

# 复方清热颗粒剂含药血清对低浓度抗生素环境下 细菌耐药性的影响

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球医学内科, 北京 100050)

[摘要] 目的: 观察中药复方清热颗粒剂含药血清对低浓度抗生素环境下细菌耐药性的影响。方法: 采用血清药理学方法, 在中药复方清热颗粒剂含药血清和低浓度新霉素条件下传代培养大肠杆菌 ATCC25922, 以空白血清、低浓度新霉素、空白肉汤作对照, 采用纸片扩散法(KB法), 以抑菌环直径(mm)作为衡量标准, 动态观察诱导菌株耐药性变化。结果: 复方清热颗粒剂含药血清对大肠杆菌 ATCC25922 具有直接抑菌作用, 末次灌胃给药 60 min 后含药血清抑菌环直径达 10 mm; 经低浓度新霉素诱导 30 代后, 大肠杆菌 ATCC25922 不仅对新霉素产生耐药, 而且导致丁胺卡那、氨苄西林失效, 对庆大霉素、链霉素敏感性降低, 产生多重耐药; 新霉素+含药血清组菌株第 40 代菌株对新霉素产生耐药性, 对丁胺卡那、氨苄西林、庆大霉素、链霉素始终保持敏感, 其中氨苄西林的敏感性同空白肉汤组保持一致( $P > 0.05$ )。结论: 复方清热颗粒剂具有延缓和控制细菌在低浓度抗生素诱导下产生耐药性以及多重耐药作用。

[关键词] 复方清热颗粒剂; 血清; 抗生素; 耐药性

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)10-0024-05

## Influence of the Compound Qingre Granule-Serum on Bacteria-Resistance under Antibiotics of Low Concentration

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 influence of the Compound Qingre Granule-Serum (SQ) on bacterial resistance under antibiotics of low concentration. **Methods:** According to serum pharmacology methods. SQ with the strongest bacteriostatic effect was used for the following experiment. E. coli cells ATCC25922 were incubated under the culture media with low concentration of Neomycin and SQ, compared with blank serum, blank culture media and low concentration of Neomycin. The bacteriostasis diameter (mm) of Neomycin, Kanamycin, Gentamicin, Stmycin and Ampicill was tested for culture cells to determine the induced germ's drug resistance. **Results:** SQ has bacteriostatic action to ATCC25922, its bacteriostasis diameter reached to 10 mm; After being induced for 30 generations, increased resistance of ATCC25922 to Neomycin happened easily, as well as multi-resistance to Kanamycin and Ampicill at the same time. When SQ was put in the inducing system, the bacteria only appeared simple-resistance to Neomycin in the 40<sup>th</sup> generation, and it

[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; E-mail: yangj8298@163.com

always keep sensitive to Kanamycin, Gentamicin, Stmycin and Ampicill. **Conclusion:** SQ has the effect of delaying and controlling the bacteria multiple-drug resistance with low concentration of antibiotics.

[ **Key words** ] Compound Qingre Granule; serum; Antibiotics; bacteria resistance

抗菌药物的广泛应用使得细菌耐药性日趋严重, 几乎所有临床应用的抗菌药均有耐药菌株出现, 从临床分离到的多数耐药菌具有多种耐药机制, 表现为多重耐药, 治疗耐药菌感染性疾病已成为临床棘手问题。深入系统研究中药及中药复方抗细菌耐药性的作用环节和机制, 阐明中药复方抗耐药菌感染体内作用机理具有深远的理论和现实意义。本实验分别在含有抗生素和中药复方清热颗粒剂含药血清的培养基中对敏感大肠杆菌标准菌株 ATCC25922 进行连续传代培养, 以培养前后抗生素对细菌抑菌环直径(mm) 作为衡量标准, 观察中药复方清热颗粒剂对低浓度抗生素环境下细菌耐药性产生的影响。

## 1 材料

### 1.1 动物与试剂

**1.1.1 实验动物** 健康新西兰大耳白兔, 雌雄各半, 体重(2.25~ 2.5) kg, 均购自北京科宇动物养殖中心, 合格证号: 0065884。

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

**1.1.3 实验药物** 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 2.62 g 生药/mL 的混悬液, 置 4 °C 冰箱保存备用。新霉素、庆大霉素、丁胺卡那、链霉素、氨苄西林, 均为中国药品生物制品检定所标准品, 批号分别为: 0309-9310、130326-200314、130318-200308、130310-200412、130414-200405。

**1.1.4 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, pH 7.4; ②M-H 培养基, 购自 BD 公司, 批号: 5063705; ③血琼脂培养基, 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, 加蒸馏水配置成 4% 的溶液, 高温高压灭菌后置 4 °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。

**1.1.5 实验设备** 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 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 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, ip, 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 > 39.5 °C, 白细胞总数 >  $13 \times 10^9 \cdot L^{-1}$  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  $22 g \cdot kg^{-1}$  为动物给药的 1 日剂量, 采用 1 日剂量分为每日给药 1 次、2 次和 3 次给药组, 每组 3 只, 连续 5 d 灌胃给药  $8.4 mL \cdot kg^{-1}$ , 第 5 d 末次给药 30, 60, 90, 120, 180 min 后, 无菌心脏取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离含药血清后同组混合, - 20 °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  $8.4 mL \cdot kg^{-1}$  灌胃 5 d 后, 取血制备和保存血清同 2.2。

**2.4 菌株培养条件与接种方法** 大肠杆菌 ATCC25922, 平板划线 35 °C 恒温培养箱培养过夜, 挑取单菌落, 稀释成  $1 \times 10^8 CFU \cdot mL^{-1}$  菌悬液, 接种 1 mL 休止细胞菌悬液于 1 mL 液体 LB 培养基中, 35 °C 摇床培养 12 h。轻轻混匀待传代菌悬液, 平板划线 35 °C 恒温培养箱培养过夜, 挑取单菌落, 稀释后传代接种。休止菌种 10% 脱脂牛乳管 - 70 °C 冻存。

**2.5 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>[1]</sup>。

**2.6 细菌耐药性及抗生素、含药血清最低抑菌浓度(MIC) 的测定** 药物敏感试验采用纸片扩散法(KB 法)(同 2.5)。抗生素、含药血清最低抑菌浓度(MIC) 的测定采用试管两倍稀释法<sup>[2]</sup>, MH 肉汤培养基。

**2.7 低浓度下菌株的传代培养** 根据敏感试验的结果, 选择在低浓度新霉素和含药血清条件下传代

培养,同时以单纯低浓度新霉素,和低浓度新霉素+空白血清,和空白 LB 肉汤培养基为对照。每 24 h 传代 1 次,以  $1 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup> 转接菌量传代,共传代诱导培养 60 代,每 10 代测定诱导菌株对新霉素、庆大霉素、丁胺卡那、链霉素、氨苄西林的敏感性,药物敏感试验采用纸片扩散法(KB 法)(同 2.5)。

**2.8 分组方法** 按照 2.4 和 2.7 方法将大肠杆菌 ATCC25922 菌株分别接种于含低浓度新霉素 LB 肉汤培养基中,每组 5 株,随机分为诱导组:低浓度新霉素+含药血清组(A)、低浓度新霉素组(B)、低浓度新霉素+空白血清组(C)和空白对照组(D)4 组。

**2.9 统计学处理** 用 SPSS for Windows 11.5 统计软件。所有数据均用均值±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 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( $22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),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,可操作性强,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, min)				
	30	60	90	120	180
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

**3.2 试验药品、血清最低抑菌浓度** 含药血清、新霉素对 ATCC25922 最低抑菌浓度分别为  $670 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$   $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,空白血清不具有抑菌作用。参照相关文献<sup>3,41</sup>,选择传代培养所用低浓度新霉素和含药血清的浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ,同时以单纯低浓度新霉素,和低浓度新霉素+空白血清  $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ,和空白 LB 肉汤培养基为对照。

### 3.3 诱导菌株对多种抗生素耐药性变化

**3.3.1 诱导菌株对新霉素耐药性分析** 诱导至第 30 代开始:B 组、C 组菌株抑菌环直径 < 12.00 mm,对新霉素产生耐药;A 组第 40 代对新霉素产生耐药,自 20 代始其抑菌环直径( $15.40 \pm 0.55$ ) mm 大于 B 组( $12.40 \pm 0.89$ ) mm 和 C 组( $12.60 \pm 0.89$ ) mm,

耐药性弱于后者( $P < 0.01$ ),且耐药性趋势变化始终一致。提示中药复方清热颗粒剂具有延缓和抑制低浓度抗生素环境下细菌耐药性产生的作用(见图 1)。

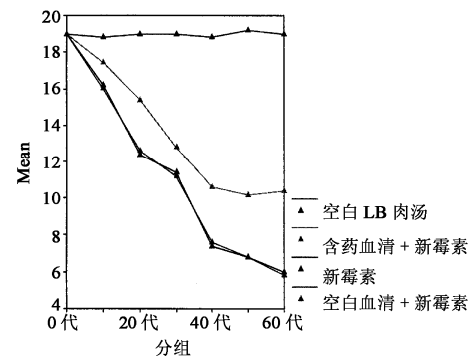


图 1 新霉素抑菌环直径(mm)变化趋势图

**3.3.2 诱导菌株对丁胺卡那耐药性分析** 诱导至第 30 代开始:B 组、C 组菌株抑菌环直径 < 13.00 mm,对丁胺卡那产生耐药,A 组菌株抑菌环直径始终  $\geq 15.00$  mm,始终保持对丁胺卡那的敏感性(见图 2)。

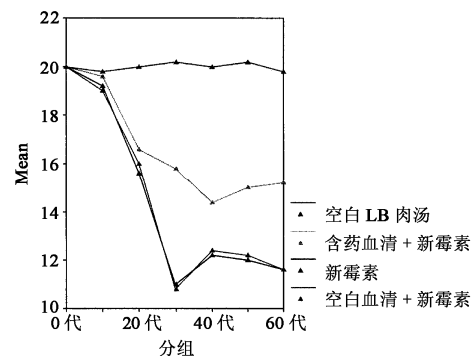


图 2 卡那霉素抑菌环直径(mm)变化趋势图

**3.3.3 诱导菌株对氨苄西林耐药性分析** 诱导至第 40 代开始:B 组、C 组菌株抑菌环直径 < 17.00 mm,对氨苄西林产生中等耐药,至第 50 代抑菌环直径 < 13.00 mm,对氨苄西林耐药。A 组同空白对照组耐药性趋势变化始终一致( $P > 0.05$ ),对氨苄西林始终未产生耐药性(见图 3)。

对丁胺卡那、氨苄西林耐药性分析结果提示中药复方清热颗粒剂抑制了低浓度抗生素环境下细菌多重耐药性的产生。

**3.3.4 诱导菌株对庆大霉素耐药性分析** 诱导至第 60 代各组最小抑菌环直径  $\geq 15.00$  mm,对庆大霉素均未产生耐药;诱导组抑菌环直径较 D 组均有不同程度减小,至第 30 代开始:A 组抑菌环直径( $19.80 \pm 0.45$ ) mm 大于 B 组( $16.80 \pm 0.45$ ) mm, C

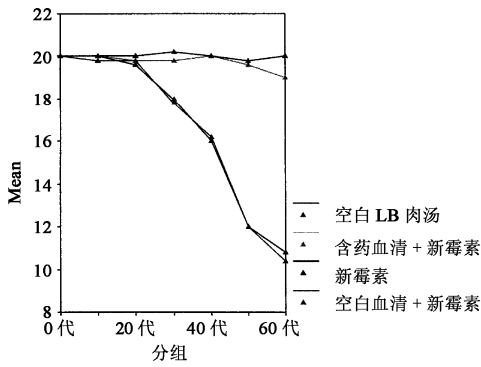


图3 氨苄西林抑菌环直径(mm)变化趋势图

组(17.00 ± 0.00) mm, 具有统计学差异( $P < 0.01$ ) (见图4)。

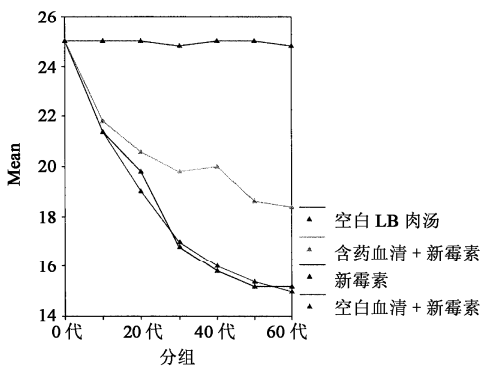


图4 庆大霉素抑菌环直径(mm)变化趋势图

**3.3.5 诱导菌株对链霉素耐药性分析** 诱导至第60代各组最小抑菌环直径  $\geq 16.80$  mm, 对链霉素均未产生耐药; 诱导组抑菌环直径较D组均有不同程度减小, 至第30代开始: A组抑菌环直径(19.20 ± 0.84) mm 大于B组(17.40 ± 0.55) mm 和C组(17.00 ± 0.71) mm, 具有统计学差异( $P < 0.01$ ) (见图5)。

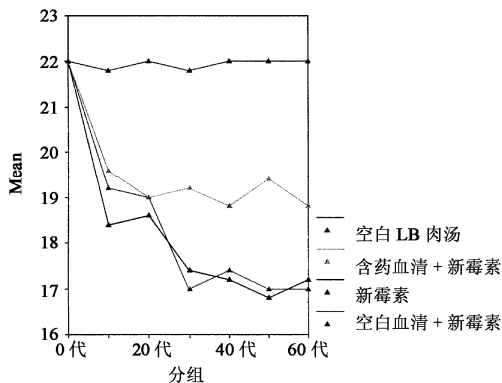


图5 链霉素抑菌环直径(mm)变化趋势图

#### 4 讨论

本研究采用了血清药理学方法, 通过研究给药

动物血清的生物学活性来揭示药物作用机制。本方法既具有体外实验条件可控性强, 药物效应易于检测等优点, 同时又不失在体实验的优点, 可增加实验结论的真实性和可靠性。

对不同药物甚至同一药物的不同成分, 究竟采取什么剂量 给药方案和采血时间, 应根据以往经验方案通过预试验确定。本实验以临床10倍剂量给药, 以标准菌株抑菌环直径为指标, 发现连续5d 每日分2次或3次给药后60 min 时所取含药血清作用最强, 其抑菌环直径为10 mm, 确定每日分2次灌胃给药, 连续5d, 末次给药后60 min 采取含药血清具有最佳抗菌活性, 同以往相关研究相一致<sup>[8,9]</sup>。

中药复方清热颗粒剂可以延缓抗生素诱导细菌耐药。在新霉素低浓度下传代培养大肠杆菌 ATCC25922 30代对新霉素、丁胺卡那产生耐药, 诱导至40代对氨苄西林产生耐药, 同时该菌株对庆大霉素、链霉素敏感性降低。提示一种抗生素若连续使用, 所带来的潜在的威胁, 不仅其自身效力会逐渐下降, 也可能导致其它抗生素失效, 产生多重耐药。已发现细菌获得性耐药情况至少有: 1) 适应性增强, 细菌耐药性的发生和发展是抗菌药物广泛应用, 特别是无指征滥用的结果<sup>[10]</sup>, 多重耐药基因转录活性和主动外排泵作用可被多种抗生素诱导增强<sup>[11,12]</sup>, 产生耐药性。2) 耐药基因的传播, R质粒是细菌染色体外的遗传物质, 能独立复制。其携带的耐药基因可指导药物灭活酶、钝化酶的合成及其他耐药方式的形成, 其传播被认为是导致多重耐药性产生的主要原因之一<sup>[13]</sup>。近年, 具有捕获及表达外来基因能力的整合子系统(integron)作为最新研究的细菌耐药机制, 正越来越引起研究者的关注<sup>[14]</sup>。

本实验采用中药复方清热颗粒剂含药血清为研究对象, 以空白血清、单纯低浓度抗生素和空白肉汤作对照, 作用于低浓度抗生素细菌诱导体系, 最大限度地模拟了中西药结合治疗细菌感染的体内状态, 探讨中药复方清热颗粒剂对细菌耐药性诱导产生的影响。研究发现, B组和C组第30代菌株对新霉素、丁胺卡那、氨苄西林产生耐药, 对庆大霉素、链霉素未产生耐药, 但抑菌环直径较前显著降低( $P < 0.01$ ); A组菌株第40代菌株对新霉素产生耐药性, 对丁胺卡那、氨苄西林、庆大霉素、链霉素始终保持敏感, 其中氨苄西林的敏感性同空白肉汤组保持一致, 抑菌环直径大于B组和C组( $P < 0.01$ ), 说明中

药复方清热颗粒剂含药血清不仅延缓了低浓度抗生素环境下细菌对诱导药物耐药性产生,同时阻止对其它相关抗菌药物产生多重耐药,其机制可能阻断了多重耐药性产生的途径,可作用于细菌的不同靶位和繁殖的不同阶段,并对细菌的多个代谢、遗传环节起作用,使其不易产生耐药性。

### [参考文献]

- [ 1 ] National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Approved Standard. 12th edition. M 1002S12. NCCLS, Wayne, Pa P50-2589662-70.
- [ 2 ] 郑钧镛,王光宝.药品微生物及检验技术[M].北京:人民卫生出版社,1985.349-351.
- [ 3 ] Michea-Ham Zehpour M., Kahr A., Pechere JC. In vitro step wise selection of resistance to quinolones,  $\beta$ -lactams and amikacin in nosocomial Gram-negative bacilli[J]. Infectious, 1994, ( Suppl 2 ): 105.
- [ 4 ] 叶高峰,姜素椿.绿脓假单菌对环丙沙星和Tienam等8种药物体外交叉耐药研究[J].中国抗生素杂志,1995,20(1):51.
- [ 7 ] 崔晓兰,贺玉琢,高英杰,等.中药复方血清药理研究

方法学的探讨-I[J].中国实验方剂学杂志,1998,4(2):16.

- [ 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 ] 杨奎,周明眉,姜远平,等.中药血清药理学的方法学研究——给药方案研究[J].中药药理与临床,1999,15(3):43.
- [ 10 ] Greenwood D. Resistance to antimicrobial agents: a personal view[J]. J Med Microbiol, 1998, 47(2): 751-755.
- [ 11 ] Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of escherichia coli multiple antibiotic resistance (Mar) mutants [J]. J Bacteriol, 1996, 178(1): 306-308.
- [ 12 ] 王瑜.大肠埃希氏菌的多重药物外排泵AcrAB-TolC[J].国外医药,抗生素分册,2002,23(3):115-117.
- [ 13 ] Foster T J. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria[J]. Microbiol Rev, 1983, 47(3): 361-409.
- [ 14 ] Gebreyes WA, Altier C. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. Enterica serovar Typhimurium isolates from Swine [J]. J Clin Microbiol, 2002. 40: 2813-2820.