

## 短篇论著

文章编号:1000-5404(2012)11-1126-02

### 苦豆子生物碱对幽门螺杆菌耐药株的体外抑菌研究

高承霞<sup>1</sup>, 严祥<sup>1</sup>, 韩俭<sup>2</sup>, 魏莲花<sup>3</sup>, 王琮<sup>1</sup> (730000 兰州, 兰州大学: 第一医院老年病科<sup>1</sup>, 病原生物学研究所<sup>2</sup>; 730000 兰州, 甘肃省人民医院临床检验中心<sup>3</sup>)

**[摘要]** **目的** 探讨中药苦豆子总碱、苦参碱、苦参素、槐定碱对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)临床耐药株的体外抑菌作用。**方法** 收集上消化道疾病患者胃黏膜标本, 分离、鉴定出42株Hp临床菌株, 采用E-test方法检测其对甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林的耐药状况, 共筛选出27株临床耐药株; 采用液体倍比稀释法测定4种苦豆子生物碱对27株临床耐药株的体外抑菌效果。**结果** 42株临床分离的Hp菌株对甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林的耐药率分别为64.3%、14.3%和0。苦豆子总碱、苦参碱、苦参素及槐定碱的MIC<sub>50</sub>分别为16、64、64、128 mg/ml。**结论** Hp菌株对甲硝唑耐药率高, 故甲硝唑不应作为根除Hp感染的一线药物。苦豆子总碱在体外抗Hp效果较好, 有可能成为治疗Hp感染的一种可选药物。

**[关键词]** 幽门螺杆菌; 耐药; 苦豆子总碱; 苦参碱; 苦参素; 槐定碱; 抑菌效果

**[中图分类号]** R282.71; R285.5; R377

**[文献标志码]** A

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是微需氧的革兰阴性杆菌, 其感染严重影响胃内菌群的变化<sup>[1]</sup>, 与功能性消化不良密切相关<sup>[2]</sup>, 是慢性胃炎、消化性溃疡及胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤等疾病的致病因素之一<sup>[3]</sup>。流行病学调查<sup>[4]</sup>表明我国的总感染率已达56.22%。临床治疗Hp感染的一线方案仍以质子泵抑制剂加2种抗生素的三联疗法为首选<sup>[5]</sup>。然而, 近年来由于抗生素的广泛应用以及治疗的不规律性, 造成Hp耐药严重, 并且有逐年上升趋势<sup>[6-7]</sup>。因此, 探索能够替代或者辅助抗生素治疗Hp感染的药物具有重要的意义。

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)系豆科槐属野生草本植物, 《本草纲目》记载其具有抗菌消炎、利尿去火、止痛镇静等功效。民间用于治疗喉痛、咳嗽、痢疾等疾病; 临床上常用来治疗急性菌痢, 各种妇科疾病等。苦豆子的药理活性广泛, 众多研究发现生物碱是苦豆子中主要的一类活性成分, 对革兰阳性菌和阴性菌都具有一定的抑菌作用<sup>[8-9]</sup>。目前, 国内外学者已从苦豆子中提取出20余种单体生物碱。此次实验选取其中4种生物碱, 研究其对Hp临床耐药株的体外抑菌活性, 探索其治疗Hp感染的可行性。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 材料

菌株: 42株Hp临床株来自兰州大学第一医院胃镜室。其中男性23例, 女性19例, 年龄21~76(46.2±13.0)岁。消化性溃疡23例, 胃炎19例。质控菌株: Hp NCTC11637(中国疾病

预防控制中心传染病预防控制所)。试剂: 苦豆子总碱、苦参碱、苦参素、槐定碱(宁夏紫金花药业公司); 哥伦比亚琼脂、脑心浸液(美国BD公司); 无菌脱纤维羊血(兰州大学实验动物中心); 无支原体新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 葡萄糖(四川科伦药业股份有限公司); E-test纸条(AB Biodisk公司); 微需氧产气袋(日本三菱瓦斯化学株式会社)。仪器: Hp厌氧培养罐(HP050, 广州海太光电生物科技有限公司); 电热恒温培养箱(DHP-9162, 上海益恒实验仪器有限公司); 洁净工作台(SW-CJ-2F, 苏州净化设备有限公司); 生物安全柜(BMC-1300 II, 苏州净化设备有限公司)。

##### 1.2 方法

**1.2.1 培养基制备** 固体培养基采用哥伦比亚琼脂加1%选择性抗生素(万古霉素250 g/L, 两性霉素B 200 g/L, 多粘菌素220 g/L, TMP 300 g/L), 5%葡萄糖、7%脱纤维羊血制成; 液体培养基由脑心浸液琼脂加1%选择性抗生素、5%葡萄糖、10%灭活小牛血清制成。

**1.2.2 Hp的分离培养、鉴定及保存** 于患者胃窦部用灭菌活检钳取黏膜组织1块(快速尿素酶试验>++以上)置转运培养基, 送实验室接种于固体培养基, 微需氧条件(5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>和85% N<sub>2</sub>), 湿度大于95%, 温度为37℃下培养3~5 d。肉眼及镜下观察菌落形态, 尿素酶、氧化酶及触酶试验阳性可鉴定Hp。将纯培养的Hp转种于液体培养基, 微需氧环境下, 转速为120 r/min, 振荡培养48 h, 调整细菌浓度为3×10<sup>8</sup> cfu/ml, 备用。

**1.2.3 药敏试验** 收取纯培养48~72 h的新鲜Hp充分研磨于灭菌生理盐水中, 调整浓度为2×10<sup>8</sup> cfu/ml, 无菌棉签蘸取菌液, 均匀涂布整个琼脂表面, 静置, 稍干后, 取含抗生素的E-test试条平放琼脂表面(1条/90 mm平皿), 37℃, 微需氧环境中培养72 h后观察结果, 椭圆型抑菌环与试纸条交界处的刻度即为最小抑菌浓度。结果判定参照文献<sup>[10-11]</sup>, 以甲硝唑≥8 mg/L, 克拉霉素≥1 mg/L, 阿莫西林≥0.5 mg/L判定为耐药, 同时筛选出27株Hp临床耐药株。

**[基金项目]** 甘肃省重点中医药科研项目(GZK-2009-4)

**[通信作者]** 严祥, 电话: (0931) 8625200-6573, E-mail: yanyang528@sohu.com

**1.2.4 MIC** 采用液体倍比稀释法测定4种生物碱对27株临床耐药株的体外抑菌活性。待测药物用脑心浸液培养基溶解,1%盐酸调整pH值为7~8左右,使药物终浓度均为512 mg/ml。分别取无菌试管10支,每管中加入液体培养基1 ml。第1支管分别加入上述制备药液1 ml,摇匀后,倍比稀释至第8支管,药物浓度依次为256、128、64、32、16、8、4、2 mg/ml。各管中加入100  $\mu$ l液体培养的Hp菌悬液,第9支管不加药液加菌液,为阴性对照,第10支管不加菌液不加药液,为阳性对照。微需氧环境,120 r/min,振荡培养48 h。肉眼观察试管浑浊度,取样染色和生化鉴定,同时取100  $\mu$ l至固体培养基继续培养72 h后观察菌落生长情况,无细菌生长者判定为有抑菌作用,以能够抑制Hp生长的最小药物浓度即为该药的MIC值。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,行 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 药敏试验结果

Hp对甲硝唑耐药率高,对克拉霉素耐药率较高,对阿莫西林敏感。不同性别,年龄及疾病类型分离的Hp对甲硝唑、克拉霉素的耐药率差异无显著性( $P>0.05$ )。见表1。

表1 E-test法检测Hp对3种抗生素的耐药情况( $n=42$ )

抗生素	耐药株	敏感株	耐药率
甲硝唑	27	15	64.3%
克拉霉素	6	36	14.3%
阿莫西林	0	42	0

### 2.2 待测药物的最小抑菌浓度(MIC)结果

4种苦豆子生物碱对临床耐药株的体外抑菌作用以苦豆子总碱最为显著,具有较强的抗Hp的作用;苦参碱与苦参素也有一定的抗Hp作用;槐定碱的抑菌效果相对较弱(表2)。

表2 4种苦豆子生物碱对27株Hp耐药株的体外抑菌结果

药物	MIC值(mg/ml)		
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	范围
苦豆子总碱	16	32	16~32
苦参碱	64	64	32~64
苦参素	64	64	32~64
槐定碱	128	256	64~256

## 3 讨论

对抗生素(特别是甲硝唑)耐药是Hp根除失败的主要原因,也是临床疗效越来越低的主要原因,寻求更为安全有效的抗Hp感染的新方案非常迫切。中药具有副作用小、安全性高、不易产生耐药性等优点,若将其开发用于治疗Hp感染将具有广阔的前景。

中药苦豆子具有清热解毒、祛风燥湿、止痛杀菌等作用<sup>[12]</sup>。以苦豆子生物碱为主要有效成分的克泻灵片、苦生素注射液、苦生素胶囊等已经广泛用于临床治疗。然而,用于Hp感染的治疗却鲜有报道。我们前期研究<sup>[13]</sup>发现苦豆子生物碱对Hp标准菌株具有较

好的体外抑菌效果,本实验探索其对Hp临床耐药株的体外抑菌活性,结果表明:苦豆子总碱对Hp耐药株的MIC值最小,为16 mg/ml,体外作用优于其他3种单体生物碱,抗菌效果最为明显。因其也是苦豆子提取物中的主要有效成分,若将其研发为适当的中药单剂或复方制剂,将有望成为一种安全、有效、经济的新型抗Hp药物。

值得注意的是Hp适宜生长在特殊的高胃酸环境中,体外实验只是模拟其较适宜的pH环境,而在该pH条件下苦豆子总碱能够更好地发挥其抑菌作用<sup>[9]</sup>。然而,这些实验仍处于基础性研究阶段,要使苦豆子生物碱应用于临床治疗Hp感染,还有待进行药效学、药理学、药代动力学以及毒理学等方面更深入的研究和大量的临床试验。

### 参考文献:

- [1] 蒲瑞雪,郭红,廖亚玲,等.幽门螺杆菌感染对胃内正常菌群结构的影响[J].第三军医大学学报,2010,32(5):450-453.
- [2] 李宜辉,张朋彬,郭红,等.根除幽门螺杆菌对功能性消化不良的作用[J].第三军医大学学报,2004,26(11):1013-1015.
- [3] Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection; the Maastricht 2-2000 Consensus Report[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2002, 16(2): 167-180.
- [4] 张万岱,胡伏莲,萧树东,等.中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J].现代消化及介入诊疗,2011,15(5):265-270.
- [5] 中华医学会消化病学分会,幽门螺杆菌学组/幽门螺杆菌科研协作组.第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告(2007·庐山)[J].现代消化及介入诊疗,2008,13(1):73-76.
- [6] Gao W, Cheng H, Hu F, et al. The evolution of *Helicobacter pylori* antibiotics resistance over 10 years in Beijing, China[J]. Helicobacter, 2010, 15(5): 460-466.
- [7] Sun Q J, Liang X, Zheng Q, et al. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics from 2000 to 2009 in Shanghai[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(40): 5118-5121.
- [8] 张为民,张彦明,张涛,等.苦豆子生物碱抑菌抗炎作用研究[J].动物医学进展,2005,26(10):82-85.
- [9] 刘军锋,丁泽,欧阳艳,等.苦豆子生物碱抗菌活性的测定[J].北京化工大学学报:自然科学版,2011,38(2):84-88.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement[J]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009, 29(3): M100-S19.
- [11] Talebi-Bezmin-Abadi A, Mobarez A M, Taghvaei T, et al. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Mazandaran, North of Iran[J]. Helicobacter, 2010, 15(6): 505-509.
- [12] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,1997:1293.
- [13] 段玲,严祥,韩俭.苦豆子总碱及4种单体生物碱对幽门螺杆菌的体外抑菌作用研究[J].时珍国医国药,2010,21(9):2217-2218.

(收稿:2011-10-26;修回:2011-11-25)

(编辑 王 红)