

## 中药体外抑菌研究的方法学进展

马建凤, 刘华钢, 朱 丹

广西医科大学 药理学教研室, 广西 南宁 530021

**摘 要** 目前利用我国中医药宝藏进行抗菌作用的研究已经取得了一定的成果, 中药因其作用独特日益受到关注。体外研究是新药开发的第一步, 抑菌试验方法应进行标准化, 使其更为方便和灵敏, 为准确评价药物作用提供重要依据。回顾了近年来研究中中药提取物体外抑菌作用的试验方法。

**关键词** 中药; 体外; 抑菌方法

**中图分类号:** R965.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1674-6376 (2010) 01-0042-04

我国中药历史悠久, 功效显著, 许多研究资料表明, 中药在体内外有不同程度的抑菌作用, 并且较抗生素不易产生耐药性。另外中药具有毒副作用小, 取材方便, 经济实惠的优点, 因此研究和开发中药抗菌药具有重大意义。中药药敏试验方法和抗生素药敏试验一样, 有扩散法、稀释法和比色法等, 但中药提取物一般都是混合物, 颗粒较粗, 成分复杂, 有的成分不溶或难溶于水而易溶于有机溶剂, 或对光和热不稳定。由于中药的特殊性, 对试验方法的选择和操作有着更高的要求。

### 1 扩散法

利用药物在琼脂中扩散使其周围的细菌生长受到抑制而形成抑菌圈, 根据抑菌圈大小判定细菌对药物的敏感性。主要包括 K-B 法, 杯碟法和平皿打孔法。结果受多种因素影响, 如培养基的质量、pH、琼脂的厚度、药物扩散力、接种菌量、孵育温度和时间等。优越性也很多, 如方法简单易行、价格便宜、药物选择性灵活、结果判断易被接受。

K-B 法即纸片琼脂扩散法, 是体外药敏试验的经典方法之一, 可用于多种微生物的体外药物敏感检测, 有利于大量标本的处理。药物吸取琼脂中的水分溶解后不断向纸片周围区域扩散形成递减的梯度浓度。纸片周围抑菌浓度范围内检测菌的生长被抑制, 形成透明的抑菌圈。含药纸片的制备: 选用吸水力强而质地均匀的滤纸, 用打孔机制成直径 6 mm 圆片。高压灭菌烘干后, 用逐片定量加样或浸泡的方法使每片含药液 10~20  $\mu$ L, 置真空干燥器

内抽干或 37  $^{\circ}$ C 孵箱 2~3 h 烘干。

杯碟法又称小杯法或平皿法<sup>[1]</sup>, 由牛津大学 Abraham 首创。小杯内的药物在接种有细菌的平皿培养基中扩散, 使杯子周围产生一个抑制细菌生长的抑菌圈, 其大小与药物作用大小成正比。内径 90 mm 的平板, 注入高压灭菌后水浴平衡至 50 $^{\circ}$ C 的水解酪蛋白琼脂 (MHA) 20 mL 作为底层并使其凝固, 另取适量培养基, 加入适量的菌悬液混匀, 每皿 5 mL 作为菌层。在供试菌的双层琼脂平板上, 按间隔一致的距离置小钢管即牛津小杯, 定量加入药液。

平皿打孔法<sup>[1,2]</sup>, 又称挖孔法或打洞法, 吸取菌液, 加入 50  $^{\circ}$ C 的培养基, 混匀后倒入 90 mm 平板, 或按管碟法倒好双层平板, 凝固后用无菌打孔器在琼脂平板上打直径 6 mm 的孔 6 只, 以无菌针头挑出孔内琼脂。滴少量融化琼脂培养基于小孔中封底, 以防药液从皿底流走。向孔内定量加入药液, 37  $^{\circ}$ C 培养 16~18 h 后观察抑菌圈大小, 求出平均值。

TTC 快速纸片扩散法, 细菌的琥珀酸脱氢酶在其繁殖过程中活力增强, 能使无色的氯化三苯四氮唑 (TTC) 还原为红色的三苯甲瓚, 细菌的繁殖被药物抑制时, 琥珀酸脱氢酶的活力下降, 不能使 TTC 还原, 则不现红色。内径 90 mm 的平板内分别加入 0.5 mL 5 g/L 的 TTC 和浓度为  $10^9$  CFU/mL 的待测菌液和 50 $^{\circ}$ C 的 25 mL MHA, 混匀, 凝固后贴上含药纸片, 37 $^{\circ}$ C 培养 1~3 h 即可得出结果。本法对肺炎球菌、链球菌等, 在培养基加 10% 无菌血清后出现结果, 但培养时间需延长至 7~8 h, 不能达到快速

收稿日期: 2009-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目“两面针生物活性与化学特征相关指纹图谱的研究”(30760302); 广西壮族自治区科技厅自然科学基金项目(0832127)

作者简介: 马建凤, (1985—), 女, 广西浦北人, 药理学硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。电话: 07715354066; E-mail: mjf424@163.com.

检测的目的。

抑菌或杀菌作用的观察：从平板透明抑菌圈中挑取一小块琼脂进行液体培养 16 h 后，再涂平板，于 37℃ 培养 24 h，观察各平板上菌落的生长情况<sup>[3]</sup>。

刘春云等<sup>[1]</sup>采用纸片法、杯碟法和打孔法研究了凤丹丹皮酚的体外抗菌作用，并对 3 种方法进行了比较：K-B 法所得抑菌圈较规则，易测量，纸片的质量、含药量和保存方式等对结果都有影响；杯碟法操作需非常小心，否则易造成牛津杯在琼脂平板表面滑动，药物向菌层中渗透扩散不均匀，得到的抑菌圈不规则；打孔法和杯碟法相比，省去了数量较多的牛津杯，且所得抑菌圈规则清晰。路俊仙等<sup>[4]</sup>用 K-B 纸片扩散法观察了不同产地黄芩 100% 浸出液的体外抑菌活性的差别。戴文君等<sup>[5]</sup>采用杯碟法对见血封喉内生真菌进行 3 种人体病原菌的抑菌活性试验，结果内生真菌 J6 对 MRSA 有明显的抑制作用。研究<sup>[6]</sup>表明 TTC 快速纸片扩散法由于抑菌环呈圆形无色，细菌生长部分为鲜红色至紫红色，对比强烈，结果极易观察和判断。TTC 法和 K-B 法药物敏感度基本一致，选用标准菌株时抑菌圈也没有显著差异，因此结果可靠。李先斌等<sup>[7]</sup>发现采用半固体更利于细菌活动和获取营养，为细菌快速生长扩散提供了条件，药物在半固体上扩散速度也更快，还可节省 40%~50% 的培养基。

## 2 稀释法

稀释法是将药物倍比稀释，形成一系列的药物稀释浓度，再往其中加入一定量的菌液，完全抑制细菌生长的最低浓度即为该药的 MIC。

琼脂稀释法，根据实验设计，将不同浓度的药物分别加入 50℃ MHA 中，充分混匀倾倒入于灭菌平皿，琼脂厚度约 4 mm。通常按 1:9 比例配制药物琼脂平板，根据需要来选择药物浓度范围。以多点接种器或定量移液器吸取备好菌液 (1~2 μL) 接种于琼脂表面，形成直径为 5~8 mm 的菌斑，每个菌斑含菌数为 10<sup>4</sup> CFU，以抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC。无细菌生长的平板，37℃ 培养箱中续培养 18 h，以不出现菌落的平板内药物的最小浓度为最小杀菌浓度 (MBC)。

常量肉汤稀释法，取无菌试管 (13 mm×100 mm) 12 支，每管加入水解酪蛋白肉汤 (MHB) 2 mL，在第 1 管加入药物 2 mL 混匀，连续倍比稀释至第 11 管，并从第 11 管中吸取 2 mL 弃去，第 12 管为不含

药物的生长对照。在每管内加入制备好的接种物各 100 μL，使每管最终菌液浓度约为 5×10<sup>5</sup> CFU/mL。在读取 MIC 前，检查生长对照管的细菌生长情况是否良好，同时检查接种物的传代培养情况以确定其是否污染，肉眼观察药物最低浓度管无细菌生长者，即为受试菌的 MIC。白雪等<sup>[8]</sup>采用肉汤稀释法测量水杨梅和冰团花不同提取物对 6 种实验菌的抑菌活性。

微量稀释法<sup>[9]</sup>，将不同浓度的药物溶液分别加到灭菌的 96 孔聚苯乙烯板中，第 1 至第 11 孔加药液，每孔 10 μL，第 12 孔不加药作为生长对照，向每孔中加稀释好的菌悬液 100 μL，密封后置 37℃ 孵育 16~20 h 判断结果。黑色背景光源下与生长对照孔中细菌的生长特性如肉汤混浊、孔底出现沉淀等比较判断，完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC。若各浓度均有细菌生长，该药为抑菌作用。

未见细菌生长的培养物各吸取 0.1 mL 涂布于琼脂平板，继续培养，菌落数小于 5 个的最低样品浓度即为该样品的最低杀菌浓度<sup>[10]</sup>。

一般说来，用连续稀释法测出的药物抗菌效力比用扩散法要大些，可能与中药成分在琼脂中的渗透性有关。由于中药提取物都是悬液，药物在固体培养基上扩散受到限制，结果易受到影响。研究<sup>[11]</sup>表明琼脂稀释法的优点是可在一个平板上同时作多株菌 MIC 测定，结果可靠，易发现污染菌。缺点是制备含药琼脂平板费时费力，中药浓度不好控制。通常对革兰阴性杆菌而言，微量肉汤稀释法测得的 MIC 与常量肉汤稀释法测得的结果相同或低一个稀释度 (1 孔或 2 倍)。但这两种检测方法的影响因素很多，如培养基的成分和 pH 值、接种菌浓度、孵育时间和温度、终点判读的误差等。

## 3 改良液体稀释法

中草药为天然药物，其抗菌作用较同等浓度的纯化学制品为弱，在用量上较抗生素为多，且中药浸出液本身具有浓度和色度。稀释法由于在观察结果时需要观察浓度及管底或孔底的细菌沉积，结果较难判定，常需借助其他手段来判断终点。

赵晓丹<sup>[12]</sup>等借助比色法测定醋蒜提取物的抑菌活性，即除实验组外，另取一稀释系列，不接种任何菌作为空白对照。将培养后的培养物与空白对照，用分光光度计进行比色测定，以相同浓度下二者浊度完全相同为准，即培养基中完全没有菌生长

的最低浓度为 MIC。

显色法, 根据细菌可以氧化还原指示剂, 产生肉眼可见的颜色变化来判断结果。噻唑蓝 (MTT) 和氯化三苯四氮唑 (TTC) 都是四唑盐, 细菌能将含有偶氮基的四唑盐还原成甲瓚, 把 MTT 还原成蓝紫色甲瓚, 把 TTC 还原成红色甲瓚。Alamar blue 则是一种新开发的染料<sup>[13]</sup>, 在国内尚未被广泛采用, 与 MTT 相比, Alamar blue 的水溶性好, 对细胞无损伤, 在培养液中性质稳定, 不易自发地产生氧化还原反应。孵育结束 3 h 前加入指示剂, 继续孵育, 记录颜色变化。MTT: MIC 的定义是阻止颜色从黄色变为紫色的最低药物浓度。TTC: MIC 的定义是阻止颜色变红的最低药物浓度。Alamar blue: MIC 定义为阻止颜色从蓝色变为粉红色的最低药物浓度。

在培养基中加入 1.0% 葡萄糖和 1.6% 溴甲酚紫指示剂<sup>[14]</sup>, 或用葡萄糖酚红肉汤 (即肉汤中含 1.0% 葡萄糖, 0.002% 酚红) 代替普通肉汤。细菌利用培养基中的葡萄糖发酵产酸遇溴钾酚紫使培养基的紫色褪去, 使酚红指示剂由红色变成黄色。此法必须调节药液的 pH 近中性, 加入的碱液和某些细菌如绿脓杆菌在生长代谢过程中产生的碱性物质, 能中和细菌自身分解葡萄糖时所产生的酸。作用强的中药在稀释到很低浓度时仍可抑制大部分的细菌生长, 仅有少量细菌存在, 其在数量上达不到发酵葡萄糖后出现可见现象的目的。某些中药液自身颜色就是黄色或者颜色较深, 浓度高的药液管仍为药液颜色或稍有变化。

#### 4 菌落计数法

帕提古丽·马合木提等<sup>[15]</sup>测定西伯利亚花楸枝条提取物抑菌作用, 将不同浓度的药物与菌液混合并作用一定时间后, 与生长对照在 MH 培养基上倒平皿, 35℃ 培养 24 h, 观察细菌生长情况, 分别数菌落数, 按下列公式计算抑菌率:

$$\text{抑菌率}(\%) = (\text{对照皿菌落数} - \text{试验皿菌落数}) \times 100\% / \text{对照皿菌落数}$$

也可先通过菌落计数和测定吸光度, 作出吸光度—菌数标准曲线。以样品液所测得的吸光度, 从标准曲线中查出对应的菌数。通过添加中药和不加中药的菌液浓度的变化即可得到该样品液的抑菌效果<sup>[16]</sup>, 用抑菌率表示如下:

$$\text{抑菌率}(\%) = (\text{对照菌浓度} - \text{含药菌浓度}) \times 100\% / \text{对照菌浓度}$$

#### 5 MTT 比色法

噻唑蓝 (MTT) 分析法首先被 Mosmann 于 1983 年用于哺乳动物细胞生长存活的测定。其原理是: MTT (四甲基偶氮唑盐) 分子结构中的四氮唑环可在活细胞线粒体的琥珀酸脱氢酶的催化下断裂, 形成难溶性的蓝紫色结晶物甲瓚 (formazan), 沉积于细胞内或细胞周围, 在一定细胞浓度范围内, 其生成量与活细胞数量及细胞活性状态呈正比关系。用异丙醇或二甲亚砜 (DMSO) 等有机溶剂溶解甲瓚, 该溶液在 570 nm<sup>[17]</sup> 波长下的吸光度 (A) 值可间接反应活细胞数量。抑制率 =  $(1 - \text{测定孔 } A \text{ 值} / \text{阳性对照孔 } A \text{ 值}) \times 100\%$ , 以开始出现微混的孔 (即阳性对照孔被抑制达 80% 以上的孔) 的药物质量浓度作为其 MIC。

Stevens 等<sup>[18]</sup>报道用 MTT 比色法测定吞噬细胞的杀菌活性, 其应用于检测细菌活性, 较之传统的平板计数法更快、更灵敏、更低廉。研究<sup>[19]</sup>表明, MTT 比色法可很好的反映细菌的数量和生长存活状况, 而且细菌还原 MTT 速度较快, 一般加入 MTT 后 30 min 可出现清晰的蓝色, 比哺乳动物细胞快 (一般 4~6 h); 以 2 倍以上体积的 DMSO 能完全溶解甲瓚颗粒, 可避免离心等步骤, 这对于实际工作中进行快速和大量样本的检测, 十分方便。肖晶等<sup>[20]</sup>对 MTT 法进行改进, 使其适用于抗铜绿假单胞菌药物的高通量药物筛选, 结果显示 MTT 比色法可以用来评价天然产物与合成化合物的抗菌活性。与常规 MIC 药敏测定方法 (常量稀释法) 比较, 结果一致。

其使用的前提在于建立待测菌种的直接数据与菌体浓度之间的回归关系或标准曲线; 使用的关键在于待测菌液的浓度必须调整到适用范围之内。不同细菌其脱氢酶的量和活性不同, 实验条件如温度、反应时间、MTT 浓度等也不同。另外, MTT 极易被氧化, 易受实验条件中混入的各种氧化剂的干扰。

#### 6 营养物质消耗法

细菌的生长与繁殖离不开营养物质, 通过测定细菌生长过程中营养物质的消耗来判读结果。

利用细菌被抗菌药物抑制时, 其摄取营养成分, 如葡萄糖的能力下降, 培养基中剩余的葡萄糖浓度高的原理制备测试组和对照组, 对照组细菌生长摄取葡萄糖多, 培养基中剩余的葡萄糖浓度低。通过比较各药物浓度组的葡萄糖的量, 求得 MIC 值。以葡萄糖氧化酶法准确测定葡萄糖消耗量<sup>[21, 22]</sup>, 或用

3, 5-二硝基水杨酸比色定糖法定量剩余葡萄糖, 该法具有较高的准确性和重复性。

蛋白质也是一类非常重要的营养物质。细菌通过摄取环境中蛋白质来构建子代细胞骨架及重要细胞器。蛋白质的量占细菌干重的70%, 培养基中蛋白质的量是一定的, 随着细菌的消耗, 培养环境中蛋白质的量会逐渐减少。因此, 可以通过测定蛋白质的量变化来判读结果。采用凯氏定氮法测定蛋白质的量, 能够满足快速试验的要求, 却比较繁琐。也可用考马斯亮蓝 G250 染色法<sup>[23]</sup>。

## 6 结语

体外试验结果能为新药研究及开发提供有价值的信息, 且简便、快速、经济、重复性好。传统的中药抑菌实验方法存在许多问题, 应对培养基使用, 菌液制备, 接种量等进行规范化。另外, 体外试验并没有考虑到一种细菌对一种抗菌药在体内的动力学和复杂的生物学, 由于中药成分复杂多样, 目前对其抑菌机制的探讨研究还比较少, 研究手段也较局限。因此应加强对药效物质基础, 药动学及作用机制的研究, 这样才有利于全面了解和阐明中药的抑菌作用。

## 参考文献:

- [1] 刘春云, 武廷章, 周大喜, 等. 凤丹丹皮酚抗菌作用的研究[J]. 生物学杂志, 2000, 17(3): 23-24.
- [2] 张劲松, 李 博, 陈家宽, 等. 加拿大一枝黄花挥发油成分及其抗菌活性[J]. 复旦学报(自然科学版), 2006, 45(3):413-415.
- [3] 胡静丽. 杨梅叶提取物抑菌作用的研究[D]. 浙江大学, 2002:24.
- [4] 路俊仙, 崔 璐, 张才波, 等. 不同种质黄芩体外抑菌作用的研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(6):364-366.
- [5] 戴文君, 张秀环, 黄贵修, 等. 见血封喉内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 中草药, 2009, 40(6):955-957.
- [6] 李 慧. 一种新的细菌药敏试验方法的探讨[J]. 医药世界, 2006, (9):63-64.
- [7] 李先斌, 莫丽亚, 赵 蕊. 用显色半固体进行快速细菌药敏试验的方法[J]. 实用预防医学, 2004, 4(2):443-444.
- [8] 白雪, 林 晨, 李药兰, 等. 水杨梅和冰团花提取物体外抑菌活性的实验研究[J]. 中草药, 2008, 39(10): 1532-1535.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理学实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [10] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [11] 吴 决, 顾世海, 王立霞. 抗菌性中药药物敏感试验方法研究[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2000, 12(6):489-491.
- [12] 赵晓丹, 傅达奇, 陈计峦, 等. 醋蒜提取物抑菌作用研究[J]. 中国调味品, 2004, 10:14.
- [13] 盛大平. Alamar blue 在临床检验中的应用[J]. 国外医学·临床生物化学与检验学分册, 2005, (6):367-371.
- [14] 高尚进, 毛 艳, 周汉东, 等. 11 种中草药对 8 种常见细菌的体外抑菌试验[J]. 川北医学学报, 2008, 23(5): 466-468.
- [15] 帕提古丽·马合木提, 祖丽皮亚·玉努斯. 西伯利亚花椒枝条提取物抑菌作用的测定[J]. 食品科学, 2006, 17(11):186.
- [16] Malkoskim K. A novel antibacterial milk[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 8:2309-2315.
- [17] Gabrielson J, Hart M, Jarelov A, et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates[J]. *J Microbiol Methods*, 2002, 50(1):63-73.
- [18] Stevens M G, Olsen S C. Comparative analysis of using neutrophil bactericidal activity. [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 157:225.
- [19] 张建清, 刘晓波. 噻唑蓝比色法检测细菌生长和存活状况的研究[J]. 卫生研究 2002, 31(5):361-363.
- [20] 肖 晶, 朱永红, 李 洋, 等. 用甲基噻唑蓝筛选抗铜绿假单胞菌药物方法的建立[J]. 中国新药杂志, 2006, 17:1443-1446.
- [21] Riesselman M H, Hazen K C, Cutler J E. Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(1):333-340.
- [22] Li R K, Elie C M, Clayton G E, et al. Comparison of a new colorimetric assay with the NCCLS broth microdilution method(M27-A) for antifungal drug MIC determination[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38 (6):2334-2338.
- [23] 蒋立科, 杨婉身. 现代生物化学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.