

中药复方清热颗粒剂抗急性耐药菌感染的药效作用研究

杨 钧^{1*}, 张淑文², 阴赓宏², 王 红², 任爱民², 张丽霞², 王 超², 王宝恩²
(1. 武警总医院重症监护科, 北京 100039;
2. 首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学内科, 北京 100050)

[摘要] 目的: 观察中药复方清热颗粒剂对急性耐药菌感染药效作用。方法: 新西兰大耳白兔腹腔注射肺炎克雷伯杆菌(ATCC700603)建立急性耐药菌感染兔动物模型, 随机分为 5 组: 正常对照组(A 组)、模型组(B 组)、中西药组(复方清热颗粒剂+头孢地尼, C 组)、西药组(头孢地尼, D 组)、中药组(复方清热颗粒剂, E 组)。造模成功后连续 5d 各治疗组给药 2 次/d, A、B 组给予等量的蒸馏水。观察治疗前后生命体征、血象、免疫功能、炎症损伤及病理组织形态学变化。结果: 中药复方清热颗粒剂降低急性耐药菌感染动物体温(T)、呼吸频率(R), 降低血浆内毒素、IL-10 和 TNF- α 水平的作用与西药头孢地尼相同($P > 0.05$); 中西药组 T, R, 腹腔菌落计数疗后恢复正常, 与正常对照组比较无统计学差异($P > 0.05$), 病死率为 0%, 疗效优于单纯中药、西药组($P < 0.05$), 中西医结合疗效显著提高。结论: 复方清热颗粒剂能够改善急性耐药菌感染动物的一般情况, 降低血浆内毒素, 调节抗炎、促炎细胞因子的含量, 提高中性粒细胞吞噬指数, 减轻模型动物脏器组织的病理损伤, 降低病死率。

[关键词] 复方清热颗粒剂; 头孢地尼; 急性耐药菌感染

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)10-0058-04

Pharmacodynamic Effect of Compound Qingre Granules on Acute Drug-resistance Bacterial Infection

YANG Jun^{1*}, ZHANG Shu-wen², YIN Cheng-hong², WANG Hong², REN Ai-min²,
ZHANG Li-xia², WANG Chao², WANG Bao-en²

(1. Critical Care Medicine Department, General Hospital of Armed Police Force, Beijing 100039, China;
2. Infection and Critical Care Medicine Department, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective** To observe the pharmacodynamic effect of Compound Qingre Granules(QRKL) on acute drug-resistance bacterial infection in rabbit model. **Methods** Applying abdominal injection of ATCC700603, we created the acute drug-resistance bacterial infection of rabbit model and divided them into five groups: normal (A), model (B), QRKL+ Cefdinir Capsules(C), Cefdinir Capsules(D) and QRKL (E). We observed and recorded rabbits' vital signs, hemogram, immune function and inflammatory mediators, etc. Patho- samples were obtained after being sacrificed. **Results** QRKL has the significantly pharmacodynamic effect of treating acute drug-resistance bacterial infection. There are more significant effect through integrating traditional Chinese medicine and antibiotic together. **Conclusion** QRKL can significantly improve the infected rabbits' general conditions, decrease plasma endotoxin level, and regulate cytokines

[收稿日期] 2008-12-01

[基金项目] 北京市重大科技项目(H020920070091); 北京市自然科学基金项目(7052026)

[通讯作者] * 杨 钧, Tel: (010) 88276660; E-mail: yangj8298@163.com

of the acute drug-resistance bacteria infection, while raises nonspecific immunity so as to control the inflammatory reaction and tissue damage and lower the mortality.

[**Key words**] Compound Qingre Granules(QRKL); cefdinir; acute drug-resistance bacterial infection

抗菌药物的广泛应用使得细菌耐药性日趋严重, 治疗耐药菌感染性疾病已成为临床棘手问题。本课题成功地制备了耐药菌腹腔感染兔动物模型, 以具有清热解毒, 通腑泻热功效的中药复方清热颗粒剂为治疗药物, 以头孢地尼为西药对照药, 观察复方清热颗粒剂抗急性耐药菌感染的药效及作用机制, 为中西医结合抗细菌耐药性提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康新西兰大耳白兔 40 只, 雌雄各半, 体重范围 2.25~ 2.5 kg, 均购自北京科宇动物养殖中心。

1.2 造模菌株 产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)肺炎克雷伯杆菌 ATCC700603, 北京友谊医院检验中心保存菌株。

1.3 主要试剂与药物 LB 肉汤培养基每升含蛋白胨 10 g, 牛肉浸膏 5 g, 氯化钠 5 g, 酵母粉 5 g, 葡萄糖 1 g, pH7.4; M-H 培养基, 购自 BD 公司, 批号: 5063705; 血琼脂培养基, 购自天津金章科技发展有限公司, 批号: P112905; 西黄蓍胶, 购自上海化学试剂公司, 批号: 120010716, 加蒸馏水配置成 4% 的溶液, 高温高压灭菌后置 4 °C 冰箱保存备用; 内毒素试剂盒: 上海市医学化验所, 批号: 10170555; IL-10 ELISA 试剂盒: 购自 PapidBio 公司, 批号: 10170555; TNF- α ELISA 试剂盒: 购自 PapidBio 公司, 批号: 11300544。复方清热颗粒剂(败酱草、蒲公英、半枝莲等), 由北京友谊医院制剂室提供, 浓缩成含生药 2.62 g/mL 的混悬液, 置 4 °C 冰箱保存备用; 头孢地尼, 由日本藤泽药品工业株式会社生产, 西安杨森制药有限公司分装[国药准字 J20020060, 生产批号: 1081, 分装批号: 050225309], 将头孢地尼粉剂研细, 加蒸馏水配置成 1% 的混悬液, 置 4 °C 冰箱保存备用。

1.4 实验设备 VITEK 全自动微生物分析系统, 美国, 生物梅里埃公司; OLYMPUS AU5400 生化检测系统, 日本 OLYMPUS 公司; 光电比浊仪, 美国, 生物梅里埃公司; 光学显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; UV-1206 紫外分光光度计, 日本岛津公司。

2 实验方法

2.1 耐药菌腹腔感染模型的制作 健康新西兰大耳白兔 40 只, 适应性喂养 1 周后, 禁食 12 h, 将 ATCC700603 菌液同 4% 西黄蓍胶 3:2 混合后 ip, 剂量 $2.5 \times 10^9 \cdot \text{kg}^{-1}$ 。4 h 后测量肛温、血常规。体温 (T) > 39.5 °C, 白细胞(WBC)总数 > $13 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 者进入实验。

2.2 分组与给药方法 随机分为 5 组: 正常对照组(A)、模型对照组(B)每日予以等量蒸馏水; 中西药组(C)每日予以复方清热颗粒剂 $22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和头孢地尼 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 西药组(D)每日予以头孢地尼 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 中药组(E)每日予以混悬液复方清热颗粒剂 $22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。造模成功后即开始每日分 2 次 ig 给药, 连续 5d。各组动物自由取水, 普通饲料喂养。

2.3 观测指标 治疗前后观察各组兔的行为表现, 测量呼吸频率(R)、心率(HR)、体温(T)、体重(W), 于给药前及 5 d 结束时禁食 12 h 后心脏采血测定相关指标, 处死前留取血清、腹腔菌落计数。处死后留取病理标本。

2.4 统计学处理 用 SPSS for Windows 11.5 统计软件。所有数据均用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间均数比较用 *t* 检验, 多组间均数比较用方差分析。

3 结果

3.1 一般情况 A 组动物饮食、饮水量正常, 活泼好动, 体重增加, 毛色洁白而有光泽; 造模成功后动物蜷缩静卧, 精神萎靡, 对声、光等外界刺激反应迟钝, 呼吸增快, 心率增加, 毛色缺乏光泽, 饮食、饮水量、体重较其它各组明显减少, 病死率达 50%。

3.2 各组实验动物 HR, R, T, W 变化的比较 见表 1。模型组 R, HR, T 较正常对照组显著升高 ($P < 0.01$), 治疗后各治疗组 R, HR, T 较疗前均下降 ($P < 0.05$); C 组、D 组和 E 组治疗后 R, T 均低于 B 组 ($P < 0.05$), C 组疗效优于 D, E 组 ($P < 0.05$), D, E 组间比较无统计学差异; 疗后 C, D 组 HR 低于 B 组 ($P < 0.05$)。

治疗前各组间 W 无显著性差异 ($P > 0.05$), 治疗后 C 组、D 组和 A 组 W 较疗前增加 ($P < 0.05$), B 组存活动物 W 下降 ($P < 0.05$); 疗后 C 组和 A 组 W 高于 B 组存活动物, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。

表 1 各组治疗前后 R, HR, T, W 的变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	测量时间	R (次/min)	HR (次/min)	T (℃)	W (Kg)
正常对照组 A	疗前	43.80 ± 4.49	143.20 ± 11.88	38.52 ± 0.45	2.34 ± 0.04
	疗后	44.40 ± 2.97 ⁴⁾	131.40 ± 6.11 ⁴⁾	38.44 ± 0.55 ⁴⁾	2.49 ± 0.02 ^{1,4)}
模型组(B)	疗前	72.00 ± 5.53	290.38 ± 15.89	40.31 ± 0.37	2.32 ± 0.05
	疗后	74.75 ± 3.40	277.75 ± 8.58	40.10 ± 0.12	2.30 ± 0.10 [*]
中药+西药组(C)	疗前	74.17 ± 5.56	286.00 ± 12.65	40.08 ± 0.26	2.33 ± 0.06
	疗后	51.33 ± 10.48 ^{2,4)}	186.67 ± 44.12 ^{2,4)}	38.95 ± 0.31 ^{2,4)}	2.41 ± 0.07 ^{1,3)}
西药组(D)	疗前	71.86 ± 5.37	285.00 ± 15.55	40.04 ± 0.22	2.34 ± 0.09
	疗后	63.00 ± 4.38 ^{2,4,6)}	221.50 ± 40.35 ^{2,3)}	39.55 ± 0.37 ^{2,3,5)}	2.40 ± 0.09 ¹⁾
中药组(E)	疗前	75.17 ± 6.31	295.00 ± 14.29	40.15 ± 0.12	2.31 ± 0.06
	疗后	60.80 ± 3.63 ^{2,4,5)}	240.00 ± 39.53 ²⁾	39.50 ± 0.37 ^{1,3,5)}	2.39 ± 0.09

注:与本组治疗前比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 B 组同期比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与 C 组同期比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (下同)。

3.3 对各组实验动物肝、肾功能的影响 各组动物肝功能未见异常变化,组间比较无统计学差异($P > 0.05$)。B 组血尿素氮(BUN)较治疗前显著上升($P < 0.01$),同 A 组、各治疗组比较有统计学差异($P < 0.05$),各治疗组未见异常,见表 2。

表 2 各组治疗前后 BUN(mg/dl)变化($\bar{x} \pm s$)

组别	疗前	疗后
A	20.78 ± 4.60	20.53 ± 5.28 ³⁾
B	23.21 ± 4.08	46.38 ± 42.02 ²⁾
C	18.23 ± 4.32	20.08 ± 5.80 ³⁾
D	19.41 ± 7.96	21.65 ± 7.09 ³⁾
E	18.03 ± 4.19	18.48 ± 3.45 ³⁾

3.4 各组实验动物病死率的比较 B 组 D 组 E 组分别死亡 4 只,1 只,2 只,B 组病死率达 50%,A 组、C 组无死亡,病死率显著低于 B 组($P < 0.05$),各治疗组组间比较无统计学差异。

3.5 各组实验动物 WBC 及中性粒细胞吞噬指数 (%) 变化的比较 见图 1~2。造模后各组 WBC、中性粒细胞吞噬指数较 A 组显著升高($P < 0.05$),造模各组间比较无统计学差异($P > 0.05$)。疗后 C、D 组 WBC 降至正常,D 组下降最为显著,显著低于 B 组、C 组和 E 组($P < 0.05$);B 组中性粒细胞吞噬指数显著降低,低于 A 组和各治疗组($P < 0.01$),治疗组中性粒细胞吞噬指数恢复正常与 A 组比较无统计学差异。

3.6 各组治疗前后血浆内毒素、IL-10, TNF- α 变化 见表 3。造模后模型组血浆内毒素、IL-10, TNF- α 显著升高;C 组和 E 组疗后内毒素水平较疗前下

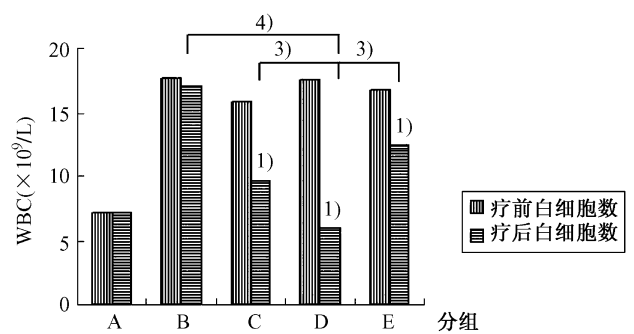


图 1 治疗前后 WBC 变化

注:组内比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;
组间同期比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)

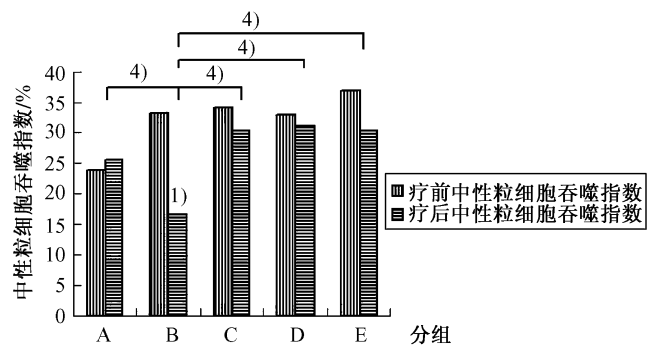


图 2 治疗前后中性粒细胞吞噬指数变化

降($P < 0.05$);B 组 IL-10 TNF- α 升高,显著高于各治疗组和 A 组($P < 0.05$);各治疗组 IL-10 较疗前显著降低($P < 0.01$);C 组 TNF- α 显著低于治疗前($P < 0.05$)。

3.7 病理学观察 模型动物腹腔器官组织:肠、大网膜、肝均出现严重的炎症浸润和组织破坏,胸腔器官肺组织也同时受到累及,出现组织充血、水肿、炎

表 3 各组治疗前后血浆内毒素, IL-10, TNF- α 变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	时间	血浆内毒素 (EU/mL)	IL-10 (μ g/L)	TNF- α (μ g/L)
A	疗前	0.04 \pm 0.02	51.77 \pm 14.20	26.78 \pm 7.97
	疗后	0.04 \pm 0.02 ³⁾	57.19 \pm 43.26 ³⁾	44.87 \pm 8.40 ⁴⁾
B	疗前	0.23 \pm 0.33	102.98 \pm 41.87	53.35 \pm 15.09
	疗后	0.41 \pm 0.48	130.35 \pm 37.04 ²⁾	81.75 \pm 12.98 ²⁾
C	疗前	0.24 \pm 0.04	117.98 \pm 58.89	53.76 \pm 16.35
	疗后	0.14 \pm 0.12 ^{1,3)}	85.82 \pm 6.61 ^{2,3)}	41.92 \pm 7.48 ^{1,4)}
D	疗前	0.11 \pm 0.08	109.61 \pm 53.69	50.48 \pm 13.83
	疗后	0.06 \pm 0.02 ³⁾	82.42 \pm 18.29 ^{2,3)}	54.30 \pm 22.24 ³⁾
E	疗前	0.27 \pm 0.07	105.77 \pm 23.65	56.66 \pm 25.57
	疗后	0.12 \pm 0.11 ^{1,3)}	94.82 \pm 29.33 ²⁾	44.63 \pm 17.92 ⁴⁾

性细胞浸润,肺泡壁的破坏。中药组:腹腔器官及肺炎炎症浸润、充血、水肿、组织破坏均轻于模型组,可见轻度纤维组织增生,同西药组比较无明显差异;中西药组其病理损伤显著轻于单纯中药、西药组,轻度炎症浸润、充血、水肿,组织结构完整,无纤维组织增生。

4 讨论

以往研究显示,中药直接杀菌作用弱于西药抗生素,而中药复方具有配伍协同,整体调节的作用特点,抗细菌耐药性方面具有自身的优势^[1]。临床研究证实:中药复方清热颗粒使脓毒症患者(PCT)水平显著下降,提示其可加强抗感染作用^[3]。本实验进一步提示,中西药结合使用对严重感染所导致的全身炎症反应具有显著治疗作用。

临床研究和动物实验均证实,严重感染时血中内毒素水平明显高于正常^[2]。重症脓毒症患者 IL-10, TNF- α 明显高于健康人,健康成人外周血单核细胞以内毒素刺激后 IL-10, TNF- α 分泌明显增加^[3]。细菌内毒素能够刺激免疫系统和血管内皮系统的炎症效应细胞产生大量促炎细胞因子相互作用形成许多正反馈,导致炎症反应的持续加重,同时伴有多种抗炎因子的产生并可能导致免疫抑制和感染失控^[4-5]。本研究发现,兔腹腔耐药菌感染后 4 h 之内,肝、肾功能无明显改变。5 天后,模型组 BUN 显

著高于正常组,出现氮质血症,肾功能变化同兔内毒素进行性增高,持续存在的高水平 IL-10, TNF- α 和中性粒细胞吞噬指数下降具有时间上的对应关系。本实验发现:中药复方清热颗粒剂通过降低血浆内毒素水平的作用,控制和调节某些炎性介质的产生,同时增强感染动物的非特异性免疫功能,从而提高机体自身清除内毒素能力与直接拮抗内毒素毒力的能力是治疗内毒素血症、防止和减轻 SIRS 的关键。这也正是中医清热解毒法实质——以全面调动机体抗感染能力为主的综合性抗感染原则的体现。

体外实验发现,复方清热颗粒剂含药血清能够有效抑制 ATCC700603 产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)活性,抑酶效果与血清浓度呈正相关,是其治疗产 ESBLs 肺炎克雷伯杆菌急性感染的机制之一^[6]。本实验结果进一步显示,中药复方清热颗粒剂具有直接抑菌、对细菌内毒素及其诱导产生的细胞因子消除和抑制及免疫调节作用,避免了过度的炎症反应对组织器官的损伤作用,从而显著降低急性耐药菌感染模型动物的病死率。

[参考文献]

- [1] 焦 扬,杨效华,刘 娟. 活血解毒法治疗耐药菌致细菌性肺炎 57 例[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(5): 53-54.
- [2] 奚晶晶,王 红,杨 钧. 降钙素原在脓毒症患者中的动态变化及中药干预的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(6): 327-329.
- [3] 陈有为,王宝恩,赵淑颖. 大黄及肺炎 III 号对急性感染内毒素血症的影响[J]. 中西医结合杂志, 1998, 8(11): 654-657.
- [4] 于泳浩,崔乃强,王国林,等. 重型脓毒症患者单核细胞功能改变及大黄素和参脉注射液对其调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(6): 98-101.
- [5] Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock [J]. Lancet, 2005, 365(1): 63-78.
- [6] 杨 钧,张淑文,阴焱宏. 复方清热颗粒剂含药血清对超广谱 β -内酰胺酶的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(11): 40-43.