

• 实验研究 •

芪归银方对耐亚胺培南铜绿假单胞菌 耐药作用的影响

高洁¹ 刘清泉^{1*} 田金洲¹ 时晶¹ 邱泽计² 吴珺²

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700; 2. 北京中医药大学基础医学院)

基金项目:“十一五”科技重大专项(2009ZX09103-415); 国家中医药管理局传染病防治行业专项(200907001-2)

* 通讯作者: liuqingquan2003@yahoo.com.cn, (010)52176506

[摘要] 目的 观察芪归银方体外逆转耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药的作用。方法 采用血清药理学方法制备芪归银方含药血清; 常规肉汤培养耐亚胺培南铜绿假单胞菌(1643 菌株), 分为含药血清组(M-H 肉汤培养基 0.8ml+含药血清 0.2ml)、空白血清组(M-H 肉汤培养基 0.8ml+空白血清 0.2ml)、阳性对照组(M-H 肉汤培养基 1ml), 各组分别传代干预至第 8 代, 用二倍稀释法测定细菌对亚胺培南的最小抑菌浓度(MIC), 并比较抑菌环直径; 耐亚胺培南铜绿假单胞菌冻融离心, 收集酶粗提液, 以头孢噻吩为底物, 分为含药血清组(0.1mmol/L 头孢噻吩 95 μ l+3 μ l 含药血清+2 μ l 酶粗提液)和空白血清组(0.1mmol/L 头孢噻吩 95 μ l+3 μ l 空白血清+2 μ l 酶粗提液), 测定耐亚胺培南铜绿假单胞菌 β -内酰胺酶水解速率。结果 含药血清组耐亚胺培南铜绿假单胞菌对亚胺培南的 MIC 为 8 μ g/ml, 空白血清组与阳性对照组均为 16 μ g/ml; 含药血清组抑菌环直径显著大于阳性对照组($P<0.05$); 含药血清组 β -内酰胺酶水解速率显著低于空白血清组($P<0.05$)。结论 在芪归银方含药血清作用下, 耐亚胺培南铜绿假单胞菌对亚胺培南的敏感性一定程度上得到了恢复, 并且可以减慢 β -内酰胺酶的水解速率, 提示抑制 β -内酰胺酶水解可能是芪归银方干预耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药的机制之一。

[关键词] 芪归银方; 耐药; 铜绿假单胞菌; β -内酰胺酶; 亚胺培南

Effect of Qiguiyin Formula on the Imipenem-Resisting *Pseudomonas Aeruginosa*

GAO Jie¹, LIU Qingquan¹, TIAN Jinzhou¹, SHI Jing¹, QIU Zeji², WU Jun²

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700; 2. Basic Medical College, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Qiguiyin Formula [Formula of Huangqi (*Radix Astragalii*), Danggui (*Angelica sinensis*) and Jinyinhua (*Lonicera Japonica*)] on imipenem-resisting *pseudomonas aeruginosa*. **Methods** Serum pharmacological method was used to prepare drug-containing serum of Qiguiyin Formula. Imipenem-resisting *pseudomonas aeruginosa* (1643 strains) was cultured with conventional broth and was divided into the drug-containing group (0.8ml of MH broth+0.2ml of drug-containing serum), blank serum group (0.8ml of MH broth+0.2ml of blank serum) and the positive control group (1ml of MH broth). Three groups were given passaged intervention to the 8th generation. The minimal inhibitory concentration (MIC) value of strains in each group to imipenem was determined with double dilution method and the inhibition zone diameter was compared. Imipenem-resisting *pseudomonas aeruginosa* strains was frozen, thawed and centrifuged. The enzyme crude extracts was collected. Cephaloridine was used as substrate and divided into the drug-containing serum group (95 μ l of 0.1mM/L cephaloridine+3 μ l of drug-containing serum+2 μ l of enzyme crude extracts) and blank serum group (95 μ l of 0.1mM/L cephaloridine+3 μ l of blank serum+2 μ l of enzyme crude extracts). The hydrolysis rate of β -lactamase was determined. **Results** The MIC value of imipenem-resisting *pseudomonas aeruginosa* to imipenem in the drug-containing serum group, blank serum group and positive control group was 8 μ g/ml, 16 μ g/ml and 16 μ g/ml respectively. The inhibition zone diameter in the drug-containing serum group was significantly larger than that in the positive control group ($P<0.05$). The hydrolysis rate of β -lactamase in the drug-containing serum group was significantly lower than that in the blank serum group ($P<0.05$). **Conclusion** The sensitivity of imipenem-resisting *pseudomonas aeruginosa* to imipenem could be restored by the drug-containing serum of Qiguiyin Formula. The Qiguiyin Formula-containing serum of could reduce the hydrolysis rate of β -lactamase, which maybe the mechanism of its reversal effect on the resisting of imipenem-resistant *pseudomonas aeruginosa*.

Keywords Qiguiyin Formula [Formula of Huangqi (*Radix Astragalii*), Danggui (*Angelica sinensis*) and Jinyinhua (*Lonicera Japonica*)]; drug resistance; *pseudomonas aeruginosa*; β -lactamase; imipenem

以亚胺培南为代表的碳青霉烯类抗生素是临床治疗铜绿假单胞菌感染最有效的药物,但是近年来耐亚胺培南铜绿假单胞菌株不断增多^[1]。耐亚胺培南铜绿假单胞菌不但对碳青霉烯类及其他 β 内酰胺类耐药,而且还对喹诺酮类和氨基糖苷类等抗生素耐药^[2]。亚胺培南比头孢他啶、环丙沙星更易引起铜绿假单胞菌的耐药性^[3]。本研究采用血清药理学方法观察芪归银方含药血清对耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药性的干预作用,并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 动物与菌株

亚胺培南铜绿假单胞菌 1643 菌株(铜绿假单胞菌,由北京朝阳医院微生物室提供);清洁级健康 SD 大鼠 20 只,体重 180~220g,雌雄各半,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号:SCXK-(京)2007-0001。

1.2 药物及试剂

芪归银方(由黄芪、当归、金银花等组成)浓煎水提醇沉液(北京中医药大学中药学院提供)含生药 2g/ml;亚胺培南(默沙东公司,国药准字:J20070006),亚胺培南药敏纸片(Biomérieux),头孢噻吩标准品(中国药品生物制品检定所),头孢噻吩纸片(OXOID),M-H 琼脂(Mueller-Hinton Agar, Solarbio)。

1.3 仪器

电热恒温培养箱(DNP9162 JINGHONG),高速离心机(Centrifuge5417R EPPENDORF),DNA/蛋白分析仪(Du530 BECKMAN),恒温振荡培养仪(SPH-210A),超低温冰箱(THERMO)。

1.4 芪归银方含药血清制备

采用随机数字表法将大鼠分为给药组、对照组,每组 10 只。适应性喂养 3 天后,开始灌胃。给药组给予芪归银方浓煎水提醇沉液临床等效剂量的 2.5 倍,根据标准体重成人每天用量折算^[4]为 5g/d,将原液稀释成 1.25g/ml,每日灌胃 4ml,分早晚两次灌入;对照组灌胃相同体积蒸馏水,两组均灌胃 5 天,末次灌胃前 12h 禁食,灌胃后 1h 腹主动脉无菌取血。离心取上层血清同组混匀, -70℃ 冰箱保存备用。

1.5 芪归银方含药血清^[5]逆转耐药

应用二倍稀释法测得铜绿假单胞菌对亚胺培南的最小抑菌浓度(MIC)为 16 μ g/ml;常规肉汤培养铜绿假单胞菌,按不同干预措施分为:含药血清组:

M-H 肉汤培养基 0.8ml+含药血清 0.2ml;空白血清组:M-H 肉汤培养基 0.8ml+空白血清 0.2ml;阳性对照组:M-H 肉汤培养基 1ml。

分别接种 0.5 麦氏浓度铜绿假单胞菌菌液 5 μ l 于上述每组试管内,37℃ 温箱培养 24h 为一代,分别由各组试管中取菌液配制为上述浓度后继续传代,如此重复传代至第 8 代,用二倍稀释法分别测定每组菌株对亚胺培南的 MIC,并用亚胺培南药敏纸片测得抑菌环直径。

1.6 芪归银方含药血清对 β -内酰胺酶水解速率的作用

制备 β -内酰胺酶粗提液^[6],将铜绿假单胞菌接种于 10ml M-H 肉汤培养基中,37℃ 振荡培养 18h,后将 10ml 含菌肉汤转至 190ml M-H 肉汤中继续振荡培养 4h,收获前 2h 加入亚胺培南溶液作为诱导剂,终浓度为 1 倍 MIC,收获后于 4℃ 下,4300r/min 离心 20min,弃上清,PBS 缓冲液洗涤 2 次,并悬浮菌体于其中。冻融 2 次碎菌,菌液于 10000r/min,4℃ 离心 30min 后,取酶粗提液,分装 -20℃ 保存。定性检测:头孢硝噻吩纸片由浅黄色变为橙红色即为 β -内酰胺酶阳性。

测定铜绿假单胞菌 β -内酰胺酶水解速率,按不同干预措施分为:含药血清组:0.1mmol/L 头孢硝噻吩 95 μ l+3 μ l 含药血清+2 μ l 酶粗提液;空白血清组:0.1mmol/L 头孢硝噻吩 95 μ l+3 μ l 空白血清+2 μ l 酶粗提液。分别在 37℃、pH7.0 条件下用 DNA/蛋白分析仪 260nm 波长扫描 15min,每 30s 记录 OD 值,分别记录 0-3min、3-6min、6-9min、9-12min、12-15min 5 个时间段内的 OD 值平均变化速率,根据如下公式记算酶水解速率,水解速率 $V = [\Delta OD / \text{单位时间}] \times N / \Delta OD_{\text{总}}$,单位为 $\mu\text{mol} / (\text{min} \cdot \text{ml})$ ^[7],其中 $\Delta OD_{\text{总}}$ 指反应开始至所有药物水解完毕吸光度总变化值,N 指药物的摩尔量。为排除仪器本身对测定结果的影响,在不同时间进行 4 次成对重复测定,即第 1 次测定空白血清和含药血清干扰下的酶水解速率记为 V_{k1} 、 V_{m1} ,另选取时间第 2 次测定记为 V_{k2} 、 V_{m2} ,第 3 次测定记为 V_{k3} 、 V_{m4} ,第 4 次测定记为 V_{k4} 、 V_{m4} ,分别比较同时测定的两组间差异,并将同组 4 次测定值的均值进行比较。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件分析,计量资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 t 检验,多组间

比较用方差分析。

2 结果

2.1 体外逆转耐药

经 M-H 肉汤加血清干预传代至第 8 代,应用二倍稀释法测得含药血清组铜绿假单胞菌对亚胺培南的 MIC 为 $8\mu\text{g/ml}$,空白血清组与阳性对照组均为 $16\mu\text{g/ml}$;亚胺培南药敏纸片法测得抑菌环直径为:含药血清组(14.19 ± 0.32)mm,空白血清组(12.54 ± 0.41)mm,阳性对照组(10.32 ± 0.38)mm,各组比较差异具有统计学意义($F=79.18, P<0.05$),除抑菌环直径差异外,传代后空白血清组的菌株产绿色素明显,菌群生长较旺盛,而含药血清组的菌株绿色素产生不明显。

2.2 β -内酰胺酶水解速率

当反应速率 $\leq 0.01\text{ABS/min}$ 时,即认为 β -内酰胺酶水解反应停止,见表 1,表 2。酶量在 15min 内消耗完的前提下,空白血清组的平均总反应时间 10.5min,含药血清组的平均总反应时间为 13.5min。

表 1 不同时间段空白血清组 OD 值变化速率(ABS/min)

时间段	Vk1	Vk2	Vk3	Vk4	Vmean
0—3min	0.0673	0.0583	0.0643	0.0773	0.066833
3—6min	0.0420	0.0547	0.0473	0.0727	0.054167
6—9min	0.0340	0.0210	0.0410	0.0263	0.030583
9—12min	0.0177	0.0100*	0.0200	0.0043*	0.013333
12—15min	0.0060*	0.0020*	0.0097*	0.0020*	0.003917
平均速率	0.0403	0.0447	0.0432	0.0588	

注: * 表示反应停止所在时间段

表 2 不同时间段含药血清组 OD 值变化速率(ABS/min)

时间段	Vm1	Vm2	Vm3	Vm4	Vmean
0—3min	0.0523	0.0573	0.0700	0.0780	0.064417
3—6min	0.0477	0.0430	0.0570	0.0640	0.052917
6—9min	0.0423	0.0393	0.0353	0.0240	0.03525
9—12min	0.0253	0.0303	0.0127	0.0047*	0.01825
12—15min	0.0120	0.0137	0.0013*	0.0023*	0.007333
平均速率	0.0359	0.0367	0.0438	0.0553	

注: * 表示反应停止所在时间段

根据公式计算反应全程的 β -内酰胺酶水解平均速率为:空白血清组(0.3420 ± 0.0603) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{ml})$,含药血清组(0.3140 ± 0.0657) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{ml})$,两组比较差异均有统计学意义($t=3.1824, P<0.05$)。表 3 示,两组各时间段 β -内酰胺酶水解平均速率中,空白血清组在前 6min 快于含药血清组,在随后的时间中两组速率逐渐下降,但

后期含药血清组速率下降较空白血清组慢。

表 3 不同时间段两组 β -内酰胺酶水解平均速率比较($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{ml})$)

时间段	空白血清组	含药血清组
0—3min	0.4891474	0.4714611
3—6min	0.3964437	0.3872950
6—9min	0.2238373	0.2579912
9—12min	0.0902664	0.1335708
12—15min	0.0231773	0.0536717

3 讨论

应用血清药理学方法制备芪归银方含药血清进行研究,虽是体外实验,但使其药效发挥更接近于体内状态,在一定程度上弥补了体外实验的不足。本研究中,在含药血清干预作用下传代培养,耐亚胺培南铜绿假单胞菌对亚胺培南的 MIC 和抑菌环直径均较空白血清组有明显变化,说明在芪归银方含药血清的作用下,耐亚胺培南铜绿假单胞菌株对亚胺培南的敏感性在一定程度上得到恢复。

铜绿假单胞菌几乎可以产生所有类型的 β -内酰胺酶^[8],其在对亚胺培南的耐药机制中起到重要作用,在对芪归银方逆转铜绿假单胞菌耐药性作用机制的初步研究中发现,芪归银方含药血清可以减慢铜绿假单胞菌中 β -内酰胺酶对头孢噻吩的水解速率。具体表现在相同反应条件下,含药血清组水解相同量的头孢噻吩所用的时间较空白血清组长,全程反应的平均速率慢,空白血清组在反应的初期,速率明显快于含药血清组,随着反应的进行,其速率下降亦较快,约在第 10—11min 时,反应基本结束;含药血清组的初始速度较慢,反应中段速率下降略慢,反应后期其下降与空白血清组基本平行,反应持续至约 13—14min。以上结果显示,芪归银方含药血清可以减慢铜绿假单胞菌中 β -内酰胺酶的水解速率即降低酶活性。提示对 β -内酰胺酶的抑制作用是芪归银方作用的机制之一,结合本课题前期体内实验证实芪归银方对造模大鼠的免疫调节作用分析,可能由于含药血清中存在芪归银方刺激机体产生的未知抗体蛋白,从而在某些通路上影响菌株的耐药性。中药的作用常是多靶点多途径的,芪归银方干预耐药的作用机制有待从多个耐药机制方面进行深入研究。

芪归银方以扶正透邪为治法,与清热解毒类中药的体外抑菌作用不同,其本身无明显的体外杀菌抑菌作用,而是通过与抗生素的联合应用,增强或恢

复细菌对抗生素的敏感性^[9],及时应用于临床,对于解决目前多重耐药菌感染应用药物少、选药困难、病死率高的问题,具有重要临床意义。

参考文献

- [1]何林,张立军,李勇,等.铜绿假单胞菌对22种抗生素耐药性的差异[J].中华医院感染学杂志,2002,12(11):853-855.
- [2]许宏涛,张秀珍.医院感染铜绿假单胞菌多重耐药机制的研究[J].中国抗感染化疗杂志,2005,5(3):141-145.
- [3]Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006,50(1):43-48.
- [4]黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,

2004,9(9):1069-1072.

- [5]Miller K, O'Neill AJ, Chopra I. Response of *Escherichia coli* hypermutators to selection pressure with antimicrobial agents from different classes [J]. J Antimicrob Chemother, 2002,49(6):925-934.
- [6]van Loon HJ, Box AT, Verhoef J, et al. Evaluation of genetic determinants involved in beta-lactam and multi-resistance in a surgical ICU [J]. Int J Antimicrob Agents, 2004, 24 (2):130-134.
- [7]张卓然,夏梦岩,倪语星.微生物耐药的基础与临床[M].北京:人民卫生出版社,2007:186,269.
- [8]孙淑娟,裘燕.抗菌药物治疗学[M].北京:人民卫生出版社,2008:287,428.

(收稿日期:2012-02-20;修回日期:2012-05-19)

[编辑:洪涛]

欢迎邮购《一选方治验实录》

在浩瀚的中医典籍中,有方名的古方数以十万计。为了汰芜存菁,借鉴古今医家的经验,为现代临床服务,作者在长期从事中医方药文献研究和临床诊疗工作的基础上,在完成“中医古方筛选方案和利用研究”课题研究的基础上,经过深入发掘,编纂完成《一选方治验实录》(上下册)。本书以有验案资证作为筛选古方的重要条件,结合古方其他价值特征,从近10万首方剂中,筛选出583首古方及其相关验案5500余则。这些优选出的古方,既不乏传世名方,也有相当一部分以往未被方剂学教材或方剂选本收录过的“新面孔”。从10万首方中最终优选出500余首方,其比例约为200选1;又鉴于治验记录是本书的主要内容,故名《一选方治验实录》。

全书分上、下两册,上册收录汉唐方(张仲景方、晋唐方),下册收录宋元明清方(宋元方、明清方),编次以方为纲,医案为目,每一方剂又分方源记载和治验实录(分为中医病证医案、西医病症医案)两部分。书末附有方名索引、中医病证索引、西医病症索引和引用书目,方便读者检索。

本书汇集古今文献,资料丰富,拥有本书,就如同跟随古今名医侍诊,通过品读古方所附的具体病例,领悟出该方的适应证和用法秘诀,可大大提高中医治疗的疗效。本书是中医各科临床医生提高临床疗效必备的案头书,又可为各中药生产厂家研发新药提供借鉴。

《一选方治验实录》(上下册),为16开精装本,1584页,已由人民卫生出版社于2011年1月出版。上册定价99元,下册定价108元,全套207元。邮购汇款地址:北京市东直门南小街16号中医杂志社医海林音像书店;邮政编码:100700;联系电话:(010)64013162,(010)64014411转3053。请在汇款附言中注明所购书名、上下册或全套及数量,邮购单册需加邮费10元,全套及2册以上免邮费。欢迎邮购。

第二届全国脑卒中诊疗实践学术研讨会暨第二届“奇星·华佗再造丸”杯优秀论文征集通知

为积极参与国家“脑卒中筛查与防治工程”,大力推动对脑中风的学术研究,由中华中医药学会主办,中医杂志社、中国中药杂志社协办,广州奇星药业有限公司、数源汇通(北京)医药科技有限公司承办,共同发起第二届全国脑卒中诊疗实践学术研讨会暨第二届“奇星·华佗再造丸”杯脑卒中诊疗实践优秀医学论文征集活动,具体事宜通知如下。

一、征文内容:1.脑卒中的基础研究;2.脑卒中内科治疗;3.脑卒中外科治疗;4.脑卒中介入治疗;5.脑卒中的中西医结合治疗;6.脑卒中与糖尿病;7.脑卒中与血管异常;8.脑卒中与血管超声、TCD;9.脑卒中与房颤;10.脑卒中与高血压;11.脑卒中的康复。

二、征文要求:1.凡未公开发表的论著、述评、病例报告、讲座综述、实验研究、临床研究、经验总结等,均可投稿。2.按照杂志论文格式,要求800字中文摘要1份,包括目的、方法、结果、结论四部分,数据准确、重点突出、文字精炼。3.请在征文后详细注明姓名、工作单位、科室、邮政编码和电话。4.截稿日期:2012年10月30日。请自留底稿,恕不退稿。5.论文投稿方式:邮寄地址:北京市海淀区西三环北路11号海通时代商务中心A1栋,数源汇通(北京)医药科技有限公司收,邮编:100089,电话:010-68718711;或电子版发至:cnyxyx@cnyxyx.com。

三、联系方式:数源汇通(北京)医药科技有限公司,联系人:赵森,电话:010-68412716转603,传真:010-68715756, E-mail:cnyxyx@cnyxyx.com。

(C) 2012 by China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net