

# 复方清热颗粒剂含药血清对超广谱 $\beta$ -内酰胺酶的抑制作用

杨 钧<sup>1\*</sup>, 张淑文<sup>2</sup>, 阴赓宏<sup>2</sup>, 王 红<sup>2</sup>, 任爱民<sup>2</sup>, 张丽霞<sup>2</sup>, 王 超<sup>2</sup>, 王宝恩<sup>2</sup>  
(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: 观察复方清热颗粒剂含药血清对超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs) 的抑制作用。方法: 采用紫外分光光度法, 以空白血清、磷酸缓冲液为对照, 以底物氨苄西林紫外吸光度(OD) 变化为指标, 观察不同浓度的中药复方清热颗粒剂含药血清对肺炎克雷伯杆菌 ATCC700603 产生的  $\beta$ -内酰胺酶抑制作用。结果: 复方清热颗粒剂 33.33% 含药血清对 ATCC700603 产  $\beta$ -内酰胺酶抑酶率超过 50%, 抑酶效果与血清浓度呈正相关( $P < 0.05$ ), 与对照组有显著性差异( $P < 0.01$ ); 结论: 中药复方清热颗粒剂含药血清能够有效抑制 ESBLs 活性是其抗产 ESBLs 肺炎克雷伯杆菌急性感染的机制之一。

[关键词] 复方清热颗粒剂; 血清; 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)11-0040-04

## Study on the Depressant Effect of Compound Qingre Granule-Serum on Extended-Spectrum Beta-Lactamase

YANG Jun<sup>1\*</sup>, ZHANG Shu-wen<sup>2</sup>, YIN Cheng-hong<sup>2</sup>, WANG Hong<sup>2</sup>, REN Ai-min<sup>2</sup>,  
ZHANG Li-xia<sup>2</sup>, WANG Chao<sup>2</sup>, WANG Bao-en<sup>2</sup>

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

[Abstract] **Objective:** To observe the depressant effect of the Compound Qingre Granule-Serum(SQ) on extended-spectrum beta-lactamase(ESBLs). **Methods:** According to ultraviolet spectrophotometry, different concentration SQ's  $\beta$ -lactamase inhibiting effect was determined. The effect was tested by changes of optical density in ultraviolet light induced by ampicillin. **Results:** 33.3% SQ can inhibit the  $\beta$ -lactamase effect of ATCC700603 more than 50%, and had significant difference to control group. The  $\beta$ -lactamase inhibiting effect of SQ also showed positive correlation with its concentration. **Conclusion:** SQ can inhibit the action of ESBLs significantly. It may be one of the mechanisms of the granule for curing drug-resistance bacteria infections.

[Key words] Compound Qingre Granules; serum; extended-spectrum beta-lactamase

[收稿日期] 2007-01-04

[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); 北京市中医药科技项目(2005)

[通讯作者] \* 杨钧, Tel: (010) 88276660

耐药性是细菌针对抗生素应用造成的选择压力而进化的必然结果。其中革兰阴性菌产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs), 是导致新型广谱  $\beta$ -内酰胺类抗生素临床治疗失败的重要原因。以往的临床和实验研究显示<sup>[1-2]</sup>: 以复方清热颗粒剂为基本药物中药复方能显著提高抗菌效果。本研究采用血清药理学和

紫外分光光度方法, 研究中药复方清热颗粒剂含药血清对超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)的抑制作用, 探讨中药复方抗细菌耐药性的作用环节和机制。

## 1 材料

**1.1 实验动物** 健康新西兰大耳白兔, 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, 合格证号: 0065884。

**1.2 实验菌株** 肺炎克雷伯杆菌 ATCC700603, 大肠杆菌 ATCC25922, 为北京友谊医院检验中心保存菌株。

### 1.3 实验药物

**1.3.1 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, 浓缩成相当于生药 $2.62\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混悬液, 置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

**1.3.2 抗生素** 氨苄西林(Am), 中国药品生物制品检定所标准品, 批号: 130414-200405。

**1.3.3 主要试剂** ①LB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; ②M-H培养基, 购自BD公司, 批号: 5063705; ③血琼脂培养皿, 购自天津金章科技发展有限公司, 批号: P112905; ④西黄蓍胶, 购自上海化学试剂公司, 批号: 120010716, 加蒸馏水配制成浓度为4%的溶液, 高温高压灭菌后置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用; ⑤药敏试验纸片, 购自中国药品生物制品检定所。

**1.4 实验设备** UV-1206紫外分光光度计, 日本岛津公司; VITEK全自动微生物分析系统, 美国, 生物梅里埃公司; 光电比浊仪, 美国, 生物梅里埃公司; 电热恒温培养箱DH6000AB型, 天津市泰斯特仪器有限公司。

## 2 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32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, 腹腔注射, 注射剂量25亿/kg。4 h后测量肛温、耳缘静脉采血测定血常规, 体温(T) $> 39.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 白细胞(WBC)总数 $> 13\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$ 者纳入实验。

**2.2 复方清热颗粒剂含药血清的制备** 耐药菌腹腔感染模型成模后, 以10倍临床剂量复方清热颗粒剂 $22\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 为动物给药剂量, 采用日剂量分为每日给药1次、2次和3次给药组, 分为3组, 每组3只, 连续5 d灌胃给药 $8.4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 第5天末次给药

30, 60, 90, 120, 180 min后, 无菌心脏取血,  $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 分离含药血清后同组混合,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

**2.3 空白血清的制备** 健康新西兰大耳白兔, 蒸馏水 $8.4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃后, 无菌心脏取血,  $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 分离空白血清后混合,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

**2.4 含药血清对ATCC25922体外抑菌活性的时-效关系的研究** 采用纸片扩散法(KB法)药物敏感试验, 抑菌环直径(mm)作为衡量标准, 空白血清作为对照, 药物敏感试验的操作及结果的解释参照NCCLS2002版的标准<sup>[3]</sup>。

**2.5  $\beta$ -内酰胺酶的提取** 将菌种以 $1\times 10^5\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于2 mL液体LB培养基中,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养4 h, 用液体LB培养基稀释至10 mL,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养3 h后, 加入氨苄西林(Ampicillin, Am)至终浓度 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养1 h。取上述菌液100  $\mu\text{L}$ 到10 mL液体LB培养基中,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养12 h, 于 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min, 菌体细胞经 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH7.0的磷酸缓冲液1 mL重悬浮、混合,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融10次, 最后 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$   $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温离心15 min, 取上清液, 分装 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**2.6 分组方法** 在 $\beta$ -内酰胺酶+Am+磷酸缓冲液体系中分别加入33.33%, 20%, 10%含药血清依次命名为A1, A2, A3组; 分别加入33.33%, 20%, 10%空白血清依次命名为B1, B2, B3组; 以 $\beta$ -内酰胺酶+Am+磷酸缓冲液为空白对照组(C组)。

### 2.7 $\beta$ -内酰胺酶的抑制实验

**2.7.1 Am紫外吸收曲线** 于235 nm下测定0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 不同浓度下Am水溶液的吸光度(OD), 作回归曲线图。

**2.7.2 血清、血清与Am混合液的紫外吸收变化** 准确吸取100%, 33.33%, 20%, 10%含药血清及空白血清各100  $\mu\text{L}$ , 加入3.9 mL  $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH=7.0的磷酸缓冲液, 震荡15 s后于235 nm下测定8 min内OD值变化; 100%, 33.33%, 20%, 10%含药血清、空白血清各100  $\mu\text{L}$ , 加入3.5 mL  $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH=7.0的磷酸缓冲液, 最后加入1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Am溶液0.4 mL, 震荡15 s后于235 nm下测定8 min内OD值变化。

**2.7.3  $\beta$ -内酰胺酶活性测定** 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 含有4 mL反应液的比色池中进行, 反应液含有浓度为

1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Am 溶液 400  $\mu\text{L}$ , 酶提取液 100  $\mu\text{L}$  和 3.5 mL 0.05  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH= 7.0 的磷酸缓冲液。先加酶提取液最后加 Am, 加 Am 后震荡 20 s, 准确到 1 min 后每 30 s 测定 1 次 OD 值。

酶活单位(u): 每 mL 酶提取液在 37  $^{\circ}\text{C}$ , pH= 7.0 时每分钟能水解 Am 的 mg 数

$$\text{酶活}(u) = \Delta\text{OD}/(T \times K) \times 4/0.1 \times 10^3$$

$\Delta\text{OD}$  为紫外吸收变化, T 为反应时间, K 为消光系数, 4/0.1 将酶液体积换算成 1 mL,  $\times 10^3$  是将克转换成毫克。

**2.7.4 抑酶实验** 吸取含药血清或空白血清 100  $\mu\text{L}$ , 加入 100  $\mu\text{L}$  酶液, 摇匀后 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 10 min, 加入 400  $\mu\text{L}$  Am (1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 和 3.4 mL 0.05  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH= 7.0 的磷酸缓冲液, 震荡 20 s, 准确到 1 min 后每 30 s 测定 1 次 OD 值, 每测 1 次抑酶对应测 1 次酶活, 以下列公式测算抑酶率:

$$\text{抑酶率}(\%) = (\text{未加血清的酶活} - \text{加血清后的酶活}) / \text{未加血清的酶活} \times 100\%$$

### 3 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。

### 4 结果

**4.1 不同给药方案 采血时间制备含药血清对体外抑菌作用的影响** 复方清热颗粒剂以不同给药方案, 给药后不同时间采血所得含药血清对大肠杆菌 ATCC25922 的体外抑菌作用呈明显的时效关系见表 1。10 倍临床剂量 (22  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}$ ), 每日分 2 次连续 5 d 灌胃给药, 末次给药后 60 min 采取含药血清抑菌环直径达 10.0 mm 与每日 3 次给药效果相同, 可操作性强于后者, 用于后续实验。

表 1 不同给药方案 采血时间含药血清抑菌作用的比较

组别	各采血时间抑菌环直径(mm)				
	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
空白血清组	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1 次给药组	0.00	8.00	0.00	0.00	0.00
2 次给药组	0.00	10.00	8.00	0.00	0.00
3 次给药组	0.00	10.00	8.00	0.00	0.00

**4.2 Am 浓度-紫外吸收变化** 检测结果表明。Am 紫外吸收曲线在浓度 (0~ 100)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  有良好的线性关系,  $y = 0.004 4x$ ,  $r^2 = 0.994 8$ 。

**4.3 血清 血清与 Am 混合液紫外吸收变化** 经试

验检测未发现在 8 min 内有血清或血清与 Am 混合液的紫外吸收发生变化, 说明血清对 Am 以及血清本身都无水解作用。

**4.4  $\beta$ -内酰胺酶活性测定**  $\beta$ -内酰胺酶液水解 Am 引起反应液紫外吸收变化-时间 (OD-t) 曲线图见图 1, 可知 8 min 内  $\beta$ -内酰胺酶液水解 Am 的 OD-t 变化有良好的线性关系,  $y = -0.001 5x + 0.529 7$ ,  $R^2 = 0.968 4$ , 参考血清与 Am 混合液紫外吸收变化曲线, 确定 8 min 作为后续实验的测定时间。根据 2.7.3 酶活公式计算出  $\beta$ -内酰胺酶提取液的酶活为: 0.506 u。

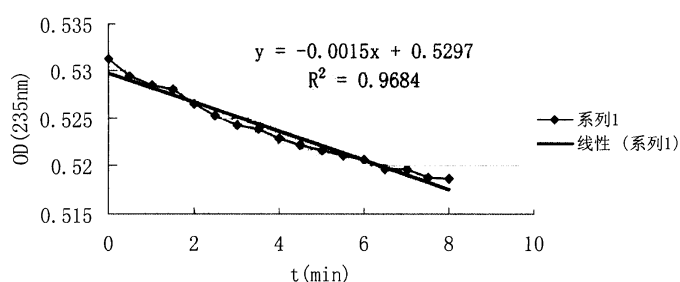


图 1  $\beta$ -内酰胺酶液水解 Am 引起反应液紫外吸收变化-时间 (OD-t) 曲线图

**4.5 含药血清对  $\beta$ -内酰胺酶活性抑制作用** 见表 2。

表 2 抑酶实验结果 (n = 5)

组别	血清浓度 (%)	酶活 (u)	抑酶率 (%)
含药血清 A1	33.3	0.25 $\pm$ 0.04	50.64 $\pm$ 9.87
含药血清 A2	20.0	0.39 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	23.72 $\pm$ 5.05 <sup>1)</sup>
含药血清 A3	10.0	0.47 $\pm$ 0.05 <sup>1,2)</sup>	7.69 $\pm$ 12.37 <sup>1,2)</sup>
空白血清 B1	33.3	0.50 $\pm$ 0.02 <sup>1,2)</sup>	1.41 $\pm$ 6.67 <sup>1,2)</sup>
空白血清 B2	20.0	0.48 $\pm$ 0.05 <sup>1,2)</sup>	4.87 $\pm$ 7.39 <sup>1,2)</sup>
空白血清 B3	10.0	0.50 $\pm$ 0.02 <sup>1,2)</sup>	1.54 $\pm$ 3.44 <sup>1,2)</sup>
空白对照 C	—	0.50 $\pm$ 0.02 <sup>1,2)</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>1,2)</sup>

注: 与 A1 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 A2 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$

浓度为 33.33%, 20% 的含药血清作用后的  $\beta$ -内酰胺酶提取液活性显著低于 10% 含药血清组、各浓度空白血清组和空白组, 具有显著统计学差异 ( $P < 0.01$ )。其中 33.33% 含药血清抑酶率超过 50%, 不同浓度含药血清组间比较具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 抑酶效果与血清浓度呈正相关。

### 5 讨论

**5.1 中药复方清热颗粒剂对  $\beta$ -内酰胺酶的抑制作用** 细菌对  $\beta$ -内酰胺抗生素产生耐药性, 机理可能为: 产生  $\beta$ -内酰胺酶; 膜通透性改变; 青霉素结合蛋

白(penicilin binding protein, PBP)靶位的改变。上述机制中,约有 80% 的病原菌的耐药性与产  $\beta$  内酰胺酶有关<sup>[4]</sup>。目前,国内外对中草药进行了大量的抑菌作用筛选,在实验和临床研究中都有很大进展<sup>[5]</sup>。从中寻找对  $\beta$  内酰胺酶具有强的抑制力,对酶有不可逆的钝化作用的方药和有效成分,探讨其机制具有重要意义。

本实验采用血清药理学方法,以底物氨苄西林紫外吸光度(OD)变化为指标,测定不同浓度的复方清热颗粒剂含药血清对肺炎克雷伯杆菌 ATCC700603  $\beta$  内酰胺酶提取液活性的抑制作用,发现浓度为 33.33% 20% 的含药血清作用后的  $\beta$  内酰胺酶提取液活性显著低于 10% 含药血清组和对照组( $P < 0.01$ ),其中 33.33% 含药血清抑酶率超过 50%,抑酶效果与血清浓度呈正相关,不同浓度含药血清组间比较具有显著性差异( $P < 0.01$ )。空白血清则对该酶无抑制作用。血清稀释 3 倍后加入体外反应体系中仍具有 50% 以上的抑酶率,服药后体内能够达到有效的抗菌成分浓度,结合本课题动物药理学实验结果:中药复方清热颗粒剂具有抗产超广谱  $\beta$  内酰胺酶(ESBLs)肺炎克雷伯杆菌急性感染作用。提示中药复方清热颗粒剂能够有效抑制 ESBLs 活性是其抗产 ESBLs 肺炎克雷伯杆菌急性感染的机制之一。

**5.2 方法学探讨** 本研究所采用的复方清热颗粒剂含药血清技术最大程度地包括中药复方制剂抗菌耐药性有效成分。不但防止了中药粗制剂本身理化性质对实验的干扰,还能反映中药在胃肠道消化吸收,经体内生物转化,最后产生药理效应的过程。确定实验动物给药剂量、方案和采血时间是血清药理学实验的关键。以往对于给药剂量、方案作了大量的研究<sup>[6]</sup>,每日大剂量重复给药,1~3 d 后提取含药血清,体外药理活性作用较单次给药方案效果强。对 412 种药物的药动学指标分析发现<sup>[7]</sup>,每日给药 2 次,连续给药 3 d,末次给药后 1 h 采血,80% 以上的药物其血药浓度大于 1 次给药的  $C_{max}$ ,每隔 1 个半衰期给药 1 次,连续给 4~6 次,即可达到最大血药浓度。动物实验可参考每天给药 2 次,连续 3 d 通法方案。理想的采血时间应落在血药浓度的高峰期,这

样能够避免由于有效物质尚未吸收或代谢殆尽而造成的假阴性结果。文献报道<sup>[8~10]</sup>,中药复方含药血清采血时间分散在末次给药后(30~180) min,并无统一的方法。对于采血时间杨奎等<sup>[11]</sup>分析了 96 个药物的达峰时间,其中 0.5~1 h 占 43.7%,(1~2) h 的占 47.9%,大于 2 h 的占 8.3%。本研究采用以临床大剂量给药,以标准菌株抑菌环直径为指标进行预实验确定,发现连续 5 d 每日分 2 次或 3 次给药后 60 min 时所取含药血清作用最强,实验结论与以往报道一致,证明中药复方血清药理学实验通法方案具有一定的普遍指导意义。

### [参考文献]

- [1] 马纪平,张淑文,王宝恩.中药“肺炎 III号”治愈急性肺炎机制的初步探讨[J].北京医学,1981,3(2):104.
- [2] 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,1988,8(9):636.
- [3] National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved Standard [M]. 12th edition, 1002S12. NCCLS, Wayne, pa P59-2589662-70.
- [4] 于守凡.病原菌对  $\beta$  内酰胺类抗生素的耐药性[J].国外医药抗生素分册,2000,21(1):33-35.
- [5] 陈星灿,刘定安,宫锡坤.中药抗菌作用研究[J].中医药学报,1998,(1):36-37.
- [6] 刘成海,刘成,刘平,等.扶正化瘀复方药物血清对大鼠肝贮脂细胞增殖及胶原合成的影响[J].中国实验方剂学杂志,1996,2(2):16.
- [7] 李仪奎.中药血清药理学实验方法的若干问题[J].中药新药与临床药理,1999,10(2):96.
- [8] 杨彦芳,王玉芹.中药复方血清药理学方法规范化探讨[J].中国中西医结合杂志,2000,20(5):380.
- [9] 阴焱宏,李兰芳,金亚宏,等.当归补血汤对小鼠巨噬细胞的活化作用[J].中国中医基础医学杂志,1998,4(7):24.
- [10] 徐瑶,卞国武,吴敏毓.淫羊藿醇提物对内皮细胞释放 NO 的影响[J].中药新药与临床药理,2001,12(1):38.
- [11] 杨奎,周明眉,姜远平,等.中药血清药理学的方法研究——给药方案研究[J].中药药理与临床,1999,15(3):43.