

消毒愈肌液对大鼠糖尿病足的抗菌活性

李 旗* 田福玲 李继安

(河北联合大学中医学院, 河北省唐山市建设南路 57 号, 063000)

基金项目: 唐山市科技计划资助项目(121302118b)

* 通讯作者: liqi19801211@163.com, 15133902870

[摘要] 目的 观察消毒愈肌液对大鼠糖尿病足的抗菌活性。方法 将 60 只大鼠高脂高蛋白饲养 4 周后, 采用链脲佐菌素腹腔注射和薄铁片固定法制备糖尿病足模型, 做创面分泌物的细菌培养与分离, 分别采用消毒愈肌液(浓度 1 g/ml)、哌拉西林(浓度 500 μ g/ml)、左氧氟沙星(浓度 500 μ g/ml)、氟康唑(浓度 300 μ g/ml)、生理盐水进行体外抑菌试验, 比较各药物对不同病原菌体外抑菌环直径的影响。结果 60 例分泌物标本中共培养出病原菌 86 株, 其中革兰阳性菌 41 株(47.7%), 革兰阴性菌 37 株(43.0%), 真菌 8 株(9.3%)。消毒愈肌液对革兰阴性菌、革兰阳性菌、真菌均高度敏感, 其中对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血性链球菌敏感性优于左氧氟沙星($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 对大肠埃希菌、阴沟肠杆菌、变形杆菌属球菌敏感性优于哌拉西林($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 对热带假丝酵母菌敏感性优于氟康唑($P < 0.05$)。结论 消毒愈肌液对糖尿病足溃疡有明显的抑菌作用。

[关键词] 消毒愈肌液; 糖尿病足; 抗菌活性

Antibacterial Activity of Xiaodu Yuji Solution on Diabetic Foot Ulcers in Rats

LI Qi, TIAN Fuling, LI Jian

(TCM School of Hebei United University, Hebei Province 063000)

ABSTRACT **Objective** To observe the antibacterial activity of Xiaodu Yuji Solution (Skin Healing Disinfectant Solution) on diabetic foot ulcers in rats. **Methods** Sixty rats were selected and the diabetic foot models were established with intraperitoneal injection of streptozotocin and thin sheet iron fixation after 4 weeks of high-fat high-protein feeding. The bacterial culture and separation was conducted on wound secretions. Xiaodu Yuji Solution (concentration 1 g/ml), piperacillin (concentration 500 μ g/ml), levofloxacin (concentration 500 μ g/ml), fluconazole (concentration 300 μ g/ml) and normal saline were used for in vitro antibacterial test. The effects of various drugs on the in vitro inhibition zone diameters of different pathogens were compared. **Results** Eighty-six pathogens were cultured in 60 secretion samples. There were 41 (47.7%) gram-positive bacteria, 37 gram-negative bacteria (43.0%) and 8 (9.3%) fungi. Xiaodu Yuji Solution had high sensitivity to gram-negative bacteria, gram-positive bacteria and fungi. The sensitivity of Xiaodu Yuji Solution to *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus* was superior to that of levofloxacin ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The sensitivity of Xiaodu Yuji Solution to *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Proteus* bacteria was superior to that of piperacillin ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The sensitivity of Xiaodu Yuji Solution to *Candida tropicalis* was superior to that of fluconazole ($P < 0.05$). **Conclusion** Xiaodu Yuji Solution has obvious antimicrobial effect on diabetic foot ulcers.

Keywords Xiaodu Yuji Solution; diabetic foot; antibacterial activity

糖尿病足是糖尿病患者常见的慢性并发症之一, 而细菌感染是引起糖尿病足难以恢复的重要病因之一^[1]。既往研究证实, 中医外治法在治疗糖尿病足方面具有独特的疗效^[2]。本研究中消毒愈肌液是以《外科正宗》生肌玉红膏为主方, 加黄连、黄柏, 具有解毒消肿、生肌止痛作用。本实验观察了消毒愈肌液对糖尿病足溃疡的抗菌作用, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 180~

200, 河北联合大学动物实验中心提供, 动物许可证号为 SCXK11-00-0010, 以高脂高蛋白饲料单笼喂养, 室温 18~22℃, 自由摄食、饮水。

1.2 药物及药液制备

消毒愈肌液制备: 黄连 20 g, 黄柏 30 g, 白芷 25 g, 甘草 60 g, 当归 10 g, 血竭 20 g, 轻粉 20 g, 虫白蜡 10 g, 紫草 10 g, 按比例混合, 取 30 g, 分别加水 400 ml 浸泡 30 min 后煎煮, 沸后文火煮 2 h, 纱布过滤, 滤液用循环蒸发器置 70℃ 恒温水浴中抽气加压浓缩至 30 ml, 使生药浓度为 1 g/ml, 高压灭菌后备用。

哌拉西林:菏泽睿鹰制药集团有限公司,国药准字 H20083213,配制成 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度备用。左氧氟沙星:哈药集团制药总厂,国药准字 H20059241,配制成 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度备用。氟康唑:广东太阳神荔城制药有限公司,国药准字 H44023370,配制成 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度备用。生理盐水:哈药集团制药总厂,国药准字 B060504341。溶解链脲佐菌素(STZ):上海华蓝化学科技有限公司,批号 18883-66-4。

1.3 主要仪器

血琼脂平板,北京朋利驰科技有限公司;中国蓝琼脂平板,上海佩欧生物科技有限公司;全自动微生物鉴定系统,法国生物梅里埃股份有限公司。

1.4 造模方法

参考文献[3],将大鼠饲养 28 天后,禁食 6 h 后,以 0.1 mmol/L 的枸橼酸钠缓冲液(pH4.2)在 4℃ 条件下,STZ 配成 1% 溶液,以 55.0 mg/kg 的剂量在大鼠空腹时左下腹注射,注射后 5 天连续 3 天监测空腹血糖,空腹血糖在 12.0 mmol/ml 以上者入选继续造模。选择大鼠的足背皮肤,用薄铁片固定,持续按压直径 5 mm 的铁片,每次 30 min,每日两次。按压后用 50% 冰醋酸涂抹创面,连续刺激 1 周后形成缺损性皮肤溃疡大鼠模型。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 菌株鉴定 用灭菌盐水棉拭子蘸取模型大鼠创面分泌物或脓液,置于灭菌试管内送检。菌株鉴定严格按《全国临床检验操作规程》^[4] 进行操作,接种于血琼脂平板与中国蓝琼脂平板做细菌培养,采用法国生物梅里埃全自动微生物鉴定系统进行鉴定与试验,对培养出的感染菌进行分析,分离并保存。

1.5.2 各药物的体外抑菌试验 从感染菌株中选取 11 株细菌(革兰阴性菌 5 株、革兰阳性菌 4 株、真菌 2 株),采用平板打孔法做消毒愈肌液对耐药株的体外抑菌试验。用无菌棉拭蘸取浓度为 10^7 CFU/ml 菌液均匀涂布于 4 mm 厚 MH 琼脂板,室温干燥 5 min 后,按图样打孔,0.5% 无菌琼脂封底,每孔分

别加消毒愈肌液、哌拉西林、左氧氟沙星、氟康唑、生理盐水各 70 μl , 30℃ 加湿培养 18~24 h,参照文献[5]判定结果,抑菌圈直径 ≥ 20 mm 为高度敏感;抑菌圈直径 10~19 mm 为中度敏感;抑菌圈直径 < 10 mm 为低度敏感。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 菌株鉴定结果

60 例分泌物标本中,共培养出病原菌 86 株,其中革兰阳性菌 41 株(47.7%),以金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、表皮葡萄球菌、溶血性链球菌为主;革兰阴性菌 37 株(43.0%),以铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、阴沟肠杆菌、变形杆菌属球菌、克雷伯杆菌为主;真菌 8 株(9.3%),以白色念球菌、热带假丝酵母菌为主。单一菌感染 43 例,混合菌感染 17 例。

2.2 各药物对不同革兰阳性菌体外抑菌情况比较

由于左氧氟沙星对革兰阳性菌敏感,故选用其为对照药物。表 1 示,消毒愈肌液对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、表皮葡萄球菌、溶血性链球菌均高度敏感。左氧氟沙星对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌高度敏感,对表皮葡萄球菌、溶血性链球菌均出现耐药。左氧氟沙星对粪肠球菌敏感性优于消毒愈肌液($P < 0.05$),而消毒愈肌液对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血性链球菌敏感性优于左氧氟沙星($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 各药物对不同革兰阴性菌体外抑菌情况比较

由于哌拉西林对革兰阴性菌敏感,故选用其为对照药物。表 2 示,消毒愈肌液对铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、阴沟肠杆菌、变形杆菌属球菌、克雷伯杆菌均高度敏感。哌拉西林对铜绿假单胞菌、变形杆菌属球菌、克雷伯杆菌高度敏感,对大肠埃希菌、阴沟肠杆菌中度敏感。哌拉西林对铜绿假单胞菌敏感性优于消毒愈肌液($P < 0.05$),而消毒愈肌液对大肠埃希菌、阴沟肠杆菌、变形杆菌属球菌敏感性优于哌拉西林($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各药物对不同革兰阳性菌体外抑菌环直径的比较(mm, $\bar{x} \pm s$)

药物	金黄色葡萄球菌(6 株)	粪肠球菌(5 株)	表皮葡萄球菌(3 株)	溶血性链球菌(2 株)
消毒愈肌液	24.84 $\pm$ 2.30	22.08 $\pm$ 2.00	24.68 $\pm$ 1.90	20.69 $\pm$ 2.10
左氧氟沙星	20.64 $\pm$ 1.10*	27.12 $\pm$ 2.10*	7.59 $\pm$ 1.26**	5.30 $\pm$ 1.50**
生理盐水	—	—	—	—

注:与消毒愈肌液比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;“—”表示未见抑菌环。

表2 各药物对不同革兰阴性菌体外抑菌环直径的比较(mm, $\bar{x} \pm s$)

药物	铜绿假单胞菌(7株)	大肠埃希菌(5株)	阴沟肠杆菌(3株)	变形杆菌属(3株)	克雷伯菌属(2株)
消毒愈肌液	21.08±1.2	22.14±2.0	23.56±1.9	24.30±1.8	23.07±1.5
哌拉西林	25.12±2.5*	11.25±1.6**	14.98±1.4**	20.48±1.0*	22.60±1.3
生理盐水	—	—	—	—	—

注:与消毒愈肌液比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;“—”表示未见抑菌环。

2.4 各药物对不同真菌体外抑菌情况比较

由于氟康唑对真菌敏感,故选用其为对照药物。表3示,消毒愈肌液和氟康唑对白色念球菌、热带假丝酵母菌均高度敏感,消毒愈肌液对热带假丝酵母菌敏感性优于氟康唑($P<0.05$)。

表3 各药物对不同真菌体外抑菌环直径的比较(mm, $\bar{x} \pm s$)

药物	白色念球菌(3株)	热带假丝酵母菌(2株)
消毒愈肌液	23.62±2.0	24.33±1.9
氟康唑	24.64±1.1	21.07±1.4*
生理盐水	—	—

注:与消毒愈肌液比较,* $P<0.05$;“—”表示未见抑菌环。

3 讨论

糖尿病患者由于长期处于代谢紊乱状态导致免疫力下降,易发生各种感染。因此,在发病初期应及时应用药物,控制病情进展,改善预后。近年来糖尿病足感染往往系多种细菌所致的混合感染^[6],而抗生素的广泛应用,使临床上引起感染的细菌谱发生明显改变,细菌耐药的现象也愈来愈多,条件致病菌及寄殖菌所致的感染也增多^[7-8]。寻找抗菌谱广、不良反应小、耐药性小、能控制感染、有效地促进伤口愈合的药物,成为医学界积极探讨的问题。

消毒愈肌液是以《外科正宗》生肌玉红膏为主方,加上黄连、黄柏,具有解毒消肿、生肌止痛作用。当归、白芷、紫草主要具有活血养血、清热解毒,黄连、黄柏加强其清热解毒作用,甘草、血竭、轻粉、虫白蜡主要具有活血化瘀、祛腐生肌作用。研究结果显示,在足部溃疡处提取的病原菌中,革兰氏阴性菌约43.0%,革兰氏阳性杆菌约47.7%,真菌约占9.3%。感染的病原菌以铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、阴沟肠杆菌、变形杆菌属表皮葡萄球菌、粪肠球菌金黄色葡萄球菌为主;真菌以白色念珠菌为主。体外抑菌实验结果发现,消毒愈肌液对糖尿病足溃疡有明确的抑菌作用,并在某些病原菌方面优于西药($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。可能由于消毒愈肌液中的黄连、黄柏含有小檗碱,通过抑制细菌的核酸和蛋白质代谢等方式起到抑菌、杀菌作用,同时增强白细胞的吞噬作用^[9]。甘草含有甘草酸、甘草糖可激活

淋巴细胞增殖,增加白细胞介素-1(IL-1),刺激B细胞增殖,诱导IgG、IgM的生成增强体液免疫,同时具有抗DNA、RNA病毒效应诱导干扰素 α 、干扰素 γ ,对金葡菌等有抑制作用,具有氢化可的松样的抗炎作用,协同白芷增强其抗炎作用^[10]。当归具有增强巨噬细胞的吞噬能力和白细胞介素-2(IL-2)生成,增强体液免疫,诱导干扰素活性,抑制血小板凝聚和抗血栓形成作用,有明显的抗氧化作用^[11]。轻粉外用有杀虫、攻毒、敛疮、杀菌作用,对堇色毛癣菌、许兰氏黄癣菌、奥杜盎氏小芽胞癣菌、红色表皮癣菌、星形奴卡氏菌等皮肤真菌均有不同程度的抑制作用^[12]。

综上所述,消毒愈肌液治疗糖尿病足感染有较好的抗菌作用,为临床治疗糖尿病足提供依据,但其治疗机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Michael E, Alethea F, Lee S. A practical manual of diabetic foot care [M]. Oxford: Wiley-Blackwell, 2004: 120-121.
- [2] 张力, 张春霞. 中医外治糖尿病足临床应用进展[J]. 广西中医药大学学报, 2012, 15(2): 93-95.
- [3] 陈群力, 杨五彪, 马灵筠. 实验性糖尿病足大鼠模型的建立[J]. 河南预防医学杂志, 2004, 15(1): 1-3.
- [4] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程 [M]. 南京: 东南大学出版社, 1997: 540-548.
- [5] Murry PR. Manual of Clinical Microbiology [M]. 8th ed. Washington DC: ASM Press, 2003: 1037-1178.
- [6] 金虹飞, 蔡少平, 顾慧群, 等. 544例糖尿病足感染患者的病原菌特点及药敏分析[J]. 检验医学, 2010, 25(5): 356-359.
- [7] 金少鸿, 张凤凯. 抗生素耐药性现状透视[J]. 国外医学药学分册, 2000, 27(2): 74-78.
- [8] 贾战生, 张学忍, 伍忠诚, 等. 创口净对绵羊伤口感染的预防和治疗[J]. 新药与临床, 1996, 15(4): 202-204.
- [9] 沈丕安. 中药药理与临床运用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 329-334.
- [10] 黄敬耀. 药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 304.
- [11] 欧明. 简明中药成分手册 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 194.
- [12] 刘丽. 生肌玉红膏促进肛瘘术后创面愈合的临床研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2010: 47.

(收稿日期: 2013-01-24; 修回日期: 2013-05-10)

[编辑: 邓媛]