

were sacrificed and the plasma levels of cAMP and cGMP, the organ indexes and the protein expression of AQP4 in renal tissues were detected in the groups. Results: The growth of body weight were slowed down, the body temperature was decreased, the autonomous activities were reduced, the exhaustive swimming time was shortened, the plasma contents of cAMP and cGMP were increased, and the protein expression of AQP4 was decreased in the model group A and the model group B; the indexes of liver, spleen and kidney were increased in the model group B. Conclusion: The deficiency syndrome model was induced after 2 weeks of modeling in the model group A and the model group B. The characteristics of the model became more obvious after 3 weeks of modeling in the two groups. The damages in the model group B were more significant than that in the model group A.

Key words: Deficiency syndrome; Animal model; Mice; cAMP/cGMP; Aquaporin 4

小儿青翘颗粒对呼吸道病原菌的体外抑制作用研究

王荣花^{1,2}, 郑志慧^{1,2}, 张雨茜^{1,2}, 闵锐¹, 王泽华¹, 何枢衡³, 黄雁³, 张评浒^{1,2*}

(1. 扬州大学医学院, 转化医学研究院, 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏 扬州 225009;
2. 扬州大学, 江苏省人兽共患病重点实验室, 江苏 扬州 225009; 3. 亿帆医药股份有限公司, 浙江 杭州 310000)

摘 要:目的: 了解小儿青翘颗粒体外抗呼吸道病原菌的活性。方法: 采用微量法测定小儿青翘颗粒对临床分离的肺炎链球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌和副流感嗜血杆菌的最低抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC); 采用平板法测定小儿青翘颗粒对鲍曼不动杆菌的杀菌时效与量效曲线。结果: 小儿青翘颗粒对大部分呼吸道病原菌均有较好抗菌效果, 对肺炎链球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌和副流感嗜血杆菌的 MIC 范围分别为 9.38 ~ 75、4.69 ~ 9.38、1.17 ~ 4.69 和 4.69 ~ 75 mg/mL; MBC 范围分别为 18.75 ~ 75、4.69 ~ 9.38、2.34 ~ 4.69 和 4.69 ~ 75 mg/mL。结论: 小儿青翘颗粒对常见呼吸道病原菌均具有较好的抑菌作用, 对鲍曼不动杆菌的抑菌效果最好。

关键词: 细菌; 呼吸道感染; 鲍曼不动杆菌; 肺炎链球菌; 最低抑菌; 最低杀菌浓度

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2392(2022)01-0032-04

DOI: 10.19664/j.cnki.1002-2392.220008

近年来随着抗生素类抗菌药物在养殖业中的广泛滥用以及临床的不规范使用, 细菌耐药已成为临床治疗细菌感染性疾病的世界难题。因此寻找高效低毒且能有效解决细菌耐药性问题的抗菌药物是当前研究的热点。中草药作为我国特有的药物资源, 不仅具有药源广、价格低的特点, 而且可以通过直接杀灭细菌菌体和调控机制免疫等多种途径发挥综合抗菌作用^[1]。近年来研究表明多种中草药和中药复方不仅体外对多种细菌具有良好的抑菌效果, 而且在临床治疗感染性疾病中显现出良好的抗菌效果^[1-6]。小儿青翘是一种

临床用于治疗小儿呼吸道病毒感染的常用中成药, 对小儿呼吸道感染具有良好疗效^[7-10], 但有关该药是否具有抗呼吸道病原菌效应, 迄今尚未见相关报道。本研究首次对小儿青翘体外抗常见呼吸道病原菌的药效作用进行研究, 以期为指导该药临床治疗呼吸道病原菌感染提供理论依据。

1 材料

1.1 菌株

试验菌株为 2019 年 3 月—2019 年 10 月收集的临床分离株, 分别来自扬州大学临床医学院和扬州大学临床中医学院, 标准株来自扬州大学医学院病原教研室, 所有菌株均经生化与药敏鉴定。

1.2 药物

小儿青翘颗粒由亿帆医药股份有限公司提供; 阳性药青霉素和庆大霉素购自上海生工生物有限公司; 药敏纸片购自杭州微生物有限公司。

收稿日期: 2021-02-19 修回日期: 2021-03-24

基金项目: 扬州大学高端创新人才资助项目(137011384)

作者简介: 王荣花(1996-), 女, 硕士研究生, 从事中药药理方面的研究。

* 通讯作者: 张评浒(1976-), 男, 博士, 教授, 主要从事抗病毒药物药理方面的研究。

2 测试方法

2.1 微量测定法

按着 NCCLS^[11] 中的抗菌药物药效学评价参考方法进行的操作和结果判定,对小儿青翘颗粒体外抗菌活性进行评价,该方法是将小儿青翘颗粒做连续两倍稀释,然后每孔加入适量的稀释菌液,混匀后 37 ℃ 培养 24 ~ 48 h。同时设定不含待测化合物的溶媒对照,只含培养基的空白对照,以青霉素和庆大霉素为阳性药。以空白对照为参照,比较不同药物浓度的浑浊度,以抑制细菌生长的最低浓度作为小儿青翘颗粒对相应菌株的 MIC 值;以杀死 99.9% 以上细菌的药物浓度作为小儿青翘颗粒的 MBC 值。

2.2 平板测定法

将 MH 琼脂培养基高压灭菌后冷却至 50 ℃ 左右时,加入小儿青翘颗粒、庆大霉素和青霉素,分别制成含 20、10、5、2.5、1.25、0.625、3.13 mg/mL 的小儿青翘和含 100 μg/mL 青霉素或庆大霉素的 12 孔琼脂培养板,然后每板加入含 1 × 10³ 个 CFU 的菌液,涂匀后置 37 ℃ 培养 24 ~ 48 h。以空白对照孔细菌数为参照,以庆大霉素与青霉素为阳性药,对比分析小儿青翘对鲍曼不动杆菌敏感株与耐药株的杀菌效应。

2.3 杀菌量效曲线测定

将对数生长期的鲍曼不动杆菌用生理盐水稀释成 1 × 10⁵ 个菌落/mL,然后分别加入青霉素、庆大霉素和小儿青翘颗粒,青霉素和庆大霉素浓度为 100 μg/mL,小儿青翘颗粒浓度从 100 μg/mL 开始依次做 2 倍梯

度稀释,分别获得终浓度为 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39 mg/mL 的含药试管,然后每试管加入 1 × 10⁵ 个细菌,37 ℃ 培养 24 h 后测定各处理组的活菌数。

2.4 杀菌时效曲线测定

将对数生长期的鲍曼不动杆菌用生理盐水稀释成 1 × 10⁵ 个菌落/mL,然后分别加入青霉素、庆大霉素和小儿青翘颗粒,青霉素和庆大霉素浓度为 100 μg/mL,小儿青翘颗粒浓度为 20、10 和 5 mg/mL,然后每试管加入 1 × 10⁵ 个细菌,37 ℃ 培养 2、4、6、8、12、24、48 h 后,测定。

3 结果

3.1 小儿青翘颗粒对常见呼吸道病原菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度测定结果

本研究采用微量法对小儿青翘体外抗呼吸道常见病原菌的效果进行了研究,具体结果见表 1。由表 1 可以看出,小儿青翘颗粒对肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和副流感嗜血杆菌的敏感菌和耐药菌均有一定的抑制活性,其抑制上述临床菌株的 MIC (mg/mL) 范围分别为 9.38 ~ 75、4.69 ~ 9.38、1.17 ~ 4.69 和 4.69 ~ 75, MBC (mg/mL) 范围分别为 18.75 ~ 75、4.69 ~ 9.38、2.34 ~ 4.69 和 4.69 ~ 75。从上述 MIC 和 MBC 结果可以看出小儿青翘颗粒对常见呼吸道病原菌的抑菌效果依次为鲍曼不动杆菌 > 肺炎克雷伯菌 > 肺炎链球菌 > 流感嗜血杆菌。

表 1 小儿青翘颗粒抗菌效果的测试结果

细菌	株数	药物	MIC	MBC
肺炎链球菌	10	庆大霉素 (Gentamicin)	0.20 ~ >100 μg/mL	0.20 ~ >100 μg/mL
		(Streptococcus 青霉素 (Penicillin) pneumoniae)	1.56 ~ >100 μg/mL	3.13 ~ >100 μg/mL
		小儿青翘颗粒 (XEQQ granule)	9.38 ~ 75 mg/mL	18.75 ~ 75 mg/mL
肺炎克雷伯菌	15	庆大霉素 (Gentamicin)	0.20 ~ >100 μg/mL	0.20 ~ >100 μg/mL
		(Klebsiella 青霉素 (Penicillin) pneumoniae)	1.56 ~ >100 μg/mL	1.56 ~ >100 μg/mL
		小儿青翘颗粒 (XEQQ granule)	4.69 ~ 9.38 mg/mL	4.69 ~ 9.38 mg/mL
鲍曼不动杆菌	15	庆大霉素 (Gentamicin)	0.20 ~ >100 μg/mL	0.20 ~ >100 μg/mL
		(Acinetobacter 青霉素 (Penicillin) baumannii)	1.56 ~ >100 μg/mL	1.56 ~ >100 μg/mL
		小儿青翘颗粒 (XEQQ granule)	1.17 ~ 4.69 mg/mL	2.34 ~ 4.69 mg/mL
流感嗜血杆菌	10	庆大霉素 (Gentamicin)	0.78 ~ 3.13 μg/mL	0.78 ~ 3.13 μg/mL
		(Haemophilus 青霉素 (Penicillin) influenzae)	1.56 ~ >100 μg/mL	1.56 ~ >100 μg/mL
		小儿青翘颗粒 (XEQQ granule)	4.69 ~ 75 mg/mL	4.69 ~ 75 mg/mL

3.2 小儿青翘颗粒对鲍曼不动杆菌的量效杀菌曲线测定结果

本实验采用统一的菌液浓度 (1.0 × 10⁵ CFU), 以

阳性药青霉素和庆大霉素 (100 μg/mL) 为对照, 对小儿青翘颗粒 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39 mg/mL 等 9 个浓度 24 h 内是否具有杀灭鲍曼不

动杆菌的效应进行了观察,结果如图 1 和图 2 所示。从图 1 可以看出,药物作用 24 h 后,小儿青翘颗粒具有剂量依赖性地抑制鲍曼不动杆菌敏感菌株和耐药菌株的生长,而阳性药庆大霉素和青霉素仅能抑制各自敏感菌株的生长,对耐药菌株基本无抑制作用。从图 2 可以直观看,小儿青翘颗粒在 5 mg/mL 浓度条件下能完全抑制鲍曼不动杆菌敏感株和耐药株的生长,但从 2.5 mg/mL 浓度可以看出,小儿青翘颗粒抑制鲍曼不动杆菌敏感株生长的效应明显优于耐药株。

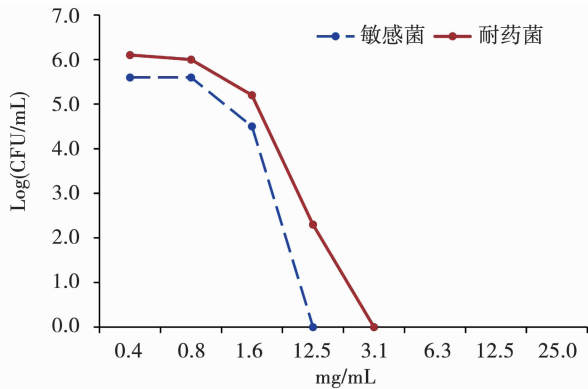


图 1 小儿青翘颗粒对鲍曼不动杆菌的量效杀菌曲线

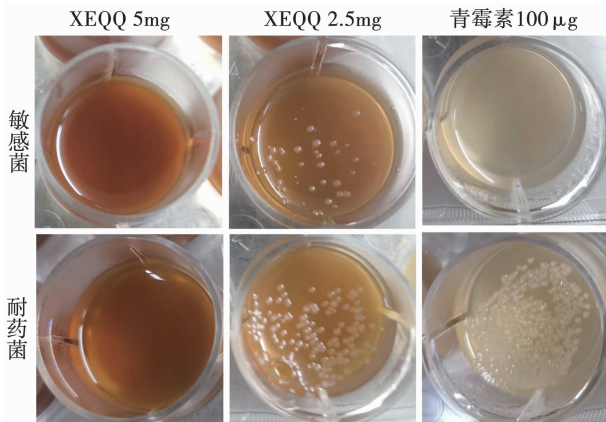


图 2 小儿青翘颗粒对鲍曼不动杆菌体外抗菌活性

3.3 小儿青翘颗粒对鲍曼不动杆菌的时效杀菌曲线测定结果

以时间为 x 轴和以对应菌落数的对数为 y 轴绘制小儿青翘颗粒对鲍曼不动杆菌的时效杀菌曲线,结果如图 3 所示。可以看出,小儿青翘颗粒在 20, 10 和 5 mg/mL 3 个剂量条件下均可以时间依赖性地杀灭鲍曼不动杆菌敏感株和耐药菌株,且两者无明显差别,表明小儿青翘颗粒杀灭鲍曼不动杆菌的效应具有较好的广谱性;随着浓度的增加,杀灭细菌的时间缩短,表明随着浓度增加小儿青翘颗粒的杀菌效率增强。而阳性药青霉素与庆大霉素除对敏感菌株有较好的抑制作用外,对耐药菌株基本无任何杀灭作用,见图 4。

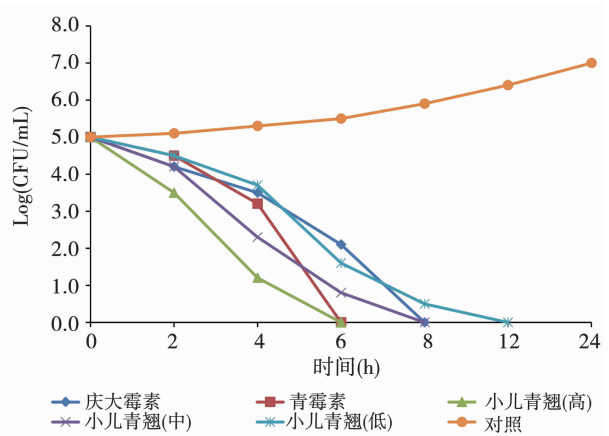


图 3 小儿青翘颗粒对鲍曼不动杆菌敏感菌株的时效杀菌曲线

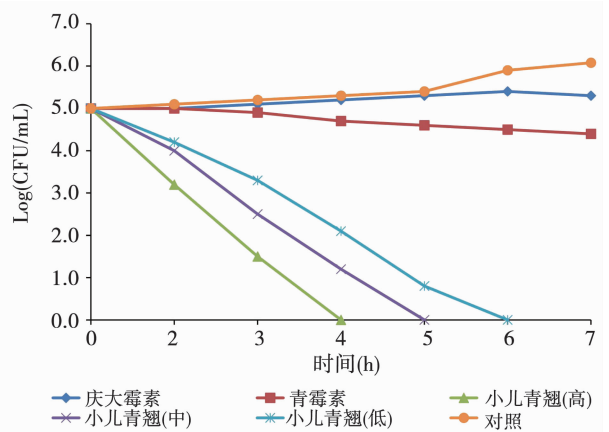


图 4 小儿青翘颗粒对鲍曼不动杆菌耐药菌株的时效杀菌曲线

4 讨论

鲍曼不动杆菌是当前临床最为严重的多重耐药菌,医院内感染的死亡率高达 35%,迄今尚无有效的治疗药物与治疗策略^[6]。因此,抗鲍曼不动杆菌感染是当前微生物研究领域的热点与难点。中草药活性成分多,药理作用广泛,在抗菌、抗病毒以及抗寄生虫等方面具有独特优势。现有大量文献研究表明,中草药如黄连、黄芩、黄柏、金银花等对临床常见的病原菌如大肠杆菌、沙门氏菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌,鲍曼不动杆菌均具有较好的抑制作用^[1-6]。此外,多数中草药不仅具有广谱的抗菌活性,而且可以有效缓解细菌的耐药性问题。

小儿青翘颗粒是一种小儿专用的纯中药复方制剂,以《温病条辨》中经典方“银翘散”为基础方,联合“柴胡葛根汤”加减而成,具有疏风清热、解毒利咽,消肿止痛之功效。其组方为山银花、连翘、粉葛、大青叶、山豆根、柴胡、甘草。方中山银花主清热解毒,连翘主辛凉解表,葛根主润燥生津之效,大青叶与山豆根主清热解毒,利咽消肿之功。现有研究表明方中山银花、连翘、大青叶和山豆根均有广谱抗菌作用,特别对肺炎链

球菌、金黄色葡萄球菌等病原菌有很好的抑制作用^[2-5]。此外,该方还具有抗炎、解热和镇痛之效。因此,该方临床常用于治疗风热袭肺所致乳蛾,咽喉肿痛,喉核红肿、扁桃体炎等上呼吸道感染^[7-11]。但有关该方是否具有直接抑制呼吸道病原菌生长的作用迄今鲜有报道。

本研究选择以临床最易发生多重耐药感染的肺炎链球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌和副流感嗜血杆菌为研究对象对临床治疗小儿呼吸道感染的小儿青翘颗粒的抗菌效果进行了研究,发现小儿青翘颗粒具有较好的广谱抑菌活性,能抑制包括肺炎链球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌和副流感嗜血杆菌等多种常见呼吸道病原菌的生长,且对青霉素与庆大霉素具有显著抗性的耐药菌也表现出较好的抑制作用,其中对鲍曼不动杆菌的抑制效果最为显著。杀菌曲线结果也进一步证实小儿青翘颗粒具有剂量依赖性与时间依赖性抑制鲍曼不动杆菌生长的效应。综上所述,小儿青翘颗粒在体外具有较好的广谱抗菌活性,其抗菌活性可能与其具有较强的直接杀菌活性有关。本研究不仅拓展了小儿青翘颗粒在临床治疗呼吸道感染方面的应用,而且为该方剂的临床推广应用提供了理论基础。

参考文献:

[1] 林真亭,隋华秀,王皇斌. 中药抗菌活性的研究进展[J]. 海峡药

学,2019,31(10):57-60.

- [2] 徐晓津,李秀华,马一帆,等. 49 味中药及其复方与抗生素对溶藻弧菌的体外抑菌作用[J]. 广东海洋大学学报,2019,39(6):30-38.
- [3] 李海华,郭蔚冰,陈志强,等. 45 味中药对多重耐药大肠杆菌的抑菌效果[J]. 中国现代中药,2019,21(6):791-796.
- [4] 程招敏,陈泳余,彭方,等. 多种中药对泛耐药肺炎克雷伯菌体外抗菌活性筛选[J]. 蚌埠医学院学报,2020,45(4):515-522.
- [5] 高贵阳,黄志昂,黄晓辉,等. 鱼腥草等 12 种中药对铜绿假单胞菌的体外抗菌活性研究[J]. 中医临床研究,2019,11(13):18-21.
- [6] 周孟杰,蔡燕. 中草药抗鲍曼不动杆菌及其机制研究进展[J]. 甘肃医药,2019,38(12):1065-1069.
- [7] 胡璇,王小菊,沈妙文. 小儿青翘颗粒治疗小儿反复呼吸道感染的临床效果研究[J]. 世界中西医结合杂志,2020,15(3):520-523.
- [8] 苏建华,闫虹. 小儿金翘颗粒治疗小儿急性上呼吸道感染的临床研究[J]. 西北药学杂志,2020,35(2):299-303.
- [9] 蔡露良,林涛,钟广会. 小儿金翘颗粒治疗儿童急性上呼吸道感染的临床研究[J]. 中外医疗,2020,39(1):84-86.
- [10] 李传应. 小儿金翘颗粒联合头孢呋辛治疗小儿急性上呼吸道感染的临床观察[J]. 临床医药文献电子杂志,2020,7(1):2-3.
- [11] BARBRO, OLSSON - LILJEQUIST, CARL, et al. Methods for Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria[J]. Clin Infect Dis, 1994, 18 (Supple4):293-296.
- [12] 霍蓓蓓,霍娜娜,吴琳琳. 小儿金翘颗粒联合西药治疗小儿急性扁桃体炎的临床研究[J]. 世界中医药,2019,14(5):1255-1257.

In Vitro Anti - Bacteria Activity of Xiaoer Qingqiao Granule on Pathogens of Respiratory Tract

WANG Ronghua¹, ZHENG Zhihui¹, ZHANG Yuqian¹, MIN Rui¹, WANG Zehua¹,
HE Shuheng³, HUANG Yan³, ZHANG Pinghu^{1,2}

(1. Medical College of Yangzhou University, Institute of Translational Medicine, Key Laboratory of Geriatric Disease Prevention and Control of Jiangsu Province, Yangzhou 225009, China; 2. Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou 225009, China; 3. Yifan Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310000, China)

Abstract: Objective: To explore the activity of Xiaoer Qingqiao Granule on pathogenic bacteria of respiratory tract in vitro. Methods: The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of Xiaoer Qingqiao Granule against streptococcus pneumoniae, acinetobacter baumannii, klebsiella pneumoniae and haemophilus parainfluenzae were determined, and the bactericidal efficacy and dose - effect curve of Xiaoer Qingqiao Granule against acinetobacter baumannii were determined by plate method. Results: Xiaoer Qingqiao Granule showed good antibacterial effect on most pathogens of respiratory tract. The MIC ranges of Xiaoer Qingqiao Granule against streptococcus pneumoniae, acinetobacter baumannii, klebsiella pneumoniae and haemophilus parainfluenzae were 9.38 - 75, 4.69 - 9.38, 1.17 - 4.69 and 4.69 - 75 mg/mL respectively. The MBC ranges of Xiaoer Qingqiao Granule against above bacteria were 18.75 - 75, 4.69 - 9.38, 2.34 - 4.69 and 4.69 - 75 mg/mL respectively. Conclusion: Xiaoer Qingqiao Granule exhibited good antibacterial activities on common pathogens of respiratory tract.

Key words: Bacteria; Respiratory tract infection; Acinetobacter baumannii; Streptococcus pneumoniae; MIC; MBC