

·方药研究·

本文引用:张 涛,伍君锋,肖新云,邓江艳,李帅东,刘俊青,蔡 锐.三黄地榆散对多重耐药铜绿假单胞菌的抑制作用研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(8):823-826.

## 三黄地榆散对多重耐药铜绿假单胞菌的抑制作用研究

张 涛,伍君锋,肖新云,邓江艳,李帅东,刘俊青,蔡 锐\*  
(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

**[摘要]** **目的** 探讨三黄地榆散对多重耐药铜绿假单胞菌的抑制效果,为其临床应用提供依据。**方法** 首先制备中药含药血清用于体外最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)测定。然后建立烫伤大鼠感染多重耐药铜绿假单胞菌模型,分别给予西药硫酸庆大霉素和中药三黄地榆散灌胃,正常组和模型组灌胃等容量的无菌生理盐水;在给药后的第3、7、10天检测血液中炎性细胞和炎性因子的水平。**结果** 体外抑菌实验显示,三黄地榆散含药血清与庆大霉素对多重耐药铜绿假单胞菌的MIC、MBC均为512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。体内实验结果显示,与模型组比较均能显著下调大鼠血清WBC、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的水平( $P<0.05$ )。**结论** 三黄地榆散能抑制多重耐药铜绿假单胞菌的生长,对多重耐药铜绿假单胞菌感染烫伤大鼠治疗具有较好的疗效,机制可能与调节IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平有关。

**[关键词]** 三黄地榆散;多重耐药铜绿假单胞菌;庆大霉素;抑菌

**[中图分类号]**R285.5;R378.99\*1

**[文献标志码]**B

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.08.003

### Study on Inhibitory Effects of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* by Sanhuang Diyu Powder

ZHANG Tao, WU Junfeng, XIAO Xinyun, DENG Jiangyan, LI Shuaidong, LIU Junqing, CAI Rui\*  
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate inhibitory effects of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* by Sanhuang Diyu powder and provide the basis for its clinical application. **Methods** TCM serum was used for antibacterial experiment in vitro of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The scald model rats infected by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* were given with gentamicin sulphate and Sanhuang Diyu powder by gavage, respectively. Both the normal group and the model group were given with same volume sterile normal saline by gavage. At the first 3, 7, 10 days after delivery, neutrophils and inflammatory factors were determined. **Results** The results of bacteriostasis experiment *in vitro* indicated that MIC and MBC of Sanhuang Diyu powder and gentamicin on multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* both were 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The results of bacteriostasis experiment *in vivo* indicated that Sanhuang Diyu powder and gentamycin could significantly decrease the levels of serum WBC, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in model rats ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Sanhuang Diyu powder has inhibitory effect against the growth of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in rats, which may be related to its ability of regulating IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

**[Keywords]** Sanhuang Diyu powder; multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*; gentamicin; antimicrobial effect

**[收稿日期]**2016-10-22

**[基金项目]**中西医结合基础湖南省“十二五”重点学科开放基金资助项目。

**[作者简介]**张 涛,男,本科在读,中西医临床医学专业。

**[通讯作者]\***蔡 锐,女,硕士,副教授,E-mail: chary1203@sina.com。

铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)原称绿脓杆菌,是一种常见的条件致病菌,属于革兰氏阴性菌。由于激素、免疫抑制剂的长期应用,加上化疗、放射治疗等导致病人免疫功能低下,可引起严重的甚至致死性的感染;手术后或某些治疗操作后(气管切开、留置导尿等)的病人也易罹患本菌感染,因此铜绿假单胞菌已成为医院内感染的重要病原菌之一,特别在灼伤和儿童重症监护室<sup>[1]</sup>。由于铜绿假单胞菌抗药性强,近年来多重耐药铜绿假单胞菌(MDRPA)感染日益增多,多重耐药和泛耐药菌株的检出率不断增高,耐药谱广泛,其发病率和病死率居高不下,可发生在人体任何部位和组织,常见于烫伤或者创伤部位,这为抗菌药物治疗带来极大挑战<sup>[2]</sup>。

中医药抗感染的历史经验表明,在中医理论指导下遣方用药,可以将抗菌与保护机体、调节免疫紊乱相结合,通过多途径、多环节、多靶点发挥作用,促进损伤的修复,稳定内环境,从而削弱和改善细菌及其毒素对机体的损害与免疫系统的破坏<sup>[3]</sup>。药理学研究亦表明中药具有较多的抑菌成分,抑菌作用的机制和功能也较为多重,可作用于细菌的不同部位和繁殖的不同阶段,对细菌的多个代谢环节发挥作用,甚至可以逆转细菌的耐药性<sup>[4]</sup>。但目前中药在烧伤理论研究上虽有所发展却仍显创新不足,缺乏中药药效和机制研究<sup>[5]</sup>。中药三黄地榆散由黄连、黄芩、黄柏、地榆、紫苏、冰片组成,具有清热燥湿、泄火解毒作用,研究表明其具有化腐生肌、抗菌、消炎、止痛,促进组织细胞、表皮细胞再生的功效,有广谱抗菌作用<sup>[6]</sup>。本文探讨三黄地榆散体外对多重耐药铜绿假单胞菌的抑制作用,为拓展多重耐药菌感染的治疗提供参考。

## 1 材料

### 1.1 药物

三黄地榆散:黄连 9 g,黄柏 9 g,黄芩 9 g,地榆 3 g,紫苏 3 g,冰片 1 g,饮片于湖南中医药大学第一附属医院药房购入。2次水煎浓缩,药物浓度为 0.43 g/mL。硫酸庆大霉素颗粒(葵花药业集团得菲尔有限公司,批号 15015103),用无菌蒸馏水溶解,最终配制为 0.3 g/mL 的溶液。

### 1.2 实验动物

SPF级SD大鼠,雌雄各半,体质量 200~240 g,

购自湖南斯莱克斯景达实验动物有限公司。许可证号:SCXK(湘)2014-0002。

### 1.3 实验菌株

多重耐药铜绿假单胞菌临床痰分离 1509211399 号,由湖南中医药大学第一附属医院检验科鉴定提供。挑取单个菌落,接种于液体 LB 营养琼脂培养基中,37℃下 180 r/min 摇菌 5~6 h,使其在 600 nm 波长下吸光度值达到 0.8~1.0。收集处于对数生长期的细菌悬液,以半径 4 cm,3 000 r/min 离心 20 min。弃去上清液,用生理盐水洗涤 3 次重新悬浮后置于 4℃冰箱备用,用平板倍比稀释法确定每毫升中 CFU 为  $1 \times 10^6$ 。

### 1.4 主要试剂与仪器

营养琼脂粉(杭州天和微生物试剂有限公司),硫化钠(天津市风船化学试剂有限公司)。立式压力蒸汽灭菌器(CLDZX-30KB 上海申安医疗器械厂)。电热恒温培养箱中(上海新苗医疗器械治疗有限公司);酶标仪(北京普朗新技术有限公司);AC8 洗板机(芬兰 Thermo Labsystems)。TG16W 离心机(国产)。GNP-9080 型培养箱(国产)等均由湖南中医药大学动物实验中心提供。

## 2 方法

### 2.1 体外抑菌实验

2.1.1 三黄地榆散含药血清(简称三黄血清)制备 大鼠常规饲养 1 周,室温控制在 18~22℃之间,自由饮食饮水,采血前禁食过夜。大鼠 0.43 g/mL 三黄地榆散浓缩液灌胃 1.72 g/kg,上下午各 1 次,共 7 d,最后 1 次灌胃后 1 h 麻醉大鼠,进行腹主动脉取血注入含 EDTA 的抗凝采血管,3 000 r/min 离心 10 min,无菌分离血清,56~60℃水浴 30 min,灭活,4℃保存备用。

2.1.2 体外抑菌各组最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)、抑菌圈直径测定 将庆大霉素溶液分别和空白血清、三黄血清 1:1 混合。在 24 孔板中加入 M-H 肉汤培养基 1 mL,再分别在每组的第 1 个孔加入三黄血清、庆大霉素溶液、庆大霉素+空白血清混合溶液、庆大霉素+三黄血清混合溶液 1 mL。采用二倍稀释法将各孔依次对倍稀释,最终每个反应体系均为 1 mL。取实验菌悬液 10 μL 加入各孔中,37℃培养 18~24 h,然后分别转种至含有 M-H 琼

脂培养基的培养皿上。37℃培养18~24 h。

在无菌操作条件下,吸取菌悬液100 μL,用涂布棒均匀涂抹在冷却凝固的琼脂培养基上,将牛津杯轻放在培养基表面。分别取上述各组溶液200 μL加入牛津杯中,于37℃恒温培养箱培养24 h后取出,测量各培养皿中有效抑菌圈的直径(mm),计算平均值。

## 2.2 体内抑菌实验

2.2.1 动物分组 SD大鼠40只,雌雄各半,随机分正常组、模型组、庆大霉素对照组、三黄地榆散组,共4组,每组各10只。除正常组外,其他三组均造模。

2.2.2 造模<sup>[7-8]</sup> 大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,用硫化钠将大鼠背部皮肤脱毛。将恒温水浴锅温度调至80℃,并在上面放置自制的中间有直径为3 cm圆形洞的薄木板。将大鼠放置在木板上,背部脱毛的区域浸在圆形洞的水浴中烫8 s,形成直径3 cm的深Ⅱ度圆形烫伤区域。24 h后在烫伤区域接种0.1 mL含 $1 \times 10^6$  CFU/mL多重耐药铜绿假单胞菌菌液,接种细菌后24 h进行HE染色观察创面炎症反应情况,分别在创面接种植细菌后第3、7、10天,用无菌操作法取痂下组织,进行革兰染色及生化反应鉴定菌种,检测并计算痂下细菌含量,造模成功标准为痂下细菌定量达到 $1 \times 10^5$  CFU/g。

2.2.3 干预 模型成功后,模型组即给予生理盐水灌胃0.8 mL,西药组给予硫酸庆大霉素灌胃(0.12 g/kg,1次/d)0.8 mL,中药组给予0.43 g/mL三黄地榆散浓缩液灌胃1.72 g/kg每日1次,共10 d,正常组大鼠常规饲养。

2.2.4 取材与指标检测 分别在给药治疗后的第3、7、10天从各组大鼠尾静脉采血1 mL。大鼠取血后立即送样检测血液中白细胞(WBC)总数、中性粒细胞(N)总数、淋巴细胞(L)总数、C反应蛋白;第10天处死时采血用ELISA法测定白介素-1(IL-1β)、肿瘤坏死因子(TNF-α)的水平。

## 2.3 数据处理

用SPSS 19.0软件处理数据,各分组所得计量数据采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多样本均数满足正态分布及方差齐性者用F检验,两组间均数比较用q检验,否则用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著性差异。

## 3 结果与分析

### 3.1 体外抑菌各组MIC、MBC及抑菌直径测定

三黄地榆散含药血清MIC值为512 μg/mL,MBC值为512 μg/mL,平均抑菌圈直径为9.9 mm;庆大霉素MIC值为512 μg/mL,MBC值为512 μg/mL,平均抑菌圈直径为10.8 mm,联合三黄地榆散含药血清后其MIC和MBC值均有所下降,其MIC值降至256 μg/mL,MBC值为256 μg/mL,平均抑菌圈直径为13.4 mm。见表1。

表1 体外抑菌各组对多重耐药铜绿假单胞菌的MIC、MBC值、平均抑菌圈直径

组别	MIC/μg·mL <sup>-1</sup>	MBC/μg·mL <sup>-1</sup>	平均抑菌圈直径/mm
三黄血清	512	512	9.9
庆大霉素	512	512	10.8
庆大霉素+三黄血清	256	256	13.4
庆大霉素+空白血清	512	512	10.9

### 3.2 各干预组对多重耐药铜绿假单胞菌感染烫伤大鼠WBC水平的影响

各组大鼠在烫伤感染后,WBC水平升高明显。在第3天治疗组大鼠的WBC水平均高于正常组水平( $P < 0.01$ );在第7天模型组大鼠的WBC水平远高于正常水平( $P < 0.01$ ),三黄地榆散组与庆大霉素对照组大鼠的WBC水平较模型组降低明显( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ );第10天,三黄地榆散组与庆大霉素对照组只有1例超出正常范围,而模型组均高于正常范围( $P < 0.01$ ),三黄地榆散组、西药对照组与模型组相比,WBC水平降低( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),其值接近正常水平。见表2。

表2 各组大鼠各时间点血液WBC的变化( $\bar{x} \pm s, n=10, \times 10^9$ 个/L)

组别	3 d	7 d	10 d
正常组	6.78±1.02	6.14±2.10	7.01±1.71
模型组	12.19±0.99 <sup>#</sup>	19.22±1.45 <sup>#</sup>	12.27±2.72 <sup>#</sup>
庆大霉素组	10.99±2.16 <sup>#</sup>	16.45±1.69 <sup>#*</sup>	6.10±3.67 <sup>**</sup>
三黄地榆散组	10.39±1.15 <sup>#</sup>	13.53±1.61 <sup>#**</sup>	6.69±1.70 <sup>*</sup>
F	1.793	16.070	7.337
P	0.208	0.000	0.008

注:与正常组比较:# $P < 0.01$ ;与模型组比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

### 3.3 各干预组对多重耐药铜绿假单胞菌感染烫伤大鼠白介素-1(IL-1β)、肿瘤坏死因子(TNF-α)增殖水平的影响

三黄地榆散组与庆大霉素对照组IL-1β、TNF-

$\alpha$  水平与正常组水平接近,均明显低于模型组,差异非常显著( $P<0.01$ )。见表3。

表3 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平的变化  
( $\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$ )

组别	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
正常组	49.75 $\pm$ 3.21	240.10 $\pm$ 10.34
模型组	74.48 $\pm$ 3.09 <sup>##</sup>	288.87 $\pm$ 11.59 <sup>##</sup>
庆大霉素组	62.66 $\pm$ 8.69 <sup>**</sup>	236.43 $\pm$ 36.02 <sup>**</sup>
三黄地榆散组	55.34 $\pm$ 5.81 <sup>**</sup>	222.68 $\pm$ 23.10 <sup>**</sup>
<i>F</i>	19.91	18.63
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与正常组比较,## $P<0.01$ ;与模型组比较,\*\* $P<0.01$ 。

## 4 讨论

烧烫伤主要是由于各种理化因素造成的体表甚至深部组织的损害,病情具有广泛性和多发性的特点。近年来在烧烫伤的治疗上,中药和西药都有了长足的发展,中西医结合仍是目前临床治疗烧烫伤最重要手段之一。中医学认为热毒为烧烫伤的主要病因,热毒内痈、血败肉腐是其基本的病机,提出清热解毒、热者寒之为治疗烧烫伤的基本原则。而西医学主要是从病理生理学角度开展烧伤治疗,通过改善烧伤早期的液体复苏、感染控制、营养补给、对烧伤创面进行覆盖并及时给予康复治疗来控制病情<sup>[9-10]</sup>,其中很大一方面是从控制创面感染来考虑的,抗生素类药物的使用占有很大的比例。由于近年来抗生素的泛滥使用,使得烧烫伤感染的常见菌也不断发生改变,多重耐药铜绿假单胞菌感染的发病率急剧攀升,其耐药性和耐药水平也迅速增加。近年来,该菌的临床分离率不断增加,已成为临床上最重要的耐药菌之一<sup>[11]</sup>。

结合中西医在治疗烧烫伤各自的优势,本课题组成员查阅大量文献发现验方三黄地榆散在临床治疗烧烫伤中疗效显著<sup>[12]</sup>,故从体内外探讨三黄地榆散对多重耐药铜绿假单胞菌的抑制作用。

本课题体外抑菌实验结果显示三黄地榆散含药血清能有效抑制多重耐药铜绿假单胞菌的生长,与庆大霉素对多重耐药铜绿假单胞菌的 MIC、MBC 值相同,能提高抗菌素的抑菌率,增强其抑菌、杀菌作

用。体内实验以烫伤大鼠感染多重耐药铜绿假单胞菌为模型,探讨三黄地榆散对烫伤大鼠感染多重耐药铜绿假单胞菌机体相关炎症细胞和炎症因子的影响,结果表明三黄地榆散显著下调 WBC、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的水平来控制烫伤组织的炎症反应,促进烫伤组织的修复。综上所述,三黄地榆散能体内抑制多重耐药铜绿假单胞菌的生长,并对其感染烫伤大鼠具有较好疗效,为中医抗多重耐药菌感染药物的研发提供了思路,值得进一步研究,拓展临床防治烧烫伤感染多重耐药菌的手段与措施。

## 参考文献:

- [1] 张 栩,盛传伦.铜绿假单胞菌感染现状及耐药分析[J].中国实验诊断学,2013,17(1):199-201.
- [2] Sander HS, Jones RN. Comprehensive in vitro evaluation of ceftazidime combined with aztreonam or ampicillin/sulbactam against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp[J]. Int J Antimicrob Agents, 2005, 25(5): 380-384.
- [3] 刘清泉,孔令博,高 洁,等.扶正透邪方干预多重耐药铜绿假单胞菌研究[C].//第4届首都急诊医学高峰论坛论文集,北京:2011:140-154.
- [4] 李亚娜,陶庆春.中药抑菌的研究现状及思考[J].国际检验医学杂志,2015,35(2):198-200.
- [5] 袁 汀,周瑜姝.外用中药治疗烧烫伤的研究进展[J].光明中医,2010,25(11):2151-2153.
- [6] 张海岩,李婷婷,范曼利,等.芩柏复方烫伤膏对大鼠实验性烫伤模型的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学,2015,20(4):399-403.
- [7] 韩 璐,俞为荣,华拯敏,等.甘石软膏的制备及药效学研究[J].中医药导报,2012,18(1):55-56,59.
- [8] 张大伟,龚震宇,彭毅志,等.大鼠烫伤创面感染模型的研制[J].中华烧伤杂志,2011,27(2):104-108.
- [9] 黄志群,韦 斯,陆 钢,等.中西药制剂治疗烧烫伤概述[J].右江民族医学院学报,2013,35(2):196-197.
- [10] 杨胜群,熊 茜,邹俊波,等.中药应用于烧烫伤治疗的研究进展[C].广州:世界中医药学会联合会,全国中药药理联合会,2014.
- [11] 薛金方,邓海云,黄涌泉.铜绿假单胞菌耐药性分析[J].中国实用医药,2016,11(14):172-173.
- [12] 吕 萍,常向东.三黄地榆散在烧烫伤中的应用 317 例报告[J].交通医学,2001,15(2):199.

(本文编辑 杨 瑛)