

· 数据挖掘 ·

53 味清热类中药对绿脓杆菌抑菌作用的聚类分析

何先元¹, 李坤¹, 喻录容^{1*}, 刘俊康², 廖巴祥¹, 刘艳霞²

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331; 2. 第三军医大学微生物学, 重庆 400038)

[摘要] 目的:通过对 53 味清热类中药对绿脓杆菌的抑菌作用的聚类分析,了解它们抑菌效果的差异,指导临床用药。方法:通过药敏纸片法测定抑菌环直径和液体培养测定吸光度(A)确定中药的抑菌效果。结果:聚类分析表明清热中药抑制绿脓杆菌效果的类群与传统分类存在不一致现象。结论:临床上对于防治绿脓杆菌的感染,可选用赤芍、胡黄连、黄连、蒲公英、丝瓜络、黄芩、密蒙花等清热类中药。

[关键词] 清热类中药; 绿脓杆菌; 抑菌效果; 聚类分析

[中图分类号] R287.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0222-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200222

Cluster Analysis of 53 Chinese Antipyretic Herbs on Bacteriostatic Effects Against *Pseudomonas Aeruginosa*

HE Xian-yuan¹, LI Kun¹, YU Lu-rong^{1*}, LIU Jun-kang², LIAO Si-xiang¹, LIU Yan-xia²

(1. College of Traditional Chinese Medical, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 401331, China;

2. Microbial Pharmacy of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective:** The bacteriostatic effects of 53 Chinese antipyretic herbs against *Pseudomonas aeruginosa* and their antibacterial difference were classified and confirmed by cluster analysis in order to instruct clinical administration. **Method:** Antibacterial effect of traditional Chinese medicine was ascertained by determination of diameter of inhibition zone K-band in liquid culture. **Result:** The cluster analysis showed that the classification of bacteriostatic *Pseudomonas aeruginosa* effects were not consistent with traditional classification of Chinese antipyretic herbs group. **Conclusion:** For the clinical prevention of *P. aeruginosa* infection, the optional Chinese antipyretic herbs were suggested as *paeoniae radix rubra*, *picrorhizae rhizoma*, *coptidis rhizoma*, *taraxaci herba*, *luffae fructus retinervus*, *scutellariae radix*, *buddlejae flos*, etc.

[Key words] Chinese antipyretic herbs; *Pseudomonas aeruginosa*; antibacterial effect; cluster analysis

绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)或称铜绿假单胞菌,广泛分布于自然界及正常人皮肤、肠道和呼吸道,是临床上较常见的条件致病菌之一,尤其在烧伤感染的病人中,我国多年来的细菌培养结果表明绿脓杆菌占第一位^[1-3]。因其耐药性强,绿脓杆菌的感染率不断上升,感染范围不断扩大,感染的程度愈来愈严重。目前临床多用三代头孢类治疗绿脓杆菌感染,其价格昂贵,副作用大,也由于临床治疗手段快速发展,抗生素药物广泛及不合理的使用,带来的负面效

应是医院感染率上升和耐药菌株的增加,导致产生多重耐药性的绿脓杆菌菌株,成为临床上一个治疗难题^[4-6],其对抗生素的多重耐药性导致治疗上缺乏有效药物。由于中草药具有抗菌、低毒、不易产生耐药性等特点与优势,特别是某些清热解毒类中药具有广谱抗菌作用,且药源广泛,价格低廉,具有极大的开发潜能。近年来,国内外对大量的中草药进行了抑菌作用的筛选,在实验和临床研究中都有很大进展,本实验采用模糊聚类分析方法从常用 53 味清热药中筛

[收稿日期] 20131031(018)

[基金项目] 重庆市卫生局科技项目(2012-2-144)

[第一作者] 何先元, 硕士, 教授, 从事中药资源开发与中药药理学研究, Tel:13647653516, E-mail:hxy9418@126.com

[通讯作者] * 喻录容, 从事中药制剂与中药药理学研究, Tel:13101327285, E-mail:yulurong1976@163.com

选抑制绿脓杆菌功效强的中药^[7-16],为研制治疗绿脓杆菌感染的中药制剂和预防绿脓杆菌感染提供思路及其基础研究,旨在筛选出对绿脓杆菌有抑菌作用的药物,指导临床合理用药,开展抗菌中草药的筛选和应用研究对耐药细菌的防治具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 清热药物 所有药物于重庆市沙坪坝区西部药城采购各饮片各 10.0 g 备用。其中清热泻火药(13种):石膏、寒水石、知母、栀子、竹叶、芦根、夏枯草、决明子、谷精草、密蒙花、青箱子、夜明砂、天花粉;清热燥湿药(6种):黄芩、黄连、黄柏、龙胆草、苦参、秦皮;清热解毒药(23种):金银花、连翘、大青叶、板蓝根、青黛、紫花地丁、蒲公英、败酱、大血藤、白头翁、鸦胆子、白鲜皮、土茯苓、漏芦、山慈菇、马勃、山豆根、射干、白花蛇舌草、半枝莲、虎耳草、穿心莲、白蔹;清热凉血药(7种):地黄、玄参、牡丹皮、赤芍、紫草、白薇、丝瓜络;清虚热药(4种):青蒿、地骨皮、银柴胡、胡黄连。

1.1.2 菌种 耐氯霉素绿脓杆菌(PA)由第三军医大学附属西南医院烧伤科分离鉴定并由第三军医大学天然药化教研室保存。

1.1.3 仪器 KH-600DE 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司),SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),HFsafe-1200 型生物安全柜(力康发展有限公司),H2100R 型低温高速离心机(湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司),HH-B11-600 型电热恒温培养箱(上海市跃进医疗器械一厂),DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司),Infinte M200 型酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 中药的提取 浓缩所购需中药先置于真空干燥箱中 80 ℃ 干燥 60 min,然后打粉。根茎类药物打粉 1 min,全草及花类药物打粉 0.5 min,矿物类药物研细即可,种子不做处理。称取各中药 5.0 g,置于 100 mL 锥形瓶中。花及全草类药物加去离子水 15 mL,其他加去离子水 10 mL,常温浸泡 4 h,然后于超声波清洗器中 80 ℃,100 kHz 超声 30 min,趁热抽滤。再各加去离子水 10 mL,然后于超声波清洗器中 80 ℃,100 kHz 超声 10 min,趁热抽滤。两次滤液合并于 100 mL 锥形瓶中,于真空干燥箱中 80 ℃ 干燥。液体浓缩至 5 mL 左右,转移至 10 mL EP 管中,并用去离子水少量多次清洗锥形瓶,洗液转移至 10 mL EP 管中,并定容到 EP 管圆环处。于 4 ℃ 冰箱中静置过夜,于低温高速离心机中 4 ℃ 下 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,冷藏于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2.2 药敏纸片的制作 取一张较厚的滤纸,用打孔器打成直径 5 mm 的小圆片 120 个,将中药的编号用黑色签字笔标记于纸片上(另记一张“空白”),标记 2 份。置于玻璃平板中于电热恒温鼓风干燥箱中 100 ℃ 烘 30 min,取出冷却,按编号加入药材浓缩液 10 μL 每片(空白对照加 10 μL 去离

子水)。然后放于电热恒温鼓风干燥箱中 60 ℃ 烘干,再重复加药 4 次,烘干后 4 ℃ 保存待用。

1.2.3 菌种的培养方法

1.2.3.1 固体培养基 DPA 培养基示脲、K₂SO₄、MgCl₂、甘油琼脂、淀粉、吐温-20 等,溶于 800 mL 去离子水中加热使各组分充分溶解,冷却后用 2 mol·L⁻¹ NaOH 调节 pH 至 7.2~7.4,加水至 1 000 mL。分装于 5 个 250 mL 的锥形瓶中,200 mL 每瓶。121 ℃ 高压灭菌 20 min。待温度降至 50 ℃ 左右加入 10% FeSO₄ 上清液 0.25%,摇匀后立即倒平板,培养皿直径 9 cm,20 mL/皿。

1.2.3.2 液体培养基 肉汤膏培养基牛肉膏、蛋白胨、NaCl、甘油、吐温-80 等,溶于 800 mL 去离子水中,2 mol·L⁻¹ NaOH 调节 pH 至 7.4~7.6,加去离子水至 1 000 mL,分装于 5 个 250 mL 的锥形瓶中,200 mL/瓶。121 ℃ 高压灭菌 20 min。冷却后分装于 15 mL 无菌 EP 管中,5 mL/管。

1.3 绿脓杆菌的复苏及稀释 用接种针蘸取有本实验室保存的耐氯霉素 PA,按三线法涂在 DPA 培养基上,于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h。在平板上取一形状规则的菌落,用生理盐水稀释后取 100 μL 涂布于一块 DPA 培养基上,于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h。刮取此平板上的细菌,用生理盐水稀释,用比浊法稀释至 1.5 × 10⁹,再按 10 倍稀释法稀释至 1.5 × 10⁶ 待用。

1.4 药敏试验 取稀释的绿脓杆菌(100 μL/皿)涂布于 DPA 培养基上。在培养基上加药敏纸片。置于 37 ℃ 恒温箱中培养 24 h,测量抑菌环直径。

取稀释的绿脓杆菌(100 μL/管)加入 15 mL EP 管中。加中药浓缩液 100 μL 每管。置于 37 ℃ 恒温箱中培养 24 h。3 000 r·min⁻¹ 离心 1 min。用 20 μL 移液枪于每管取出 20 μL 培养液上清液加入 96 孔板。使用酶标仪于 620 nm 处测吸光度(A)。

2 结果与分析

2.1 清热药抑菌环效果纸片法 测抑菌环的结果数值越大表明抑菌效果越好。从表 1 数据,抑菌效果较好的清热中药有赤芍、胡黄连、黄连、蒲公英、丝瓜络、黄芩、密蒙花、秦皮、土茯苓、连翘、白蔹、青蒿等。

2.2 清热药液体培养 绿脓杆菌效果肉汤法检测 A 结果数值越小表明抑菌效果越好。从表 2 数据发现,抑菌效果较好的中药有石膏、丝瓜络、芦根、赤芍、谷精草、紫草、密蒙花、竹叶、夏枯草、银柴胡、大青叶、地黄、蒲公英、黄连、地骨皮等。

2.3 清热药抑菌效果聚类分析 按照数值越大表明抑菌效果越好,将纸片法测定的抑菌环直径与 A 的倒数使用 SPSS 19.0 进行聚类分析,所得树状图 1。聚为 5 类:第 1 类有秦皮、土茯苓、黄芩、连翘、白蔹、青蒿、密蒙花、夏枯草、紫草、紫花地丁;第 2 类有黄连、蒲公英、胡黄连、赤芍、丝瓜络;第 3 类有鸦胆子、白花蛇舌草、黄柏、漏芦、寒水石、玄参、金银花、虎耳草、地胆草、马勃、败酱、山慈菇、大青叶、地骨皮、银柴胡、板蓝根、白头翁、半枝莲;第 4 类有天花粉、射干、白薇、白鲜皮、牡丹皮、决明子、青黛、夜明砂、大血藤、青箱子、芦根、

表 1 清热药抑菌环效果

中药	抑菌环直径/mm	中药	抑菌环直径/mm	中药	抑菌环直径/mm	中药	抑菌环直径/mm
石膏	5.94	竹叶	7.08	谷精草	6.72	天花粉	5.36
寒水石	8.14	芦根	7.12	密蒙花	11.58	秦皮	11.50
知母	7.12	夏枯草	9.78	青箱子	6.28	白花蛇舌草	8.44
栀子	6.72	决明子	5.96	夜明砂	5.98	半枝莲	8.96
黄芩	11.64	黄柏	8.22	苦参	7.16	虎耳草	7.80
黄连	12.34	龙胆草	7.40	胡黄连	12.72	穿心莲	7.08
金银花	7.92	蒲公英	12.3	土茯苓	11.48	白薇	11.00
连翘	11.26	败酱	9.56	漏芦	8.28	银柴胡	8.96
大青叶	9.20	大血藤	5.94	山慈菇	9.72	丝瓜络	12.18
板蓝根	8.62	白头翁	8.68	马勃	7.60	紫草	10.28
青黛	5.92	鸦胆子	8.48	山豆根	6.76	白薇	5.26
紫花地丁	10.42	白鲜皮	6.18	射干	5.20	赤芍	13.16
地黄	6.78	牡丹皮	6.24	青蒿	10.84	地骨皮	9.06
玄参	8.32						

表 2 清热药液体培养绿脓杆菌的 A

中药	A	中药	A	中药	A	中药	A
石膏	0.340 8	竹叶	0.518 8	谷精草	0.448 7	天花粉	0.837 5
寒水石	0.696 4	芦根	0.407 6	密蒙花	0.514 0	秦皮	0.780 1
知母	0.738 1	夏枯草	0.521 8	青箱子	0.636 7	白花蛇舌草	0.870 0
栀子	0.625 5	决明子	0.709 6	夜明砂	0.750 9	半枝莲	0.783 0
黄芩	0.719 5	黄柏	0.787 0	苦参	0.768 9	虎耳草	0.813 1
黄连	0.613 7	龙胆草	0.803 3	胡黄连	0.835 2	穿心莲	0.958 9
金银花	0.885 9	蒲公英	0.608 3	土茯苓	0.773 7	白薇	0.922 2
连翘	0.811 2	败酱	0.814 4	漏芦	0.739 8	银柴胡	0.571 9
大青叶	0.584 5	大血藤	0.662 8	山慈菇	0.816 0	丝瓜络	0.375 6
板蓝根	0.658 7	白头翁	0.735 2	马勃	0.701 5	紫草	0.471 1
青黛	0.704 3	鸦胆子	0.840 1	山豆根	0.856 8	白薇	1.203 1
紫花地丁	0.686 7	白鲜皮	0.823 4	射干	0.943 4	赤芍	0.447 7
地黄	0.586 4	牡丹皮	0.753 7	青蒿	1.077 4	地骨皮	0.624 3
玄参	0.673 6						

谷精草、知母、苦参、穿心莲、山豆根、栀子、地黄、竹叶；第 5 类有石膏。

3 结论与讨论

在清热药抗菌作用的实验中采用的方法多为体外抗菌实验法,本研究采用药敏试验证实赤芍、胡黄连、黄连、蒲公英、丝瓜络、黄芩、密蒙花、秦皮、土茯苓、连翘、白薇、青蒿等清热药物对绿脓杆菌有较好的抑菌作用。

仅从抑制绿脓杆菌的效果聚类来看,清热药不存在与传统分类对应聚类,如石膏传统分类与知母天花粉同属于清热

泻火药,在抑制绿脓杆菌的效果方面并没有和知母天花粉属于一类。

据研究绿脓杆菌为天然耐药菌,其耐药性的主要原因是生物膜的形成,清热药水煎液对绿脓杆菌有较强的抑菌作用,并对绿脓杆菌生物膜也有同样的抑制作用,这为临床解决绿脓杆菌耐药性提供一些思路,并为开发中药类抗菌药提供依据。凭借体外抗菌实验来筛选清热药中具有抗菌作用的药具有一定的局限性,因为每味中药都有多种作用,在使用过程中往往是多种作用相互影响产生结果;如果要明确评

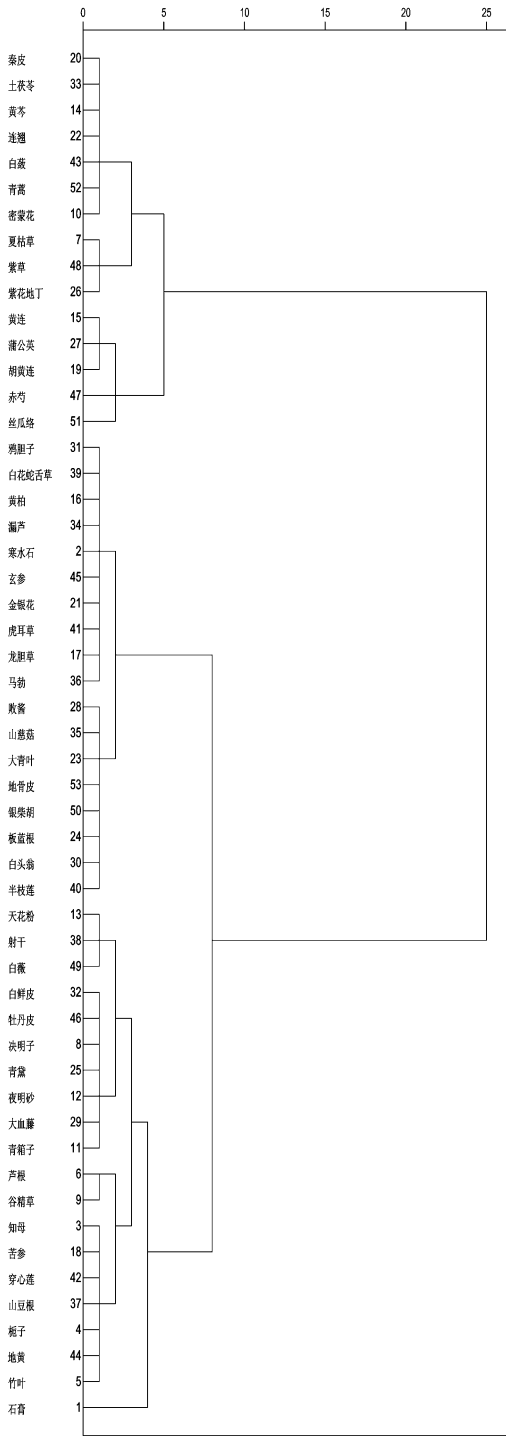


图1 53味清热药聚类树状谱

价某一味药的作用应该建立相关多种体内外实验方法,对具有抗菌功效的中药进行抗菌作用评价时,要根据该药主治病症、细菌类型、药效学及药动学等全面进行综合分析评价。

[参考文献]

[1] 藏文巧,申坤,梁晨,等. 30种绿脓杆菌的抗菌药物耐药性分析[J]. 中国医学前沿,2009,4(20):98.

[2] 郭振荣,高维谊,贺立新,等. 对几种绿脓杆菌药物疗效筛选的实验研究[J]. 中华整形烧伤外科杂志,1995,11(6):421.

[3] 丛延广,刘俊康,袁泽涛,等. 形态受培养温度影响的绿脓杆菌菌株[J]. 微生物学通报,2001,28(2):76.

[4] 杜美华,黄本成. 细菌药敏试验比色法的探讨[J]. 临床军医杂志,2000,28(2):26.

[5] 王亚霞,苏振杰,任凤秋. K-B纸片琼脂扩散法检测细菌药物敏感试验的影响因素分析[J]. 中国医药指南,2009,7(5):41.

[6] 张海沙. 绿脓杆菌的分布及耐药分析[J]. 中国社区医师,2012,14(2):284.

[7] 王济兴,夏瑞雪. 144株绿脓杆菌药敏结果分析[J]. 河北医药,2010,32(16):2278.

[8] 陈林娜,周立勤,王汉敏,等. 中药对临床耐药菌株的体外抑菌试验观察[J]. 中华医院感染学杂志,2005,15(1):118.

[9] 蔡启娟,汪辉,陈向东. 中药对临床耐药菌株体外抗菌活性的研究[J]. 药物生物技术,2009,16(6):568.

[10] 陈娟,肖洋,池明,等. 10种清热解毒类中药对绿脓杆菌体外抑菌试验的研究[J]. 吉林医学,2006,27(11):1386.

[11] 袁秀丽,吕嘉彬,程慧娟. 金银花水煎液抗绿脓杆菌生物膜作用及其与庆大霉素的协同作用[J]. 西北药学杂志,2010,25(3):201.

[12] 李洪岭,王光舜. 中药治疗绿脓杆菌感染7例[J]. 山东中医杂志,1985,6(3):16.

[13] 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.

[14] 张传美,刘海生,杨海燕,等. 16种中药对水貂绿脓杆菌的体外抑菌试验[J]. 动物医学进展,2012,33(12):214.

[15] 钟有添,马廉兰. 中草药和常用抗生素对绿脓杆菌的抑菌实验[J]. 赣南医学院学报,2001,21(3):244.

[16] 滕凤兰,陶红,林庆锋,等. 治疗手足口病中药的模糊聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):4.

[责任编辑 邹晓翠]