

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2022.02.006

• 实验研究 •

# 清金化痰汤联合亚胺培南体外抑菌活性研究<sup>\*</sup>

杜 蕾 焦伟杰 张翔云 赵 旭<sup>△</sup>

河南省中医院药学部, 郑州 450000

**摘要 目的** 探讨清金化痰汤联合亚胺培南对多重耐药肺炎克雷伯菌的体外抑菌活性。**方法** 应用肉汤稀释法测定清金化痰汤、亚胺培南单独及联合用药时对 40 株多重耐药肺炎克雷伯菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)范围;计算部分抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)指数,判定联合用药的抑菌效果。**结果** 单独用药时,清金化痰汤的 MIC 范围为 15.625~125 mg/mL,亚胺培南的 MIC 范围为 32~512  $\mu$ g/mL;联合用药时,清金化痰汤的 MIC 范围为 7.813~62.5 mg/mL,亚胺培南的 MIC 范围为 32~256  $\mu$ g/mL,均较单独用药时明显降低。联合抑菌试验结果显示,FIC 指数 $\leq 0.5$  为 42.5%, $0.5 < \text{FIC 指数} \leq 1$  为 32.5%, $1 < \text{FIC 指数} \leq 2$  为 17.5%,FIC 指数 $> 2$  为 7.5%。**结论** 与单独用药相比,清金化痰汤与亚胺培南联合用药对多重耐药肺炎克雷伯菌可表现出更好的抑菌作用。清金化痰汤联合亚胺培南的抑菌效果大多表现为协同作用和相加作用。

**关键词** 清金化痰汤;亚胺培南;多重耐药;肺炎克雷伯菌

**中图分类号** R965;R285 **文献标志码** A

## In Vitro Antibacterial Activity Study of Qingjin Huatan Decoction Combined with Imipenem for Multidrug Resistant Klebsiella Pneumoniae

DU Lei, JIAO Weijie, ZHANG Xiangyun, ZHAO Xu<sup>△</sup>

Department of Pharmacy, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

**Abstract Objective** To investigate the in vitro antibacterial activity of Qingjin Huatan decoction combined with imipenem on multidrug resistant Klebsiella pneumoniae. **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC) range of the Qingjin Huatan decoction and imipenem in 40 strains of the multidrug resistant Klebsiella pneumoniae when administered alone and in combination was determined by broth dilution method. The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated to determine the antibacterial effect of the combination. **Results** When used alone, the MIC range of Qingjin Huatan decoction was 15.625 to 125 mg/mL, the MIC range of imipenem was 32 to 512  $\mu$ g/mL. In combination, the MIC range of Qingjin Huatan decoction was 7.813 to 62.5 mg/mL, the MIC range of imipenem was 32 to 256  $\mu$ g/mL, all of which were significantly lower than those used alone. The result of combined antibacterial assay showed that FIC index $\leq 0.5$  was 42.5%,  $0.5 < \text{FIC index} \leq 1$  was 32.5%,  $1 < \text{FIC index} \leq 2$  was 17.5%, and FIC index $> 2$  was 7.5%. **Conclusion** In contrast to the medication alone, the combination of Qingjin Huatan decoction and imipenem showed better antibacterial effects on multidrug resistant Klebsiella pneumoniae. The antibacterial effect of Qingjin Huatan decoction combined with imipenem was mostly synergistic and additive.

**Key words** Qingjin Huatan decoction; imipenem; multidrug resistant; Klebsiella pneumoniae

肺炎克雷伯菌为革兰氏染色阴性肠杆菌科细菌,

广泛存在于自然界的水和土壤中,也存在于人、动物上呼吸道和肠道中,是一种重要的条件致病菌,可引起肺部、尿路、血流、中枢及腹腔等部位感染,尤其是肺部感染和尿路感染<sup>[1]</sup>。根据历年中国细菌耐药监测结果显示<sup>[2-4]</sup>,以肺炎克雷伯菌为代表的多重耐药

<sup>\*</sup> 河南省中医管理局 2019 年国家中医临床研究基地科研专项课题 (No. 2019JDZX063)

<sup>△</sup> 通信作者, Corresponding author, E-mail: 13503991966@139.com

菌的检出率呈急速上涨趋势,给临床的抗感染治疗带来了巨大压力。目前临床上普遍认为,碳青霉烯类抗生素是治疗多重耐药肺炎克雷伯菌最有效的药物<sup>[5]</sup>,其中亚胺培南为临床常用治疗肺炎克雷伯菌的碳青霉烯类抗菌药物。但是,近年来随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛应用,该类药物的疗效也逐渐减弱,常常导致临床抗感染治疗的失败和病程的迁延<sup>[6]</sup>。清金化痰汤为清肺化痰之名方,最早记载于明代叶文龄的《医学统旨》,并且收录于 2018 年国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录(第一批)》中。全方有化痰止咳、清肺润燥之功,是治疗痰热壅肺证的代表方剂。现代药理研究<sup>[7-10]</sup>表明,清金化痰汤中的各味中药大都具有抑菌、抗炎、调节免疫的功效。临床研究表明,清金化痰汤可运用于痰热壅肺型肺部疾病的治疗,如社区获得性肺炎<sup>[11]</sup>、呼吸机相关性肺炎<sup>[12]</sup>、重症肺炎<sup>[13]</sup>、脑卒中相关肺炎<sup>[14]</sup>等,均可提高临床总有效率,降低中医症状评分,缩短发热、咳嗽消失时间和胸部 X 线改善时间,从而提高疗效、改善症状,减轻肺部炎症反应。为扩大多重耐药肺炎克雷伯菌的治疗药物选择范围,本研究通过体外抑菌实验,评价了清金化痰汤联合亚胺培南对多重耐药肺炎克雷伯菌的抑菌效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验药物

清金化痰汤由黄芩 12 g、栀子 12 g、桔梗 15 g、麦门冬(去心)9 g、桑白皮 9 g、浙贝母 9 g、知母 9 g、瓜蒌 9 g、橘红 9 g、茯苓 9 g、甘草 3 g 组成,购于河南省中医院药学部。采用煮沸法制备溶液,加 2000 mL 纯化水浸泡 30 min,煎煮 30 min,尼龙网过滤留存药液;药渣再加入 2000 mL 纯化水煎煮 30 min,尼龙网过滤留存药液;将 2 次煎煮后的药液合并、离心后浓缩配制为 1000 mg/mL 的母液;将母液 121 ℃、15 min 高压灭菌后装于玻璃瓶 4 ℃ 保存。每次实验药物现配现用,实验时对药物进行倍比稀释。注射用亚胺培南西司他丁钠(杭州默沙东制药有限公司,进口药品注册证号 H20130347,批号 T024597)。

### 1.2 实验菌株

40 株实验菌株均来自 2019 年 7 月 1 日—2020 年 12 月 31 日河南省中医院临床分离株,排除同一患者重复株,通过微生物鉴定系统鉴定为肺炎克雷伯菌,并选出多重耐药株(药敏试验结果显示对青霉素、头孢唑林、头孢曲松、头孢吡肟、阿米卡星、庆大霉素、氨基糖苷类、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、环丙沙

星、左氧氟沙星、厄他培南、亚胺培南、呋喃妥因、复方磺胺甲噁唑等均耐药),质控菌为大肠埃希菌 ATCC25922。

### 1.3 仪器与试剂

M-H 肉汤培养基(北京奥博星生物技术有限公司)、麦康凯平板(OXOID 公司)、培养基血平板(上海科玛嘉微生物技术有限公司)、电热恒温培养箱(上海精密仪器仪表有限公司,DHP-9162)、全自动微生物鉴定药敏分析仪(BD 公司,Phoenix-100)、比浊仪(南京威美特科学仪器有限公司,HNTD5-TDR-1002)、1000  $\mu$ L 微量加样器(Thermo Scientific,FINNPIPETTE F3)、200  $\mu$ L 微量加样器(Thermo Scientific,FINNPIPETTE F3)、医用离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,L530R)、电子天平(上海上平仪器有限公司,FA2004)、营养肉汤(杭州滨和微生物试剂有限公司)、0.9% NaCl 注射液(四川科伦药业股份有限公司)等。

### 1.4 实验方法

1.4.1 实验菌株液配制 取 40 株鉴定分离纯化的多重耐药肺炎克雷伯菌菌落,分别配制为 0.5 麦氏比浊,再用 M-H 肉汤稀释 10 倍备用。

1.4.2 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)测定 取 96 孔平板,于 1~12 孔中加入 100  $\mu$ L 肉汤,再将 100  $\mu$ L 药液加入第 1 孔内,依次倍比稀释到第 10 孔,取出 100  $\mu$ L 弃去,1~10 孔加 100  $\mu$ L 悬菌液,使清金化痰汤在孔内的最终浓度依次为 250、125、62.5、31.25、15.625、7.813、3.906、1.953、0.977、0.488 mg/mL,亚胺培南在孔内的最终浓度依次为 1024、512、256、128、64、32、16、8、4、2  $\mu$ g/mL,第 11 孔仅加入肉汤作阴性对照,第 12 孔仅加入菌液和肉汤作阳性对照。放置在 37 ℃ 恒温箱培养 24~36 h 后观察结果,无细菌生长且孔内澄清即为 MIC,同时观察半数抑菌浓度(minimum inhibitory concentration reached by 50%, MIC<sub>50</sub>)和 90% 抑菌浓度(minimum inhibitory concentration reached by 90%, MIC<sub>90</sub>)。在读取结果前,先观察生长对照管的细菌生长情况是否良好,并检查接种物的传代培养是否污染。采用肉汤稀释法测定单用及联用清金化痰汤、亚胺培南的 MIC 范围。

1.4.3 联合抑菌试验 根据 40 株试验菌株的 MIC 结果,最高稀释浓度为 2 倍 MIC,分别配制对倍稀释的清金化痰汤 40 组、亚胺培南 8 组。采用棋盘法取不同浓度的清金化痰汤和亚胺培南药液各 0.5 mL,两两组合加入试管,混合后每管药液 1 mL;再将试验菌液

50  $\mu$ L 加入每组的各管药液中,在 35  $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h,读取两药联用最佳组合效应时的分别 MIC 值,再计算 FIC 指数。

1.4.4 结果判读 计算 FIC 指数,FIC 指数 = MIC (甲药联合)/MIC(甲药单用)+MIC(乙药联合)/MIC (乙药单用)。FIC $\leq$ 0.5 判定为协同作用,0.5< FIC $\leq$ 1 判定为相加作用,1<FIC $\leq$ 2 判定为无关作

用,FIC>2 判定为拮抗作用。

2 结果

2.1 MIC 范围、MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub> 比较

清金化痰汤、亚胺培南联合用药时的 MIC 范围、MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub> 均较单独用药时明显降低。见表 1。

表 1 单用及联用的 MIC 范围、MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub> 比较

| 用药情况 | 药物    | MIC 范围            | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> |
|------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 单独用药 | 清金化痰汤 | 15.625~125 mg/mL  | 31.25 mg/mL       | 62.5 mg/mL        |
|      | 亚胺培南  | 32~512 $\mu$ g/mL | 128 $\mu$ g/mL    | 256 $\mu$ g/mL    |
| 联合用药 | 清金化痰汤 | 7.813~62.5 mg/mL  | 15.625 mg/mL      | 31.25 mg/mL       |
|      | 亚胺培南  | 32~256 $\mu$ g/mL | 64 $\mu$ g/mL     | 128 $\mu$ g/mL    |

2.2 FIC 指数分布

联合抑菌实验结果显示,FIC $\leq$ 0.5 为 42.5%,0.5<FIC $\leq$ 1 为 32.5%,1<FIC $\leq$ 2 为 17.5%,FIC>2 为 7.5%。

3 讨论

多重耐药菌所造成的感染已成为整个医学界关注的焦点之一,目前治疗耐药菌感染疾病的药物进入了“新药研发-临床应用-细菌耐药”的恶性循环,对于多重耐药菌,当现有的抗菌药物治疗方案疗效欠佳时,我们可以考虑运用中医药方法来进行治疗,中药治疗就是其中非常行之有效的策略之一<sup>[15]</sup>。

清金化痰汤由黄芩、栀子、桔梗、麦门冬(去心)、桑白皮、浙贝母、知母、瓜蒌、橘红、茯苓、甘草共 11 味中药组成。方中黄芩清热燥湿,善清肺胃之火,尤其善于清泄上焦湿热,为该方君药。栀子、知母、瓜蒌、桑白皮共为方中臣药;栀子,泻火除烦、清热利湿、凉血解毒,能清泄上、中、下三焦火邪;知母,清热泻火、滋阴润燥,长于泻肺热、润肺燥;瓜蒌,清热化痰、宽胸散结、润肠通便,《本草纲目》中记载该药“润肺燥,降火,治咳嗽,涤痰结,利咽喉,止消渴”,善清肺热,润肺燥而清热痰、燥痰;桑白皮,能清泄肺火兼泻肺中水气而行平喘之功。方中佐药为浙贝母、麦冬、橘红、茯苓、桔梗,其中浙贝母清热泻肺、化痰止咳;麦冬养肺阴、清肺热,益胃生津,清心除烦;橘红宽中理气、燥湿化痰;茯苓善渗利水湿,使湿无所聚,痰无由生;桔梗宣肺祛痰,助排壅肺之脓痰。使药为甘草,止咳、祛痰、平喘,还可调和药性。诸药合用,共奏化痰止咳、清肺润燥之效。

现代药理学研究发现,该方中的多个单味中药成分也显示有抗菌作用。例如,黄芩是临床最常用的清热解毒类中药之一,其中所含的黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素是其特有的成分,也是其产生抑菌作用的主要成分,有研究<sup>[16]</sup>结果显示黄芩苷可抑制细菌核酸代谢中的 DNA 拓扑异构酶 I 和 II 的一些关键催化亚基,从而抑制其功能,产生抑菌效应。栀子含有的栀子苷是主要活性成分,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、溶血性链球菌、木霉菌等多种细菌、真菌均有一定的抑制作用<sup>[17]</sup>。桑白皮的提取物具有一定的杀菌防腐作用,一般认为该作用是通过影响细菌的细胞结构或相关的代谢酶而产生,有研究<sup>[18]</sup>发现桑白皮甾醇对大肠杆菌菌体分裂及菌体蛋白代谢有明显的抑制作用,同时桑白皮甾醇对其他菌种也有一定的抑制作用,表现出较强的抑菌活性。浙贝母中含有多种甾体类生物碱化合物、有机酸及其脂类、挥发油、多糖等成分,能有效抑制金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、卡他球菌、铜绿假单胞菌等多种细菌的生长<sup>[19]</sup>。桔梗具有药食两用性,其中含有桔梗多酚、桔梗多糖、桔梗皂苷等多种有效成分,桔梗提取物有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理作用,有研究<sup>[20]</sup>表明桔梗多酚对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌等抑菌作用显著,有良好的抗菌活性。

肺炎克雷伯菌为呼吸道感染常见致病菌,所导致的肺炎可归属中医学“咳嗽”范畴。病位在肺,与肺脾两脏关系密切,其中以痰热阻肺型在临床较为常见;其病因病机多为热邪或风燥之邪犯肺,热伤津液,炼液成痰,痰热互结,加之脾虚生痰,痰热相搏,壅结于内,阻遏肺气,致肺气失于宣降,肺气上逆。症状可见咳嗽或喘促、咳痰,身热,胸闷胸痛,痰多、质黏、色黄,

舌苔黄腻,舌质红,脉滑数。清金化痰汤具有润肺清燥、清热化痰、止咳平喘的功效,多用于痰浊不化、蕴而化热之证<sup>[21]</sup>。中药具有天然、低毒甚至无毒、靶位多、不易产生耐药性、安全性高等优点,但面对耐药菌,中药大多直接抑菌杀菌效果不强。亚胺培南为临床常用治疗肺炎克雷伯菌的抗菌药物,但近年来该药物的耐药率逐年增加,给临床治疗带来极大挑战<sup>[22]</sup>。中药与抗菌药物联用可通过影响细菌生物被膜、调控耐药基因表达或转移、抑制灭活酶活性等机制改善甚至逆转细菌耐药性,从而达到事半功倍的治疗效果<sup>[23]</sup>。本实验结果表明,单用药物时,清金化痰汤的 MIC 范围为 15.625~125 mg/mL,亚胺培南的 MIC 范围为 32~512  $\mu$ g/mL;联用药物时,清金化痰汤的 MIC 范围为 7.813~62.5 mg/mL,亚胺培南的 MIC 范围为 32~256  $\mu$ g/mL,均较单用时明显降低。联合抑菌实验结果显示,清金化痰汤联合亚胺培南以相加和协同作用为主。

综上所述,与单独用药相比,清金化痰汤与亚胺培南联合用药对多重耐药肺炎克雷伯菌可表现出更好的抑菌作用。清金化痰汤联合亚胺培南的抑菌效果大多表现为协同作用和相加作用。

## 参 考 文 献

- [1] 赵娟,刘志远,刘贵建.肺炎克雷伯菌动物感染模型及在中药抗感染应用中的研究进展[J].国际检验医学杂志,2019,40(3):269-272.
- [2] 胡付品,郭燕,朱德妹,等.2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(3):241-251.
- [3] 胡付品,郭燕,朱德妹,等.2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2020,20(1):1-10.
- [4] 胡付品,郭燕,朱德妹,等.2019 年 CHINET 三级医院细菌耐药监测[J].中国感染与化疗杂志,2020,20(3):233-243.
- [5] 王明贵.广泛耐药革兰阴性菌感染的实验诊断、抗菌治疗及医院感染控制:专家共识[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(5):481-491.
- [6] 李子尧,鲁炳怀.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制及其分子检测[J].中国临床新医学,2021,14(3):256-261.
- [7] 任正肖,车萍,李紫薇,等.黄芩化学成分和药理作用的研究进展[J].山东化工,2021,50(3):65-67.
- [8] 卜妍红,陆婷,吴虹,等.栀子化学成分及药理作用研究进展[J].安徽中医药大学学报,2020,39(6):89-93.
- [9] 侯宝林,施洋,赵俊芳,等.桑白皮化学成分及药理作用研究进展[J].辽宁中医杂志,2020,47(8):212-214.
- [10] 邓亚玲,任洪民,叶先文,等.桔梗的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J].中国实验方剂学,2020,26(2):190-202.
- [11] 韩利峰.清金化痰汤联合西药治疗社区获得性肺炎临床研究[J].新中医,2019,51(10):60-63.
- [12] 张菊华.清金化痰汤治疗 60 例呼吸机相关性肺炎临床效果分析[J].深圳中西医结合杂志,2016,26(24):43-45.
- [13] 谢娟.序贯清金化痰汤联合抗生素治疗重症肺炎临床研究[J].深圳中西医结合杂志,2017,27(24):38-40.
- [14] 蒲新宇,辜娜.清金化痰汤加减治疗脑卒中相关性肺炎临床研究[J].新中医,2020,52(20):42-45.
- [15] 刘艳霞,杜宝中.中草药抗菌活性研究进展[J].中国医药,2021,16(4):622-625.
- [16] 殷姿,欧宜文,李蓓,等.黄芩对肺炎克雷伯菌抑制作用及其机制研究[J].中国病原生物学杂志,2016,26(16):388-392.
- [17] 郑玲,张文生.栀子现代药理学作用研究进展[J].环球中医药,2020,13(10):1813-1817.
- [18] 蔡森森.桑白皮甾醇的提取及功能研究[D].长春:吉林大学,2013.
- [19] 赵婉,姜海,王知斌,等.贝母属植物的药理作用概述[J].上海中医药杂志,2018,52(11):97-100.
- [20] 陈丹丹,洪挺,王栋,等.桔梗的化学成分及其药理作用研究概况[J].药品评价,2020,17(15):9-11.
- [21] 关锦贞,张勇,陈瑶.清金化痰汤治疗脑卒中相关肺炎痰热壅肺证的临床效果[J].中国当代医药,2020,27(6):163-166.
- [22] 李东明,王宇凡,伍玉晶,等.耐碳青霉烯革兰阴性杆菌耐药性及基因分布[J].中华医院感染学杂志,2021,11(5):816-820.
- [23] 贾丽阳,邓冬,孙丽华,等.中药治疗耐药菌感染作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(16):228-234.

(收稿日期:2021-10-06)