

微量肉汤稀释法检测中药香囊挥发油对 5 种呼吸道致病菌抗菌作用*

陈奕雯, 陈 华[△], 许爱萍(湖北省武汉市中医医院检验科 430014)

【摘要】 目的 探讨中药香囊提取挥发油在体外对 5 种呼吸道常见致病菌的抗菌作用。方法 采用微量肉汤稀释法测定中药香囊挥发油对肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌标准菌株的最小抑菌浓度值和临床分离菌株最小抑菌浓度范围。结果 挥发油对以上 5 种菌标准菌株最低抑菌浓度值分别为小于或等于 0.000 15、0.000 125、0.001 25、0.001 45、 >0.08 , 对临床分离菌最低抑菌浓度范围分别为小于或等于 0.000 15、0.000 25~0.000 145、0.002 5~0.000 625、0.002 5~0.001 25、 >0.08 。结论 除铜绿假单胞菌外, 中药香囊挥发油对肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌均有较好的抗菌效果。

【关键词】 中药香囊挥发油; 体外抗菌作用; 微量肉汤稀释法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.033 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)01-0085-02

呼吸道感染是人类最常见的传染病之一, 预防和治疗呼吸道感染一直是全球关注的热点, 现代中医通过状态调治以消除异常病理状态, 恢复正常健康状态, 这种在长期医学实践中形成的独具特色的医学体系, 在治未病方面有潜在的优势^[1-3]。本院将广藿香、丁香、檀香等具有抑菌作用和薄荷脑、艾叶等有祛风散寒作用的药材制作成中药香囊, 通过让患者长期佩戴改善患者基础健康状态, 同时通过抑制人体的潜在病原体过度繁殖达到预防呼吸道感染、治未病的作用。本实验参照美国标准化委员会的药敏执行标准 M45-A2、M07-A8、M100-S20 对本院中药香囊挥发油进行药敏测试, 研究其抗菌效果。

1 材料与方 法

1.1 试验临床菌株来源与鉴定 选用的临床菌株有金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌各 20 株。它们均来自本院门诊及病房送检的呼吸道标本中分离并经过 BD-phenix100 全自动微生物分析仪鉴定及药敏试验, 将其纯培养后存于 30% 甘油肉汤管或脱脂牛奶管中 -20℃ 冰箱备用。

1.2 标准菌株 ATCC29213 金黄色葡萄球菌、ATCC25922 大肠埃希菌、ATCC49619 肺炎链球菌、ATCC27853 铜绿假单胞菌、ATCC700603 肺炎克雷伯菌购自中国普通微生物种保藏管理中心。

1.3 中药材 艾叶 200 g、白豆蔻 200 g、丁香 60 g、檀香 100 g、山奈 200 g、小茴香 100 g、苍术 100 g、广藿香 150 g、薄荷脑 50 g、肉桂 60 g, 由武汉市中医医院药学基地提供, 取各中药的药材, 适当粉碎, 按 2010 版《中国药典》^[4] 附录 XD 的方法提取挥发油, 经无水硫酸钠脱水加入挥发油融化, 密封保存, 备用。

1.4 试剂及培养基 十二烷基硫酸钠(分析纯), 武汉医药公司进口分装; 生理盐水(0.9% 氯化钠注射液), 武汉滨湖双鹤药业有限责任公司, 产品批号: 121004907; MHB 肉汤培养基, 购自杭州天和微生物试剂公司; MHA 营养琼脂培养基, 购自杭州天和微生物试剂公司; 脱干冻纤维羊血, 购自杭州天和微生物试剂公司。

1.5 仪器与设备 中草药粉碎机、挥发油提取装置、HH-S 型

水浴锅、超净工作台、电热蒸气消毒器、手动(可调试)移液枪、96 孔灭菌酶标板购自美国 Costar 公司、恒温培养箱、电子天平、冰箱、超纯水制造系统等。

1.6 实验分组 参照美国国家临床实验室标准化委员会 M45-A2《苛养菌的稀释法抗菌药物敏感试验参考方法》^[3]; M07-A8《需氧菌的稀释法抗菌药物敏感试验参考方法》^[3]; M100-S20《抗菌药物敏感性试验执行标准》^[3] 对中药香囊挥发油进行最低抑菌浓度检测, 分为标准菌株组和临床分离组。标准菌株组: 测试挥发油乳液对 5 种呼吸道细菌标准菌株(模式种)的 MIC 值, 保证实验浓度和结果的可行性。临床分离组: 测试挥发油乳液对临床呼吸道标本分离的不同耐药性菌株的 MIC 值, 评价挥发油体外抗菌的效果。

1.7 方法

1.7.1 挥发油乳液储存液的制备 取十二烷基硫酸钠 0.1 g, 加生理盐水 100 mL 溶解, 制成 0.1% 十二烷基硫酸钠溶液; 取溶液 21 mL, 加中药香囊挥发油原液 4 mL, 搅拌使其充分乳化, 挥发油乳液储存液浓度为最高试验浓度的 10 倍, 即 $0.16 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.7.2 微量挥发油药敏板的制备 取无菌 96 孔酶标板, 在每列第 1 孔加入 0.1% 十二烷基硫酸钠溶液 50 μL 为阴性对照, 第 2 孔只加入菌液为阳性对照, 第 3 孔加入中药香囊挥发油原液 100 μL , 第 4~12 孔加 0.1% 十二烷基硫酸钠溶液 50 μL 。从第 3 孔吸取 50 μL 药液加入第 4 孔, 充分混匀后吸取 50 μL 加入第 5 孔, 依次做倍比稀释至第 12 孔, 第 12 孔的药液混匀后吸取 50 μL 弃去。配置好的药敏板每列为一株受试菌的梯度, 从第 3 孔至第 12 孔加入菌液后最终药物浓度由高到低为 $0.08 \sim 0.001 56 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.7.3 试验菌株和标准菌株菌液的制备 肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌的试验菌株和标准菌株用无菌接种环从脱脂牛奶管或 30% 甘油肉汤管中刮取菌液到血平板, 35℃、5% CO_2 环境中培养 18~24 h 后, 从血平板中挑选 2~3 个菌落在生理盐水中制成 0.5 麦氏单位悬液, 其浓度是 $(1 \sim 2) \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

* 基金项目: 湖北省武汉市卫生局临床医学科研项目(WZ11B02)。

[△] 通讯作者, E-mail: 769491105@qq.com。

1.7.4 试验菌株和标准菌株接种

1.7.4.1 将肺炎链球菌外的试验菌株和标准菌株 0.5 麦氏单位悬液取 50 μL 加入 5 mL 的 MHB 肉汤培养基中制成接种液,取已加入挥发油乳液的 96 孔酶标板每株菌接种一行 2~12 孔接种 50 μL,使其最终试验菌每孔浓度大约是 5×10⁵ cfu·mL⁻¹,放 35℃ 环境中培养 24 h。

1.7.4.2 肺炎链球菌的试验菌株和标准菌株 0.5 麦氏单位悬液取 50 μL 加入 5 mL 的 MHB 肉汤+5% 脱脂纤维羊血培养基中制成 0.5 麦氏单位悬液,取已加入挥发油乳液的 96 孔酶标板每株菌接种一行 2~12 孔接种 50 μL,其最终试验菌每孔浓度大约是 5×10⁵ cfu·mL⁻¹,放 35℃、5% CO₂ 环境中培养 24 h。

1.7.5 最低抑菌浓度(MIC)值判读 肉眼观察培养液澄清的为阴性(即无细菌生长),培养液混浊的为阳性(即有细菌生长)。并且用多点接种装置接种到血平板培养 24 h,观察有无菌落生长以验证是否无菌生长。

2 结 果

2.1 标准菌株组结果 香囊挥发油对 5 种实验标准菌株(金黄色葡萄球菌 ATCC29213、大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎链球菌 ATCC49619、铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯菌 ATCC700603)的 MIC 值检测结果见表 1。除铜绿假单胞菌外,香囊挥发油对试验菌株的标准菌株均有抑制效果,实验的挥发油浓度范围合理,实验可以继续。

2.2 临床分离组结果 香囊挥发油对 20 株临床分离得到肺炎链球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌抑制率

分别为 100%、90%、95%、60% (MIC 范围分别为 (MIC ≤ 0.000 15、0.002 5~0.000 625、0.002 5~0.001 25、0.000 25~0.000 145),对 20 株临床分离的铜绿假单胞菌无抑制效果 (MIC>0.08),结果见表 2、3。

表 1 中药香囊挥发油对 5 种标准菌株的抑菌效果

试验菌	MIC 值	阳性对照	空白对照
大肠埃希菌	0.001 25	+	-
肺炎链球菌	≤0.000 15	+	-
金黄色葡萄球菌	0.000 125	+	-
铜绿假单胞菌	>0.08	+	-
肺炎克雷伯菌	0.001 25	+	-

注: + 为细菌为生长, - 为无细菌生长。

表 2 中药香囊挥发油对临床分离的试验菌株的抑菌效果

试验菌	可抑制菌 MIC 值统计		
	MIC 值范围	阳性对照	空白对照
大肠埃希菌	0.002 5~0.000 625	+	-
肺炎链球菌	≤0.000 15	+	-
金黄色葡萄球菌	0.002 5~0.001 25	+	-
铜绿假单胞菌	>0.08	+	-
肺炎克雷伯菌	0.002 5~0.001 25	+	-

注: + 为细菌为生长, - 为无细菌生长。

表 3 不同浓度的中药香囊挥发油对 5 种不同细菌的耐药菌株数量

试验菌	MIC 值									
	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005	0.002 5	0.001 25	0.000 625	0.000 312	0.000 15
大肠埃希菌	2	2	2	2	2	2	5	8	20	20
肺炎链球菌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
金黄色葡萄球菌	8	8	8	8	8	8	12	20	20	20
铜绿假单胞菌	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
肺炎克雷伯菌	1	1	1	1	1	5	8	20	20	20

3 讨 论

呼吸道感染多发于冬春季节,散发,且可在气候突变时小规模流行。呼吸道感染 20%~30% 为细菌引起,可单纯发生或继发于病毒感染之后,以肺炎链球菌、葡萄球菌等口腔定植菌多见,也常见肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌等革兰阴性菌,但接触病原体后是否发病,取决于传播途径和人群易感性。淋雨、受凉、气候突变、过度劳累等可降低呼吸道局部防御功能,使原携带的病毒或细菌迅速繁殖,同时作为一些易感人群,老年、体弱免疫功能低下或有慢性呼吸道疾病者更易发病^[4]。传统的处理措施是在出现呼吸道症状后予以药物治疗,但往往因已过细菌潜伏期,发病时间较长使得应用抗菌药物事倍功半,对于年老、体弱等免疫力低下人群更是危害性较大。寻求一种安全、简便的方法进行有效地预防呼吸道疾病发生,使在治未病方面取得良好的效果,是目前老年化社会亟待解决的一个医学问题。

目前已有较多研究证明中药对细菌或耐药菌有良好的抗菌作用^[5]。文献报道广藿香水提取物对金黄色葡萄球菌、枯草杆

菌、铜绿假单胞菌、肠炎球菌、产气杆菌有明显抑制效应^[6]。中药丁香具有较强的抗菌消炎作用,张军锋等^[7]报道丁香对金黄色葡萄球菌、肠炎球菌、肺炎链球菌、痢疾杆菌、铜绿假单胞菌等具有明显的抗菌作用,同时还具有明显的镇咳、祛痰作用,因而对呼吸道感染具有良好的防治作用。而檀香具有良好的抗菌和抗氧化成分,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用^[8]。由此可见,以上 3 种中药对常见的呼吸道细菌均有良好的抑制作用,因此本院将广藿香、丁香、檀香 3 种具有抑菌效果的中药和薄荷脑、艾叶等有祛风散寒作用的药材制作成中药香囊,研究其抗菌活性,以期对免疫功能低下等特殊人群起着良好的治未病功效。

本实验中本院中药香囊的挥发油对常见呼吸道致病菌有较好的抑制效果,特别是社区人群容易感染的肺炎链球菌,本实验中 20 株临床分离菌在 MIC ≤ 0.000 15 的浓度,可全部抑制,对其他常见菌如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌也有较好的抑制效果,抑制率分别达到 90%、95%、60%,如果患者在日常生活中长期佩戴中药香囊,能对(下转第 89 页)

引起的术后相关并发症的发生^[3]; (5)横截面大,可减少塌陷的风险,同时使植骨面与椎体有足够大的接触面,促进椎间融合^[8]; (6)后缘的金属线有助于术中判断 Cage 放置的深度和位置,避免压迫脊髓^[9]。

在本研究中,作者对所纳入的 CDH 患者亦采用颈前路减压+单纯 Cage 融合术治疗,术中刮除软骨终板,使 Cage 的锯齿面更好地嵌入到骨皮质中;同时,将病变间隙的后纵韧带彻底去除,使脊髓获得更充分的减压,也避免了游离髓核残留于韧带后方影响术后效果的风险。本研究中,所有患者术后神经功能均获得明显改善,至末次随访时,神经功能恢复率达到 62.7%,与其他文献报道的接受前路减压钛板固定患者的术后恢复率基本相同^[2]。由于术后椎间高度获得了很好的恢复,颈椎矢状序列(颈椎曲度指数)和稳定性得以巩固和维持,故在随访中,未发现颈椎不稳及后凸畸形等情况出现。

除上述特点外,该术式还具有有以下优点:(1)前路减压单纯 Cage 置入具有手术时间短(96.3 min),术中出血量少(90.7 mL)等特点;(2)PEEK Cage 作为骨骼的替代品,省略了椎间盘切除后取髂骨植骨这一常规步骤,可减小手术创伤^[8-9]; (3)住院医疗费用较前路钛板固定者明显减低。

在颈椎屈伸、旋转作用下,早期置入的 Cage 是否会从椎间隙内脱出是脊柱外科医生顾虑较多的问题。在本研究中,经过平均 27.3 个月的临床随访,未发现 Cage 移位、下沉、脱出等并发症发生。作者认为,术中在自动撑开器的作用下,所置入的 Cage 会比原椎间隙高度略大,这样能使锯齿状凸面与骨性终板结合更加紧密;此外,术中椎间隙的过度撑开,势必会增加关节囊、黄韧带及椎旁肌肉的内在张力,从而将 Cage 牢固地固定于椎间隙内,不至于脱出。

由于在本研究中,所纳入的研究对象多为单/两间隙的 CDH 患者,占总数的 87.5%(28/32),单纯 Cage 置入后未出现局部失稳及后凸畸形发生,但多间隙的单纯置入是否会增加假关节、椎间隙塌陷及后凸畸形的发生率,更需进一步研究加以证实。

总体来看,颈前路减压+单纯 Cage 融合术作为治疗颈椎间盘突出症的一种有效术式,具有安全性高、创伤小、并发症少、临床疗效显著等特点,值得临床应用。

(上接第 86 页)

人体携带的潜在的呼吸道致病菌(肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌)有一定抑制作用,控制了潜在致病菌的过度繁殖,能达到防治呼吸道感染的效果。此次实验中中药香囊挥发油对铜绿假单胞菌没有抑菌效果,这和既往文献报道有所矛盾,分析其原因可能是由于选取适应其他 4 种致病菌的挥发油浓度不足以抑制铜绿假单胞菌,并且铜绿假单胞菌的耐药基因多,机制较复杂,因此几种抗菌药物如何进行合适比例的配伍以发挥更好的疗效是未来进一步研究的方向。

参考文献

- [1] 张志巧,夏以琳. 中医药防治小儿反复呼吸道感染的研究进展[J]. 四川中医, 2012, 30(3): 56-59.
- [2] 赵童童,王建玲,舒兰. 小儿反复呼吸道感染的中医治疗研究进展[J]. 中医药导报, 2012, 18(1): 76-78.

参考文献

- [1] Korinath MC. Treatment of cervical degenerative disc disease-current status and trends[J]. Zentralbl Neurochir, 2008, 69(3): 113-124.
- [2] 张颖,王新伟,陈华江,等. 单纯前路手术治疗“钳夹型”颈椎病的疗效[J]. 中华骨科杂志, 2012, 32(8): 714-720.
- [3] 江兵,刘立明,曹燕庆,等. 无前方钢板的嵌片+聚醚醚酮复合材料融合器用于外伤性颈椎间盘突出症融合术治疗的效果观察[J]. 中华全科医师杂志, 2012, 11(9): 682-684.
- [4] Joo YH, Lee JW, Kwon KY, et al. Comparison of fusion with cage alone and plate instrumentation in two-level cervical degenerative disease [J]. J Korean Neurosurg Soc, 2010, 48(4): 342-346.
- [5] Hirabayashi K, Miyakawa J, Satomi K, et al. Operative results and postoperative progression of ossification among patients with ossification of cervical posterior longitudinal ligament[J]. Spine, 1981, 6(4): 354-364.
- [6] Ishihara A. Roentgenographic studies on the mobility of the cervical column in the sagittal plane [J]. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1968, 42(11): 1045-1056.
- [7] Pechlivanis I, Thuring T, Brenke C, et al. Non-fusion rates in anterior cervical discectomy and implantation of empty polyetheretherketone cages[J]. Spine, 2011, 36(1): 15-20.
- [8] Liao JC, Niu CC, Chen WJ, et al. Polyetheretherketone(PEEK) cage filled with cancellous allograft in anterior cervical discectomy and fusion[J]. Int Orthop, 2008, 32(5): 643-648.
- [9] Kim MK, Kim SM, Jeon KM, et al. Radiographic Comparison of Four Anterior Fusion Methods in Two Level Cervical Disc Diseases: Autograft Plate Fixation versus Cage Plate Fixation versus Stand-Alone Cage Fusion versus Corpectomy and Plate Fixation[J]. J Korean Neurosurg Soc, 2012, 51(3): 135-140.

(收稿日期:2014-02-22 修回日期:2014-05-06)

- [3] 李小鹏,王治国. 美国临床实验室标准化委员会标准与指南[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(4): 251-252.
- [4] 王挺. 老年呼吸道感染患者病原性细菌分析[J]. 中国卫生产业, 2014, 22(9): 155-156.
- [5] 范虹,李彦峰. 国产微量肉汤稀释法药敏试剂检测常见多重耐药菌[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(20): 2735.
- [6] 罗超坤. 广藿香水提物的抗菌实验研究[J]. 中药材, 2005, 28(8): 700-701.
- [7] 张军锋,张树军. 丁香属植物的化学成分及其药理作用的研究进展[J]. 海南大学学报:自然科学版, 2007, 25(2): 200-205.
- [8] 黄娟娟,杨艳,林奕云,等. 檀香叶提取物抗氧化及抗菌活性初步研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 13-130.

(收稿日期:2014-04-22 修回日期:2014-09-10)