

应用压电微生物传感仪研究五味消毒饮抑菌作用的量效关系

张晓青, 陈伶利*, 李斌, 黄莺, 许光明

湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

摘要: **目的** 研究五味消毒饮对细菌生长、代谢的影响及量效关系。**方法** 用多通道串联式压电传感仪(MSPQC)测定五味消毒饮对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌生长代谢影响的频移曲线, 根据曲线中细菌的检出时间(FDT)以及频移的大小得出最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC), 绘制出五味消毒饮的质量浓度与FDT的线性关系曲线, 进行量效关系分析。用传统试管稀释法进行平行实验。**结果** 五味消毒饮对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌有不同程度的抑制作用, 质量浓度越高抑菌效果越强, 其中对大肠杆菌的抑制作用最强, 24 h内对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌的MIC分别为0.7、0.8、0.8 g/mL, MBC均为0.9 g/mL。**结论** 用MSPQC检测抑菌类中药的量效关系具有实时、灵敏、定量、快速等优势。

关键词: 五味消毒饮; 抑菌; 最低抑菌浓度; 最低杀菌浓度; 量效关系; 多通道串联式压电传感仪

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)18-2569-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.015

Research on dose-effect relationship of Wuwei Xiaodu Drink on antibacterial metabolism by MSPQC

ZHANG Xiao-qing, CHEN Ling-li, LI Bin, HUANG Ying, XU Guang-ming

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective The effect of Wuwei Xiaodu Drink (WXD) on the metabolism of bacteria and the dose-effect relationship were investigated by MSPQC. **Methods** The frequency shift-time curves of the growth and metabolism of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* affected by WXD were obtained by using MSPQC. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were gained according to FDT and the frequency shift. The dose-effect relationship was analyzed according to the curve which represented the relationship between the concentration of WXD and FDT. The parallel test was carried out with the traditional tube dilution method. **Results** The results indicated that WXD inhibited the growth of *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*, which was dose-dependent. The higher the concentration was, the stronger the antibacterial effect became. The MBC of WXD for three kinds of pathogenic bacteria was 0.9 g/mL. The MIC of WXD for *S. aureus* and *P. aeruginosa* was 0.8 g/mL, however for *E. coli* was 0.7 g/mL within 24 h. **Conclusion** MSPQC is a sensitive, quantitative, quick method, which could provide the process information in real time for determining the dose-effect relationship of antimicrobial Chinese materia medica.

Key words: Wuwei Xiaodu Drink; bacteriostatic; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration; dose-effect relationship; MSPQC

五味消毒饮出自清代名著《医宗金鉴》, 主要由金银花、野菊花、蒲公英、紫花地丁、紫背天葵子组成, 是历代中医治疗由火毒结聚而引起痈疮疔肿的首选方剂, 具有清热解毒、消散疔疮的功效, 临

床上广泛用于治疗热毒所致的疾患, 效果良好^[1-3]。

多通道串联式压电传感仪(MSPQC)是一种基于电化学信号表达生物活性的监测仪器, 已广泛用于化学、生物学等检测领域^[4-6], 但将该技术用于中

收稿日期: 2013-01-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202451); 湖南省自然科学基金资助项目(12JJ4029); 湖南省教育厅科研项目(11A083, 11C0952, 11C0943); 湖南省高校科技创新团队资助项目(15); 湖南省重点学科中西医结合基础资助(100601)

作者简介: 张晓青(1978—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为药物化学。Tel: (0731)88458237 E-mail: xiaoqingzhang2006@163.com

*通信作者 陈伶利 Tel: (0731)85351771 E-mail: linglichen02@sina.com

药抗菌活性研究还鲜见报道。本实验应用 MSPQC 在线监测五味消毒饮对大肠杆菌 *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* Rosenbach、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula 生长的影响, 根据细菌的生长曲线, 得出最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC), 探讨五味消毒饮对 3 种细菌抑制作用的量效关系, 为开辟研究中草药及方剂量效关系研究的新方法和手段提供参考。

1 材料

1.1 药材与试剂

五味消毒饮各味药材均购自长沙市老百姓大药房, 经湖南中医药大学药学院周日宝教授鉴定, 金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾, 野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 干燥头状花序, 蒲公英为菊科植物 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. 的干燥全草, 紫花地丁为堇菜科植物紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 的干燥全草, 紫背天葵子为毛茛科植物天葵 *Semiquilegia adoxoides* (DC.) Makino 的干燥块根。

酵母浸膏、葡萄糖、枸橼酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁, 上海化学试剂公司; 牛肉浸膏, 北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.2 菌株

大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、绿脓杆菌 ATCC27853 由中南大学湘雅附属第三医院检验科提供。

1.3 仪器

多通道串联式压电微生物传感仪, 湖南大学生物传感与化学计量国家重点实验室研制。

2 方法

2.1 五味消毒饮提取物的制备

称取金银花 20 g, 野菊花、蒲公英、紫花地丁、紫背天葵子均 15 g, 分别加 10、8、8 倍量蒸馏水 (浸泡 60 min) 煎煮 3 次, 煎煮时间分别为 30、25、20 min, 合并 3 次滤液, 65 °C 减压定容至 80 mL (相当于含生药量 1.0 g/mL), 备用。

2.2 培养基的制备

培养基由酵母浸膏 3 g、葡萄糖 3 g、枸橼酸钠 3 g、磷酸氢二钾 2 g、牛肉浸膏 5 g、24.7% 硫酸镁 20 mL、蒸馏水 1 000 mL 组成, 除葡萄糖及硫酸镁外其他物质混合, 加热溶解, 调节 pH 至 7.6, 煮沸 5 min,

滤纸滤过并分装于锥形瓶中, 121 °C 灭菌 15 min。将葡萄糖配成 100 g/L 的水溶液, 硫酸镁配成 24.7 g/L 的水溶液, 分别高压灭菌 15 min (葡萄糖为 113 °C)。最后在无菌操作台中将上述灭菌液混匀, 于 37 °C 培养 48 h, 证明无菌生长后 4 °C 保存备用。

2.3 MSPQC 检测

向培养管中加入 1 mL 培养基、0.1 mL 的菌液 (1×10^8 CFU/mL) 和不同体积的五味消毒饮药液, 使药物终质量浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 g/mL。检测池中加入 2.5 mmol/L 的 KOH 溶液 6 mL 作为接受液。将培养管置于检测池中, 37 °C 恒温培养, 采集实时数据 (每隔 80 s 自动采集数据 1 次)。利用响应曲线的细菌检出时间 (FDT) 和频移判断 MIC 和 MBC。

2.4 试管稀释法检测五味消毒饮的抑菌作用

用培养基将 1.0 g/mL 中药母液分别稀释至 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 g/mL, 定容至 1 mL, 用不加中药液的培养基作为空白对照。每支试管中均接种 0.1 mL (1×10^8 CFU/mL) 的菌液, 37 °C 恒温培养 24 h。并用琼脂平板法^[7]进行佐证, 实验重复 4 次。

3 结果

3.1 五味消毒饮抑菌作用的响应曲线

细菌生长曲线如图 1 所示。FDT 和频移是评价试药抑菌的主要依据^[8-9]。曲线的转折点表示 FDT。FDT 前是细菌在培养基中的适应期, 很少有气体从培养基中放出来。由空白对照组 (0 g/mL) 细菌生长曲线可见, 在 FDT 后细菌开始进入生长旺盛期, 大量的 CO₂ 从培养基中释放并被 KOH 接收液所吸收, 溶液的电导值明显下降, 导致频移快速上升, 这一过程持续至细菌的衰亡期。由于绿脓杆菌不仅能分解葡萄糖产酸 (在微碱性条件下反应生成 CO₂), 而且还能分解枸橼酸钠产生 NH₃^[10], 因而其生长曲线的频移变化趋势及大小不同于其他 2 株细菌的生长曲线。绿脓杆菌生长曲线中空白对照组曲线上段是因为绿脓杆菌代谢引起的 CO₂ 的量多于 NH₃ 的量, 进而导致溶液电导值下降、频移上升; 而曲线中的下降段则是因为绿脓杆菌代谢引起的 NH₃ 的量多于 CO₂ 的量, 进而导致溶液电导值上升, 频移下降。

与空白对照组曲线相比, 给予五味消毒饮后, FDT 拖后, 频移下降, 且随药物质量浓度的增加, FDT 越拖后、频移越小, 表明五味消毒饮对细菌生

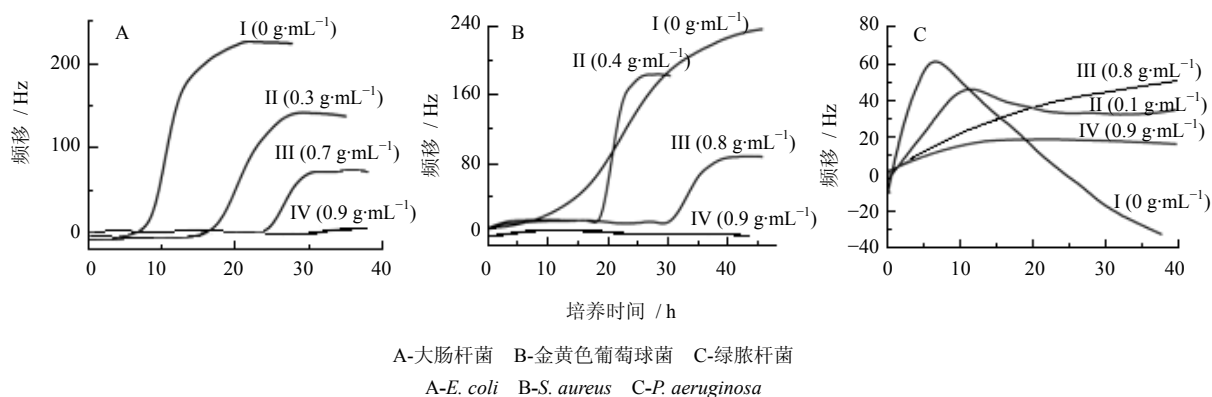


图1 五味消毒饮不同质量浓度抑菌作用的响应曲线 ($n = 4$)
Fig. 1 Response curves of WXD bacteriostasis at different concentration ($n = 4$)

长有抑制作用并呈质量浓度相关性。当 $FDT_{\text{给药组}} \geq 3 FDT_{\text{空白对照组}}$ ，频移降低至 $1/3$ ，经琼脂平板计数法验证已经达到 MIC。当检测曲线的频移只是小幅度漂移，经琼脂平板计数法验证没有细菌生长，表明已经达到 MBC。

各细菌生长曲线中 II 的 FDT 与频移比曲线 I 拖后或减小，表明五味消毒饮对细菌有抑制作用，但未达到 MIC。而大肠杆菌、金黄色葡萄球菌生长曲线中 III 频移降低至 $1/3$ ，表明五味消毒饮对这 2 个细菌的 MIC 分别为 0.7 、 0.8 g/mL 。绿脓杆菌生长曲线中 III 的 FDT 严重拖后，40 h 内未出现转折，表明五味消毒饮的 MIC 为 0.8 g/mL 。五味消毒饮对 3 种菌株的 MBC 均为 0.9 g/mL 。

3.2 FDT 与五味消毒饮质量浓度的关系

在五味消毒饮质量浓度为 $0 \sim 0.7 \text{ g/mL}$ ，FDT (Y) 与药物质量浓度 (X) 之间的关系如线性方程所示：大肠杆菌， $Y = 26.341X + 7.1707$ ， $r^2 = 0.9676$ ；金黄色葡萄球菌， $Y = 26.220X + 8.6098$ ， $r^2 = 0.9804$ ；绿脓杆菌， $Y = 38.415X + 7.7073$ ， $r^2 = 0.9959$ 。在相同质量浓度下，五味消毒饮对绿脓杆菌的抑制作用最弱，对大肠杆菌的抑制作用最强。

3.3 试管法检测五味消毒饮的抑菌作用

以空白对照组的菌落数计定为 100% ，五味消毒饮给药组菌落数只有空白对照组的 1% 时，视为 MIC。五味消毒饮质量浓度低于 0.4 g/mL ，目视法直接观察浊度，没有定量，其质量浓度从 0.4 g/mL 开始，全部转琼脂平板继续培养，并与空白对照组进行对照。结果发现随五味消毒饮质量浓度的增加，抑菌作用增强，对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌的 MIC 分别为 0.7 、 0.8 、 0.8 g/mL ，MBC 均为 0.9 g/mL 。

4 讨论

MSPQC 的检测管内部是培养管，管内盛有葡萄糖营养肉汤，细菌能代谢培养基中的碳源和氮源，产生的挥发性 NH_3 、 CO_2 被接收液 KOH 吸收，使接收液中 NH_4^+ 、 NH_2COO^- 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 不断增加，导致接收液的电导发生改变^[11]。这种电导变化能灵敏地被仪器检测到。MSPQC 法从频率变化曲线反映细菌的生长状况，由曲线的 FDT 和频移大小判断试药对细菌抑制作用的强弱^[8-9]，并得到 MIC 和 MBC 值。本实验通过 MSPQC 测定五味消毒饮对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌 3 种细菌抑制作用的强弱，并用试管稀释法进行了平行实验，且用琼脂平板法进行佐证。结果表明，FDT 与五味消毒饮浓度在一定范围内成线性关系，五味消毒饮对 3 种细菌均有抑制作用，且呈质量浓度相关性，其对大肠杆菌的抑制作用最强，对绿脓杆菌的抑制作用最弱，MSPQC 法和试管稀释法的实验结果一致。

与传统的纸片琼脂扩散法、试管稀释法等相比，用 MSPQC 法研究中药的抑菌作用显示出很大优势，即该方法操作简单，能实时、在线获得检测曲线，对结果的判断简单、客观^[12-17]，而且能从细菌生长曲线中判断试药抑制作用的强弱。因此 MSPQC 法在中药抑菌作用的研究中具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 游俊，王英夫. 五味消毒饮内服外敷治疗寻常性痤疮 35 例临床观察 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(8): 626-627.
- [2] 郭丽娜. 五味消毒饮合仙方活命饮治疗耳鼻喉科疾病的体会 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 2068.

- [3] 卢利员, 李永浩, 谢玉萍. 生脉散合五味消毒饮治疗晚期肺癌癌性发热临床观察 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(6): 692.
- [4] Mi X W, He F J, Xiang M Y, *et al.* Novel phage amplified multichannel series piezoelectric quartz crystal sensor for rapid and sensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(2): 939-946.
- [5] He F J, Li T, Zhang L L, *et al.* New MSPQC method for rapid identification and quantification of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Anal Lett*, 2009, 42(1): 58-67.
- [6] Ren J L, He F J, Yi S L, *et al.* A new MSPQC for rapid growth and detection of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24(3): 403-409.
- [7] Liu W, Hansen J N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(8): 2551-2558.
- [8] He F J, Zhang X Q, Liu Z H. A new sensor method for studying the effect of surfactants on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2006, 113(1): 428-434.
- [9] Zhao J W, Zhu W J, He F J. Rapidly determining *E. coli* and *P. aeruginosa* by an eight channels bulk acoustic wave impedance physical biosensor [J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2005, 107(1): 271-276.
- [10] 周学章, 田东林, 邓旭明. 雏鸡 *P. aeruginosa* 病原菌的分离和鉴定 [J]. 中兽医医药杂志, 2004, 23(3): 19-21.
- [11] Brettschneider O, Thiele R, Faber R, *et al.* Experimental investigation and simulation of the chemical absorption in a packed column for the system $\text{NH}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{S-NaOH-H}_2\text{O}$ [J]. *Sep Purif Technol*, 2004, 39(3): 139-159.
- [12] 马建凤, 刘华钢, 朱 丹. 中药体外抑菌研究的方法学进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 39-42.
- [13] 贾云鹏, 程 宁. 中药对大肠埃希菌抗生素耐药性逆转作用的实验研究 [J]. 陕西中医, 2009, 30(3): 366-368.
- [14] 阮殿清, 史默怡, 李建志, 等. 12 种中草药对耐药与非耐药菌株抑菌活性的对比研究 [J]. 中医药信息, 2011, 28(3): 52-54.
- [15] 李建志, 刘文丽, 王亚贤. 9 种中草药抗菌作用实验研究 [J]. 中医药学报, 2012, 40(1): 45-46.
- [16] 刘华钢, 申庆荣, 刘丽敏. 中药抗菌研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 463-465.
- [17] 廖凤霞, 孙冠芸, 杨致邦, 等. 枳实挥发油的化学成分分析及其抗菌活性成分的研究 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 20-22.