-567.

[23] 朱征, 丁显平, 杨敏, 等. 高脂血对临床生化测定影响及处理方法的临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(20): 2533-2560.

[24] 刘万彬, 隆维东. 聚乙二醇 4000 处理脂血后对生化结果的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(4): 504-506.

[25] 张帆. 高速离心对临床常规生化项目测定结果的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 887-888.

[26] 刘俊, 黄文红, 付波. 三种消除血浆高脂质浑浊方法对酶类检测结果的影响[J]. 华南国防医学杂志, 2010, 24(1): 42-43.

[27] 郑治纲, 杨可, 蔡迪娅, 等. 脂血经乙醚处理后对生化指标测定结果的影响[J]. 陕西医学检验, 2008, 23(3): 28-29.

[28] 张蕴秀, 石育英, 盛惠光, 等. 稀释法消除脂血对生化检测结果干扰的效果评价[J]. 武警医学, 2012, 23(3): 281-283.

(收稿日期: 2013-08-17)

• 综 述 •

中药抑菌的研究现状及思考

李亚娜 综述, 陶庆春 审校

(首都医科大学附属北京友谊医院检验科, 北京 100050)

关键词: 中药; 抑菌; 抑菌机制

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 02. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)02-0198-03

由于抗菌药物的不合理使用,使得细菌对抗菌药物的耐药性不断升级。中国具有大量宝贵的中药资源,无论在感染控制还是在现代医疗方面都凸显出独特的优势,中药取药天然,起效方式全面,近年来,有大量抑制及杀灭细菌的报道,在此将有关中药的抑菌作用、实验方法、抑菌机制等方面做总结。

1 抑菌效果

很多中药具有抑菌杀菌作用,其作用的有效成分也较为多样,其有效成分多为挥发油、有机酸、生物碱、萜类、黄酮、醌类、多糖类等。

1.1 单味中药 很多单味中药具有抑菌作用,如板蓝根、大黄、大青叶、地锦草、百部、大蒜、黄柏、杜仲、秦皮、蛇床子等等。

有研究^[1]采用琼脂扩散法对 18 种中草药对水产动物的致病弧菌进行实验,发现地锦草、苏木、五倍子、石榴皮对病原性弧菌具有良好的抑制和杀灭作用,这对于水产养殖行业的发展具有中药的支持作用。

邓业成等^[2]等的研究采用滤纸片法和带药培养基涂布法对石菖蒲的茎和野的甲醇提取物的抑菌活性进行测定,结果表明石菖蒲的茎对痢疾志贺菌、表皮葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌等 9 种病原菌具有明显的抑制作用,相对于茎来说,石菖蒲的叶

的抑菌活性不及其茎。

有研究发现^[3]当百部的浸出液浓度为 1 : 80 时可以在 10 min 内将结核分枝杆菌杀灭,而百部的有效成分为百部碱,此种成分对结核分枝杆菌的杀灭具有重要作用。

刘涛峰等^[4]用单味中药土槿皮、黄柏、百部、蛇床子、苦参、白藓皮、大风子、地肤子以及几种药物的混合液对马拉色菌进行体外抑菌实验,结果表明同一种中药对不同种的马拉色菌的抑制程度不同,而且作用混合。

有研究^[5]对大蒜、黄柏、辣椒粉、青黛、乌梅等 12 种中药的体外抑菌作用进行实验,结果表明除青黛,其余中草药对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌、伤寒沙门菌都具有不同程度的抑制作用。此外,其抑菌性能还与培养基相关,在最适培养基上生长旺盛的病原菌对中药的抵抗作用强,这也说明体内和体外实验环境的不同也会使得中药的抑菌作用有差异,因此,尽量模拟体内环境才能更准取的发挥中药的性能。

1.2 复方制剂 在实际医疗中,复方制剂应用的更为广泛,很多研究表明,复方制剂具有更好地抑制和杀灭细菌的作用。常用的复方制剂有:痰热清、双黄连、连翘甘草汤等,另外根据各个疾病特点制定的组方,在临床方面具有良好的作用。

有报道^[6]采用双黄连冻干粉对产 ESBLs 肺炎克雷伯菌进行体外抑菌实验,利用浊度不同细菌含量不同的原理进行比较,发现双黄连冻干粉在一定范围内对产 ESBLs 肺炎克雷伯菌具有抑制作用。而且这与其他文献结论相一致^[7]。

张传美等^[8]研究,采用管碟法并且绘制生长曲线的方法进行分析,最终结果发现小檗碱可以抑制耐庆大霉素的大肠杆菌的产生,而三黄汤却具有消除耐庆大霉素大肠杆菌的耐药性的作用。

有研究^[9]分析麻黄杏仁甘草石膏汤、银翘散、桑菊饮等 12 个中草药复方及相应的加减方对常见的病原菌铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌等的抑制和杀灭性能,研究结果表明,麻黄杏仁甘草石膏汤加味方具有很强的抑制和杀灭作用。

何平等^[10]报道,贵州苗族方抗妇炎糜中间体(由蛇床子、苦参等 7 味中药组成)可以显著杀灭金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、淋病奈瑟菌、粪肠球菌、白色念珠菌、乙型溶血性链球菌、支原体,对阴道毛滴虫有很强的杀灭作用。余园媛^[11]利用耐药细菌和耐药真菌感染的日本大白兔为研究对象,对其用复方黄连凝胶剂进行治疗并观察,其结果表明复方黄连凝胶剂具有较强的抗菌作用。

综上所述可以看出,中药不论是单味还是复方都具有良好的抑制和杀灭细菌甚至真菌的作用,而且作用范围较广,临床上中西药联合应用也应用较为广泛,中药和西药取长补短能够减少耐药菌的发生,利于疾病的治疗。

2 实验方法

有关中药抑菌实验的实验方法报道有很多,现在将常用的方法有以下几种。

2.1 稀释法 主要有连续稀释法(包括常量肉汤稀释法和微量肉汤稀释法)、琼脂稀释法和改良稀释法。一般来说,连续稀释法的优势是抗菌效果相对更强,而琼脂扩散法虽然抗菌效果不及连续稀释法强,但可以在一块平板上同时对多个菌株进行最小抑菌浓度的测定。有报道表明,在对革兰阴性菌进行实验时,微量肉汤稀释法测得的最小抑菌浓度相较于常量稀释法会相同或者低一个稀释度^[12]。但无论是连续稀释法还是琼脂稀释法都容易受培养基的营养成分、pH 值,孵育的温度、时间,终点判读的误差等等的影响。而改良稀释法是在稀释法的基础上,分为实验组和空白组,借助分光光度计对两组结果进行比色对照来判断细菌的生长状况^[13],在稀释法的基础上进一步减少了终点判读的误差。

2.2 扩散法 主要有药敏纸片法、杯碟法、挖孔法。其中,药敏纸片法^[14]所测得的抑菌圈较规则,具有容易测量、适合大批量标本的检测的优点,但是容易受纸片的质量(如含药量和药物的扩散力)、菌液浓度及储存方式等因素的影响;杯碟法的缺点是操作上要求小心谨慎,如果杯碟滑动,所得抑菌圈会呈不规则状,不便于结果的测量;而打孔法^[15]在一定程度上可以弥补杯碟法的缺点。

2.3 菌落计数法 将菌液与不同浓度的药物混合作用,当作用一段时间后,与生长对照同时分别均匀倒在 MH 培养基上,35℃孵育培养 24 h 后观察细菌生长的菌落个数,并按照如下公式来计算抑菌率^[16]:

抑菌率(%)=(对照平板菌落数-实验平板菌落数)×100%/对照平板菌落数。

除以上实验方法外,还有营养物质消耗法、含药血清体外抑菌法等,其中含药血清体外法在临床实验中更为常用。体外实验方法虽然具有简便快速、重复性好的特点,但在量化和标

准化上仍有不足,仍有待发掘更好地、更能模拟体内环境的实验方式。此外,进行细胞实验及分子生物方面的研究对于深层次挖掘中药抑菌的本质具有很好的补充作用。

2.4 动物实验法 与体外实验相比,动物实验无疑更具优势,它能更好的模拟人体内环境,有研究采用小鼠感染幽门螺杆菌模拟人体的感染状态,采用复方制剂进行治疗前后效果观察,发现其对幽门螺杆菌导致的胃黏膜损伤具有明显的保护作用^[17]。而且随着基因技术的不断发展,被基因改造后的动物模型也逐渐出现,有研究表明^[18-19],免疫系统人源化小鼠模型和诱导型一氧化氮合酶基因敲除小鼠模型可用于伤寒沙门菌感染的动物模型。但由于中医强调辨证论治,不同的症候需要不同的模型,在这方面仍需在动物模型上进行更深层次的探索。

3 抑菌机制

中药的组分复杂,其抑菌作用的机理和功能也较为多重。中药抑菌杀菌的有效成分多样,报道的有:有机酸、挥发油、生物碱、多糖类、黄酮、萜类、醌类等等,其中挥发油类抑菌杀菌的报道的较多。这些有效成分的作用机制主要有:

3.1 对病原菌的直接作用 中药可以破坏菌体细胞膜和细胞壁,同时还具有干扰细菌的代谢的作用,例如干扰细菌的糖代谢、呼吸,阻碍 RNA 或 DNA 以及蛋白质的合成。有研究表明,在电镜下发现当中药热必宁、肺炎一号、清胆糖浆作用于革兰阳性菌(耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌和耐青霉素肺炎链球菌)后使得菌体细胞膨大破裂,其内容物有溢出现象;当作用于革兰阴性菌(产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌)时则会使菌体结构残缺、胞质淡染、核糖体聚集成块,从而便于药物渗透入细菌内对其进行抑制和杀灭^[20]。

有研究^[21]采用连翘水煎剂对环丙沙星外排表型阳性且 adeB 基因阳性的多重耐药鲍曼不动杆菌进行抑菌实验,选其中作用最明显的代表菌株进行基因测序,结果发现连翘水煎剂对多重耐药鲍曼不动杆菌的主动外排系统具有抑制,并且可使主动外排泵的编码基因 adeB 序列发生碱基或者氨基酸替换的突变,从而逆转了细菌的耐药性。另外有报道表明,穿心莲内酯对铜绿假单胞菌的外排系统的表达也具有抑制作用^[22]。

此外,有研究鱼腥草、黄连、黄芩对产 β-内酰胺酶金黄色葡萄球菌的耐药质粒在不同程度具有消除作用。而且同一中药对产 β-内酰胺酶金黄色葡萄球菌的质粒消除率不同,不同中药对同一菌株的也具有不同的质粒消除率^[23]。

3.2 调节机体的免疫功能 中药中含有很多免疫活性物质及营养成分,它能够给机体增强营养的同时还可以促进免疫器官的发育,并激活其免疫功能。有研究表明^[24],茯苓 3 种不同提取部位均能增强由氢化可的松所致免疫低下小鼠巨噬细胞的吞噬功能,还能显著提高免疫因子 IL-2 和 TNF-α 的含量,提高机体的免疫机能。

3.3 抗炎作用 中药可以减轻 5-羟色胺、组胺的血管通透性作用,抑制细胞的溢出,同时能增强组织和器官的机能,从侧面达到抑菌的作用。有研究表明,大叶秦艽可以降低炎症部位的 PGE₂ 水平,同时对 PLA₂ 及 NO 的产生均具有抑制作用,从而达到抑制炎症反应的效果^[25-26]。

中药的成分多样,其抑菌杀菌的切入点也更全面。可以从疾病的发生的角度对其机制进行深入的剖析,对发病的环节进行逐一的验证,以便更深的挖掘中药抑菌杀菌的机制。

中药是中国的传统资源,它具有西药不具备的优势,可以作用于抗菌的多个环节,甚至可以逆转细菌的耐药。除了单纯应用中药抑菌外,中西药联合应用也是现在较为提倡的方法,

其抑菌效果也很理想。从西医思路开发中药的同时,更要结合中医的思维方式,从整体的角度去把握疾病的发生、发展,更加全面的去看待中药。

参考文献

[1] 梁利国,阎斌伦,张晓君,等.常用中草药对 4 种病原弧菌体外抗菌效果的研究[J].渔业科学进展,2010,31(2):114-119.

[2] 邓业成,玉艳珍,王萌萌,等.石菖蒲提取物及其初步分离物的抑菌活性研究[J].安徽农业科学,2010,38(15):7836-7838,7875.

[3] 赵霞,赵焯,朱国强.中药在治疗肺结核中的作用及地位[J].实用中医内科杂志,2005,19(6):506.

[4] 刘涛峰,刘小平,张虹亚,等.中药水煎剂对马拉色菌分离株的体外抑菌[J].中国皮肤性病杂志,2011,25(1):62-63.

[5] 杨红文,艾玲,雒秋江.大蒜等 12 种中草药的体外抑菌实验[J].时珍国医国药,2009,20(9):2209-2210.

[6] 郭丽双,胡静,张文莉,等.双黄连冻干粉对肺炎克雷伯菌抑制作用的实验研究[J].抗感染药学,2011,8(2):95-97.

[7] 郭丽双,张文莉,张晓丽.双黄连冻干粉对大肠埃希菌直接抑制作用的实验研究[J].牡丹江医学院学报,2010,31(3):2-4.

[8] 张传美,刘宁波,于森,等.庆大霉素、三黄汤和小檗碱对 E. Coli 抑菌作用研究[J].莱阳农学院学报,2008,21(1):14-17.

[9] 卢芳国,朱应武,田道法,等.12 个中药复方体外抗菌作用的研究[J].湖南中医学院学报,2008,24(1):9-11.

[10] 何平,张亚洲,纪刚,等.抗妇炎康中间体体外杀虫、抑菌及杀菌作用的实验研究[J].贵阳中医学院学报,2010,4(32):77-80.

[11] 余园媛.复方黄连凝胶剂体内抗菌活性研究[J].中国医药指南,2008,18(1):47-50.

[12] 康玉军. 抑菌实验 [EB/OL]. <http://baike.com/view/549956.htm>,2010-09-13/2013-06-20.

[13] 赵晓丹,傅达奇,陈计峦,等.醋蒜提取物抑菌作用研究[J].中国调味品,2008,14(1):13-19.

[14] Clinical and Laboratory Standards Institute. Introduction to tables 1 and 2 for use with M02-A10(disk diffusion) and M07-A8(MIC

testing). M100-S21,2010.

[15] 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[J].吉林农业大学学报,2008,30(4):429-433.

[16] 帕提古丽.马合木提,阻丽皮亚.玉努斯.西伯利亚花楸枝条提取物抑菌作用的测定[J].食品科学,2006,17(2):186.

[17] 任守忠,郭建生,曾贵荣.安胃丸对小鼠幽门螺杆菌感染胃炎的治疗作用[J].中国医院药学杂志,2012,32(2):117-120.

[18] Mian MF, Pek EA, Chenoweth MJ, et al. Humanized mice for Salmonella typhi infection; new tools for an old problem[J]. Virulence, 2011, 2(3):248-252.

[19] Alam MS, Zaki MH, Yoshitake J, et al. Involvement of Salmonella enterica serovar Ttphi RpoS in resistance to NO-mediated host defense against serovar Ttphi infection[J]. Microb Pathog, 2007, 41(3):116-125.

[20] 周立勤,王汉敏,陈林娜,等.透射电镜下中药制剂对耐药菌株的抑菌作用观察[J].湖北中医学院学报,2008,10(1):13-15.

[21] 黄瑞玉,穆小萍,柏彩英,等.连翘对多重耐药鲍曼不动杆菌主动外排泵编码基因 adeB 的影响[J].中国病原生物学杂志,2011,6(2):111-114.

[22] 李洪涛,吴春民,覃慧敏,等.穿心莲内酯对铜绿假单胞菌 PAO1 株 MexAB-OprM 外排泵 mRNA 表达的影响[J].中华传染病杂志,2007,25(2):338-341.

[23] 陈世彪.3 种中药对产 β-内酰胺酶金黄色葡萄球菌 R 质粒的消除作用[J].畜牧与兽医,2010,42(1):81-83.

[24] 邓媛媛,邵贝贝,王光忠,等.茯苓调节免疫功能有效物质的比较研究[J].中国医药指南,2012,10(1):94-95.

[25] Yu FR, Yu FH, Li RD, et al. Inhibitory effects of the Gentiana macrophylla (Gentianaceae) extract on rheumatoid arthritis of rats[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 99(1):77-81.

[26] 安卓琳,金哲雄.秦艽提取物对一氧化氮合酶、磷脂酶 A2 和环氧化酶的影响[J].黑龙江医药,2007,20(2):109.

(收稿日期:2013-08-20)

• 综 述 •

有关肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯酶的研究进展*

王 娜,刘志勇,路 娟,赵金英,宋熙瑶,陈淑兰 综述,常 东[△]审校
(哈尔滨医科大学第一临床学院,黑龙江哈尔滨 510000)

关键词:碳青霉烯酶; 肺炎克雷伯菌; 分型; 检测方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)02-0200-03

1 KPC 型酶的简介

1996 年,产 KPC 型酶的肺炎克雷伯菌首次在北卡罗来纳州发现^[1]。属于分子分类的 A 类,功能分类的 2 f 组。命名为 KPC-1,可以被克拉维酸和他唑巴坦所抑制,但不能被 EDTA 所抑制。目前有 11 种亚型,分别命名为 KPC-1/2-KPC-12^[1]。

2 KPC 的分型

KPC-1 型酶一个氨基酸编码的改变,被称为 KPC-2 型^[2-3]。不久在肺炎克雷伯菌和沙门菌血清中发现。然而后来研究表明 KPC-1 型酶和 KPC-2 型酶序列相同,因此 KPC-1 和 KPC-2 为同一亚型^[4]。KPC-2 型酶结构基因突变产生了

KPC-3 型和 KPC-4 型^[5]。大量的研究表明 KPC 亚型之间往往仅有一个氨基酸的改变。目前,KPC-2 型和 KPC-3 型酶最常见,几乎存在于所有已报道的国家。中国 KPC-2 型报道最多,2007 年浙江大学的魏泽庆首次报道了中国浙江地区出现了 KPC-2 型酶,见于肺炎克雷伯菌。KPC-2 型酶和 KPC-3 型酶可以水解几种不同的 β-内酰胺类抗菌药物,这 2 种酶能够高效的水解头孢硝噻、头孢噻吩、头孢菌素类、适度水解碳青霉烯类抗菌药物和头孢噻肟,可是却不能水解头孢西丁和头孢他啶,与 KPC-2 型酶相比,KPC-3 型酶水解头孢他啶的能力更强。其余的亚型目前临床上一概很少见。

* 基金项目:省自然科学基金(D2011174);国家自然科学基金(81273129)。

作者简介:王娜,女,检验技师,主要从事临床微生物学与检验研究。

[△] 通讯作者,E-mail:13946031058@163.com。