

- tion of a cell dispersion method of sputum examination [J]. Clin Exp Allergy, 1994, 24: 778-783.
- [7] Hargreave F E. Induced sputum for the investigation of airway inflammation: evidence for its clinical application [J]. Can

- Respir J, 1999, 6(2): 169-175.
- [8] 宁耀瑜, 珂美珍, 周晓铃, 等. 雾化吸入鱼腥草提取液对大鼠呼吸管道及全身免疫功能的影响 [J]. 广西医科大学学报, 1997, 14(4): 70-72.

应用 M-H 琼脂进行黄连对 252 株临床菌株的体外抗菌活性研究

李仲兴, 王秀华, 赵建宏, 杨敬芳, 王 鑫*
(河北医科大学第二医院, 河北 石家庄 050000)

摘要: 目的 评价黄连对 252 株临床菌株的体外抗菌活性。方法 采用新方法 (M-H 琼脂代替营养琼脂) 对黄连进行金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和肠球菌等体外抗菌活性检测。结果 黄连对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和肠球菌的 MIC₅₀ 分别为 0.161, 0.161 和 0.322 mg/mL。结论 黄连对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和肠球菌均有很好的抗菌活性。

关键词: 黄连; 金黄色葡萄球菌; 表皮葡萄球菌; 肠球菌; 抗菌作用

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)04-0337-03

Studies on *in vitro* antibacterial activity of *Coptis chinensis* against 252 strains in clinic with mueller-hinton agar

LI Zhong-xing, WANG Xiu-hua, ZHAO Jian-hong, YANG Jing-fang, WANG Xin

(Second Hospital of Hebei University of Medical Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

Key words *Coptis chinensis* Franch; *Staphylococcus aureus* Rosenbach; *Staphylococcus epidermidis* (Winslow et Winslow) Evans; *Enterococcus* Thiercelin et Jouhau; antibacterial effect

黄连为临床常用的清热燥湿、泻火解毒中药^[1]。

徐仲吕报道 100% 黄连水煎剂对志贺氏菌有抑制作用^[2]。刘国声报道黄连对金黄色葡萄球菌 (以下简称金葡菌) 的最低抑菌浓度 (MIC) 为 1:160^[3]。西安医学院附一院检验科报道 0.15% 黄连煎剂可抑制金葡菌生长^[4]。中国医学科学院药物研究所报道黄连对金葡菌的 MIC 为 1:128^[5]。还有许多报道^[6-8] 对研究黄连及其临床应用起了重要作用, 但报道大多为定性实验, 只有少数是定量试验, 而且多使用的是 1 株细菌, 由于样本小, 很难有重复性和代表性, 尤其所用培养基均为肉膏汤和营养琼脂, 其结果显示黄连对金葡菌的 MIC 数值较低。我们将黄连定量抑菌实验作了重大改进: 一是利用琼脂稀释法 (M-H 琼脂代替营养琼脂); 二是采用大批量菌株进行实验; 三是将手工接种细菌改用多点接种仪接种 (每次可接种 28 株细菌)。经改进后不仅准确性高, 具可重复性, 且提高了中药的抑菌效果, 也为中药研究早日与世界接轨创造了条件。

1 材料与方 法

1.1 材料: 微量多点接种仪: 北京医科大学昆仑药物发展研究所生产。培养基: Mueller-Hinton 琼脂 (美国 BD 公司生产, BBL, 简称 M-H 琼脂)。黄连 (购自河北省药材公司), 先将黄连按常法做成煎液^[9,10], 即 100 g 黄连, 文火煎后做成 200 mL 煎液 (为 50% 黄连煎液) 备用。菌种: 从我院临床病人的血液、尿液、脓汁、痰等标本分离的菌株共 252 株, 其中金葡菌 112 株, 表皮葡萄球菌 112 株, 肠球菌 28 株。

1.2 方法: 采用琼脂稀释法, 用 M-H 琼脂对黄连进行定量抗菌实验^[11,12]。

1.2.1 药液稀释: 排列无菌中试管 10 只, 于 2~10 只管中加无菌蒸馏水 10 mL, 取 50% 黄连水煎液 20 mL, 于第一管加入 10 mL, 第 2 管加入 10 mL, 于第 2 管混合后取出 10 mL, 加入第 3 管, 再混合后取 10 mL 放入第 4 管, 如此连续稀释至第 9 管取出 10 mL 弃掉。第 10 管只有无菌蒸馏水作对照。这样 1~9 管只含有不同浓度药液各 10 mL。

1.2.2 含药平板制备: 用无菌操作将已溶化的无菌 M-H 琼脂 900 mL, 分装于 10 瓶, 每瓶 90 mL, 将第

* 收稿日期: 2000-06-12

基金项目: 国家中医药管理局重点课题资助项目 (编号: 97Z099)

1管含 10 mL 50% 黄连水煎液放入含 90 mL 培养基的瓶中,混合后倾注 4个平板,每个平板含 25 mL含药琼脂,第 2管以后的平板制备同第 1管,凝固后备用 这样第一组的琼脂平板实际含黄连 5% (1∶ 2),第二组为 1∶ 40,第三组为 1∶ 80……。

含药培养基的药物浓度计算: 将一定量 (50 mL 或 100 mL) 一定比例 (1∶ 2或 1∶ 4)的生药水煎液于 37℃ 温箱中烘干,称重,求出每毫升水煎液的实际重量,就可算出每毫升培养基中水煎药液干重量。如 100 mL 50% 黄连煎液干重为 10 300 mg,第一组 100 mL含药培养基含有煎液 10 mL,那么每毫升培养基含煎液干重 = $\frac{10300}{100} \times \frac{10}{100} = 103 \times \frac{1}{10} = 10.3 \text{ mg}$

所以第一组含药培养基实际含煎剂干重为

10.3 mg /mL,因倍量稀释,故第二组含药培养基为第一组数被 2除即可。

1.2.3 菌液制备: 将金葡菌等新鲜培养物(菌落)制成菌液,浓度相当于 0.5 麦氏比浊管。

1.2.4 用多点接种仪分别吸取各种菌液并点种于含不同药物浓度的琼脂平板上。于 35℃ 培养 18~24 h,观察 MIC^[11,12],并统计出 MIC₅₀和 MIC₉₀的药物浓度和累积抑菌百分率。

2 结果

通过黄连煎剂对 112株金葡菌及 112株表皮葡萄球菌和 28株肠球菌的抑菌实验,结果表明黄连对上述 3种细菌的抑菌效果均较好。其 MIC₉₀分别为 2.575, 1.288和 0.644 mg /mL, MTC₅₀分别为 0.161, 0.161和 0.322 mg /mL,结果见表 1,2

表 1 黄连对金葡菌、表皮葡萄球菌和肠球菌的抗菌作用

菌种	菌株数	MIC(mg /mL)			
		MIC范围	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC _{总数}
金葡菌	112	0.04~ 10.3	0.161	2.575	0.161
表皮葡萄球菌	112	0.04~ 2.575	0.161	1.288	0.322
肠球菌	28	0.04~ 0.644	0.322	0.644	0.322

表 2 黄连对金葡菌、表皮葡萄球菌和肠球菌的累积抗菌率

菌种	菌株数	MIC(mg /m L)							
		10.3 (1∶ 20)	5.15 (1∶ 40)	2.575 (1∶ 80)	1.288 (1∶ 160)	0.644 (1∶ 320)	0.322 (1∶ 640)	0.161 (1∶ 1280)	0.08 (1∶ 2560)
金葡菌	112	生长菌株数	3	5	11	16	24	26	36
		抑制菌株数	109	107	101	96	88	86	76
		累积抑菌率(%)	97.32	95.54	90.18	85.71	78.57	76.79	69.86
表皮葡萄球菌	112	生长菌株数	0	0	0	1	18	42	55
		抑制菌株数	112	112	112	111	94	70	57
		累积抑菌率(%)	100	100	100	99.11	83.93	62.5	59.89
肠球菌	28	生长菌株数	0	0	0	0	0	3	15
		抑制菌株数	28	28	28	28	28	25	13
		累积抑菌率(%)	100	100	100	100	100	89.29	46.43

3 讨论

关于黄连的抑菌作用,以前研究报道大多为定性实验,即黄连有无抗菌作用;真正观察黄连的抗菌作用,应采用定量方法,即稀释法(分为琼脂稀释法和肉汤稀释法) 我们通过用 M-H琼脂以琼脂稀释法研究表明,黄连对革兰阳性球菌有较强的抑菌作用,不仅对两种葡萄球菌有较好的抑菌效果,而且对肠球菌的抑菌活性也很好,生药的 1∶ 640 (0.322 mg /mL)稀释,则可抑制 28株肠球菌的 89.29%。在目前肠球菌对许多抗生素耐药的情况下,黄连对肠球菌的抑菌效果,对治疗此菌的感染有重要的现实意义。

关于黄连体外抗菌实验所用的培养基,过去一

般液体培养基用肉汤或肉膏汤,固体培养基使用营养琼脂,由于培养基中大多含有蛋白胨,能钝化抗菌药物的抗菌作用,因此不能很好地显示黄连的抗菌作用。我们将国际上公认的抗菌药物敏感实验所用的培养基—— Mueller-Hinton琼脂培养基引入抗感染中药的抗菌实验中,提高了抗菌效果^[13],本试验在对黄连的抗菌实验中亦可看出此培养基可提高黄连的抗菌效果(表 3)

实验菌株是反映抗菌效果的重要指标,然而菌株之间其对抗菌药物耐药程度则截然不同。同种药物对同种菌的不同菌株的抑菌结果也不同,如我们使用的 112株金葡菌,黄连对这些菌株的 MIC最高可达 10.3 mg /mL,而有的菌株 MIC则低于

表 3 不同作者定量检测黄连对金葡菌抑菌活性报道情况

作者	报道年代	所用培养基	菌株数	菌株来源	MIC
刘国声 ^[3]	1950	肉膏汤	1	实验室保存	1: 160
中国医科学院药 物研究所 ^[5]	1960	肉膏汤	1	实验室保存	1: 128
陈杏科等 ^[14]	1987	双料基础培养基	1	实验室保存	1: 640
魏长志等 ^[9]	1994	营养琼脂	1	实验室保存	1: 320
本试验	2000	M-H琼脂	112	临床菌株	1: 1 280

* MIC₅₀数值

0.08 mg/mL,因此,要想对一种中药客观地反映其抑菌效果,就必须采用大样本,至少同一菌种的抑菌实验应在 30株以上,否则很难有代表性和重复性。

关于接种细菌方法,过去接种菌株,一般采用手工方法,由于取菌量不一,往往会出现误差,而且手工接种每次只能接种 1株细菌,不仅费时、费力,同时准确性差,建议今后琼脂稀释法应采用多点接种仪接种细菌,不仅易于操作,每次可接种至少 28株细菌,同时由于取菌量一致,从而保证了结果的准确性。

总之,中药抑菌实验宜采用 M-H琼脂,淘汰使用营养琼脂,采用大样本以多点接种仪进行实验,可促进中药抑菌实验逐步走向标准化,为中药尽快走向世界创造条件,发挥中药为全人类服务的重要作用。

参考文献:

- [1] 王浴生,邓文龙,薛春生.中药药理与应用[M].第二版.北京:人民卫生出版社,1998.
- [2] 徐仲吕.89种中药对志贺氏菌痢之体外抗生实验研究[J].中

华医学杂志,1947,3(3): 71-75.

- [3] 刘国声.中药抗生力研究(第二报)[J].中华新医学报,1950,1(4): 285-287.
- [4] 西安医学院附一院检验科.黄连、黄柏及小檗碱对痢疾杆菌及金黄色葡萄球菌抗生作用的观察[J].西安医学院学报,1958,(5): 40-42.
- [5] 中国医学科学院药物研究所.545种中药的抗菌作用筛选[J].药学通报,1960,(2): 59-63.
- [6] 向近敏,叶宗蕃.青霉素与黄连对化脓性葡萄球菌作用的比较[J].中华医学杂志,1957,(4): 276-277.
- [7] 微生物教研组.110种中药抗菌谱试验的初步结果[J].山东医学院学报,1959,(8): 42-45.
- [8] 郝洪贵.62种中药对小儿腹泻致病性大肠杆菌抗菌作用研究[J].辽宁医学杂志,1960,(9): 32-34.
- [9] 魏长志,张来周,时淑平.黄连与香连丸的体外抑菌实验对比[J].山东中医杂志,1994,13(1): 34-35.
- [10] 163医院药局.中药汤剂煎煮方法研究[J].中草药通讯,1976,6(7): 16-18.
- [11] 李仲兴,郑家齐,李家宏.诊断细菌学[M].香港:黄河文化出版社,1992.
- [12] Balows A. Manual of Clinical Microbiology [J]. 5th. Washington, DC: Am Society for Microbiology, 1991.
- [13] 李仲兴,王秀华,赵建宏,等.应用 M-H琼脂进行连翘体外抗菌实验的效果观察[J].中国中药杂志,2000,25(12): 742-745.
- [14] 陈杏科,黄必奎.黄连及其炮制品的体外抗菌研究[J].中成药研究,1987,9(5): 18.

大承气汤对大鼠肠平滑肌细胞内磷酸二酯酶的影响

谢文利¹,林秀珍²,马德禄²,李宏捷^{2*}

(1. 武警医学院 药理教研室,天津 300162 2 天津医科大学,天津 300070)

摘要:目的 探讨大承气汤的“通里攻下”作用与肌醇脂质信号系统的关系,进一步阐明大承气汤的作用机制。方法 采用反相高效液相色谱法分别测定了手术对照组、肠梗阻模型组、不同剂量大承气汤组的大鼠肠平滑肌细胞内磷酸二酯酶(PDE)的含量。结果 体内实验发现:50%、100%、250%大承气汤可使肠梗阻大鼠肠平滑肌细胞内PDE含量明显升高($P < 0.05$)。体外实验发现:50%、100%、250%大承气汤可使肠梗阻大鼠肠平滑肌细胞内PDE含量明显升高($P < 0.05$)。结论 大承气汤可使大鼠肠平滑肌细胞内钙调蛋白(CaM)活性提高,由此推断,大承气汤的通里攻下作用很可能是通过激活肌醇脂质(IP₃)信号转导系统使胃肠道平滑肌细胞内Ca²⁺释放增加,再通过CaM间接地激活一系列的蛋白激酶而实现。

关键词:大承气汤; IP₃; CaM; PDE; 肠道平滑肌

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2001)04-0339-03

* 收稿日期: 2000-07-08

作者简介: 谢文利(1968-),男,湖南,讲师,硕士学位。本科毕业于中国药科大学,硕士毕业于天津医科大学。研究方向为生化药理。
Tel 24372788-78457