论著·基础研究

6 种中草药对多重耐药菌的抗菌活性及逆转耐药性作用的体外研究*

房 华，汪瑞忠，张晓雪，杨 柳
（上海健康医学院附属浦东新区人民医院检验科，上海 201299）

摘 要：目的 筛选抗菌活性较强并可逆转细菌耐药性的中草药，为治疗多重耐药菌感染提供新的思路。**方法** 以赤芍、青黛、五倍子、野菊花、鱼腥草、小檗碱等 6 种临床常用抗菌中草药为研究对象，煎煮法制备提取液后，采用 2 倍稀释法观察 6 种中草药对多重耐药铜绿假单胞菌（MDR-PA）与多重耐药鲍曼不动杆菌（MDR-AB）的抑菌效果；采用纸片扩散（K-B）法检测中草药对多重耐药菌及原始菌株的最低抑菌浓度，计算两者抑菌圈差值，评估中草药逆转多重耐药菌耐药性的效果。**结果** 6 种中草药对 MDR-AB 与 MDR-PA 有不同程度的抑制作用，抑菌作用由强到弱依次为五倍子、鱼腥草、野菊花、赤芍、青黛、小檗碱，五倍子对 MDR-AB 与 MDR-PA 抑菌效价为 512～1 024，抑菌作用最强；五倍子与小檗碱对 MDR-AB 与 MDR-PA 的敏感性在逆转前后的抑菌圈直径均值比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），但逆转前后抑菌圈直径均值的差值小于 3 mm。**结论** 赤芍、青黛、五倍子、野菊花、鱼腥草、小檗碱对 MDR-AB 与 MDR-PA 有不同程度抑制作用，五倍子抑菌作用最强；五倍子与小檗碱对 MDR-AB 与 MDR-PA 的耐药性有一定程度逆转作用。

关键词：中草药； 多重耐药菌； 抗菌活性； 耐药性； 逆转
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2018.04.004 **中图法分类号：**R932
文章编号：1673-4130(2018)04-0396-04 **文献标识码：**A

Antimicrobial activity and drug-resistant reverse of 6 traditional Chinese medicines against multidrug resistant bacteria in vitro*

FANG Hua, WANG Ruizhong, ZHANG Xiaoxue, YANG Liu
(*Department of Clinical Laboratory, Affiliated Pudong New Area People's Hospital, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai* 201299, *China*)

Abstract: Objective To filter the traditional Chinese medicine with strong antibacterial activity and effects of reversing drug resistance of bacteria for providing new ideas for the treatment of multi-drug resistant bacteria infection. **Methods** Six kinds of antibacterial Chinese traditional medicines commonly used in clinic treatment as Radix Paeoniae Rubra, Indigo Naturalis, Galla Chinensis, Flos Chrysanthemi Indici, Herba Houttuyniae, and Berberine were used in this study. After preparation of the extract using decocting method, bacteriostatic effects of these six kinds of Chinese medicine on multiple resistant bacteria were detected by double dilution method. To evaluate the effects of Chinese medicines on reversing drug resistance of multi-drug resistant bacteria, minimum inhibitory concentrations for multi-drug resistant bacteria and the original strain were detected by K-B method and calculated the difference of the bacterial inhibition rings. **Results** The six kinds of traditional Chinese medicines had different degrees of inhibitory effects on MDR-AB and MDR-PA, and the bacteriostatic effect sequence were Galla Chinensis, Herba Houttuyniae, Flos Chrysanthemi Indici, Radix Paeoniae Rubra, Indigo Naturalis, and Berberine. The bacteriostatic titer of Galla Chinensis on MDR-AB and MDR-PA was 512－1 024, whose antibacterial activity was the strongest in the six antibacterial Chinese traditional medicines. Galla chinensis and Berberine had significant effects on reversing drug resistance of MDR-AB MDR-PA ($P<0.05$), but the difference value of inhibition zone diameters before and after reversing were less than 3 mm. **Conclusion** Radix Paeoniae Rubra, Indigo Naturalis, Galla Chinensis, Flos Chrysanthemi Indici, Herba Houttuyniae, and Berberine could inhibit MDR-AB and MDR-PA in different degrees, in which Galla

* **基金项目：**上海市卫生和计划生育委员会资助项目（201440066）。
作者简介：房华，男，副主任技师，主要从事微生物学研究。
本文引用格式：房华，汪瑞忠，张晓雪，等. 6 种中草药对多重耐药菌的抗菌活性及逆转耐药性作用的体外研究[J]. 国际检验医学杂志，2018，39(4)：396-399.

Chinensis was the most effective antibacterial Chinese Medicine. Ggalla chinensis and Berberine could reverse drug resistance of MDR-AB and MDR-PA to some extent.

Key words: traditional Chinese medicine;　multi-drug resistant bacteria;　antimicrobial activity;　drug resistant;　reverse

随着广谱抗菌药在临床的广泛使用，多重耐药菌不断出现，已成为临床感染治疗的难题。我国中医中草药治疗疾病已有千年历史，不少中草药具有抗菌、抑菌活性，可逆转细菌耐药性。为了研究中草药对多种耐药菌的抗菌及逆转耐药性作用，本研究选取文献[1-3]中报道的对鲍曼不动杆菌与铜绿假单胞菌抑菌作用较好的 6 种中草药，分别对多重耐药铜绿假单胞菌(MDR-PA)与多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)进行了体外抑菌及逆转细菌耐药性试验，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　实验菌株　2014 年 5 月至 2016 年 12 月临床分离鉴定菌株：MDR-AB 20 株，其中来自痰液标本 15 株，导管标本 3 株，血液标本 2 株；MDR-PA 20 株，痰液标本 11 株，伤口分泌物标本 4 株，尿液标本 3 株，血液标本 1 株，导管标本 1 株。多重耐药判断参照文献[4]的判断标准，标准菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.2　中草药水煎剂　赤芍、青黛、五倍子、野菊花、鱼腥草购自养和堂药房，小檗碱粉剂购自中国药品生物检定所，水解酪蛋白(M-H)肉汤培养基购自上海伊华公司，Oxid 药敏纸片购自北京普纳德科技有限公司。

1.3　方法　目前中草药抗菌实验和逆转细菌耐药性实验尚无统一的标准操作规范。中草药抗菌实验采用中草药抗菌实验试管法，逆转细菌耐药性实验采用纸片扩散(K-B)法，分别参照参考文献[5-6]进行。

1.3.1　中草药原液的制备　分别称取赤芍、青黛、五倍子、野菊花、鱼腥草、小檗碱粉剂 6 种中草药各 50 g，按 5 倍量加入蒸馏水浸泡，4 ℃冰箱内放置 24 h 后，加热 100 ℃ 30 min，过滤，将滤渣再加 5 倍水加热 100 ℃ 30 min。将两次滤液混合加热浓缩至 50 mL，生药含量为 1 g/mL；根据说明书将小檗碱配制成 1 g/mL；调节 pH 值为 7.6，离心后留取上清，进行高压灭菌，4 ℃冰箱保存备用。

1.3.2　药液的倍比稀释　取上述药液采用 2 倍稀释法稀释，即取 72 支无菌试管，每组 12 支编号，每管加 1 mL 肉汤；取上述中草药原液，先在第 1 管加 1 mL，混匀后加入第 2 管中，以此类推，到第 10 管吸出 1 mL 弃去，使 1～10 管含有倍比稀释的药液即 1∶2、1∶4、1∶8、1∶16、1∶32、1∶64、1∶128、1∶256、1∶512、1∶1 024。

1.3.3　加菌　抽取 MDR-AB 与 MDR-PA 各 10 株，MDR-AB 组：除对多黏菌素 B 敏感，其余药物均耐药；MDR-PA 组：对哌拉西林、头孢噻肟、环丙沙星、亚胺培南、庆大霉素均耐药。复苏后，从 18～24 h 35 ℃培养的血琼脂培养基上挑选几个菌落于生理盐水中，调配至 0.5 麦氏浓度(1.5×10^8 CFU/mL)，稀释 30 倍，向 2 倍稀释的 1～11 支试管药液中加 100 μL 菌悬液，最终接种量为 5×10^5 CFU/mL，第 11 管为阳性对照管，第 12 管不加菌为阴性对照管。

1.3.4　中草药抗菌实验结果判读　35 ℃孵育 18～24 h 后观察，抑制检测菌肉眼可见生长的最低药物浓度为测定药物对检测菌的最低抑菌浓度，阳性对照组呈浑浊状，阴性对照管呈清晰状。为了排除中草药煎剂本身颜色对结果判读影响，读取最低抑菌浓度时应以第 12 管不加菌液的药液为对照，在光亮处判读，这样比对浓度变化，使结果更加准确。

1.3.5　逆转细菌耐药性实验　分别将 6 种中草药原液配制成低于最低抑菌浓度的药液，挑取 MDR-PA 与 MDR-AB 于各药液中，35 ℃培养 18～24 h 后，使用生理盐水离心洗涤配制成 0.5 麦氏浓度菌液，M-H 平板上用 K-B 法做药敏实验，同时做原菌株药敏实验作为阴性对照。比较逆转前后抑菌圈直径变化。

1.4　统计学处理　采用 SPSS17.0 软件进行数据处理及统计分析，中草药抗菌效价取中位数，其他计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，比较方法采用 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　6 种中草药的抑菌作用　除小檗碱外，其余 5 种中草药对 MDR-AB 与 MDR-PA 有不同程度的抑菌作用，抑菌作用由强到弱依次为五倍子、鱼腥草、野菊花、赤芍、青黛、小檗碱，见表 1。

表 1　6 种中草药对 2 种多重耐药菌作用对比

细菌	n	赤芍	青黛	五倍子	野菊花	鱼腥草	小檗碱
MDR-AB	10	8	2	512	8	16	2
MDR-PA	10	8	4	1 024	16	32	2

注：表内数字代表抗菌效价中位数，以能抑制试验细菌生长的最高稀释度为 MIC，如 8 表示将 100%中草药提取原液稀释成 1∶8 时，该菌的 MIC 为 8

2.2　6 种中草药的逆转细菌耐药性作用　五倍子与小檗碱对 MDR-AB 与 MDR-PA 的敏感性在逆转前后的抑菌圈直径均值比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。但逆转前后抑菌圈直径均值的差值小于 3 mm，6 种中草药材对 MDR-AB 与 MDR-PA 逆转细菌

耐药性不明显。见表 2、3。

表 2　6 种中草药对 10 株 MDR-AB 逆转耐药性后药敏直径($\bar{x}\pm s$, mm)

抗菌药物	赤芍	青黛	五倍子*	野菊花	鱼腥草	小檗碱*	阴性对照
阿米卡星	6.3±0.48	6.1±0.32	9.0±0.67	7.1±0.57	6.7±0.48	8.0±0.67	6.8±0.63
庆大霉素	6.1±0.32	6.1±0.32	7.0±0.47	6.2±0.42	6.1±0.32	7.0±0.47	6.2±0.42
哌拉西林	6.1±0.32	6.2±0.42	7.1±0.47	6.1±0.32	6.1±0.32	6.1±0.32	6.2±0.42
头孢噻肟	6.1±0.32	6.1±0.32	8.3±0.48	6.1±0.32	6.0±0.00	8.3±0.48	6.1±0.32
头孢吡肟	7.2±0.42	7.2±0.42	10.1±0.57	7.6±0.52	7.2±0.42	9.2±0.42	7.7±0.48
环丙沙星	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00
亚胺培南	6.3±0.48	6.2±0.42	7.2±0.42	6.1±0.32	6.1±0.32	8.1±0.32	6.2±0.42
多黏菌素 B	14.4±0.70	14.3±0.67	15.0±0.67	15.1±0.57	14.3±0.48	16.8±1.12	15.0±0.67

注：与阴性对照比较，* $P<0.05$

表 3　6 种中草药对 10 株 MDR-PA 逆转耐药性后药敏直径($\bar{x}\pm s$, mm)

抗菌药物	赤芍	青黛	五倍子*	野菊花	鱼腥草	小檗碱*	阴性对照
阿米卡星	14.4±1.71	14.4±0.97	16.4±1.07	15.2±0.92	15.1±0.58	15.1±0.99	15.1±0.87
庆大霉素	8.1±0.57	8.3±0.67	9.1±0.99	8.1±0.57	8.2±0.79	10.1±0.99	7.9±0.57
哌拉西林	9.3±2.26	9.4±1.90	10.8±1.87	9.3±1.89	9.3±1.89	11.1±2.18	9.3±2.00
头孢噻肟	11.2±2.35	11.3±1.34	12.8±1.75	11.3±2.11	11.3±1.95	13.2±1.69	11.1±1.85
头孢吡肟	18.3±1.70	18.2±1.69	21.2±2.20	19.3±1.42	18.4±1.90	19.8±1.69	19.3±1.70
环丙沙星	6.0±0.00	6.1±0.32	6.4±0.52	6.1±0.32	6.2±0.42	6.3±0.48	6.2±0.42
亚胺培南	6.1±0.32	6.1±0.32	8.1±0.88	6.1±0.32	6.1±0.32	8.3±0.48	6.2±0.42
多黏菌素 B	21.4±2.27	21.4±2.07	21.9±1.91	21.9±2.02	21.3±1.70	21.8±1.77	21.8±2.04

注：与阴性对照比较，* $P<0.05$

3　讨　论

自抗菌药物在临床应用以来，其在治疗病原菌感染方面起到极其重要的作用，成为二十世纪微生物学对人类的最大贡献之一。但随着抗菌药物的不合理使用，耐药菌已经大量产生，多重耐药菌不断增加，甚至出现泛耐药菌株[7]，单一抗菌药物治疗往往以失败而告终，尤其是泛耐药铜绿假单胞菌与鲍曼不动杆菌需要亚胺培南与多黏菌素联合治疗[8-9]。新药的研发速度远跟不上细菌耐药的速度，加之很多抗菌药物有很多不良反应，给临床抗感染治疗带来极大困难。

中草药抗菌作用有着悠久的历史，近年来的研究已经表明，中草药的确有抗菌，延缓、消除细菌耐药性的作用[10-12]。中草药的抗菌机制可以分为两类，一类是通过各种途径直接对细菌进行抑制；第二类是通过提高人体的免疫力来抗菌。目前对中草药提高人体免疫力抗菌的这种间接方式研究较少，专注于中草药直接抗菌作用的研究较多，也取得了许多成果。一种抗菌、抑菌的中草药材中可能含有多种抑菌、抗菌的活性成分，有多种抑菌、抗菌的作用靶点，细菌不易对这样的单一中草药材产生抗药性突变[13]。某些中草药的抑菌成分，可通过多种抑菌、抗菌途径起作用，也具有多种作用靶点，如金建玲等[10]发现小檗碱能与细菌核酸结合，而产生抑制细菌 DNA 复制、RNA 转录、蛋白质翻译等作用，且其他研究还发现其能与细菌蛋白质结合，并因此干扰多种酶的活性[14]，还能增加细菌细胞膜的通透性[15]。近几年，中草药逆转耐药性的机制作为中草药抗菌研究的一个新的领域悄然兴起，近年来得到的一些成果也给医疗工作者带来了巨大的想象空间，中草药可否改变即将面临无药可用的尴尬局面呢？本文就中草药对 MDR-AB、MDR-PA 抑菌与逆转细菌耐药性作用进行了探索研究。

铜绿假单胞菌与鲍曼不动杆菌为条件致病菌，是医院内感染的两种主要病原菌[16-17]，在抗菌药物广泛使用情况下容易出现多重耐药菌株。常见抗菌药物不能用于临床治疗的情况下，如何选择一些具有抗菌作用的中草药成为一种潜在的可行性途径。本研究的抑菌实验中，用 2 倍稀释法检测中草药单体对 MDR-AB 与 MDR-PA 的抑菌作用，6 种中草药对 MDR-AB 与 MDR-PA 均有不同程度的抑菌作用，五倍子对 MDR-AB 与 MDR-PA 抑菌效价为 512～1 024，抑菌作用最强，抑菌作用由强到弱依次为五倍子、鱼腥草、野菊花、赤芍、青黛、小檗碱。中草药煎煮

提取物成分复杂，使用剂量也比较大[18]，单一中草药口服后血药浓度可能达不到体外试验时最小抑菌浓度。临床常用复方中草药制剂或中西药联合方式治疗感染性疾病[19-20]。但随着科学技术的进步，中草药抗菌活性成分的研究将越来越充分，中草药抗菌活性组分纯化技术的提高，以及对中草抗菌药活性成分的抗菌效价的提高，必将使中草药在抗菌治疗方面得到长足发展。本次实验结果也表明中草药可以作为后抗菌药物时代一个新的选择，随着祖国医药日新月异的发展，中医药将在抗多重耐药感染领域发挥重要作用。

中草药能够逆转细菌耐药性的效果是明确的[21]，如果能够使 MDR-AB 与 MDR-PA 部分或全部恢复对抗菌药物的敏感性，则对临床治疗多重耐药菌感染具有重要意义。本实验通过中草药与多重耐药菌孵育 35 ℃24 h，观察孵育前后 K-B 法检测的抑菌圈直径变化，结果显示五倍子与小檗碱对 MDR-AB 与 MDR-PA 的敏感性在逆转前后的抑菌圈直径均值比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。但逆转前后抑菌圈直径均值的差值小于 3 mm，6 种中草药对 MDR-AB 与 MDR-PA 的耐药性逆转不明显。该结果与王洁等[22]研究结论相似，说明细菌耐药性逆转率低。但无论中草药抑菌与逆转细菌耐药性的体外试验结果怎样，在体内及血清药理等方面值得进一步探讨。

综上所述，中草药研究已经成为人们关注的热点，其现代化也已列入国家中长期发展规划。中草药成为缓解和控制细菌耐药性难题的一条可行性途径，在治疗多重耐药菌或泛耐药菌感染方面应该得到发展[23]，这方面的研究应该得到关注，力争发扬祖国医学，提升中草药在国际上的竞争力。

参考文献

[1] 段欣冉，姜志辉，杨相海，等. 中药抑制鲍曼不动杆菌研究进展[J]. 中国感染控制杂志，2017，16(6)：577-581.

[2] 宓伟，曲巍. 对抗绿脓杆菌的中药筛选及联合应用的研究[J]. 滨州医学院学报，2012，35(5)：359-361.

[3] 何先元，李坤，喻录容，等. 53 味清热类中药对绿脓杆菌抑菌作用的聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20(20)：222-225.

[4] 李春辉. MDR、XDR、PDR 多重耐药菌暂行标准定义—国际专家建议[J]. 中国感染控制杂志，2014，13(1)：62-64.

[5] 李建志，刘文丽，王亚贤. 9 种中草药抗菌作用实验研究[J]. 中医药学报，2012，40(1)：45-46.

[6] 芦亚君，程宁. 3 种中药方剂逆转大肠杆菌耐药性的实验观察[J]. 西北药学杂志，2007，22(6)：309-311.

[7] 张小江，张辉，窦红涛，等. 2012 年北京协和医院细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志，2014，14(2)：104-111.

[8] 杨海慧，韩立中，刘怡菁，等. 亚胺培南联合多黏菌素 B 对不同表型铜绿假单胞菌体外抗菌活性的研究[J]. 检验医学，2013，28(1)：1-6.

[9] 刘立凡，陈佰义. 多黏菌素 B 与亚胺培南联用对泛耐药鲍曼不动杆菌体外抗菌活性的研究[J]. 中国医疗前沿，2013，8(2)：4-5.

[10] 金建玲，徐轲，高培基. 中西药联合使用在应对细菌抗药性方面的优势[J]. 中医药学报，2011，39(4)：95-98.

[11] ZHANG G B, GONG S Y, YU D H, et al. Propolis and herba epimedii extracts enhance the non-specific immune response and disease resistance of Chinese sucker, myxocyprinus asiaticus[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(3)：467-472.

[12] 贾云鹏，程宁. 中药对大肠埃希菌抗菌药物耐药性逆转作用的实验研究[J]. 陕西中医，2009，30(3)：366-368.

[13] 陈美玲，王剑，周红霞，等. 中药饮片对多重抗菌药物耐药细菌的抑菌作用[J]. 中医药学报，2012，40(2)：10-13.

[14] 蔡燕，邢艳，谢文光. 中药抗菌作用研究进展[J]. 中国医药导报，2011，8(6)：9-10.

[15] KAPP E, WHITELEY C. Protein ligand interactions：isoquinoline alkaloids as inhibitors for lactate and malate dehydrogenase[J]. J Enzyme Inhib, 1991, 4(3)：233-243.

[16] 袁莉莉，丁百兴，沈震，等. 碳青霉烯类抗菌药物耐药铜绿假单胞菌感染的临床研究[J]. 中国感染与化疗杂志，2017，17(2)：121-126.

[17] 张岩岩，朱婉，张静萍，等. 多重耐药鲍曼不动杆菌血流感染危险因素分析[J]. 中国感染与化疗杂志，2017，17(2)：135-139.

[18] GEORGE T, FRANK R. Mutidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials[J]. Antimicrob Agent Chemother, 2002, 46(10)：3133.

[19] 崔煦然，赵京霞，郭玉红，等. 细菌耐药背景下中药抗菌作用研究进展[J]. 世界中医药，2016，11(10)：1940-1944.

[20] 李玉洋. 中西医结合治疗慢性盆腔炎的疗效观察[J]. 中国医药指南，2017，15(3)：174.

[21] 潘杰，苗霞，刘启波，等. 12 种中药配方颗粒体外逆转临床常见细菌耐药性分析[J]. 检验医学，2016，36(6)：503-508.

[22] 王洁，朱俊豪，张斌，等. 能逆转细菌耐药性的中药的筛选[J]. 中国药学杂志，2014，49(21)：1892-1896.

[23] 李娟，李晓东，杨丽霞，等. 单味中药体外抑菌活性的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17(11)：283-286.

（收稿日期：2017-07-24　修回日期：2017-09-30）