

伤寒方恢复金黄色葡萄球菌感染小鼠血清抗菌活性的研究

缪珠雷, 徐栋梁, 包寅, 刘丹, 王易, 李玉虎*
(上海中医药大学病原生物学教研室, 上海 201203)

[摘要] 目的: 验证《伤寒论》所载方剂抗金黄色葡萄球菌感染的作用。方法: 先进行 ip 金黄色葡萄球菌和不注射金葡菌的动物血清的抑菌作用比较研究, 然后以 19 种《伤寒论》中所载之方剂给金葡菌腹腔感染小鼠模型 ig, 取血清观察其抑菌效果。结论: ip 金葡菌使血清的抑菌能力降低, 而 19 种伤寒方剂可以扭转这一过程。结果: 《伤寒论》所载部分方剂在一定程度上可恢复机体抗金葡菌感染的能力。

[关键词] 伤寒方; 金黄色葡萄球菌; 血清

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0119-03

Experimental Study on Anti-exogenous Febrile Disease Prescriptions in Restoring the Inhibitory Activity of Serum from Mouse Infected by Staphylococcus aureus

MIAO Zhu-lei, XU Dong-liang, BAO Yin, LIU Dan, WANG Yi, LI Yu-hu*
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To study the inhibitory effect against Staphylococcus aureus of 19 Chinese herbal drug Compound Prescriptions from 《Treatise on Exogenous Febrile》. **Method:** Serum as obtained from the mice which were infected by Staphylococcus aureus inoculated in abdomen and those which were not infected. The inhibitory effect against Staphylococcus aureus of the serum were tested and compared. Then 19 Chinese herbal drug compound prescriptions chosen from 《Treatise on Exogenous Febrile》 was fed to the mouse which were infected by Staphylococcus aureus and their serum was tested to verify the inhibitory effect against Staphylococcus aureus. **Result:** Result shows that Staphylococcus aureus can consume lots of the anti-bacterial substances in the body, thus reduce the level of anti-bacterial capacity of those mice infected by Staphylococcus aureus, compared to those non-infected, and 19 Chinese herbal drug compound prescriptions can reverse the process. **Conclusions:** The listed Chinese herbal drug compound prescriptions can restore the inhibitory capacity of the body against Staphylococcus aureus.

[Key words] anti-exogenous febrile prescriptions; Staphylococcus aureus; serum

目前, 随着耐药病原体(细菌、病毒和原虫类寄生虫)的大量出现, 感染性疾病又重新成为临床难题。《伤寒论》收集了大量治疗诸种外感热病的方

剂, 疗效显著, 世人称为经方, 其中很多已成为当代中医临床治疗感染性疾病的常用方剂^[1]。目前用来考察中药方剂抗细菌感染的方法主要有: 体外抑菌试验, 在体的动物存活时间测定以及药物血清法^[2]。药物血清法是目前较为常用的方法, 尤其适合对药物的量效关系作精确的分析。在本研究中, 为了更真实的模拟细菌感染过程, 我们对文献^[2]中药物血清法的动物造模方法作了改进, 即在灌药之前先对小鼠 ip 一定量金黄色葡萄球菌(金葡菌), 同

[收稿日期] 2010-01-13

[基金项目] 国家科技部“973”项目(A006560901); 上海市教委重点学科(J50301)

[通讯作者] * 李玉虎, Tel: 021-51322149, E-mail: lishutcm@hotmail.com

时进行未注射金葡菌的动物对比研究。

1 材料

1.1 药物 19 种伤寒方剂: 小柴胡汤, 小承气汤, 甘草泻心汤, 大陷胸汤, 麻杏石甘汤, 白通汤, 小陷胸汤, 大承气汤, 黄连阿胶汤, 栀子生姜豉汤, 桂枝去桂加茯苓白术汤, 茯苓桂枝白术甘草汤, 麻黄升麻汤, 桂枝附子汤, 桂枝汤, 葛根加半夏汤方, 桔梗汤, 栀子豉汤, 白虎加入参汤。按《伤寒论》^[3] 中各方的剂量混合, 冷浸后煎煮 2 次, 滤液合并后浓缩至 125 mL 备用。生药饮片由上海康桥饮片厂提供, 上海中医药大学大学生药学教研室周秀佳教授鉴定。

1.2 菌株 金黄色葡萄球菌(金葡菌), 编号 SIDC (B) 26003, 上海市药品监督所提供, 上海中医药大学病原生物学教研室保存。

1.3 动物 昆明种小鼠, 雄性, 6 周龄, 体重(18 ~ 20) g, 清洁级, 由上海中国科学院动物中心提供, 合格证号 SCXK(沪) 2007-0005。

1.4 试剂 营养肉汤培养基和营养琼脂培养基, 上海中科昆虫生物技术开发有限公司提供。

2 方法

2.1 动物分组造模 取小鼠分为两组, 每组 10 只, 1 组 ip 金葡菌培养液(10^8 CFU · mL⁻¹) 0.5 mL, 另 1 组不注射金葡菌。然后两组小鼠均以生理盐水 ip, 连续 4 d, 1 次/d, 每次 0.5 mL。

2.2 血清采集 注射后 4 d, 无菌条件下摘小鼠眼球采血, 血液置于 4 ℃ 冰箱过夜后, 离心后得血清, 平板划线确定无杂菌污染, 置冰箱冷藏备用。

2.3 血清抑菌力测定 取小鼠血清 0.5 mL 与 0.5 mL 接种了少量金葡菌肉汤(10^2 CFU · mL⁻¹) 混合, 然后放入 37 ℃ 培养箱培养 18 h 后取出, 经过一定梯度稀释后, 取 100 μL 置于培养皿并加入保温于 45 ℃ 的肉汤琼脂迅速混匀, 待凝固后放入 37 ℃ 培养箱, 培养 18 h 后计数平板上的菌落数。根据之前的稀释比例换算出原液的细菌数, 比较两组血清抑制细菌能力的差异。

2.4 动物给药 取 ip 金葡菌造模小鼠, 分为不同方剂组及对照组, 每组 10 只, 给药组小鼠 ig 相应方剂水煎液 25 mL · kg⁻¹, 药物剂量经换算相当于人临床剂量 10 倍, 对照组 ig 生理盐水 0.5 mL/只, 连续 4 d, 1 次/d。

2.5 血清采集及抑菌力测定 方法同 2.2, 2.3。根据用药组与对照组合血清培养液中的细菌数, 比较

伤寒方剂含药血清抗菌作用的大小。

3 结果

3.1 注射与不注射金葡菌小鼠血清细菌数量比较 结果显示, ip 感染金葡菌的小鼠其血清培养液中细菌数量远远超过不注射金葡菌的小鼠血清培养液细菌量, 见表 1。提示前者对细菌的抑制能力大为降低($P < 0.01$)。

表 1 注射金葡菌的造模小鼠和不注射金葡菌的小鼠血清细菌数量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	细菌量 / 10^7 CFU · mL ⁻¹
注射金葡菌小鼠	2.76 ± 0.13
未注射金葡菌小鼠	1.10 ± 0.05 ¹⁾

注: 与对照组相比¹⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 伤寒方剂在体给药小鼠血清抑菌能力检测 结果显示, 19 种伤寒方剂 ig 可明显提高小鼠血清的抑菌能力, 表现在给药组血清中细菌生长量明显低于生理盐水组, 见表 2。

表 2 19 种伤寒方剂 ig 对小鼠血清细菌数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	细菌量 / 10^7 CFU · mL ⁻¹
生理盐水对照	2.76 ± 0.13
小柴胡汤	1.31 ± 0.06 ¹⁾
小承气汤	1.42 ± 0.10 ¹⁾
甘草泻心汤	1.47 ± 0.07 ¹⁾
大陷胸汤	1.52 ± 0.18 ¹⁾
麻杏石甘汤	1.64 ± 0.03 ¹⁾
白通汤	1.68 ± 0.09 ¹⁾
小陷胸汤	1.70 ± 0.04 ¹⁾
大承气汤	1.82 ± 0.04 ¹⁾
黄连阿胶汤	1.85 ± 0.09 ¹⁾
栀子生姜豉汤	1.89 ± 0.06 ¹⁾
桂枝去桂加茯苓白术汤	1.93 ± 0.13 ¹⁾
茯苓桂枝白术甘草汤	1.94 ± 0.17 ¹⁾
麻黄升麻汤	1.95 ± 0.11 ¹⁾
桂枝附子汤	2.04 ± 0.04 ¹⁾
桂枝汤	2.12 ± 0.06 ¹⁾
葛根加半夏汤方	2.13 ± 0.08 ¹⁾
桔梗汤	2.15 ± 0.03 ¹⁾
栀子豉汤	2.16 ± 0.10 ¹⁾
白虎加入参汤	2.20 ± 0.04 ¹⁾

4 讨论

根据现代微生物学和免疫学理论^[4], 一般认为, 当致病细菌进入人体或动物体内后, 一方面可以作为免疫原激活机体的免疫系统, 诱导产生相应的特异的或非特异的抗菌物质, 如抗体、补体、溶菌酶、防御素、乙型溶素、调理素、吞噬细胞杀菌素等, 使机体产生对其的抵抗力; 但同时它们又可以大量结合并消耗体内已有的抗菌物质, 降低机体的抵抗力。因此, 细菌能否在体内存活并大量繁殖最终引起疾病, 实际上取决于上述两方面因素, 如果前者占优, 则细菌被清除, 如后者占优, 则最终将导致疾病的发生。

我们研究发现, 注射金葡菌的小鼠的血清体外抑菌能力明显低于未注射金葡菌的小鼠, 而 19 种候选伤寒方剂可以有效逆转上述过程, 表现在给药组小鼠血清抑菌活性有不同程度的提高, 提示服用中药以后, 小鼠体内抗菌物质的下降在一定程度上得到了恢复。

这些方剂的可能作用机制尚待进一步研究, 就现有的资料结合这些有效方剂的组成来看, 很多方剂都含有补益类中药, 如人参、大枣、阿胶等, 文献[5]表明这些中药可以促进免疫系统动员, 使其产生抗菌物质; 也有不少方剂含有性味苦寒清热解毒类中药, 如黄芩、大黄、黄连等, 这些中药本身就含有具备抗菌活性的成分如生物碱、皂苷等^[6]。

从这些有效方剂的类别分布来看, 并不专属于某一类。如: 既有属于和解剂的小柴胡汤, 也有属泄下逐水或利水剂的大承气汤、小承气汤、大陷胸汤、茯苓桂枝白术甘草汤, 还有属于解表剂的桂枝汤、麻杏石甘汤、桂枝去桂加茯苓白术汤、葛根加半夏汤方, 其他的还包括属于益气清热的白虎加人参汤和

养阴清热的黄连阿胶汤, 属于排脓剂的桔梗汤, 涌吐剂的栀子生姜豉汤和栀子豉汤, 回阳温阳剂的白通汤和桂枝附子汤, 消痞剂的小陷胸汤和甘草泻心汤等。这些方剂主治虽各有不同, 如有的是通过和解少阳、祛邪扶正来抗菌消炎、增强免疫, 或通过利尿通便作用促进细菌和毒素排出, 或通过发汗解表来散毒退热等, 但均能针对感染性疾病的某个或几个重要环节发挥作用, 提示在治疗感染性疾病时, 除直接针对病原体本身外, 通过充分调动机体自身生理保护机制, 促进排菌排毒, 可以更好的达到阻断病机、改善症状、恢复机体正常生理平衡的效果。

上述研究结果为下一步深入研究这些中药经典方剂的抗感染作用机制、配伍及量效关系打下了基础。

[参考文献]

- [1] 韩俭, 于红娟, 吴勇杰, 等. 中药血清药理学方法学研究——抗菌试验含药血清处理方案的研究[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(1): 47.
- [2] 王莉梅, 金向群. 中药血清化学在中药及中药复方研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1): 77.
- [3] 李顺保. 伤寒论版本大全[M]. 北京: 学苑出版社, 1996: 19.
- [4] 王易. 免疫学导论[M]. 上海: 上海中医药大学出版社, 2007: 260.
- [5] 梁薇. 中药免疫调节作用的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2005, 21(16): 674.
- [6] 邓永中, 陆梦怡. 中药抗菌有效化学物质的研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(18): 110.

[责任编辑 何伟]